

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035455

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.06.18

(21) Номер заявки

201692529

(22) Дата подачи заявки

2015.06.04

(51) Int. Cl. C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 21/06 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАССТРОЙСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОЛЛИСТАТИНОВЫХ ПОЛИПЕТИДОВ

(31) 62/007,908

(32) 2014.06.04

(33) US

(43) 2017.05.31

(86) PCT/US2015/034245

(87) WO 2015/187977 2015.12.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

АКСЕЛЕРОН ФАРМА, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Кумар Равиндра, Гринберг Ася (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) Datta-Mannan A. et al. "An Engineered Human Follistatin Variant: Insights into the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Relationships of a Novel Molecule with Broad Therapeutic Potential" The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (2013) 344(3): 616-623 See page 617, left-hand column, last paragraph; abstract; Figure 3; page 620, right hand column; page 620, left-hand column; Figure 4; page 617, right-hand column

Yaden B.C. et al. "Follistatin: A Novel Therapeutic for the Improvement of Muscle Regeneration" The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (2014) 349 (2): 355-371 See page 359, left-hand column, first paragraph; Figure 2; page 360, left-hand column, first paragraph

WO-A2-2005033134

WO-A2-2013151665

WO-A2-2009158035

WO-A2-2009158025

WO-A2-2007067616

WO-A1-2014116981

WO-A1-2014187807

US-A1-20150158923

(57) Изобретение относится, в частности, к фоллистатиновым полипептидам, которые могут быть использованы для местного введения, и к способам их применения.

B1

035455

035455 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки с регистрационным № 62/007908, поданной 4 июня 2014 г. Содержание вышеуказанной заявки во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники

Суперсемейство трансформирующего фактора роста-бета (TGF-бета) включает ряд факторов роста, которые имеют общие элементы последовательностей и структурных мотивов. Известно, что эти белки оказывают биологическое действие на большое число клеток различных типов у позвоночных и беспозвоночных. Члены такого суперсемейства обладают важными функциями, влияющими на развитие эмбриона и ответственными за образование структуры ткани и за тканеспецифичность, и могут оказывать влияние на ряд процессов дифференцировки, включая адипогенез, миогенез, хондрогенез, кардиогенез, гематопоэз, нейрогенез и дифференцировку эпителиальных клеток. Это семейство подразделяется на две основных ветви: BMP/GDF и TGF-бета/активин/BMP10, члены которых обладают различными и часто взаимодополняющими функциями. При изменении активности члена семейства TGF-бета в организме часто могут происходить значительные физиологические изменения. Так, например, у крупного рогатого скота породы Пьемонт и Бельгийская голубая присутствует мутация гена GDF8 (также называемого миостатином), ответственная за потерю функции, где указанная мутация приводит к значительному увеличению мышечной массы (Grobet et al., Nat. Genet. 1997, 17(1):71-4). Кроме того, у человека неактивные аллели GDF8 ассоциируются с увеличением мышечной массы и, как сообщалось, с исключительной мышечной силой (Schuelke et al., N. Engl. J. Med. 2004, 350:2682-8).

Изменения в мышцах, костях, хрящах и других тканях могут быть достигнуты путем передачи агонистического или антагонистического сигнала, опосредуемого соответствующим членом семейства TGF-бета. Однако, поскольку члены этого семейства могут влиять более чем на одну ткань, то желательно, чтобы лечение некоторых пациентов было направлено на терапевтическое ингибиование членов этого семейства в отдельных органах, но не во всем организме. Таким образом, необходимо получить средства, которые функционировали бы как сильные регуляторы передачи сигнала TGF-бета и могли бы быть применены для местного введения.

Описание сущности изобретения

В частности, настоящее изобретение относится к фоллистатиновым полипептидам, которые были сконструированы так, чтобы они ингибировали лиганда фоллистатина (например, активин A, активин B, GDF8 и GDF11), находящиеся в непосредственной близости от ткани, в которую вводят такие фоллистатиновые полипептиды, где указанные полипептиды оказывают незначительное системное воздействие на пациента либо вообще не оказывают такого воздействия.

Описанные здесь фоллистатиновые полипептиды включают полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из SEQ ID NOS: 1-4, 7-16 и 26-43. Фоллистатиновый полипептид может быть, но необязательно, сконструирован так, чтобы он димеризовался или образовывал мультимеры высшего порядка. Это может быть достигнуто путем присоединения фоллистатиновой последовательности фоллистатинового полипептида к домену, сообщающему димеризацию или мультимеризацию. Примером такого домена является константный домен иммуноглобулина, включающий, например, Fc-часть иммуноглобулина. Фоллистатиновая часть может быть непосредственно присоединена, но необязательно, к гетерологичной части, либо может быть использована промежуточная последовательность, такая как линкер. Примером линкера является последовательность TGGG. Фоллистатиновый полипептид может, но необязательно, обладать такой же гепаринсвязывающей активностью, как и человеческий фоллистатин-288. Альтернативно, фоллистатин может иметь маскированный гепаринсвязывающий домен, подобный домену, присутствующему в человеческом фоллистатине-315. В частности, настоящее изобретение относится к терапевтически оптимизированным фоллистатиновым полипептидам, содержащим часть константного домена иммуноглобулина человеческого IgG, который обладает более низкой ADCC- или CDC-активностью по сравнению с нативным человеческим IgG1. Примерами являются IgG2, IgG3, IgG4, гибрид IgG2/4 и варианты IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В частности, настоящее изобретение относится к оптимально активной форме фоллистатина, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15 или 16, или состоит, или, по существу, состоит из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:15 или 16, которые сообщают белку более высокое качество и активность по сравнению с нативными формами FST(288) и FST(315), где такими оптимально активными формами являются димерные гибридные белки, такие как белки "фоллистатин-Fc".

В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему первую аминокислотную последовательность и вторую аминокислотную последовательность, где первая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 16, а вторая аминокислотная последовательность содержит константный домен иммуноглобулина. Между первой аминокислотной последовательностью и второй аминокислотной последовательностью может присутствовать, но необязательно, линкерный полипептид. Линкерный полипептид содержит, но необязательно, последовательность TGGG или состоит, или, по

существу, состоит из этой последовательности. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, константный домен иммуноглобулина IgG или состоит, или, по существу, состоит из этого домена. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, константный домен иммуноглобулина IgG или состоит, или, по существу, состоит из константного домена иммуноглобулина IgG, который обладает пониженной ADCC-активностью по сравнению с человеческим IgG1. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, константный домен иммуноглобулина IgG или состоит, или, по существу, состоит из этого домена. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, константный домен иммуноглобулина IgG или состоит, или, по существу, состоит из константного домена иммуноглобулина IgG, который обладает пониженной CDC-активностью по сравнению с человеческим IgG1. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, константный домен иммуноглобулина IgG или состоит, или, по существу, состоит из константного домена иммуноглобулина IgG, выбранного из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, Fc-часть иммуноглобулина или состоит из Fc-части иммуноглобулина, такого как иммуноглобулин IgG, который может представлять собой иммуноглобулин, обладающий пониженной ADCC-активностью, CDC-активностью или той и другой активностью по сравнению с человеческим IgG1, и примерами таких IgG являются IgG2, IgG4 и гибрид IgG2/4 или любые IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 с различными мутациями. В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к фоллистатиновым полипептидам, которые содержат аминокислотную последовательность или состоят, или, по существу, состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы SEQ ID NO: 38-43. В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к фоллистатиновым полипептидам, которые содержат аминокислотную последовательность или состоят, или, по существу, состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы SEQ ID NO: 26-28 и 32-34. В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к фоллистатиновым полипептидам, которые содержат аминокислотную последовательность или состоят, или, по существу, состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы SEQ ID NO: 29-31 и 35-37. Нужные фоллистатиновые полипептиды могут связываться с одним или более лигандами, выбранными из группы, состоящей из миостатина, GDF-11, активина А и активина В с KD менее чем 1 нМ, 100, 50 или 10 пМ. В некоторых аспектах изобретения любые из вышеупомянутых полипептидов могут представлять собой димеры, включая гетеродимеры или гомодимеры, или мультимеры высшего порядка. Любой из вышеупомянутых полипептидов может быть включен в фармацевтический препарат.

В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующими любые описанные здесь фоллистатиновые полипептиды, и к клеткам, содержащим такие нуклеиновые кислоты, где указанные клетки могут быть использованы для продуцирования фоллистатиновых полипептидов.

В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения тканей или органов путем непосредственного введения в такую ткань фоллистатинового полипептида. Так, например, настоящее изобретение относится к способу увеличения размера мышц или мышечной силы у пациента, где указанный способ включает введение эффективного количества фоллистатинового полипептида путем внутримышечной инъекции такого полипептида в мышцы пациента, нуждающегося в этом, в результате чего происходит увеличение размера нужной мышцы или ее силы, где фоллистатиновый полипептид не оказывает какого-либо значительного воздействия на размер мышц или мышечную силу всего организма. Нужная мышца может быть повреждена, ослаблена или атрофирована, как это может происходить при различных мышечных расстройствах, включая мышечные дистрофии (такие как мышечная дистрофия Дюшенна, мышечная дистрофия Беккера и плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия), воспалительные мышечные расстройства (такие как миозит, вызываемый тельцами включения), повреждения или травмы мышц, бездействие мышц (как это может происходить после длительного постельного режима или обездвиживания конечностей) и атрофию или слабость мышц в результате старения, раковых или хронических заболеваний различных типов. Эти способы могут быть также применены к здоровым мышцам, размер или силу которых желательно увеличить. Кроме того, введение фоллистатинового полипептида в мышцу может приводить к общему снижению жира в организме, а поэтому такой полипептид может быть использован для лечения ожирения или других расстройств, ассоциированных с избыtkом жира в организме, где такой фоллистатин может быть непосредственно введен, но необязательно, в жировую ткань. Фоллистатиновый полипептид может быть введен только в одну нужную мышцу или в более чем одну нужную мышцу. Эти способы и фоллистатиновые полипептиды могут быть применены для достижения желательного воздействия на нужную ткань, например мышцы, но без какого-либо значительного влияния на другие ткани, такие как мышцы или другие органы, не являющиеся мишениями. В результате этого системные эффекты фоллистатина могут не наблюдаться. Так, например, размер или сила мышцы, которая является контрлатеральной по отношению к мышце-мишени, могут, в основном, не увеличиваться, либо у пациента может не наблюдаться какого-либо значительного изменения

параметров, выбранных из группы, состоящей из уровней фолликулостимулирующих гормонов (FSH) в сыворотке, размера печени, гематокрита, уровней гемоглобина и ретикулоцитов.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена полная непроцессированная аминокислотная последовательность человеческого фоллистатина 315 (SEQ ID NO: 3). Лидерная последовательность показана курсивом и жирным шрифтом, N-концевая область фоллистатина (FSN) подчеркнута одной чертой, а три домена фоллистатина (FSD) подчеркнуты двойной чертой. В частности, фоллистатиновый домен I (FSDI) показан красным шрифтом, фоллистатиновый домен II (FSDII) показан синим шрифтом, а фоллистатиновый домен III (FSDIII) показан зеленым шрифтом.

На фиг. 2 проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей путем подкожной инъекции FST(288)-Fc, FST(315)-Fc или ActRIIB-Fc на массу истощенной ткани у мышей. В качестве носителя использовали забуференный три som физиологический раствор. Данные представлены как среднее±ср. кв. откл. *, величина $P<0,05$ была вычислена по сравнению с TBS-группами с помощью непарного t-критерия; #, величина $P<0,05$ была вычислена по сравнению с FST-группами с помощью непарного t-критерия. Обработка белками FST(288)-Fc, FST(315)-Fc и ActRIIB-Fc приводила к значительному увеличению массы истощенной ткани по сравнению с контрольными мышами, обработанными носителем. Увеличение массы истощенной ткани у ActRIIB-Fc-обработанных мышей было значительно больше, чем увеличение массы истощенной ткани у мышей, обработанных белком FST(288)-Fc или FST(315)-Fc.

На фиг. 3 проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей, проводимой 2 раза в неделю путем подкожной инъекции FST (288)-Fc, FST(315)-Fc или ActRIIB-Fc, на силу лап у мышей. В качестве носителя использовали забуференный три som физиологический раствор. Данные представлены как среднее±ср. кв. откл. *, величина $P<0,05$ была вычислена по сравнению с TBS-группами с помощью непарного t-критерия; #, величина $P<0,05$ была вычислена по сравнению с FST-группами с помощью непарного t-критерия. ActRIIB-Fc-обработка приводила к увеличению силы лап у мышей. У мышей, обработанных белком FST(288)-Fc или FST(315)-Fc, какого-либо увеличения силы лап не наблюдалось.

На фиг. 4 проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей, проводимой два раза в неделю путем подкожной инъекции FST (288)-IgG1, FST(315)-IgG1 или ActRIIB-Fc, на массу мышц грудной клетки (Pecs), передней большеберцовой кости (TA), икроножной мышцы (Gastroc) и мышцы бедра у мышей. В качестве носителя использовали забуференный три som физиологический раствор. Данные представлены как среднее±ср. кв. откл. *, величина $P<0,05$ была вычислена по сравнению с TBS-группами с помощью непарного t-критерия; #, величина $P<0,05$ была вычислена по сравнению с FST-группами с помощью непарного t-критерия. ActRIIB-Fc-обработка приводила к значительному увеличению массы мышц грудной клетки, передней большеберцовой кости, икроножной мышцы и мышцы бедра у мышей, но приводила лишь к незначительному увеличению или вообще не приводила к увеличению мышечной массы у мышей, обработанных белком FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1.

На фиг. 5 проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей, проводимой путем подкожной инъекции FST(288)-IgG1 или FST (315)-IgG1, на уровни фолликулостимулирующего гормона (FSH) в сыворотке. В качестве носителя использовали забуференный три som физиологический раствор. Данные представлены как среднее±ср. кв. откл. *, величина $P<0,05$ была вычислена по сравнению с TBS-группой с помощью непарного t-критерия. FST(315)-IgG1-обработка приводила к значительному снижению уровня FSH в сыворотке по сравнению с уровнями, наблюдаемыми у контрольных мышей, обработанных носителем. В противоположность этому FST(288)- IgG1-обработка не оказывала какого-либо влияния на уровень FSH в сыворотке.

На фиг. 6 проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей два раза в неделю белками FST(288)-Fc, FST(315)-Fc или ActRIIB-Fc на массу истощенной ткани у мышей. В качестве носителя использовали забуференный три som физиологический раствор. Данные представлены как среднее±ср. кв. откл. *, величина $P<0,05$ была вычислена по сравнению с TBS-группой с помощью непарного t-критерия. Обработка белком ActRIIB-Fc приводила к значительному увеличению массы истощенной ткани по сравнению с контрольными мышами, обработанными носителем. Увеличения массы истощенной ткани у мышей, обработанных FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1, не наблюдалось.

На фиг. 7 проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей, проводимой два раза в неделю путем внутримышечной инъекции белками FST(288)-IgG1, FST(315)-IgG1 или ActRIIB-Fc в правую икроножную мышцу, на массу икроножной мышцы у мышей. В качестве носителя использовали забуференный три som физиологический раствор. Данные представлены как среднее±ср. кв. откл. *, величина $P<0,05$ была вычислена по сравнению с TBS-группой с помощью непарного t-критерия. #, величина $P<0,05$ была вычислена для правой икроножной мышцы, в которую вводили инъекцию, по сравнению с левой икроножной мышцей, в которую не вводили инъекцию, с помощью непарного t-критерия. Обработка белками FST(288)-IgG1, FST(315)-IgG1 и ActRIIB-mFc приводила к значительному увеличению массы правой икроножной мышцы, в которую вводили инъекцию. ActRIIB-mFc-обработка также приводила к значительному увеличению массы левой икроножной мышцы, в которую не вводили инъекцию. В противоположность этому у мышей, обработанных белком FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1, какого-

либо увеличения массы левой икроножной мышцы, в которую не вводили инъекцию, не наблюдалось.

На фиг. 8 проиллюстрировано влияние 3-недельной обработки мышей, проводимой два раза в неделю путем внутримышечной инъекции различных доз FST(288)-IgG1 в правую икроножную мышцу, на массу икроножной мышцы у мышей, и результаты выражали как отношение к величинам, полученным для левой икроножной мышцы, в которую не вводили инъекцию. В качестве носителя использовали забуференный трисом физиологический раствор. Данные представлены как среднее±ср. кв. откл. *, величина $P<0,05$ была вычислена по сравнению с PBS-группой с помощью непарного t-критерия. Увеличение доз FST(288)-IgG1 приводило к повышению гипертрофии икроножной мышцы, в которую вводили инъекцию, по сравнению с мышцей, в которую не вводили инъекцию.

На фиг. 9 проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей, проводимой два раза в неделю путем внутримышечной инъекции различных доз FST(291)-IgG1 в левую икроножную мышцу. В качестве носителя использовали забуференный трисом физиологический раствор. Данные представлены как среднее±ср. кв. откл. *, величина $P<0,05$ была вычислена по сравнению с PBS-группой с помощью непарного t-критерия. Внутримышечное введение FST (291)-IgG2 приводило к значительному увеличению массы икроножной мышцы, в которую вводили инъекцию, по сравнению с массой мышцы, в которую не вводили инъекцию, и по сравнению с контролем.

Подробное описание изобретения

1. Общий обзор.

В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к фоллистатиновым полипептидам. Используемый здесь термин "фоллистатин" означает семейство фоллистатиновых (FST) белков и родственных фоллистатину белков, происходящих от организмов любого вида. Фоллистатин представляет собой аутокринный гликопротеин, которые экспрессируются почти во всех тканях высших животных. Впервые он был выделен из фолликулярной жидкости и идентифицирован как белковая фракция, которая ингибит секрецию фолликулостимулирующего гормона (FSH) из передней доли гипофиза, а поэтому он был назван FSH-ингибиторным белком (FSP). Впоследствии было определено, что основная его функция заключается в связывании и нейтрализации членов суперсемейства TGF- β , включающего, например, активин, то есть паракринный гормон, усиливающий секрецию FSH в передней доле гипофиза.

Используемый здесь термин "фоллистатиновый полипептид" означает полипептиды, включая любой природный полипептид, принадлежащий к семейству фоллистатинов, а также любые его варианты (включая мутанты, фрагменты, гибриды и пептидомиметики), которые сохраняют нужную активность, включая, например, активность связывания с лигандом (например, миостатином, GDF-11, активином A, активином B) или с гепарином. Так, например, фоллистатиновые полипептиды включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, происходящую от последовательности любого известного фоллистатина, имеющего последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, а предпочтительно по меньшей мере на 85, 90, 95, 97, 99% или более идентична последовательности фоллистатинового полипептида. Термин "фоллистатиновый полипептид" может означать гибридные белки, содержащие любые вышеупомянутые полипептиды вместе с гетерологичной (не-фоллистатиновой) частью. Считается, что аминокислотная последовательность гетерологична фоллистатину, если только она не является более длинной формой (315 аминокислот) человеческого фоллистатина, представленного SEQ ID NO:3. В настоящей заявке представлено много примеров гетерологичных частей, и такие гетерологичные части могут быть непосредственно присоединены посредством аминокислотной последовательности к фоллистатиновой полипептидной части гибридного белка или разделены промежуточной аминокислотной последовательностью, такой как линкер или другая последовательность.

Фоллистатин представляет собой одноцепочечный полипептид с молекулярной массой в пределах от 31 до 49 кДа, образующийся в результате альтернативного сплайсинга мРНК и вариабельного гликозилирования белка. Альтернативно сплайсированные мРНК кодируют два белка, состоящих из 315 аминокислот (то есть FST315) и 288 аминокислот (то есть FST288); а фоллистатин 315 может также подвергаться протеолитическому расщеплению с образованием фоллистатина 303 (FST303). Анализ аминокислотной последовательности показал, что нативный человеческий фоллистатиновый полипептид содержит пять доменов (начиная с N-конца), а именно пептидную сигнальную последовательность (аминокислоты 1-29 SEQ ID NO: 1), N-концевой домен (FSN) (аминокислоты 30-94 SEQ ID NO: 1), фоллистатиновый домен I (FSDI) (аминокислоты 95-164 SEQ ID NO: 1), фоллистатиновый домен II (FSDII) (аминокислоты 168-239 SEQ ID NO: 1) и фоллистатиновый домен III (FSDIII) (аминокислоты 245-316 SEQ ID NO: 1) (см. PNAS, U.S.A., 1988, Vol. 85, No 12, pp 4218-4222).

Предшественник человеческого фоллистатина-288 (FST288) имеет нижеследующую аминокислотную последовательность, где сигнальный пептид показан жирным шрифтом, N-концевой домен (FSN) подчеркнут одной чертой, а фоллистиновые домены I-III (FSI, FSII, FSIII) подчеркнуты двойной чертой

MVRARHOPGGCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLROAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKKCRMNNKPRVCAPDCS
NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEOPELEVOYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIOCT
GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGS
CN (SEQ ID NO:1).

Процессированный (зрелый) вариант человеческого фоллистатина FST(288) имеет нижеследующую аминокислотную последовательность, где N-концевой домен подчеркнут одной чертой, а фоллистатиновые домены I-III подчеркнуты двойной чертой. Кроме того, следует отметить, что любые начальные аминокислоты G или N, находящиеся перед первым цистеином, могут быть удалены путем процессинга или искусственно элиминированы без каких-либо последствий, а также могут быть включены полипептиды, содержащие такие менее крупные полипептиды

GNCWLROAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IIPCKETCENVDCPGKKCRMNNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
OPELEVOYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIOCT
GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGS
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCN (SEQ ID NO:2).

Предшественник человеческого фоллистатина-315 (FST315) имеет нижеследующую аминокислотную последовательность, где сигнальный пептид показан жирным шрифтом, N-концевой домен (FSN) подчеркнут одной чертой, а фоллистатиновые домены I-III (FSI, FSII, FSIII) подчеркнуты двойной чертой (NCBI, регистрационный номер AAH04107.1; 344 аминокислоты)

MVRARHOPGGCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLROAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKKCRMNNKPRVCAPDCS
NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
OPELEVOYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIOCT
GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGS
CNSISEDTEEEEEEDEDQDYSFPISSILEW (SEQ ID NO:3).

Процессированный (зрелый) человеческий FST(315) имеет нижеследующую аминокислотную последовательность, где N-концевой домен подчеркнут одной чертой, а фоллистатиновые домены I-III подчеркнуты двойной чертой. Кроме того, следует отметить, что любые начальные аминокислоты G или N, находящиеся перед первым цистеином, могут быть удалены путем процессинга или искусственно элиминированы без каких-либо последствий, а также могут быть включены полипептиды, содержащие такие менее крупные полипептиды

GNCWLROAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IIPCKETCENVDCPGKKCRMNNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
OPELEVOYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIOCT
GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGS
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNISEDTEEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
 (SEQ ID NO:4).

Фоллистатиновые полипептиды согласно изобретению могут включать любой природный домен фоллистатинового белка, а также его варианты (включая мутанты, фрагменты и пептидомиметики), которые сохраняют нужную активность. Так, например, хорошо известно, что FST(315) и FST(288) обладают высокой аффинностью связывания с активином (активином А и активином В) и миостатином (и близкородственным GDF11), при этом считается, что фоллистатиновые домены (например, FSN и FSD I-III) участвуют в связывании лигандов TGF-β. Однако очевидно, что каждый из этих трех доменов может обладать различными аффинностями связывания с этими лигандами TGF-β. Так, например, недавно проведенные исследования показали, что полипептидные конструкции, содержащие только N-концевой домен (FSN) и два домена FSDI в тандеме, сохраняют высокую аффинность связывания с миостатином и низкую аффинность связывания с активином или вообще не обладают аффинностью связывания с активином, а также стимулируют рост мышц всего организма при введении таких полипептидных конструкций мышам посредством генной экспрессии (Nakatani et al., The FASEB Journal, Vol. 22477-487 (2008)).

Кроме того, домен FSDI содержит гепаринсвязывающий домен человеческого фоллистатина, который имеет аминокислотную последовательность KKCRMNNKPR (SEQ ID NO: 5). Этот гепаринсвязывающий домен может быть представлен как BBXBXXBBXB (SEQ ID NO: 6), где "B" означает основную аминокислоту, а в частности, лизин (K) или аргинин (R). В соответствии с этим настоящее изобретение, в частности, охватывает варианты фоллистатиновых белков, которые в отличие от природного

белка FST обладают способностью селективно связываться с данным лигандом TGF- β и/или ингибировать этот лиганд (например, сохранять высокую аффинность связывания с миостатином и значительно более низкую аффинность связывания с активином).

В некоторых своих аспектах настоящее изобретение включает полипептиды, содержащие домен FSN, указанный ниже, и, например, один или более гетерологичных полипептидов, и при этом следует отметить, что любая из начальных аминокислот G или N, находящихся перед первым цистеином, могут быть удалены, как показано, например, ниже (SEQ ID NO: 8)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IPCKET (SEQ ID NO: 7).
CWLRLQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
CKET (SEQ ID NO: 8).

В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим домен FSDI, включающий минимальные активные центры, связывающиеся с миостатином (и/или GDF11), а также с гепарином, как показано ниже, и, например, один или более гетерологичных полипептидов

CENVDCGPGKKCRMNNKPRCVCAPDCSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ
PELEVQYQGRC (SEQ ID NO: 9).

Последовательность FSDI может преимущественно сохраняться в соответствующем структурном окружении благодаря его экспрессии как полипептида, который также содержит домен FSN. В соответствии с этим настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим последовательность FSN-FSDI, представленную ниже (SEQ ID NO: 10), и, например, один или более гетерологичных полипептидов, и при этом следует отметить, что любые начальные аминокислоты G или N, находящиеся перед первым цистеином, могут быть удалены путем процессинга или искусственно элиминированы без каких-либо последствий, а также могут быть включены полипептиды, содержащие такие менее крупные полипептиды

CWLRLQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNNKPRCVCAPDCSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVQYQGRC (SEQ ID NO: 10).

Как продемонстрировано в публикации Nakani et al., конструкция FSN-FSDI-FSDI является достаточной для инициации роста мышц всего организма в том случае, если эта конструкция генетически экспрессируется у мышей, и в соответствии с этим настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим аминокислотные последовательности, представленные ниже, и, например, один или более гетерологичных полипептидов

CWLRLQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNNKPRCVCAPDCSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVQYQGRCKKTCEVDCGPGKKCRMNNKPRCVCAPDCSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECAL
LKARCKEQPELEVQYQGRC (SEQ ID NO: 11).

Хотя последовательность FSDI сообщает активность связывания с миостатином и GDF11, однако было продемонстрировано, что активины, а в частности, активин A, а также активин B, также представляют собой негативные регуляторы мышц, а поэтому фоллистатиновый полипептид, который ингибирует группу миостатин/GDF11 и группу активин A/активин B, может сообщать более сильный мышечный эффект. Кроме того, принимая во внимание представленные здесь данные исследования, указывающие на низкую системную доступность некоторых фоллистатиновых полипептидов, а в частности, полипептидов, содержащих гепаринсвязывающий домен, а более конкретно полипептидов в гомодимерной форме, такой как Fc-гибрид, можно решить проблемы безопасности, связанные с известным негативным влиянием ингибирования активина на функционирование репродуктивной системы и других тканей. Если учесть тот факт, что FSDII сообщает активность связывания с активином A и B, то в настоящее изобретение могут быть включены полипептиды, содержащие FSDI и FSDII (SEQ ID NO: 12), а также конструкции FSN-FSDI-FSDII (SEQ ID NOS: 13) и, например, один или более гетерологичных полипептидов

CENVDCGPGKKCRMNNKPRCVCAPDCSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ
PELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSA
CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC (SEQ ID NO: 12).
CWLRLQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNNKPRCVCAPDCSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKC (SEQ ID NO: 13).

Как описано в примерах, фоллистатиновый полипептид, состоящий из 291 аминокислоты (и представляющий собой природный усеченный FST-315), обладает преимущественными свойствами. В соот-

ветствии с этим настоящее изобретение включает непроцессированный (SEQ ID NO: 14) и зрелый полипептиды FST(291) (SEQ ID NO: 15), которые могут быть объединены с гетерологичными белками. Кроме того, следует отметить, что любые начальные аминокислоты G или N, находящиеся перед первым цистеином, могут быть удалены путем процессинга или искусственно элиминированы без каких-либо последствий, а также могут быть включены полипептиды, содержащие менее крупные полипептиды, такие как, например, полипептиды, представленные ниже (SEQ ID NO: 16)

MVRARHQPGGLCLLQLQFMEDRSAQAGNCWLQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKKCRMNNKPRCVAPDCSNTWKGPVCLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVDQTNNA

YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSD

GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVASCNDATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGS

CNSIS (SEQ ID NO:14).

GNCWLQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKKCRMNNKPRCVAPDCSNTWKGPVCLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVDQTNNA

YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSD

EPVCASNDATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSIS (SEQ ID NO:15).

CWLQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKKCRMNNKPRCVAPDCSNTWKGPVCLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVDQTNNA

YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSD

EPVCASNDATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSIS (SEQ ID NO:16).

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к ингибираванию лиганда фоллистатина (также называемого фоллистатиновым лигандом) под действием рассматриваемого фоллистатинового полипептида (например, гибридного полипептида FST-IgG). Таким образом, композиции и способы согласно изобретению могут быть применены для лечения расстройств, ассоциированных с аномальной активностью одного или более лигандов фоллистатина. Репрезентативными лигандами фоллистатина являются некоторые члены семейства TGF- β , такие как активин A, активин B, миостатин (GDF8) и GDF11.

Описанные здесь фоллистатиновые белки могут здесь обозначаться как FST. Если за этим обозначением стоит цифра, например FST(288), то это означает, что белок представляет собой фоллистатин, имеющий 288 аминокислот. Если этот белок имеет обозначение FST (288)-Fc, то это указывает на то, что С-концевой Fc присоединен к FST(288), и такой белок может содержать, а может и не содержать промежуточный линкер. В этом случае Fc может представлять собой любую Fc-часть иммуноглобулина, определенную в настоящей заявке. Если этот белок имеет обозначение FST(288)-IgG2, то это указывает на то, что С-концевой Fc присоединен к FST(288) Fc-части человеческого IgG2.

Активины представляют собой димерные полипептидные факторы роста и принадлежат к суперсемейству TGF- β . Существует три вида активинов (A, B и AB), которые представляют собой гомо/гетеродимеры, состоящие из двух близкородственных β -субъединиц ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ и $\beta_A\beta_B$). Были идентифицированы и другие активины C и E, хотя функции этих белков пока еще точно неизвестны. Активины, принадлежащие к суперсемейству TGF- β , представляют собой уникальные и многофункциональные факторы, которые могут стимулировать продуцирование гормонов в клетках яичника и плаценты; поддерживать выживаемость нейронов; позитивно или негативно влиять на прохождение клеточного цикла в зависимости от типа клеток и индуцировать дифференцировку мезодермы, по меньшей мере, в эмбрионах амфибий (DePaolo et al., 1991, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr. Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Кроме того, было обнаружено, что фактор дифференцировки эритроидов (EDF), выделенный из стимулированных клеток человеческого моноцитарного лейкоза, идентичен активину A (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Было высказано предположение, что активин A действует как природный регулятор эритропоэза в костном мозге. В некоторых тканях передача сигнала активина подавляется родственным ему гетеродимером, то есть ингибином. Так, например, в процессе высвобождения фолликулостимулирующего гормона (FSH) из гипофиза активин стимулирует секрецию и синтез FSH, а ингибин предотвращает секрецию и синтез FSH. Активин также рассматривается как негативный регулятор мышечной массы и функции, а антагонисты активина могут стимулировать мышечный рост или предотвращать потерю мышечной массы *in vivo* (Link and Nishi, Exp. Cell. Res. 1997 Jun 15;233 (2):350-62; He et al., Anat. Embryol. (Berl). 2005 Jun;209(5):401-7; Souza et al. Mol. Endocrinol. 2008 Dec; 22(12):2689-702; Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2009 Jul; 297 (1):E157-64; Gilson et al. Zhou et al. Cell. 2010 Aug; 20;142(4):531-43).

Фактор роста и дифференцировки-8 (GDF8) также известен как миостатин. GDF8 представляет со-

бой негативный регулятор массы скелетных мышц. GDF8 в высокой степени экспрессируется в скелетной мышце на стадии развития организма и у взрослых. У трансгенных мышей GDF8 с нулевой мутацией ассоциируется с тяжелой гипертрофией и гиперплазией скелетной мышцы (McPherron et al., *Nature*, 1997, 387:83-90). Аналогичное увеличение массы скелетных мышц наблюдается у крупного рогатого скота с природными мутациями GDF8 (Ashmore et al., 1974, *Growth*, 38:501-507; Swatland and Kieffer, *J. Anim. Sci.*, 1994, 38:752-757; McPherron and Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12457-12461; и Kam-badur et al., *Genome Res.*, 1997, 7:910-915), и что удивительно, у человека (Schuelke et al., *N. Engl. J. Med.* 2004;350:2682-8). Исследования также показали, что истощение мышц, ассоциированное с ВИЧ-инфекцией у человека, сопровождается повышением уровня экспрессии белка GDF8 (Gonzalez-Cadavid et al., *PNAS*, 1998, 95:14938-43). Кроме того, GDF8 может модулировать продуцирование мышцеспецифичных ферментов (например, креатин-киназы) и модулировать пролиферацию миобластов (WO 00/43781). Пропептид GDF8 может нековалентно связываться со зрелым димером домена GDF8, что приводит к инактивации его биологической активности (Miyazono et al. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 6407-6415; Wakefield et al. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 7646-7654 and Brown et al. (1990) *Growth Factors*, 3: 35-43). Другими белками, которые связываются с GDF8 или со структурно родственными белками и ингибируют их биологическую активность, являются фоллистатин и, возможно, родственные фоллистатину белки (Gamer et al. (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232).

Термины, используемые в описании настоящей заявки, имеют свои общепринятые значения, обычно употребляемые в литературе, в контексте настоящего изобретения и в конкретном контексте, где используется каждый из этих терминов. Для лучшего понимания описания композиций согласно изобретению и способов их получения и применения ниже или в других разделах данного описания объясняются некоторые термины. Объем или значения употребляемых здесь терминов будут понятны специалистам из конкретного контекста описания, в котором используются данные термины.

Термины "около" и "приблизительно", по существу, означают приемлемую величину ошибки при количественных измерениях с учетом способа или точности измерений. Обычно репрезентативные величины ошибки составляют в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10%, а более предпочтительно в пределах 5% от данной величины или интервала величин.

Альтернативно, а в частности, в биологических системах, термины "около" и "приблизительно" могут иметь значения, которые находятся в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах значений, которые 5-кратно, а более предпочтительно 2-кратно превышают данную величину. Представленные здесь численные величины являются приблизительными, если это не оговорено особо, и это означает, что термины "около" и "приблизительно" могут иметь предположительные значения, если это не указано точно.

Способы согласно изобретению могут включать стадии сравнения двух последовательностей, включая сравнение последовательности дикого типа с одной или более последовательностями мутантов (вариантов последовательностей). Такие сравнения обычно включают выравнивание полимерных последовательностей, например, с использованием программ и/или алгоритмов выравнивания последовательностей, хорошо известных специалистам (например, BLAST, FASTA и MEGALIGN, помимо всех прочих). Для специалиста в данной области совершенно очевидно, что при выравнивании последовательностей, где мутация представляет собой инсерцию или делецию остатка, такое выравнивание предусматривает введение "пробела" (обычно представленного черточкой или буквой "A") в полимерную последовательность, не содержащую встроенного или делетированного остатка.

Термин "гомологичный", используемый во всех его грамматических формах и вариантах написания, указывает на "общее эволюционное происхождение" двух белков, включая белки, принадлежащие к суперсемействам, происходящим от организмов одного и того же вида, а также гомологичные белки, происходящие от организмов различных видов. Такие белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) имеют гомологичные последовательности, на что указывает сходство их последовательностей, независимо от процента идентичности или независимо от того, присутствуют ли в этих последовательностях специфические остатки, мотивы или консервативные положения. Однако термин "гомологичный", используемый в общепринятоом смысле и в описании настоящей заявки, вместе с наречием, таким как "в высокой степени", может означать сходство последовательностей и может указывать, а может и не указывать на их общее эволюционное происхождение.

Термин "сходство последовательностей", используемый во всех его грамматических формах, означает степень идентичности или соответствия последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей, которые могут иметь, а могут и не иметь общее эволюционное происхождение.

2. Фоллистатиновые полипептиды.

В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к фоллистатиновым полипептидам (например, к полипептидам FST-Fc), а в частности, к усеченным формам, представленным полипептидами, содержащими SEQ ID NO: 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16, и их вариантам. Фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы имеют, но необязательно, подобную, одинаковую или улучшенную биологическую активность по сравнению с соответствующей активностью фолли-

статиновых полипептидов дикого типа. Так, например, фоллистиновый вариант согласно изобретению может связываться с лигандом фоллистата (например, активином А, активином АВ, активином В и GDF8) и ингибировать его функцию. Фоллистиновый полипептид модулирует, но необязательно, рост тканей, а в частности мышц. Примерами фоллистиновых полипептидов являются полипептиды, содержащие, состоящие или, по существу, состоящие из них: аминокислотные последовательности любых SEQ ID NN: 1-16 и 26-43, а также полипептиды, содержащие, состоящие или, по существу, состоящие из них: аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны аминокислотной последовательности любых SEQ ID NN: 1-16 и 26-43. Варианты этих полипептидов могут быть получены в соответствии с нижеследующими руководствами. Нумерация аминокислот в фоллистиновых полипептидах начинается с последовательности SEQ ID NO: 1 независимо от того, присутствует ли нативная лидерная последовательность или нет.

Как описано выше, фоллистин характеризуется тремя цистеинбогатыми областями (то есть FS-доменами I-III), которые, очевидно, опосредуют связывание фоллистата с лигандом. Кроме того, исследования продемонстрировали, что полипептидные конструкции, содержащие только один из трех FS-связывающих доменов (например, FSDI), сохраняют сильную аффинность по отношению к некоторым лигандам фоллистата (например, к миостатину) и являются биологически активными *in vivo* (см. Nakatani et al., The FASEB Journal, Vol. 22:477-487 (2008)). Поэтому варианты фоллистиновых полипептидов согласно изобретению могут содержать одну или более активных частей фоллистинового белка. Так, например, конструкции согласно изобретению могут начинаться с остатка, соответствующего аминокислотам 30-95 SEQ ID NO: 1, и заканчиваться в положении, соответствующем аминокислотам 316-344 SEQ ID NO: 1. Другими примерами являются конструкции, которые начинаются в положении, соответствующем аминокислотам 30-95 SEQ ID NO: 1, и заканчиваются в положении, соответствующем аминокислотам 164-167 или 238-244. Другие примеры могут включать любые из последовательностей SEQ ID NN: 7-16.

Описанные здесь фоллистиновые варианты могут быть объединены друг с другом или с гетерологичными аминокислотными последовательностями различными способами. Так, например, варианты фоллистиновых белков согласно изобретению включают полипептиды, содержащие один или более доменов FS, выбранных из FSDI (аминокислоты 95-164 SEQ ID NO: 1 (то есть SEQ ID NO: 2), FSDII (аминокислоты 168-239 SEQ ID NO: 1) или FSDIII (аминокислоты 245-316 SEQ ID NO: 1), а также белки, содержащие один или более доменов FS, выбранных из последовательностей, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 92, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны FSDI (аминокислоты 95-164 SEQ ID NO: 1 (то есть SEQ ID NO: 2), FSDII (аминокислоты 168-239 SEQ ID NO: 1) или FSDIII (аминокислоты 245-316 SEQ ID NO: 1). Эти FS-домены могут быть объединены в любом порядке в варианте фоллистинового полипептида согласно изобретению при условии, что такие рекомбинантные белки могут сохранять нужную активность, включая, например, активность связывания с лигандом фоллистата (например, с миостатином) и биологическую активность (например, способность индуцировать увеличение мышечной массы или мышечной силы). Примерами таких вариантов фоллистиновых полипептидов являются, например, полипептиды, имеющие доменные структуры, такие как FSDI-FSDII-FSDIII, FSDI-FSDIII, FSDI-FSDII-FSDIII, FSDI-FSDII, FSDI-FSDI, FSN-FSDI-FSDII, FSN-FSDI-FSDI, FSN-FSDI-FSDIII, FSN-FSDI-FSDII-FSDIII, и полипептиды, полученные путем присоединения других гетерологичных полипептидов к N-концу или C-концу этих полипептидов. Эти домены могут быть связаны непосредственно или посредством линкерного полипептида. Полипептидные линкеры могут представлять собой, но необязательно, любую последовательность и могут содержать 1-50, предпочтительно 1-10, а более предпочтительно 1-5 аминокислот. В некоторых аспектах изобретения предпочтительные линкеры содержат аминокислоты, не являющиеся цистеинами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фоллистиновые варианты согласно изобретению обладают пониженной аффинностью связывания с одним или более лигандами фоллистата или вообще не обладают такой аффинностью. В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к фоллистиновым вариантам, которые обладают пониженной аффинностью связывания с активином или вообще не обладают такой аффинностью. В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к фоллистиновым вариантам, которые обладают пониженной аффинностью связывания с активином или вообще не обладают такой аффинностью, но сохраняют высокую аффинность связывания с миостатином.

В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к фоллистиновым вариантам, которые не содержат последовательность, соответствующую домену FSDII или функционально активному домену FSDII. Так, например, фоллистиновые полипептиды согласно изобретению могут включать вариант, полученный путем частичной или полной делеции домена FSDII. В некоторых аспектах изобретения такие фоллистиновые варианты имеют делецию одного или более цистеиновых остатков в области FSDII или замену не-цистеиновыми аминокислотами.

Фоллистиновые белки согласно изобретению могут содержать сигнальную последовательность. Сигнальной последовательностью может быть нативная сигнальная последовательность фоллистинового белка (например, аминокислоты 1-29 SEQ ID NO: 1) или сигнальная последовательность другого

белка, такая как сигнальная последовательность тканевого активатора плазминогена (TPA) или сигнальная последовательность меллитина пчелиного меда (HBM).

К фоллистиновому полипептиду могут быть присоединены дополнительные сайты N-связанного гликозилирования (N-X-S/T), что может приводить к увеличению времени полужизни гибридного белка FST-Fc в сыворотке. Последовательности N-X-S/T могут быть, в основном, введены в положения, находящиеся за пределами лигандсвязывающего "кармана". Последовательности N-X-S/T могут быть введены в линкер между фоллистиновой последовательностью и Fc или другого компонента гибрида. Такой сайт без каких-либо усилий может быть введен путем включения N в соответствующее положение по отношению к уже существующим S или T или путем включения S или T в соответствующее положение по отношению к уже существующему N. Любой S, который, предположительно, является гликозилированным, может быть заменен на T без создания иммуногенного сайта, поскольку защита обеспечивается гликозилированием. Аналогичным образом любой T, который, предположительно, является гликозилированным, может быть заменен на S. В соответствии с этим фоллистиновый вариант может включать одну или более дополнительных не-эндогенных консенсусных последовательностей N-связанного гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рассматривается получение функциональных вариантов путем модификации структуры фоллистинового полипептида в целях повышения терапевтической эффективности или стабильности (например, повышения срока хранения *ex vivo* и повышения резистентности к протеолитическому расщеплению *in vivo*). Модифицированные фоллистиновые полипептиды могут быть также получены, например, путем аминокислотных замен, делеций или добавлений. Так, например, есть основания предположить, что отдельная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или аналогичная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой (например, консервативные замены) не будут оказывать значительного влияния на биологическую активность полученной молекулы. Консервативными заменами являются замены аминокислот одного семейства, которые имеют родственные боковые цепи. Тот факт, что замена в аминокислотной последовательности фоллистинового полипептида приводит к образованию функционального гомолога, может быть легко подтвержден путем оценки способности варианта фоллистинового полипептида вырабатывать ответ в клетках по механизму, аналогичному ответу, продуцируемому фоллистиновым полипептидом дикого типа, или связываться с одним или более лигандами, такими как активин или миостатин, по механизму, аналогичному механизму, осуществляющему фоллистином дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рассматриваются специфические мутации фоллистиновых полипептидов, вводимые в целях модификации гликозилирования полипептида. Такие мутации могут быть выбраны так, чтобы они обеспечивали введение или элиминацию одного или более сайтов гликозилирования, таких как сайты O-связанного или N-связанного гликозилирования. Сайты распознавания аспарагинсвязанного гликозилирования обычно включают трипептидную последовательность "аспарагин-X-тронин" (где "X" означает любую аминокислоту), которая специфически распознается соответствующими клеточными ферментами гликозилирования. Модификация может быть также осуществлена путем добавления одного или более сериновых или треониновых остатков или замены этими остатками в последовательности фоллистинового полипептида дикого типа (для сайтов O-связанного гликозилирования). Различные аминокислотные замены или делеции в одном первом или третьем или в обоих аминокислотных положениях сайта распознавания гликозилирования (и/или аминокислотная делеция во втором положении) приводят к устраниению гликозилирования в модифицированной трипептидной последовательности. Другим способом увеличения числа углеводных групп на фоллистиновом полипептиде является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к фоллистиновому полипептиду. В зависимости от применяемого способа присоединения, сахар(а) может (могут) быть присоединен(ы) к (a) аргинину и гистидину; (b) свободным карбоксильным группам; (c) свободным гидрильным группам, таким как цистеиновые группы; (d) свободным гидроксильным группам, таким как сериновые, треониновые или гидроксипролиновые группы; (e) ароматическим остаткам, таким как фенилаланин, тирозин или триптофан; или (f) амидной группе глутамина. Эти методы описаны в заявке WO 87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 г., и в публикации Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, которые вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Удаление одной или более углеводных групп, присутствующих на полипептиде ActRIIB, может быть осуществлено химическим и/или ферментативным методом. Химическое дегликозилирование может включать, например, обработку фоллистинового полипептида соединением трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентным соединением. Такая обработка приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, за исключением линкерного сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), при этом аминокислотная последовательность остается интактной. Химическое дегликозилирование также описано в публикации Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное расщепление углеводных групп на фоллистиновых полипептидах может быть достигнуто с использованием ряда эндо- и экзогликозидаз, как описано Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. Последовательность фоллистинового полипептида может быть скорректирована,

если это необходимо, в зависимости от типа используемой экспрессионной системы, поскольку клетки млекопитающих, дрожжей, насекомых и растений могут иметь различные паттерны гликозилирования, на которые могут влиять аминокислотные последовательности пептида. Вообще говоря, фоллистатиновые белки, используемые для введения человеку, могут быть экспрессированы в клеточной линии млекопитающих, которая имеет нужный паттерн гликозилирования, такая как клеточная линия HEK293 или CHO, хотя предполагается, что могут быть также использованы и другие экспрессионные клеточные линии млекопитающих.

В настоящем изобретении также рассматривается способ получения вариантов, а в частности, наборов комбинаторных вариантов фоллистатинового полипептида, включая, но необязательно, усеченные варианты, где пулы комбинаторных мутантов являются особенно подходящими для идентификации последовательностей функциональных вариантов. Целью скрининга таких комбинаторных библиотек может быть, например, получение вариантов фоллистатинового полипептида, имеющих модифицированные свойства, такие как модифицированные фармакокинетические свойства или модифицированная активность связывания с лигандом. Ниже описан ряд скрининг-анализов, и такие анализы могут быть проведены для оценки вариантов. Так, например, вариант фоллистатинового полипептида может быть скринирован на его способность связываться с фоллистатиновым полипептидом и предупреждать связывание лиганда фоллистатина с фоллистатиновым полипептидом.

Активность фоллистатинового полипептида или его вариантов может быть также протестировано в клеточном анализе или в анализе *in vivo*. Так, например, может быть оценено влияние варианта фоллистатинового полипептида на экспрессию генов, участвующих в формировании мышц. Это может быть осуществлено, если это необходимо, в присутствии одного или более рекомбинантных белков-лигандов фоллистатина (например, активина A), и клетки могут быть трансфенированы так, чтобы они продуцировали фоллистатиновый полипептид и/или его варианты, и необязательно, лиганд фоллистатина. Аналогичным образом, фоллистатиновый полипептид может быть введен мышам или другим животным, а затем могут быть оценены одно или более свойств мышц, таких как мышечная масса или мышечная сила. Такие анализы хорошо известны и являются рутинными процедурами. В таких клеточных линиях для мониторинга влияния на дальнейшую передачу сигнала может быть использован репортерный ген-респондер.

Могут быть получены комбинаторные варианты, обладающие селективной активностью по сравнению с природным фоллистатиновым полипептидом. Такие варианты белков, если они экспрессируются из рекомбинантных конструкций ДНК, могут быть использованы в протоколах генотерапии. Аналогичным образом, в результате мутагенеза могут быть получены варианты, которые имеют внутриклеточное время полужизни, резко отличающееся от времени полужизни соответствующего фоллистатинового полипептида дикого типа. Так, например, модифицированный белок может сообщать большую или меньшую стабильность к протеолитическому расщеплению или инициировать другие процессы, приводящие к деструкции или к какой-либо другой инактивации нативного фоллистатинового полипептида. Такие варианты и гены, кодирующие эти варианты, могут быть использованы для изменения уровней фоллистатинового полипептида путем модуляции времени полужизни фоллистатиновых полипептидов. Так, например, чем короче время полужизни, тем более кратковременными являются биологические эффекты, и, если использовать индуцибельную экспрессионную систему, то можно осуществлять более жесткую регуляцию рекомбинантных уровней фоллистатинового полипептида в клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фоллистатиновые полипептиды согласно изобретению могут также включать, помимо модификаций, которые обычно присутствуют в фоллистатиновых полипептидах, посттрансляционные модификации. Такими модификациями являются, но не ограничиваются ими, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидизация и ацилирование. В результате этого модифицированные фоллистатиновые полипептиды могут содержать не-аминокислотные элементы, такие как полиэтиленгликоли, липиды, поли- или моносахарид и фосфаты. Влияние таких не-аминокислотных элементов на функциональные свойства фоллистатинового полипептида могут быть протестированы, как описано в настоящей заявке для других вариантов фоллистатинового полипептида. Если фоллистатиновый полипептид продуцируется в клетках в результате расщепления растущей формы фоллистатинового полипептида, то посттрансляционный процессинг может также играть важную роль в правильной укладке белка и/или в сообщении ему нужной функции. Различные клетки (такие как CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 или HEK293) обладают специфическими клеточными и характеристическими механизмами, ответственными за сообщение таких посттрансляционных активностей, а поэтому они могут быть выбраны для гарантии правильной модификации и процессинга фоллистатиновых полипептидов.

В некоторых аспектах изобретения функциональными вариантами или модифицированными формами фоллистатиновых полипептидов являются гибридные белки, имеющие по меньшей мере часть фоллистатинового полипептида и один или более гибридных доменов. Хорошо известными примерами таких гибридных доменов являются, но не ограничиваются ими, полигистидин, Glu-Glu, глутатион-S-трансфераза (GST), тиоредоксин, белок A, G-белок, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина (например, Fc), белок, связывающийся с мальтозой (MBP), или альбумин человеческой сыворотки.

Гибридный домен может быть выбран так, чтобы он сообщал желаемые свойства. Так, например, некоторые гибридные домены являются особенно подходящими для выделения гибридных белков с помощью аффинной хроматографии. Для проведения аффинной очистки используют релевантные матрицы для аффинной хроматографии, такие как смолы, конъюгированные с глутатионом, амилазой, никелем или кобальтом. Многие из таких матриц поставляются в виде "набора", такого как система очистки Pharmacia GST и система QIAexpress™ (Qiagen), в которой используются партнеры по связыванию (HIS₆). В качестве другого примера может быть выбран гибридный домен, облегчающий детектирование фоллистиновых полипептидов. Примерами таких детектирующих доменов являются различные флуоресцентные белки (например, GFP), а также "эпитопные метки", обычно представляющие собой короткие пептидные последовательности, для которых имеются специфичные антитела. Хорошо известными эпитопными метками, для которых имеются легко доступные специфические моноклональные антитела, являются FLAG, гемагглютинин вируса гриппа (HA) и метки с-мус. В некоторых случаях гибридные домены имеют сайт расщепления протеазой, такой как сайт расщепления фактором Ха или тромбином, где указанный сайт позволяет релевантной протеазе частично расщеплять гибридные белки и высвобождать рекомбинантные белки из указанных белков. Затем высвобождаемые белки могут быть выделены из гибридного домена путем хроматографического разделения. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения фоллистиновый полипептид присоединяют к домену, который стабилизирует этот фоллистиновый полипептид *in vivo* ("стабилизирующий домен"). Термин "стабилизирующий" относится к любому увеличению времени полужизни в сыворотке независимо от того, происходит ли это в результате снижения уровня деструкции, снижения клиренса почками или другого фармакокинетического эффекта. Известно, что гибриды, содержащие Fc-часть иммуноглобулина, сообщают белкам широкого ряда нужные фармакокинетические свойства. Аналогичным образом, присоединение к альбумину человеческой сыворотки может сообщать нужные свойства. При этом могут быть выбраны гибридные домены других типов, и такими доменами являются мультимеризующие (например, димеризующие, тетрамеризующие) домены и функциональные домены (которые сообщают дополнительную биологическую функцию, такую как дополнительная стимуляция роста мышц).

В своих конкретных примерах настоящее изобретение относится к гибридным белкам, содержащим фоллистиновые полипептиды, присоединенные к полипептиду, содержащему константный домен иммуноглобулина, такой как CH1-, CH2- или CH3-домен иммуноглобулина или Fc. Fc-домены, происходящие от человеческих IgG1 и IgG2, представлены ниже (SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно). Как описано в настоящей заявке, Fc-домен IgG2, IgG4 или IgG2/4 является особенно подходящим для его присоединения к фоллистиновым полипептидам, которые сохраняют гепаринсвязывающую активность, поскольку эти Fc-молекулы обладают пониженной CDC- и/или ADCC-активностью, что может оказывать негативное воздействие на клетки, к которым могут быть присоединены эти гепаринсвязывающие полипептиды. В объем настоящего изобретения входят и другие мутации, которые, как известно, снижают CDC- или ADCC-активность, а в целом в настоящем изобретении входят любые из этих вариантов, которые могут быть использованы в качестве предпочтительных компонентов гибридного фоллистинового белка. Fc-домен SEQ ID NO:17 имеет, но необязательно, одну или более мутаций в остатках, таких как Asp-265, Lys-322 и Asn-434 (пронумерованных в соответствии с нумерацией полноразмерного IgG1). В некоторых случаях мутантный Fc-домен, имеющий одну или более из этих мутаций (например, мутацию Asp-265), обладает пониженной способностью связываться с рецептором Fcγ по сравнению с Fc-доменом дикого типа. В других случаях мутантный Fc-домен, имеющий одну или более из этих мутаций (например, мутацию Asn-434), обладает повышенной способностью связываться с Fc-рецептором, ассоциированным с МНС класса I (FcRN) по сравнению с Fc-доменом дикого типа.

Примеры аминокислотных последовательностей человеческих IgG1 и IgG2, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, представлены ниже

IgG1

```
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:17).
```

IgG2

```
VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTIVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKKGQPREQ  
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:18).
```

Следует отметить, что различные элементы гибридных белков могут быть расположены в любом порядке, при условии, что они будут сообщать нужные функциональные свойства. Так, например, фоллистиновый полипептид может быть расположен у С-конца по отношению к гетерологичному домену,

или, альтернативно, гетерологичный домен может быть расположен у С-конца по отношению к фоллистатиновому полипептиду. Домен фоллистатинового полипептида и гетерологичный домен необязательно должны быть смежными в гибридном белке, и в С- или N-концы любого домена или между этими доменами могут быть включены дополнительные домены или аминокислотные последовательности.

Используемый здесь термин "Fc-домен иммуноглобулина" или просто "Fc" означает карбоксиконцевую часть константной области цепи иммуноглобулина, а предпочтительно константной области тяжелой цепи иммуноглобулина или ее части. Так, например, Fc-область иммуноглобулина может содержать 1) СН1-домен, СН2-домен и СН3-домен, 2) СН1-домен и СН2-домен, 3) СН1-домен и СН3-домен, 4) СН2-домен и СН3-домен или 5) комбинацию двух или более доменов и шарнирной области иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления изобретения Fc-область иммуноглобулина содержит, по меньшей мере, шарнирную область иммуноглобулина, СН2-домен и СН3-домен иммуноглобулина, а предпочтительно не содержит СН1-домена. Следует также отметить, что фоллистатиновый полипептид может содержать только один домен иммуноглобулина, такой как СН1-домен, СН2-домен или СН3-домен. Многие из этих доменов сообщают нужные фармакокинетические свойства, а также способность образовывать димеры или мультимеры высшего порядка.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноглобулины, от которых происходит константная область тяжелой цепи, принадлежат к классу IgG (Igγ) (γ-подкласса 1, 2, 3 или 4). При этом могут быть использованы иммуноглобулины и других классов, а именно IgA (Igα), IgD (Igδ), IgE (Igε) и IgM (Igμ). Выбор соответствующей константной области тяжелой цепи иммуноглобулина подробно обсуждается в патентах США №№ 5541087 и 5726044. Выбор последовательностей конкретной константной области тяжелой цепи иммуноглобулина некоторых классов и подклассов для достижения конкретного результата может быть осуществлен самим специалистом в данной области. Часть конструкции ДНК, кодирующей Fc-область иммуноглобулина, предпочтительно включает по меньшей мере часть шарнирного домена, а более предпочтительно по меньшей мере часть СН₃-домена Fc-гамма или гомологичные домены любого из IgA, IgD, IgE или IgM.

Кроме того, предполагается, что для практического применения описанных здесь способов и композиций в константные области тяжелой цепи иммуноглобулина может быть введена аминокислотная замена или делеция. Одним из примеров является введение аминокислотных замен в верхнюю СН2-область с получением Fc-варианта, обладающего пониженной аффинностью связывания с Fc-рецепторами (Cole et al. (1997) J. Immunol. 159:3613). Кроме того, во многих случаях С-концевой лизин или К может быть удален, и таким образом, в любом из описанных здесь полипептидов может отсутствовать С-концевой К, присутствующий в Fc-домене, как показано в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фоллистатиновые полипептиды согласно изобретению содержат одну или более модификаций, способных стабилизировать фоллистатиновые полипептиды. Так, например, такие модификации увеличивают время полужизни фоллистатиновых полипептидов *in vitro*, увеличивают время полужизни фоллистатиновых полипептидов в кровотоке или снижают уровень протеолитического расщепления фоллистатиновых полипептидов. Такими стабилизирующими модификациями являются, но не ограничиваются ими, гибридные белки (включая, например, гибридные белки, содержащие фоллистатиновый полипептид и домен-стабилизатор), модификации сайта гликозилирования (включая, например, присоединение сайта гликозилирования к фоллистатиновому полипептиду) и модификации углеводной группы (включая, например, удаление углеводных групп из фоллистатинового полипептида). В случае гибридных белков фоллистатиновый полипептид присоединяют к домену-стабилизатору, такому как молекула IgG (например, Fc-домен). Используемый здесь термин "домен-стабилизатор" означает не только гибридный домен (например, Fc), как в случае гибридных белков, но также и небелковые модификации, такие как углеводная группа или небелковый полимер, такой как полиэтиленгликоль.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к получению доступных выделенных и/или очищенных форм фоллистатиновых полипептидов, которые могут быть выделены из других белков или, по существу, не содержат эти белки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фоллистатиновые полипептиды (немодифицированные или модифицированные) согласно изобретению могут быть получены различными хорошо известными методами. Так, например, такие фоллистатиновые полипептиды могут быть синтезированы стандартными методами химии белков, такими как методы, описанные в публикациях Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) и Grant G.A. (ed.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.H. Freeman and Company, New York (1992). Кроме того, автоматические синтезаторы пептидов являются коммерчески доступными (например, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600). Альтернативно, фоллистатиновые полипептиды, их фрагменты или варианты могут быть рекомбинантно продуцированы с использованием различных экспрессионных систем (например, с использованием *E. coli*, клеток яичника китайского хомячка, клеток COS, бакуловируса), хорошо известных специалистам (также см. ниже). В другом варианте осуществления изобретения модифицированные или немодифицированные фоллистатиновые полипептиды могут быть получены путем расщепления природных или ре-

комбинантно продуцированных полноразмерных фоллистатиновых полипептидов с использованием, например, протеазы, например трипсина, термолизина, химотрипсина, пепсина, или фермента, конвертирующего парные основные аминокислоты (PACE). Для идентификации сайтов протеолитического расщепления может быть проведен компьютерный анализ (с использованием коммерчески доступной программы, например, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.). Альтернативно, такие фоллистиновые полипептиды могут быть получены из природных или рекомбинантно продуцированных полноразмерных фоллистиновых полипептидов стандартными методами, известными специалистам, такими как химическое расщепление (например, бромцианом, гидроксиламином).

3. Нуклеиновые кислоты, кодирующие фоллистатиновые полипептиды.

В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к выделенным и/или рекомбинантным нуклеиновым кислотам, кодирующими любой из описанных здесь фоллистатиновых полипептидов. Рассматриваемые нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Такими нуклеиновыми кислотами могут быть молекулы ДНК или РНК. Эти нуклеиновые кислоты могут быть использованы, например, в методах получения фоллистатиновых полипептидов.

Так, например, нижеследующая последовательность кодирует природный полипептид-предшественник человеческого фоллистатина (SEQ ID NO: 19) (NCBI, регистрационный номер BC004107.2, 1032 п.о.)

atgggtccgcgcgaggcaccaggccgggtggcttgcctctgtctgtctgcac
gttcatggaggaccgcagtcgcacaggctggaaactgtctggctccgtcaagcgaagaacggccgc
tgccaggctctgtacaagacccgaaactgaccaaggaggatgtctgcacgcacccggccggctgacca
cctctgtggaccggaggaggacgtgtaaactgtcaagttgtatgtttcaacgggg
cgcccccaactgtatcccccgttaaagaaacgtgtgagaacacgtgactgtggacctggaaaaaaa
tgccgaatgaacaagaacaacccccgtcgctcgcccccgttgcacatcaccc
gaaagggtccagtctgggctggatggaaacccatccgcataatgtgcactcttaaggc
aaatgttaaaggcagccagaactggaaatgtccatccaaggcagatgtaaaaaagacttgtcg
gatgtttctgtccaggcagctccacatgtgtgtggaccagaccaataatgcctactgtgtga
cctgtatcgatgtcccgagcgtgttcctctgagacaatatctctgtggatgtggat
cacctactccagtgcgtccacctgagaaaggctacgtcctgtggcagatctatggata
gcctatgaggaaatgtatcaaaagcaaaatgtctgtgaagatatccagtgcactgtggaaaa
aatgtttatgggatctcaagggtggggaggccgggttccctctgtatgtggactgtgcctga
cagtaatgtcgatgtcccgatgtgtccaggcgtacaatgcacccatgtccaggcagatgtggccat
aaggaaatgtccgtctccatggatgtgtactgaaatggaaacgtccggatctgtcaactcc
tttccggaaacaccggaggaaaggaggaggatgtaaagaccaggactacagcttccatatacttc
tatcttagatgtgg.

Ниже следующая последовательность кодирует зрелый полипептид FST (315) (SEQ ID NO: 20)

Нижеследующая последовательность кодирует полипептид FST (288) (SEO ID NO: 21):

исследовательство кодируст полинуклеотид Г3Т (268) (SEQ ID: 1)
gggaaactgtggctccgtcaagcgaagaacggccgtccggcagggtccgtacaagaccga
actgagacaaggaggatgtcgacgcacccggccgggtgacggacccctgtggaggaggacgtg
aatggacaacacacttcaagtggatgatttcaacgggggcggccccaactgcatccccgttga
aagaaaactgtggagaacgtggactgtggacccgtggaaaaaatgccaatgaaacaagaacaa
accccgctgcgtctgcgccccggattgttccaaatcacctgaaagggtccagtgccggctg
gatggggaaaacctaccgcaatgtgcactccataaggcaagatgtaaagagcagccagaac
tggaaagtccagttaccaaggcagatgtaaaaagactgtcgggatgtttctgcaggcgc
cacatgtgtgggaccagaccaataatgcctactgtgtgacccgtaaatcgattgcccagag
cctgtttccctgtgacaatatctctgtggaaatgtggagtccactgcgtccacc
tgagaaaggctacccgtctgtggcagatctattggataggctatggggaaagtgtatcaa
agccaaagtccgtgaagatattccaggactgcactgtggggaaaaatgtttatggatttcaagg
gggagaggccgggttccctctgtgtggatggctgcacgatggatggggatggatggatgg
gtgcaggactgacaatgtccacttgcgcggcgtggatggatggatggatggatggatgg
tgtatgtactggaaagtaaaacgtccgtatcttgcacac.

Нижеследующая последовательность кодирует зрелый полипептид FST (291) (SEQ ID NO: 22)

```

gsgaactgtggctccgtcaagcgaagaacggccgctggccaggctgtacaagaccga
actgagcaaggaggagtgtcgccagcacccggccggctgagcacctcgccggaggaggacgt
aatgacaacacacttcaagtggatgtttcaacggggcccccactgcacatcccctgt
aagaacgtgtgagaacgtggactgtggaccctggaaaaatgcgaatgaacaagaagaacaa
accccgctgcgtctgcgcggattgttcaacatcacctggaaagggtccagtcgtggggct
gatgggaaaacccatccgcataatgtgcactctaaaggcaagatgtaaagacgcggcaac
tggaaagtcccgatccaggcagatgtaaaaagactgtcgggatgtttctgtccaggcagctc
cacatgtgtggaccaggacaatgcactgtgtgacatcgattgcccagag
cctgcttctctgagcaatctctgtggatgtggatgtggactccactccagtcgtgcctgcacc
tgagaaaggctacccgtctggcgatgtggatgtggatgtggatgtggatgtggatgtggatgtgg
agcaaaagtccgtgaaagatcccgatgtggggaaaaatgtttatgggattcaaggtt
gggagaggccgggtgtccctctgtgatgagctgtgcccctgacagtaatgcggatgagcctgtct
gtggccaggatgacaatgcacccatgtccaggcagatgtgccatgaaaggctgcctgcctcagg
tgtgtactggaaagtaaagcactccggatcttgcacactccatcttcgtgg

```

Следует отметить, что в некоторых аспектах изобретения рассматриваются нуклеиновые кислоты, кодирующие фоллистиновые полипептиды, включают нуклеиновые кислоты, которые представляют собой варианты SEQ ID NN: 19-22. Вариантами нуклеотидных последовательностей являются последовательности, отличающиеся тем, что они имеют одну или более нуклеотидных замен, добавлений или делеций, таких как аллельные варианты, а поэтому такие последовательности включают кодирующие последовательности, отличающиеся от нуклеотидной последовательности кодирующей последовательности, представленной в SEQ ID NN: 19-22.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к выделенным или рекомбинантным последовательностям нуклеиновой кислоты, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны SEQ ID NN: 19-22, а в частности, к их частям, происходящим от фоллистатина (нуклеотидам, соответствующим аминокислотам 95-164 SEQ ID NO:1). Для специалиста в данной области очевидно, что в объем настоящего изобретения также входят последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарные SEQ ID NN: 19-22, и варианты SEQ ID NN: 19-22. В других вариантах осуществления изобретения последовательности нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут быть выделенными, рекомбинантными и/или присоединенными к гетерологичной нуклеотидной последовательности либо они могут присутствовать в библиотеке ДНК.

В других вариантах осуществления изобретения нуклеиновые кислоты согласно изобретению также включают нуклеотидные последовательности, которые гибридизуются в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NN: 19-22, с комплементарной последовательностью SEQ ID NN: 19-22 или с их фрагментами (например, с нуклеотидами 19-22).

Для специалиста в данной области совершенно очевидно, что соответствующие условия жесткости, стимулирующие гибридизацию ДНК, могут варьироваться. Так, например, гибридизация может быть осуществлена с использованием 6,0× хлорида натрия/цитрата натрия (SSC) приблизительно при 45°C и последующей промывки 2,0× SSC при 50°C. Так, например, концентрация соли в стадии промывки может быть выбрана из концентраций, применяемых в условиях низкой жесткости, а именно приблизительно 2,0× SSC при 50°C, и концентраций, применяемых в условиях высокой жесткости, а именно приблизительно 0,2× SSC при 50°C. Кроме того, температура в стадии промывки может быть повышена от температуры, которая применяется в условиях низкой жесткости, а именно комнатной температуры приблизительно 22°C, до температуры, применяемой в условиях высокой жесткости, а именно приблизительно до 65°C. Оба параметра, такие как температура и концентрация соли, могут варьироваться либо один из таких параметров может оставаться постоянным, а другой варьироваться. В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в условиях низкой жесткости, а именно с использованием 6× SSC при комнатной температуре и последующей промывки 2× SSC при комнатной температуре.

Выделенные нуклеиновые кислоты, которые отличаются от нуклеиновых кислот, представленных в SEQ ID NN: 19-22, что обусловлено вырожденностью генетического кода, также входят в объем настоящего изобретения. Так, например, число аминокислот представлено более чем одним триплетом. Кодоны, которые соответствуют одной и той же аминокислоте, или синонимичные кодоны (например, CAU и CAC являются синонимичными кодонами гистидина) могут продуцировать "молчание" мутаций, которые не влияют на аминокислотную последовательность белка. Однако предполагается, что в клетках млекопитающих существует полиморфизм последовательностей ДНК, который не приводит к изменениям в аминокислотных последовательностях рассматриваемых белков. Для специалиста в данной области очевидно, что такие модификации одного или более нуклеотидов (приблизительно до 3-5% нуклеотидов) нуклеиновых кислот, кодирующих конкретный белок, могут присутствовать у индивидуумов данных видов вследствие природной аллельной вариации. Любые и все указанные нуклеотидные вариации и полиморфизм конечных аминокислотных последовательностей входят в объем настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные нуклеиновые кислоты согласно изобретению могут быть функционально присоединены к одной или более регуляторным нуклеотид-

ным последовательностям в экспрессионной конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности обычно являются подходящими для клеток-хозяев, используемых для экспрессии. Специалистам известно множество типов экспрессионных векторов и регуляторных последовательностей, подходящих для различных клеток-хозяев. Обычно указанными одной или более регуляторными нуклеотидными последовательностями могут быть, но не ограничиваются ими, промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, сайты связывания с рибосомой, последовательности инициации и терминации транскрипции, последовательности инициации и терминации трансляции и энхансерные последовательности или последовательности-активаторы. В объем настоящего изобретения также входят конститутивные или индуцибельные промоторы, известные специалистам. Промоторами могут быть природные промоторы или гибридные промоторы, содержащие комбинацию из более чем одного промоторного элемента. Экспрессионная конструкция может присутствовать в клетке на эпизоме, такой как плазмида, либо такая экспрессионная конструкция может быть встроена в хромосому. В предпочтительном варианте осуществления изобретения экспрессионный вектор содержит селективный маркерный ген, позволяющий проводить отбор трансформированных клеток-хозяев. Селективные маркерные гены хорошо известны специалистам и могут варьироваться в зависимости от типа используемых клеток-хозяев.

В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к рассматриваемой нуклеиновой кислоте, присущей в экспрессионном векторе, содержащем нуклеотидную последовательность, кодирующую фоллистатиновый полипептид и функционально присоединенную по меньшей мере к одной регуляторной последовательности. Регуляторные последовательности известны специалистам и выбраны так, чтобы они регулировали экспрессию фоллистатинового полипептида. В соответствии с этим термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы регуляции экспрессии.

Презентативные регуляторные последовательности описаны в публикации Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Так, например, в этих векторах для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих фоллистатиновый полипептид, могут быть использованы любые последовательности регуляции экспрессии широкого ряда, которые регулируют экспрессию последовательности ДНК, в том случае, если она функционально присоединена к этим последовательностям. Такими подходящими последовательностями регуляции экспрессии являются, например, ранний и поздний промоторы SV40; промотор tet; предраний промотор аденоовириуса или цитомегаловириуса; промоторы RSV; система lac; система trp; система TAC или TRC; промотор T7, экспрессия которого регулируется РНК-полимеразой T7; главные операторные и промоторные области фага лямбда; регуляторные области оболочечного белка fd; промотор для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов; промоторы кислой фосфатазы, например Pho5; промоторы факторов скрещивания дрожжей- α ; полиздроновый промотор бакуловириусной системы и другие последовательности, которые, как известно, регулируют экспрессию генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов и их различных комбинаций. Следует отметить, что конструкция экспрессионного вектора может зависеть от таких факторов, как тип трансформируемой клетки-хозяина и/или тип нужного экспрессируемого белка. Кроме того, также должны учитываться число копий вектора, возможность регулировать число копий и уровень экспрессии любого другого белка, кодируемого вектором, такого как маркеры-антибиотики.

Рекомбинантная нуклеиновая кислота согласно изобретению может быть получена путем лигирования клонированного гена или его части в вектор, подходящий для экспрессии в прокариотических клетках, эукариотических клетках (в клетках дрожжей, птиц, насекомых или млекопитающих) или в тех и других клетках. Экспрессионными носителями для продуцирования рекомбинантного фоллистатинового полипептида являются плазмиды и другие векторы. Так, например, векторами, подходящими для экспрессии в прокариотических клетках, таких как *E. coli*, являются плазмиды следующих типов: плазмиды, происходящие от pBR322, плазмиды, происходящие от pEMBL, плазмиды, происходящие от pEX, плазмиды, происходящие от pBTac, и плазмиды, происходящие от pUC.

Некоторые экспрессионные векторы млекопитающих содержат прокариотические последовательности для облегчения репликации вектора в бактериях, и одну или более эукариотических транскрипционных единиц, которые экспрессируются в эукариотических клетках. Примерами экспрессионных векторов млекопитающих, подходящих для трансфекции эукариотических клеток, являются векторы, происходящие от pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo и pHug. Некоторые из этих векторов модифицируют последовательностями, происходящими от бактериальных плазмид, таких как pBR322, для облегчения репликации и отбора на резистентность к лекарственным средствам в прокариотических и эукариотических клетках. Альтернативно, производные вирусов, таких как вирус бычьей папилломы (BPV-1), или вирус Эпштейна-Барра (pHEBo, происходящий от pREP и p205) могут быть использованы для транзиентной экспрессии белков в эукариотических клетках. Примеры других вирусных экспрессионных систем (включая ретровирусные системы) приводятся ниже в описании систем доставки методами генотерапии. Различные методы получения плазмид и трансформации организмов-хозяев хорошо известны специалистам. Описание других

подходящих экспрессионных систем для прокариотических и эукариотических клеток, а также описание общих рекомбинантных методов можно найти в руководстве Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) в главах 16 и 17. В некоторых случаях может оказаться желательной экспрессия рекомбинантных полипептидов с использованием бакуловирусной экспрессионной системы. Примерами таких бакуловирусных экспрессионных систем являются векторы, происходящие от pVL (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941); векторы, происходящие от pAcUW (такие как pAcUW1); и векторы, происходящие от pBlueBac (такие как β -gal-содержащий вектор pBlueBac III).

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор может быть сконструирован для продуцирования рассматриваемых фоллистатиновых полипептидов в клетках CHO, и такими векторами являются вектор Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), векторы pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) и векторы pCI-neo (Promega, Madison, Wise). Очевидно, что рассматриваемые генные конструкции могут быть использованы для инициации экспрессии рассматриваемых фоллистатиновых полипептидов в клетках, размноженных в культуре, например, для продуцирования белков, включая гибридные белки или их варианты, применяемые для очистки.

Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, трансфенированным рекомбинантным геном, включающим кодирующую последовательность (например, SEQ ID NN: 19-22) для одного или более рассматриваемых фоллистатиновых полипептидов. Клетками-хозяевами могут быть любые прокариотические или эукариотические клетки. Так, например, фоллистатиновый полипептид согласно изобретению может экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, в клетках насекомых (например, посредством бакуловирусной экспрессионной системы), в клетках дрожжей или в клетках млекопитающих. Специалистам известны и другие подходящие клетки-хозяева.

В соответствии с этим настоящее изобретение также относится к способам продуцирования рассматриваемых фоллистатиновых полипептидов. Так, например, клетки-хозяева, трансфенированные экспрессионным вектором, кодирующим фоллистатиновый полипептид, могут быть культивированы в условиях, подходящих для экспрессии фоллистатинового полипептида. Фоллистатиновый полипептид может быть секретирован и выделен из смеси клеток и среды, содержащей фоллистатиновый полипептид. Альтернативно, фоллистатиновый полипептид может оставаться в цитоплазме или в мембранный фракции клеток, которые затем собирают, подвергают лизису и выделяют белок. Клеточная культура включает клетки-хозяева, среду и другие побочные продукты. Среды, подходящие для культивирования клеток, хорошо известны специалистам. Рассматриваемые фоллистатиновые полипептиды могут быть выделены из среды для культивирования клеток, из клеток-хозяев или из того и другого с применением методов, известных специалистам в области очистки белков, включая ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию, ультрафильтрацию, электрофорез и иммуноаффинную очистку с использованием антител, специфичных к конкретным epitопам фоллистатиновых полипептидов. В предпочтительном варианте осуществления изобретения фоллистатиновым полипептидом является гибридный белок, содержащий домен, облегчающий его очистку.

В другом варианте осуществления изобретения гибридный ген, кодирующий лидерную последовательность, используемую для очистки, такую как последовательность сайта расщепления поли-(His)/энтерокиназой, присутствующая у N-конца нужной части рекомбинантного фоллистатинового полипептида, позволяет осуществлять очистку экспрессированного гибридного белка посредством аффинной хроматографии с использованием смолы, связанной с металлом Ni^{2+} . Затем лидерная последовательность для очистки может быть удалена путем обработки энтерокиназой с получением очищенного фоллистатинового полипептида (см., например, Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177 и Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

Методы получения гибридных генов хорошо известны специалистам. Присоединение различных фрагментов ДНК, кодирующих различные полипептидные последовательности, осуществляют, в основном, стандартными методами посредством лigation по тупым концам или липким концам; посредством гидролиза рестриктирующими ферментами с образованием соответствующих концов; достривания липких концов, если это необходимо; обработки щелочной фосфатазой для предотвращения нежелательного связывания и ферментативного лigation. В другом варианте осуществления изобретения гибридный ген может быть синтезирован стандартными методами, включая методы, осуществляемые на автоматических синтезаторах ДНК. Альтернативно, ПЦР-амплификация генных фрагментов может быть осуществлена с использованием "якорных" праймеров, образующих комплементарные "висячие" концы между двумя смежными генными фрагментами, которые могут быть затем гибридизованы с получением химерной генной последовательности (см., например, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Примеры терапевтического применения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции согласно изобретению, включающие, например, FST(288)-IgG1, FST(288)-IgG2, FST(291)-IgG1, FST(291)-IgG2, FST(315)-IgG1, FST(315)-IgG2 и любые другие описанные здесь фоллистатиновые полипептиды, могут быть использованы для лечения или предупреждения заболевания или расстройства, описанного в этом разделе, включая заболе-

вания или расстройства, ассоциированные с аномальной активностью фоллистинового полипептида и/или лиганда фоллистинина (например, GDF8). Эти заболевания, расстройства или состояния обычно называются здесь "состояниями, ассоциированными с фоллистином". В некоторых своих вариантах настояще изобретение относится к способам лечения или предупреждения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, путем введения указанному индивидууму терапевтически эффективного количества фоллистинового полипептида, описанного выше. Эти способы, в частности, применяются для терапии и профилактики заболеваний у животных, а более конкретно у человека.

Используемый здесь термин "терапевтическое средство", которое "предупреждает" развитие расстройства или состояния, означает соединение, которое при статистической выборке снижает вероятность возникновения расстройства или состояния в лечебной группе по сравнению с необработанной контрольной группой либо задерживает наступление или уменьшает выраженность одного или более симптомов заболевания или состояния по сравнению с необработанной контрольной группой. Используемый здесь термин "лечение" означает ослабление тяжести или устранение состояния после его возникновения.

Комплексы "фоллистин-лиганд" играют важную роль в росте ткани, а также на ранних стадиях развития, таких как правильное формирование различных структур, или в одном или нескольких процессах последующего развития организма, включая половое развитие, продуцирование гормонов гипофиза и образование мышц. Таким образом, состояния, ассоциированные с фоллистином, включают аномальный рост ткани и дефекты развития.

Репрезентативными состояниями, которые могут быть подвергнуты лечению, являются нейромышечные расстройства (например, мышечная дистрофия и атрофия мышц), застойная обструктивная болезнь легких (и истощение мышц, ассоциированное с ХОБЛ), синдром истощения мышц, саркопения и кахексия. Другими репрезентативными состояниями являются мышечно-дегенеративные и нейромышечные расстройства, репарация ткани (например, заживление ран) и нейродегенеративные заболевания (например, амиотрофический боковой склероз).

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции (например, полипептиды FST-Fc) согласно изобретению используются в процессе лечения мышечной дистрофии. Термин "мышечная дистрофия" означает группу дегенеративных мышечных заболеваний, характеризующихся постепенным истощением и разрушением скелетных мышц, а иногда сердечных мышц и мышц дыхательных путей. Мышечные дистрофии представляют собой генетические расстройства, характеризующиеся прогрессирующим истощением и слабостью мышц, которые начинаются с микроскопических изменений в мышцах. В процессе дегенерации мышц происходит снижение мышечной силы у человека. Репрезентативными мышечными дистрофиями, которые могут быть подвергнуты лечению по схеме, включающей введение рассматриваемых фоллистиновых полипептидов, являются мышечная дистрофия Дюшенна (МДД), мышечная дистрофия Беккера (МДБ), мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса (МДЭД), мышечная дистрофия газового и плечевого поясов (МДТП), плече-лопаточная лицевая мышечная дистрофия (ПЛЛД или ПЛЛМД) (также известная как болезнь Ландузи-Дежерина), миотоническая дистрофия (МТД) (также известная как болезнь Стейнерта), окулофарингеальная мышечная дистрофия (OPMD), дистальная мышечная дистрофия (ДД), застойная мышечная дистрофия (ЗМД).

Мышечная дистрофия Беккера (МДБ) была впервые описана французским неврологом Гийомом Бенджамином Амандом Дюшенном в 1860-х годах. Мышечная дистрофия Беккера (МДБ) была названа по имени немецкого врача Петера Эмиля Беккера, который впервые описал этот вариант МДБ в 1950-е годы. МДБ является одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний у мужчин, и такое заболевание встречается у каждого одного из 3500 подростков. МДБ возникает в результате разрушения гена дистрофина, локализованного на коротком плече хромосомы X. Поскольку у мужчин имеется только одна копия хромосомы X, то у них присутствует только одна копия гена дистрофина. В отсутствие белка дистрофина мышца легко разрушается в процессе циклов сокращения и релаксации. Хотя на ранней стадии развития мышечного заболевания происходит компенсация путем регенерации мышц, однако, впоследствии, мышечные клетки-предшественники не могут противостоять такому поражению, и здоровая мышца заменяется нефункциональной фиброзированной тканью.

МДБ возникает в результате различных мутаций в гене дистрофина. У пациентов с МДБ присутствует некоторое количество дистрофина, но этот дистрофии либо присутствует в недостаточном количестве, либо является низкокачественным. Как и у пациентов с МДД, присутствие некоторого количества дистрофина у пациентов с МДБ защищает мышцы от дегенерации либо на недостаточном уровне, либо на короткое время.

Так, например, проведенные недавно исследования показали, что блокирование или элиминация функции GDF8 (лиганда фоллистинина) *in vivo* могут быть эффективно достигнуты путем устранения, по меньшей мере, некоторых симптомов у пациентов с МДД и МДБ. Таким образом, рассматриваемые фоллистиновые полипептиды могут действовать как ингибиторы (антагонисты) GDF8 и представляют собой альтернативные средства для блокирования функций GDF8 *in vivo* у пациентов с МДД и МДБ.

Аналогичным образом, рассматриваемые фоллистиновые полипептиды представляют собой эффективное средство для увеличения мышечной массы при других патологических состояниях, для лече-

ния которых необходимо такое увеличение мышечной массы. Так, например, АБС, также называемый болезнью Луи Герига (болезнь двигательных нейронов), представляет собой хроническое, неизлечимое и прогрессирующее расстройство ЦНС, поражающее двигательные нейроны, которые являются компонентами ЦНС и осуществляют взаимодействие головного мозга со скелетными мышцами. При АБС двигательные нейроны разрушаются и, в конечном счете, погибают, и хотя головной мозг у такого человека обычно полностью сохраняет свою функцию и активность, однако его команды контроля двигательных функций никогда не передаются мышцам. АБС, в основном, страдают люди в возрасте от 40 до 70 лет. Двигательные нейроны, которые первыми подвергаются ослаблению, являются нейроны, ответственные за движения рук или ног. Пациенты с АБС могут испытывать затруднения при ходьбе, а также они могутронять вещи и падать, при этом у них наблюдаются дефекты речи и непроизвольный смех или плач. В конечном счете, мышцы конечностей начинают атрофироваться в результате бездействия. Слабость этих мышц может усиливаться, в результате чего человек может передвигаться только на коляске или вообще не может встать с постели. Большинство пациентов с АБС умирает от респираторной недостаточности или от осложнений после искусственной вентиляции легких, протекающих подобно пневмонии, через 3-5 лет после начала заболевания.

Болезнь Шарко-Мари-Тута (ШМТ) может быть подвергнута лечению путем местного введения описанных здесь фоллистатиновых полипептидов. ШМТ принадлежит к группе наследственных расстройств, поражающих периферические нервы и приводящих к прогрессирующей, а чаще всего к локальной слабости и дегенерации мышц. Характерными признаками такого заболевания, которое может быть подвергнуто лечению, являются деформация стопы (очень сильно деформированная дугообразная стопа); отвислая стопа (неспособность поставить стопу в горизонтальное положение); "шаркающая" походка (шарканье ногами по полу при ходьбе из-за отвислости стопы); потеря мышечной массы нижней части голени; онемение стопы; трудности в поддержании равновесия или слабость в плечах и в руках.

Пациенты с различными системными мышечными расстройствами, включая миастенический синдром Ламберта-Итона (МСЛИ); метаболические дистрофии; атрофию мышц спинного мозга (АМСМ); дерматомиозит (ДМ); дистальную мышечную дистрофию (ДД); дистрофию Эмери-Дрейфуса (МДЭД); эндокринные миопатии; атаксию Фридриха (АФ); наследственные миопатии; митохондриальную миопатию; тяжелую миастению (ТМ) и полимиозит (ПМ), могут быть подвергнуты лечению описанными здесь фоллистатиновыми полипептидами.

Пациенты с послеоперационной или дисфункциональной атрофией одной или нескольких мышц, включая атрофию мышц после перелома бедра, общего протезирования тазобедренного сустава (ОПТС), общего протезирования коленного сустава (ОПКС) или хирургической операции на влагалище мышц-вращателей, могут быть подвергнуты лечению описанными здесь фоллистатиновыми полипептидами.

Пациенты, страдающие различными другими заболеваниями, вызывающими потерю мышечной ткани или истощение мышц, включая мышечные расстройства у пациентов с такими заболеваниями, как саркопения; кахексия; раковые заболевания различных типов, включая рак легких, толстой кишки и яичника; длительное искусственное дыхание; диабет; хроническая обструктивная болезнь легких; почечная недостаточность; сердечная недостаточность; травмы; и расстройства периферических нервов, могут быть подвергнуты лечению описанными здесь фоллистатиновыми полипептидами.

Увеличение мышечной массы, индуцированное фоллистатиновым полипептидом, может также давать благоприятный эффект у пациентов, страдающих заболеваниями, ассоциированными с истощением мышц. При этом наблюдаются обратная корреляция экспрессии GDF8 и отсутствие жировой массы у человека, и такое повышение уровня экспрессии гена GDF8 ассоциируется с потерей массы у пациентов с синдромом истощения при СПИД'е. При ингибировании функции GDF8 у пациентов со СПИД'ом может наблюдаться ослабление, а то и полное устранение, по меньшей мере, некоторых симптомов СПИД'а, что способствует значительному улучшению качества жизни пациентов со СПИД'ом.

5. Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения соединения (например, фоллистатиновые полипептиды) согласно изобретению получают в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Так, например, фоллистатиновый полипептид может быть введен отдельно или как компонент фармацевтического препарата (то есть терапевтической композиции). Рассматриваемые здесь соединения могут быть приготовлены для их введения человеку или животному любым стандартным способом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ терапии согласно изобретению включает местное или системное введение композиции или локальное введение посредством имплантата или другого приспособления. Очевидно, что терапевтическую композицию, используемую в настоящем изобретении, вводят в апирогенной физиологически приемлемой форме. Кроме того, желательно, чтобы такая композиция была инкапсулирована или введена в вязкой форме для доставки в нужный участок ткани (например, в кость, хрящ, мышцу, жировую ткань или нейроны), например в участок пораженной ткани. Местное введение может быть подходящим для заживления ран и репарации ткани. Помимо фоллистатиновых полипептидов, в описанную выше композицию могут быть также включены, но необязательно, терапевтически приемлемые агенты, и такие агенты могут, альтернативно или дополнительно, введены одновременно или последовательно вместе с рассматриваемыми соединениями (например, с

фоллистатиновыми полипептидами), применяемыми в способах согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции согласно изобретению могут включать матрицу, способную доставлять одно или более терапевтических соединений (например, фоллистатиновых полипептидов) в нужный участок ткани, с образованием структуры, необходимой для развития ткани и обладающей оптимальной способностью ресорбироваться в организме. Так, например, эта матрица может обеспечивать медленное высвобождение фоллистатиновых полипептидов. Такие матрицы могут состоять из материалов, которые в настоящее время используются в других методах терапии с использованием имплантатов.

Выбор материала матрицы зависит от ее биологической совместимости, биологической разлагаемости, механических свойств, косметически приемлемого внешнего вида и межфазных свойств. Соответствующая форма препарата зависит от конкретной цели применения рассматриваемых композиций. Матрицы, подходящие для получения композиций, могут быть биоразлагаемыми и могут включать среду определенного химического состава, такую как сульфат кальция, трифосфат кальция, гидроксиапатит, полимолочная кислота и полиангидриды. Другими подходящими материалами являются биоразлагаемые материалы определенного биологического состава, такие как костный или кожный коллаген. Другие матрицы состоят из чистых белков или компонентов внеклеточного матрикса. Другие подходящие матрицы являются биологически неразлагаемыми и могут включать среду определенного химического состава, такую как спеченный гидроксиапатит, биологическое стекло, алюминаты или другие керамические изделия. Матрицы могут состоять из комбинаций любых соединений вышеупомянутых типов, таких как полимолочная кислота и гидроксиапатит или коллаген и трифосфат кальция. Состав биокерамических материалов может быть изменен, например, они могут содержать фосфат кальция-алюминат и могут быть подвергнуты обработке для изменения размера пор, размера частиц, формы частиц и биологической разлагаемости.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции, применяемые в способах согласно изобретению, могут быть введены перорально, например в форме капсул, каше, гранул, таблеток, пастилок (полученных с добавлением ароматизаторов, а обычно сахарозы и аравийской или трагакантовой камеди), порошков, гранул, растворов или суспензий в водной или безводной жидкости, эмульсий типа "масло в воде" или "вода в масле", эликсира или сиропа, лекарственных конфеток (полученных на инертной основе, такой как желатин или глицерин или сахароза и аравийская камедь) и/или жидкости для полоскания рта и т.п., где каждый из этих компонентов содержит предварительно определенное количество агента, используемого в качестве активного ингредиента. Агент может быть также введен в виде болюса, лекарственной кашки или пасты.

В твердых лекарственных формах для перорального введения (в капсулах, таблетках, пилюлях, драже, порошках, гранулах и т.п.), одно или более терапевтических соединений согласно изобретению могут быть смешаны с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дифосфат кальция, и/или с любым из нижеследующих компонентов, таких как (1) наполнители или разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующие агенты, такие как, например, карбоксиметилцеллулоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; (3) увлажнятели, такие как глицерин; (4) дезинтегрирующие агенты, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) агенты, замедляющие растворение, такие как парафин; (6) ускорители абсорбции, такие как четвертичные соединения аммония; (7) смачивающие агенты, такие как цетиловый спирт и моностеарат глицерина; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонит; (9) замасливатели, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; и (10) красители. В случае капсул, таблеток и пилюль фармацевтические композиции могут также содержать забуферивающие агенты. Твердые композиции аналогичного типа могут быть также использованы в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах, полученных с использованием наполнителей, таких как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли.

Жидкими лекарственными формами для перорального введения являются фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмulsionи, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Жидкие лекарственные формы, помимо активного ингредиента, могут содержать инертные разбавители, обычно используемые для этих целей, такие как вода или другие растворители, солюбилизирующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, масло из семян хлопчатника, арахисовое масло, кукурузное масло, масло из проросших семян, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирной кислоты и сорбитана и их смеси. Композиции для перорального введения, помимо инертных разбавителей, могут также содержать адьюванты, такие как смачивающие, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, отдушки, красители, ароматизаторы и консерванты.

Суспензии, помимо активных соединений, могут содержать суспендирующие агенты, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбитана, микро-

кристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакантовая камедь и их смеси.

Некоторые описанные здесь композиции могут быть введены местно либо в кожу, либо в слизистую оболочку. Препараты для местного введения могут также включать один или более агентов широкого ряда, которые, как известно, являются эффективными в качестве усилителей пенетрации в кожу или в роговой слой. Примерами таких агентов являются 2-пирролидон, N-метил-2-пирролидон, диметилацетамид, диметилформамид, пропиленгликоль, метиловый или изопропиловый спирт, диметилсульфоксид и азон. Для получения косметически приемлемого препарата в композицию могут быть также включены дополнительные агенты. Примерами таких агентов являются жиры, воски, масла, красители, ароматизаторы, консерванты, стабилизаторы и поверхностно-активные вещества. В композицию могут быть также включены кератолитические агенты, такие как агенты, известные специалистам. Примерами таких агентов являются салициловая кислота и сера.

Лекарственными формами для местного или чрезкожного введения являются порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластиры и ингаляторы. Активное соединение может быть смешано в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, если это необходимо. Мази, пасты, кремы и гели, помимо рассматриваемого соединения согласно изобретению (например, фоллистинового полипептида), могут содержать наполнители, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакантовая камедь, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевая кислота, тальк и оксид цинка или их смеси.

Порошки и спреи, помимо рассматриваемого соединения, могут содержать наполнители, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция, полиамидный порошок или смеси этих веществ. Сpreи могут также содержать специально приготовленные пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или более фоллистиновых полипептидов в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или безводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильными порошками, которые перед их применением могут быть разведены стерильными инъецируемыми растворами или дисперсиями, и которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, сообщающие препаратуре изотоничность с кровью рассматриваемого реципиента, или супендирующие агенты или загустители. Примерами подходящих водных и безводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях согласно изобретению, являются вода, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Соответствующая текучесть может поддерживаться, например, с использованием материала для нанесения покрытий, такого как лецитин, путем сохранения требуемого размера частиц в случае дисперсий, и с использованием поверхностно-активных веществ.

Композиции согласно изобретению могут также содержать адьюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. В композиции могут быть также включены изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъецируемой фармацевтической формы может быть достигнута путем включения агентов, замедляющих абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Следует отметить, что схема введения доз может быть определена лечащим врачом с учетом различных факторов, модифицирующих действие рассматриваемых соединений согласно изобретению (например, фоллистиновых полипептидов). Указанные различные факторы зависят от типа заболевания, подвергаемого лечению.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение также относится к генотерапии для *in vivo* продуцирования фоллистиновых полипептидов или других соединений, описанных в настоящей заявке. Терапевтический эффект такой терапии достигается путем введения последовательностей фоллистиновых полинуклеотидов в пораженные клетки или в ткани пациента с перечисленными выше расстройствами. Доставка последовательностей фоллистиновых полинуклеотидов может быть достигнута с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, такого как химерный вирус или коллоидная дисперсионная система. Для терапевтической доставки последовательностей фоллистиновых полинуклеотидов предпочтительно использовать липосомы для доставки.

Различными вирусными векторами, которые могут быть использованы для проведения рассматриваемой здесь генотерапии, являются адено-вирус, вирус герпеса, вирус коровьей оспы или предпочтительно РНК-вирус, такой как ретровирус. Предпочтительно ретровирусным вектором является производное мышного или птичьего ретровируса. Примерами ретровирусных векторов, в которые может быть встроен один чужеродный ген, являются, но не ограничиваются ими, вирус мышного лейкоза Mo-

лони (MoMuLV), вирус мышиной саркомы Харви (HaMuSV), мышиный вирус опухоли молочной железы (MuMTV) и вирус саркомы Payса (RSV). Ряд дополнительных ретровирусных векторов могут включать множество генов. Все эти векторы могут переносить или встраивать ген селективного маркера для идентификации и продуцирования трансдуцированных клеток. Ретровирусные векторы могут быть сделаны мишеньспецифическим путем присоединения, например, сахара, гликолипида или белка. Предпочтительное нацеливание осуществляют с использованием антитела. Специалисту в данной области известно, что специфические полинуклеотидные последовательности могут быть встроены в ретровирусный геном или присоединены к вирусной оболочке для направленной специфической доставки ретровирусного вектора, содержащего фоллистатиновый полинуклеотид. В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения вводят в клетки/ткани костей, хряща, мышц или нейронов.

Альтернативно, клетки тканевой культуры могут быть непосредственно трансфенированы плазмидами, кодирующими ретровирусные структурные гены gag, pol и env, стандартным методом трансфекции, опосредуемой фосфатом кальция. Затем эти клетки трансфицируют векторной плазмидой, содержащей представляющие интерес гены. Полученные клетки высвобождают ретровирусный вектор в культуральную среду.

Другой системой направленной доставки фоллистатиновых полинуклеотидов является коллоидная дисперсионная система. Коллоидными дисперсионными системами являются макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросфера, сферы и липидные системы, включающие эмульсии типа "масло в воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Предпочтительной коллоидной системой согласно изобретению являются липосомы. Липосомы представляют собой искусственные мембранные везикулы, которые могут быть использованы в качестве носителей для доставки *in vitro* и *in vivo*. РНК, ДНК и интактные вирионы могут быть инкапсулированы в водном носителе и могут быть доставлены в клетки в биологически активной форме (см., например, Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Методы эффективного переноса генов с использованием липосомного носителя известны специалистам (см., например, Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988). В состав липосомы обычно входит комбинация фосфолипидов, а чаще всего комбинация фосфолипидов вместе со стероидами, а в частности с холестерином. При этом могут быть также использованы и другие фосфолипиды или липиды. Физические свойства липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов.

Примерами липидов, которые могут быть использованы для продуцирования липосом, являются фосфатидилевые соединения, такие как фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, сфинголипиды, цереброзиды и ганглиозиды. Репрезентативными фосфолипидами являются яичный фосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин и дистеароилфосфатидилхолин. Нацеливание липосом может быть также осуществлено, например, посредством органоспецифического, клеткоспецифического и органеллоспецифического связывания, и такой метод известен специалистам.

Примеры

Настоящее изобретение будет более понятным из описания нижеследующих примеров, которые приводятся лишь в целях иллюстрации некоторых вариантов осуществления изобретения. Эти примеры не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения.

Пример 1. Получение белков "фоллистатин-Fc".

Известно, что фоллистатин (FST) обладает сложными фармакокинетическими свойствами. Сообщалось, что короткая форма FST(288) является более эффективной для блокирования лигандов и связывания с клеточными поверхностями, что частично обусловлено присутствием немаскированного гепаринсвязывающего домена. Считается, что FST(315) является менее эффективным и плохо связывается с клеточной поверхностью, что обусловлено присутствием богатой кислотными остатками С-концевой аминокислотной последовательности, которая нейтрализует гепаринсвязывающий домен. В литературе сообщается, что фоллистатин обычно обладает системным действием. Заявителями была сделана попытка определить, можно ли получить фоллистатиновую конструкцию, которая действовала бы только в тканях, в которые ее вводят путем инъекции (например, в мышечную ткань), и может ли димеризация фоллистатина способствовать повышению способности фоллистатина сохраняться в ткани. Известно, что Fc-домены иммуноглобулинов образуют димеры. Для исследования влияния гибридных белков "фоллистатин-Fc" на мышечные и другие ткани и для оценки влияния Fc-опосредуемой димеризации на фармакокинетические свойства фоллистатиновых полипептидов авторами настоящего изобретения были получены гибридные белки, содержащие FST(288) или FST(315), которые были присоединены к Fc-части IgG1. Для присоединения каждого фоллистатинового полипептида к Fc-части была выбрана линкерная последовательность TGGG.

Для каждой конструкции FST-IgG1 рассматриваются три нижеследующих лидерных последовательности:

- (1) Лидерная последовательность фоллистатина
MVRARRHQPGLCLLCLLQFMEDRSAQA (SEQ ID NO: 23)
- (2) Тканевый активатор плазминогена (TPA)
MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 24)
- (3) Меллитин пчелиного меда (HBML)
MKFLVNVALVFMWYISYIYA (SEQ ID NO: 25).

Выбранные белки FST-Fc включают лидерную последовательность фоллистатина. Гибридный белок FST(288)-IgG1 имеет непроцессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

Непроцессированный FST(288)-IgG1 (SEQ ID NO: 26)

```
MVRARHQPGGLCLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNNGAPNCIPCKETCENVDCGPGKCKRMNNKPRCVCAPDCS
NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRGRCSDLCPDSKSDPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGS
CNTGGGHTCPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.
```

Зрелый FST(288)-IgG1 (SEQ ID NO:27)

```
GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNNGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNNKPRCVCAPDCSNTWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSDLCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNTGGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK.
```

Начальная последовательность "GN" может быть удалена с получением следующего полипептида (SEQ ID NO: 28):

```
CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNNGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNNKPRCVCAPDCSNTWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSDLCPDSKSDP
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNTGGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
QKSLSLSPGK.
```

Гибрид FST(315)-IgG1 имеет непроцессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

Непроцессированный FST(315)-IgG1 (SEQ ID NO:29)

```
MVRARHQPGGLCLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNNGAPNCIPCKETCENVDCGPGKCKRMNNKPRCVCAPDCS
NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRGRCSDLCPDSKSDPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGS
CNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEWTGGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK.
```

Зрелый FST(315)-IgG1 (SEQ ID NO:30)

```
GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNNGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNNKPRCVCAPDCSNTWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSDLCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW
TGGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
EVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
TVVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.
```

Начальная последовательность "GN" может быть удалена с получением следующего полипептида (SEQ ID NO: 31):

```

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC1P
CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNPKRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVQYQGRCKKTCDVFPCGSSTCVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEP
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISILEWTG
GGTHTCPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPFVKNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK.

```

Белки были экспрессированы в клетках HEK-293 или СНО и очищены из кондиционирований среды путем фильтрации и хроматографии на белке А. В некоторых случаях может быть также проведена анионообменная и гидрофобная хроматография и/или гель-фильтрация.

Активность белка оценивали по связыванию с активином А или GDF11. В каждом случае белки связывались с K_D менее чем 10 пМ.

Пример 2. Влияние системного введения белков "фоллистатин-Fc" на мышечную массу и силу у мышей.

Заявителями была определена способность белков "фоллистатин-Fc" повышать мышечную массу и мышечную силу у мышей дикого типа после системного введения. Гибридный белок ActRIIB-Fc, который, как хорошо известно, стимулирует значительное увеличение истощенной мышечной массы всего организма, использовали в качестве позитивного контроля.

Мышам C57BL/6 два раза в неделю в течение четырех недель вводили дозу (10 мг/кг; подкожно (s.c.)) белка FST(288)-IgG1, человеческого белка FST(315)-IgG1 или человеческого белка ActRIIB-Fc. Мышей подвергали сканированию всего организма методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для определения процента изменения массы истощенной ткани всего организма. У ActRIIB-Fc-обработанных мышей наблюдалось значительное (приблизительно 35%-ное) увеличение массы истощенной ткани по сравнению с контрольной группой, которой вводили носитель. У мышей, обработанных белком FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1, наблюдалось небольшое увеличение массы истощенной ткани по сравнению с контрольной группой (см. фиг. 2). По окончании исследования мышцы грудной клетки, передней большеберцовой кости (ТА), икроножной мышцы и мышцы бедра иссекали и взвешивали. Как показано на фиг. 4, ActRIIB-Fc-обработка приводила к значительному увеличению мышечной массы у мышей каждой из этих групп. В противоположность этому в группах обработки белками FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1 наблюдалось незначительное увеличение мышечной массы либо такого увеличения вообще не наблюдалось (см. фиг. 2).

Во время проведения данного исследования мышей также оценивали на изменение мышечной силы. Мышечную силу мышей измеряли по показанию растяжения датчика силы для оценки силы захвата передними конечностями. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что у мышей, обработанных белком ActRIIB-Fc, наблюдалось увеличение мышечной силы. В противоположность этому в группах обработки белками FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1 такого увеличения мышечной силы не наблюдалось (см. фиг. 3).

В целом, полученные результаты подтвердили, что системное введение ActRIIB-Fc приводит к значительному увеличению мышечной массы и мышечной силы у мышей по сравнению с животными контрольной группы, обработанными носителем. В противоположность этому у мышей, обработанных гибридным белком "фоллистатин-Fc", FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1, наблюдалось незначительное увеличение мышечной массы или мышечной силы либо такого увеличения вообще не наблюдалось. Поэтому очевидно, что гибридные белки "фоллистатин-Fc" при их системном введении *in vivo* оказывают незначительное влияние или вообще не оказывают никакого влияния на мышечную массу или силу.

Пример 3. Влияние системного введения белков "фоллистатин-Fc" на уровни FSH.

Фоллистатин охарактеризовывали, главным образом, на его способность связываться с членами суперсемейства сигнальпераедающих белков TGF-бета. В частности, известно, что фоллистатин является сильным ингибитором активности активина. Активин представляет собой сильный индуктор продуцирования фолликулостимулирующего гормона (FSH). FSH синтезируется и секретируется гонадотрофами передней доли гипофиза и регулирует рост и развитие организма в процессе полового созревания и различные репродуктивные процессы в организме. Для оценки системных эффектов полипептидов "фоллистатин-Fc" определяли их влияние на уровни FSH.

Обработка (10 мг/кг; подкожно (s.c.)) два раза в неделю) белком FST(288)-IgG1 давала уровни лекарственного средства в кровотоке, составляющие 3,836 ($\pm 5,22$) мкг/мл. Аналогичная обработка белком FST(315)-IgG1 приводила к значительному повышению уровней лекарственного средства в сыворотке до 19,31 ($\pm 1,85$) мкг/мл. Как показано на фиг. 5, FST(288)-IgG1 не оказывал какого-либо значительного вли-

яния на уровни FSH в сыворотке, что позволяет предположить, что такая схема обработки белком FST(288)-IgG1 не оказывает значительного влияния на системную активность активина. В противоположность этому обработка белком FST(315)-IgG1 приводила к снижению уровней FSH в кровотоке, что указывало на то, что системное введение FST(315)-IgG1 оказывает влияние на системную передачу сигнала активина. В целом, эти данные показали, что использование фоллистатинового полипептида с немаскированным гепаринсвязывающим доменом, присоединенным к Fc-домену, который опосредует димеризацию, такому как FST(288)-IgG1, приводит к получению белка, обладающего минимальной системной активностью или вообще не обладающего такой активностью, тогда как FST(315)-IgG1, имеющий маскированный гепаринсвязывающий домен, может быть использован для достижения системных эффектов.

Пример 4. Влияние местного введения белков "фоллистатин-Fc" на мышечную массу и мышечную силу у мышей.

Хотя после системного введения не наблюдалось каких-либо значимых эффектов, однако авторами настоящего изобретения был проведен аналогичный эксперимент для того, чтобы определить, может ли фоллистатин использоваться для локального увеличения мышечной массы и мышечной силы у мышей дикого типа после внутримышечного (i.m.) введения.

Мышам C57BL/6 два раза в неделю в течение четырех недель вводили дозу (50 мкг; i.m., в правую икроножную мышцу) белка FST(288)-Fc, белка FST(315)-Fc или человеческого белка ActRIIB-Fc. В различные периоды времени после первой обработки мышей подвергали сканированию всего организма методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для определения процента изменения массы истощенной ткани всего организма. У ActRIIB-Fc-обработанных мышей наблюдалось значительное увеличение массы истощенной ткани по сравнению с контрольной группой, которой вводили носитель. В противоположность этому ни у мышей, обработанных белком FST(288)-IgG1, ни у мышей, обработанных белком FST(315)-IgG1, не наблюдалось какого-либо значимого увеличения массы истощенной ткани по сравнению с контрольной группой. По окончании исследования правую икроножную мышцу, в которую вводили инъекцию, и левую контраполатеральную икроножную мышцу иссекали и взвешивали. Как показано на фиг. 6, ActRIIB-Fc-обработка приводила к значительному увеличению мышечной массы в правой и левой икроножных мышцах по сравнению с мышами, обработанными носителем. Следовательно, ActRIIB-Fc оказывал системное действие с увеличением мышечной массы даже при его местном введении в одну мышцу. В противоположность этому FST(288)-Fc и FST(315)-Fc способствовали значительному увеличению мышечной массы правой икроножной мышцы, но не оказывали какого-либо влияния на массу контраполатеральной мышцы. Таким образом, было установлено, что в противоположность эффектам, наблюдавшимся после системного введения, фоллистатиновый белок действует как сильный стимулятор мышечной массы при его непосредственном введении в мышцу. Кроме того, было обнаружено, что фоллистатин имеет явное преимущество по сравнению с другими агентами, подобными ActRIIB-Fc, и это преимущество заключается в его влиянии на мышечную массу в конкретном участке введения, что указывает на то, что фоллистатин может быть использован для направленной терапии выбранной мышцы или группы мышц, при которой он не будет оказывать какого-либо влияния на рост/активность нормальных окружающих мышц, не являющихся мишениями.

Заявителями был также проведен тщательный мониторинг уровней гибридного белка "фоллистатин-Fc" в сыворотке после i.m. введения. Обработка белком FST(288)-IgG1 давала уровни лекарственно-го средства в кровотоке, составляющие 0,156 ($\pm 0,245$) мкг/мл. Аналогичная обработка белком FST(315)-IgG1 давала немного более высокие уровни лекарственного средства в сыворотке, составляющие 3,58 ($\pm 1,73$) мкг/мл, но эти уровни были значительно ниже, чем уровни, наблюдавшиеся после системного введения FST(315)-IgG1. Поскольку белки FST(288)-IgG1 и FST(315)-IgG1 присутствовали в сыворотке пациента на более низких уровнях после i.m.-инъекции, чем это наблюдалось после системного введения FST(288)-IgG1 (то есть 3,836 ($\pm 5,22$) мкг/мл), то, как и ожидалось, ни один из белков FST(288)-IgG1 и FST(315)-IgG1 не оказывал какого-либо значительного влияния на уровни FSH в сыворотке, поскольку FST(288)-IgG1 вообще не давал такого эффекта после s.c.-введения (см. фиг. 5). В соответствии с этим эти данные показали, что белки FST(288)-IgG1 и FST(315)-IgG1 должны быть особенно подходящими для стимуляции увеличения мышечной массы у пациентов, которые являются репродуктивно активными или у которых желательно минимизировать влияние на репродуктивную систему.

Аналогичный эксперимент был проведен для построения дозозависимой кривой влияния FST(288)-IgG1 на мышечную массу и ее качество. Мышам C57BL/6 в правую икроножную мышцу вводили i.m. различные дозы (1-100 мкг) два раза в неделю в течение четырех недель. Как показано на фиг. 8, селективное увеличение массы мышц, в которые вводили инъекцию, по сравнению с контраполатеральной мышцей, становилось еще больше по мере повышения доз FST(288)-IgG1. Исследование поперечных срезов мышц показало, что увеличение мышечной массы является результатом гипертрофии мышечных волокон, но не гипоплазии.

Пример 5. Fc-оптимизация локально действующих гибридных белков "фоллистатин-Fc".

Как описано в предыдущих примерах, гибридные белки "фоллистатин-Fc", такие как FST(288)-IgG1

и FST(315)-IgG1, обладают низким системным действием на мышцы и другие ткани, а в частности, FST(288)-формы белка являются активными на участке инъекции. Авторами настоящей заявки и другими авторами было установлено, что FST(288) связывается с клетками посредством гепаринсвязывающего домена, и такое связывание может быть устранено путем введения экзогенного гепарина. Впоследствии авторами настоящей заявки было определено, что домены иммуноглобулина, которые, как известно, опосредуют влияние CDC и ADCC на клетки-мишени, могут вызывать повреждение клеток, обработанных гепаринсвязывающими фоллистатиновыми конструкциями. Такое повреждение может проявляться как иммунная реакция в ткани-мишени или как снижение роста такой ткани. Поэтому авторами настоящей заявки были получены варианты фоллистатиновых полипептидов с использованием Fc-части человеческого IgG2, являющейся примером константного домена IgG, который, как известно, обладает пониженной способностью стимулировать CDC- и ADCC-активность. Этот эксперимент был проведен для того, чтобы определить, могут ли гибридные белки "фоллистатин-Fc", полученные с использованием альтернативных Fc-доменов, сохранять свою активность.

Авторами настоящего изобретения были получены гибридные белки, содержащие FST(288) или FST(315), присоединенные к Fc-части IgG2. Для присоединения каждого фоллистатинового полипептида к Fc-части была выбрана линкерная последовательность TGGG.

Для каждой конструкции FST-IgG2 была использована лидерная последовательность фоллистатина.

Гибрид FST(288)-IgG2 имеет непроцессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

Непроцессированный FST(288)-IgG2 (SEQ ID NO:32)

результатом PCT (200) IgG1 (2E 1E 1G1 2E 1),
MVRARHQPGGLCLLLLLLQCQMEDRSAQAGNCWLQRQAKNGRCQVLYKTTELSEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKKCRMNKKPRCVCAPDCS
NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAHLRKATCLLGRS1GLAYEGKCIAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGS
CNTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPVQFNWYDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVHMHEALHNHTQKSLSLSPGK.

Этот белок кодируется нижеследующей последовательностью нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 1):

44)

Зрелый FST(288)-IgG2 (SEQ ID NO: 33)

GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IPCKETCENVDGPGKKCRMNKKNPKRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRCIPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKLWDFKVGGRCSLCDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVVGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ
DWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKKGQPREPVITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQOPENNYKTTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK.

Начальная последовательность "GN" может быть удалена с получением следующего полипептида (SEQ ID NO: 34):

CWLRLQAKNGRCQVLYKTELSEKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
CKETCENVDGPGKKCRMNKKNPKRVCAPDCSNTWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
HLRKATCLLGRS1GLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKLWDFKVRGRGRCSLCDELCPDSKSDEP
VCASDNATYAYASECAMKEAACSSGVLLEVKGSGCNTGGVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNNAKTKPREQFNSTRVSVLTVVHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKQGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPNENNYKTPPMLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK.

Гибрид FST(315)-IgG2 имеет непроцессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

Непроцессированный FST(315)-IgG2 (SEQ ID NO: 35)

MVRARHQPGGLCLLLLLLQCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTG
RLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKKCRMNKKNPKRCVCAPDCS
NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVRGRRCSCLDDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGS
CNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEWTGGGVECPPCPAPPVAGPSVLFPPPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVGDGVHEHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGOPENNYKTTPPMLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWOOGNVFSCSVMEHALHNHYTOKSLSLSPGK

Этот белок кодируется нижеследующей последовательностью нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 45):

Зрелый FST(315)-IgG2 (SEQ ID NO: 36)

```

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPCVGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRCPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISDETEEEEDEDQDYSFPISSILEW
TGGGVECPCPAPPVAGPSVFLFPPPKDTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

```

Начальная последовательность "GN" может быть удалена с получением следующего полипептида (SEQ ID NO: 37)

```

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPCVGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRCPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCPDSKSDP
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISDETEEEEDEDQDYSFPISSILEWTG
GGVECPCPAPPVAGPSVFLFPPPKDTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

```

Белки были экспрессированы в клетках HEK-293 или СНО и очищены из кондиционирований среды путем фильтрации и хроматографии на белке А. В некоторых случаях может быть также проведена анионообменная и гидрофобная хроматография и/или гель-фильтрация.

Активность белка оценивали по связыванию с активином А или GDF11. В каждом случае белки связывались с K_D менее чем 10 пМ. Эти данные показали, что могут быть получены и экспрессированы гибридные белки "фоллистатин-IgG2", сохраняющие пикомолярную лигандсвязывающую активность.

Пример 6. Оптимизированные локально действующие гибридные белки "фоллистатин-Fc".

Для оценки возможности получения оптимального гибридного белка "фоллистатин-IgG2" был получен ряд белков от FST(288) и до FST(315) с различными С-концевыми усечениями. Один из этих белков с усечением аминокислот до положения 291, обозначаемый FST(291), обнаруживал превосходные экспрессионные свойства по сравнению с другими формами и сохранял нужную гепаринсвязывающую активность, несмотря на то, что он содержал небольшую часть маскирующего домена FST(315). Эта форма была присоединена к Fc-части человеческих IgG1 и IgG2 с получением FST (291)-IgG1 и FST(291)-IgG2.

Для присоединения каждого фоллистатинового полипептида к Fc-части была выбрана линкерная последовательность TGGG.

Для каждой конструкции FST-IgG1 была использована лидерная последовательность фоллистатина.

Гибрид FST(291)-IgG1 имеет непроцессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

Непроцессированный FST(291)-IgG1 (SEQ ID NO:38)

```

MVRARHQPGGLCLLLLCQFMDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCS
NITWKGPCVGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRCPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCAASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGS
CNSISTGGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNW
YVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
QPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

```

Зрелый FST(291)-IgG1 (SEQ ID NO: 39)

```

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPCVGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRCPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISTGGGHTCPCPAPELLGGPSVFL
FPPPKDTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAQGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK.

```

Начальная последовательность "GN" может быть удалена с получением следующего полипептида (SEQ ID NO: 40)

CWLROAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
CKETCENVDCPGKCKRMNKKNPKRCVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRGRCSLCDELCPDSKSDEP
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISTGGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK.

Гибрид FST(291)-IgG2 имеет непроцессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

Непроцессированный FST(291)-IgG2 (SEQ ID NO:41)

MVRARHQPGGLLLLLLICQFMEDRSAQAGNCWLROAKNGRCQVLYKTELSKEECSTG
RLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKCKRMNKKNPKRCVCAPDCS
NITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVRGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGS
CNSISTGGGVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
DGVEVHNNAKTPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVMLSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Зрелый FST(291)-IgG2 (SEQ ID NO: 42)

GNCWLROAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IPCKETCENVDCPGKCKRMNKKNPKRCVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRGRCSLCDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISTGGGVECPCPAPPVAGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNNAKTPREEQFNSTFRVSVLTV
VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK.

Начальная последовательность "GN" может быть удалена с получением следующего полипептида (SEQ ID NO: 43):

CWLROAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
CKETCENVDCPGKCKRMNKKNPKRCVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRGRCSLCDELCPDSKSDEP
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISTGGGVECPCPAPPVAGPSVFLFPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNNAKTPREEQFNSTFRVSVLTVH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTPVMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK.

Белки были экспрессированы в клетках HEK-293 или CHO и очищены из кондиционированной среды путем фильтрации и хроматографии на белке A. В некоторых случаях может быть также проведена анионообменная и гидрофобная хроматография и/или гель-фильтрация.

Активность белка оценивали по связыванию с активином A или GDF11. В каждом случае белки связывались с K_D менее чем 10 пМ.

Были проведены дополнительные эксперименты по усечению белков для идентификации конструкций "фоллистатин-IgG2", содержащих линкер TGGG и обладающих оптимальной активностью связывания с лигандом и гепарином, в результате чего был получен полипептид, обладающий высокой активностью, значительной тенденцией к удерживанию в обработанной ткани и низкой тенденцией к продуцированию воспалительной или иммунной реакции в обработанной ткани. Для этих целей был получен ряд конструкций, обозначаемых FST(278)-IgG2, FST(284)-IgG2, FST(291)-IgG2 и FST(303)-IgG2, и эти конструкции сравнивали друг с другом и с FST(288)-IgG2 и FST-(315)-IgG2. Активность связывания с гепари-

ном оценивали путем определения уровня высвобождения белка из клеток в присутствии или в отсутствие гепарина, а затем эту активность оценивали с помощью ELISA и выражали как отношение белка, высвобождаемого в присутствии гепарина, к белку, высвобождаемому в отсутствие гепарина. Как показано ниже в таблице, все FST(278)-IgG2, FST(284)-IgG2, FST(288)-IgG2 и FST(291)-IgG2 имели аналогичные отношения, составляющие 3,00-4,00, а FST(303)-IgG2 и FST(315)-IgG2 имели отношения 1,50 и 0,97 соответственно. Это означает, что при включении большего количества аминокислот в положения от 291 до 303 гепаринсвязывающая активность резко снижается.

Гепаринсвязывающая активность усеченных белков FST-IgG2

Конструкция FST-IgG2	Отношение (белок, высвобождаемый в присутствии гепарина/белок, высвобождаемый в отсутствии гепарина)
FST(278)-IgG2	4,18
FST(284)-IgG2	3,54
FST(288)-IgG2	3,34
FST(291)-IgG2	3,00
FST(303)-IgG2	1,50
FST(315)-IgG2	0,97

Были проведены клеточные анализы гена-репортера (анализ гена-репортера A-204, описанные в WO/2006/012627) для оценки ингибирования активина и GDF11. Как показано ниже в таблице, конструкции, последовательность которых простирается за положение аминокислоты 288, обладают повышенной способностью ингибировать лиганд.

Ингибирование лиганда усеченными белками FST-IgG2

Конструкция FST-IgG2	IC50 (нг/мл) для активина A	IC50 (нг/мл) для GDF-11
FST(278)-IgG2	521	91
FST(284)-IgG2	369	123
FST(288)-IgG2	30	41
FST(291)-IgG2	20	26
FST(303)-IgG2	2	18
FST(315)-IgG2	10	15

В целом, данные по связыванию с гепарином и ингибированию лиганда показали, что конструкции FST-IgG2, полученные с использованием линкера TGGG или линкеров аналогичной длины (например, линкеров размером 1-10 аминокислот и необязательно 3-8 аминокислот), которые заканчиваются аминокислотами в положении 291-302, обнаруживали повышенную способность ингибировать лиганд по сравнению с FST(288)-IgG2 и повышенную гепаринсвязывающую активность по сравнению с FST(315)-IgG2, и что FST(291)-IgG2 представляет собой белок, обладающий оптимальным эффектом при местном введении.

Пример 7. Эффективность действия белка FST(291)-IgG2 на мышечную массу и силу при его местном введении мышам.

Авторами настоящей заявки была оценена активность оптимизированного белка FST(291)-IgG2, используемого для локального увеличения мышечной массы и силы у мышей дикого типа после внутримышечного (i.m.) введения.

Мышам C57BL/6 два раза в неделю в течение четырех недель вводили дозу (100 мкг в 50 мкл; i.m., в правую икроножную мышцу) носителя (PBS), белка FST(291)-IgG2 или контрольного Fc, происходящего от IgG1. По окончании исследования левую икроножную мышцу, в которую вводили инъекцию, и правую контралатеральную икроножную мышцу иссекали и взвешивали. Как показано на фиг. 9, FST(291)-IgG2-обработка приводила к значительному увеличению мышечной массы в левой икроножной мышце по сравнению с мышами, обработанными носителем, причем в контралатеральной мышце, какого-либо эффекта не наблюдалось. Кроме того, мышцы грудной клетки и бедра взвешивали, и в этих мышцах после введения носителя или FST(291)-IgG2 каких-либо изменений не обнаруживалось. Следовательно, FST(291)-IgG2 имел ограниченное действие на группу мышц после инъекции этого белка, причем системный эффект был минимальным или вообще отсутствовал. Были проведены аналогичные эксперименты, но при этом инъекции вводили в другие группы мышц, включая трехглавую мышцу и переднюю мышцу большеберцовой кости. В каждом случае наблюдалась селективная гипертрофия мышцы, в которую вводили инъекцию.

Были проведены дополнительные эксперименты для непосредственного сравнения влияния FST(288)-IgG1 и FST(291)-IgG2 на рост мышечной массы. Хотя обе конструкции стимулировали значительное увеличение мышечной массы в мышце, в которую вводили инъекцию (в икроножную мышцу), однако FST(291)-IgG2 вызывал приблизительно 42%-е увеличение мышечной массы в мышце, в которую

вводили инъекцию, по сравнению с контралатеральной мышцей, а FST(288)-IgG1 вызывал приблизительно 22%-е увеличение мышечной массы в мышце, в которую вводили инъекцию, по сравнению с контралатеральной мышцей.

В соответствии с этим полученные данные показали, что белок FST(291)-IgG2 представляет собой соединение, которое является оптимальным для стимуляции роста мышечной массы в мышце-мишени у пациентов, нуждающихся в этом.

Пример 8. Эффективность действия белка FST(291)-IgG2 на мышечную массу при его местном введении мышам с моделью мышечной дистрофии Дюшенна.

Влияние FST(291)-IgG2 на мышечную массу оценивали у мышей с моделью мышечной дистрофии Дюшенна. Мыши линии C57BL/10ScCN-Dmd^{mdx}/J (mdx) представляют собой хорошо известную модель человеческой мышечной дистрофии Дюшенна (Bulfield, Siller et al. 1984; Partridge 2013).

Два отдельных исследования были проведены на мышах mdx и на мышах дикого типа линии C57BL/10SnJ (WT). В первом исследовании обработку (либо белком FST (291)-IgG2, либо контрольным носителем) начинали, когда мыши достигли 6-недельного возраста. Во втором исследовании обработку начинали, когда мыши достигли 4-недельного возраста. В обоих исследованиях мышам внутримышечно вводили 100 мкг FST(291)-IgG2 в левую икроножную мышцу два раза в неделю в фиксированном объеме 50 мкл на инъекцию. 4-недельных мышей обрабатывали в течение 4 недель, а 6-недельных мышей обрабатывали в течение 6 недель.

После аутопсии икроножные мышцы голени (левой), в которую вводили инъекцию, и контралатеральной голени (правой), в которую не вводили инъекцию, вырезали и взвешивали. В обоих исследованиях икроножные мышцы животных дикого типа (WT), в которые были введены инъекции белка FST(291)-IgG2, имели значительно больший размер, чем мышцы контралатеральной голени, а также мышцы контрольного животного, которому вводили носитель ($P<0,001$). В обоих исследованиях икроножная мышца, обработанная белком FST(291)-IgG2, имела значительно больший размер, нормализованный по массе тела, по сравнению с размером контралатеральной мышцы у животных, обработанных носителем, то есть у мышей WT и мышей mdx. Увеличение мышечной массы было несколько более выраженным у молодых животных, чем у старых животных. С точки зрения увеличения процента по отношению к контралатеральной мышце FST(291)-IgG2 давал увеличение мышечной массы на 34,2 и 16,4% у 6-недельных мышей WT и мышей mdx соответственно. Было обнаружено, что мышечная масса у 4-недельных мышей WT и мышей mdx увеличивалась на 62,8 и 41,8% соответственно.

Эти данные свидетельствуют о том, что блокирование передачи сигнала активина/миостатина после внутримышечного введения FST(291)-IgG2 два раза в неделю приводило к увеличению мышечной массы у мышей с моделью мышечной дистрофии. Такое увеличение мышечной массы было локальным и наблюдалось только в мышце, в которую вводили инъекцию.

Введение посредством ссылки.

Все упомянутые здесь публикации и патенты во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки так, как если бы каждая отдельная публикация или каждый отдельный патент были конкретно и отдельно введены посредством ссылки.

Хотя в настоящем описании обсуждаются конкретные варианты осуществления изобретения, однако эти варианты приводятся лишь в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения. Многие варианты будут более понятны специалистам исходя из данного описания и формулы изобретения, прилагаемой ниже. Полный объем настоящего изобретения определен в указанной формуле изобретения вместе с полным объемом эквивалентов и в описании изобретения вместе с указанными вариантами.

Список последовательностей

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> Способы и композиции для лечения расстройств с использованием фоллистиновых полипептидов

<130> PHPH-065-W01

<140> PCT/US2015/034245

<141> 2015-06-04

<150> 62/007,908

<151> 2014-06-04

<160> 47

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 317

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys
20 25 30Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr
35 40 45Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser
50 55 60Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile
65 70 75 80Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu
85 90 95Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn
100 105 110Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys
115 120 125Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala
130 135 140Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr
145 150 155 160Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser
165 170 175Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys
180 185 190Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly
195 200 205Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr
210 215 220Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile
225 230 235 240Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys
245 250 255Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu
260 265 270Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn
275 280 285Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser
290 295 300Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn
305 310 315

<210> 2
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
 1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
 20 25 30

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
 35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
 50 55 60

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
 65 70 75 80

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
 85 90 95

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
 100 105 110

Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
 115 120 125

Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys
 130 135 140

Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys
 145 150 155 160

Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr
 165 170 175

Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg
 180 185 190

Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly
 195 200 205

Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly
 210 215 220

Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu
 225 230 235 240

Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala
 245 250 255

Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala
 260 265 270

Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn
 275 280 285

<210> 3
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys
 20 25 30

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr
 35 40 45

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser
 50 55 60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile
 65 70 75 80

035455

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu
85 90 95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn
100 105 110

Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys
115 120 125

Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala
130 135 140

Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr
145 150 155 160

Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser
165 170 175

Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys
180 185 190

Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly
195 200 205

Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr
210 215 220

Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile
225 230 235 240

Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys
245 250 255

Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu
260 265 270

Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn
275 280 285

Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser
290 295 300

Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser
305 310 315 320

Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe
325 330 335

Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp
340

<210> 4
<211> 315
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
50 55 60

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
65 70 75 80

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
85 90 95

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
100 105 110

Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu

115

120

125

Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys
 130 135 140

Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys
 145 150 155 160

Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr
 165 170 175

Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg
 180 185 190

Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly
 195 200 205

Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly
 210 215 220

Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu
 225 230 235 240

Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala
 245 250 255

Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala
 260 265 270

Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn
 275 280 285

Ser Ile Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp
 290 295 300

Tyr Ser Phe Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp
 305 310 315

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn Lys Pro Arg
 1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(2)

<223> Любая основная аминокислота, а в частности, Lys или Arg

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Любая аминокислота

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Любая основная аминокислота, а в частности, Lys или Arg

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(6)

<223> Любая аминокислота

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(8)

<223> Любая основная аминокислота, а в частности Lys или Arg

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Любая аминокислота

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Любая основная аминокислота, а в частности Lys или Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Любая аминокислота

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Любая основная аминокислота, а в частности Lys или Arg

<400> 6
 Xaa
 1 5 10

<210> 7
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 7
 Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
 1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
 20 25 30

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
 35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
 50 55 60

Thr
 65

<210> 8
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 8
 Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys
 1 5 10 15

Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr
 20 25 30

Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met
 35 40 45

Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr
 50 55 60

<210> 9
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 9
 Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys
 1 5 10 15

Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr
 20 25 30

Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu
 35 40 45

Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val
 50 55 60

Gln Tyr Gln Gly Arg Cys
 65 70

<210> 10
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

035455

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 10
Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr
20 25 30

Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met
35 40 45

Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys
50 55 60

Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys
65 70 75 80

Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp
85 90 95

Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys
100 105 110

Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln
115 120 125

Tyr Gln Gly Arg Cys
130

<210> 11
<211> 206
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 11
Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys
1 5 10 15
Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr
20 25 30

Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met
35 40 45

Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys
50 55 60

Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys
65 70 75 80

Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp
85 90 95

Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys
100 105 110

Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln
115 120 125

Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro
130 135 140

Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys
145 150 155 160

Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu
165 170 175

Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys
180 185 190

Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys
195 200 205

<210> 12
<211> 145
<212> PRT

035455

<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 12
Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys
1 5 10 15

Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr
20 25 30

Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu
35 40 45

Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val
50 55 60

Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro
65 70 75 80

Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val
85 90 95

Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu
100 105 110

Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys
115 120 125

Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys
130 135 140

Cys
145

<210> 13
<211> 208
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 13
Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr
20 25 30

Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met
35 40 45

Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys
50 55 60

Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys
65 70 75 80

Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp
85 90 95

Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys
100 105 110

Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln
115 120 125

Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly
130 135 140

Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr
145 150 155 160

Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys
165 170 175

Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala
180 185 190

Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys

195

200

205

<210> 14
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys
 20 25 30
 Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr
 35 40 45
 Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser
 50 55 60
 Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile
 65 70 75 80
 Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu
 85 90 95
 Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn
 100 105 110
 Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys
 115 120 125
 Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala
 130 135 140
 Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr
 145 150 155 160
 Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser
 165 170 175
 Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys
 180 185 190
 Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly
 195 200 205
 Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr
 210 215 220
 Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile
 225 230 235 240
 Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys
 245 250 255
 Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu
 260 265 270
 Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn
 275 280 285
 Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser
 290 295 300
 Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser
 305 310 315 320
 <210> 15
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
 1 5 10 15
 Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
 20 25 30
 Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys

035455

35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
50 55 60

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
65 70 75 80

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
85 90 95

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
100 105 110

Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
115 120 125

Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys
130 135 140

Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys
145 150 155 160

Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr
165 170 175

Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg
180 185 190

Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly
195 200 205

Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly
210 215 220

Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu
225 230 235 240

Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala
245 250 255

Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala
260 265 270

Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn
275 280 285

Ser Ile Ser
290

<210> 16
<211> 289
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr
20 25 30

Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met
35 40 45

Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys
50 55 60

Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys
65 70 75 80

Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp
85 90 95

Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys
100 105 110

Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln
115 120 125

035455

Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly
130 135 140

Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr
145 150 155 160

Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys
165 170 175

Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala
180 185 190

Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys
195 200 205

Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys
210 215 220

Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp
225 230 235 240

Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp
245 250 255

Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser
260 265 270

Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile
275 280 285

Ser

<210> 17
<211> 225
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
20 25 30

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
35 40 45

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
65 70 75 80

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
85 90 95

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
100 105 110

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
115 120 125

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

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145 150 155 160

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
165 170 175

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
195 200 205

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

035455

210 215 220

Lys 225

<210> 18
<211> 223
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
35 40 45

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
50 55 60

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
65 70 75 80

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
85 90 95

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
100 105 110

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

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
130 135 140

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
145 150 155 160

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
165 170 175

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 19
<211> 1032
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 19
atggccgcg cgaggcacca gccgggtggg cttggctcc tgctgtgtc gctctgccag 60
ttcatggagg accgcagtgc ccaggctggg aactgtgtc tccgtcaagc gaagaacggc 120
cgctggcagg tcctgtacaa gaccgaactg agcaaggagg agtgctgcgac caccggccgg 180
ctgagcacct cgtggaccga ggaggacgtg aatgacaaca cactttcaa gtggatgatt 240
ttcaacgggg gcgcccccaa ctgcaccccc ttgaaagaaa cgtgtgagaa cgtggactgt 300
ggacctggga aaaaatggcc aatgacaaca aagaacaac cccgtcggt ctggccccc 360
gattgttcca acatcacctg gaagggtcca gtctcggtc tggatggaa aacctaccgc 420
aatgaatgtg cactcctaaa ggcaagatgt aaagagcagc cagaactgg agtccagtac 480
caaggcagat gtaaaaagac ttgtcggtat gtttctgtc caggcagctc cacatgtgt 540
gtggaccaga ccaataatgc ctactgtgtc acctgtatgc ggatttgcg agagccgt 600
tcctctgagc aatatctctg tggaatgtat gggtcacct actccagtgc ctgccaccc 660
agaaaggctt cctgtgtc gggcagatctt atggatggat cctatgtgggaa aaggtgtatc 720
aaagcaatgtt cctgtgtc acgtgtggaa aaaaatgtttt atggatgtt 780
aaggatggaa gaggccgtgt ttccctgtgt gatgtgtgtt gcccgtacag taagtccgt 840
gagcgtgtt gtccgtgtca caatgtccact tatgtccatgc agtgcgttcatgtt 900

gcctgctcct caggtgtct actggaaagta aagcactccg gatcttgcaa ctccatttcg	960
gaagacacccg aggaagagga ggaagatgaa gaccaggact acagcttcc tataatctct	1020
attcttagatg gg	1032
<210> 20	
<211> 945	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 20	
ggaaactgct ggctccgtca agcgaagaac gcccgtgcc aggtcctgta caagaccgaa	60
ctgagcaagg aggagtgcgtc cagcacccgc cggctgagca cctcgtggac cgaggaggac	120
gtgaatgaca acacacttt caagtggatg atttcaacg ggggcgcccc caactgcac	180
ccctgtaaag aaacgtgtga gaacgtggac tggggacatg ggaaaaaatg cccaatgaaac	240
aagaagaaca aaccccgctg cgtctgcgc cccgattgtt ccaacatcac ctggagggt	300
ccagtctgcg ggctggatgg gaaaacctac cgcaatgaat gtgcactcct aaaggcaaga	360
tgtaaagagc agccagaact ggaagtccag taccaggca gatgtaaaaa gacttgtcgg	420
gtatgtttct gtccaggcag ctccacatgt gtgggtggacc agaccaataa tgccactgt	480
gtgaccctgta atcggatttg cccagagccct gtttccctgtc agcaataatct ctgtggaaat	540
gtggaggatca cctactccag tgccctgcac ctgagaaagg ctacccgtc gctggcaga	600
tctattggat tagccatgt gggaaagtgt atcaaagca agtccctgtg agatatccag	660
tgcactgtg ggaaaaaatg ttatggat ttcaagggtt ggagaggccg gtgtccctc	720
tgtgtatgac tggccctgtc cagtaagtgc gatgagccct tctgtgcac tgacaatgcc	780
acttatgcca gcgaggtgtc catgaaggaa gctgcgtc cctcagggt gctactggaa	840
gtaaagcact ccggatctt caactccatt tcggaaagaca ccggaggaga ggaggaagat	900
gaagaccagg actacagctt tcctatatct tctattctag agtgg	945
<210> 21	
<211> 864	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 21	
ggaaactgct ggctccgtca agcgaagaac gcccgtgcc aggtcctgta caagaccgaa	60
ctgagcaagg aggagtgcgtc cagcacccgc cggctgagca cctcgtggac cgaggaggac	120
gtgaatgaca acacacttt caagtggatg atttcaacg ggggcgcccc caactgcac	180
ccctgtaaag aaacgtgtga gaacgtggac tggggacatg ggaaaaaatg cccaatgaaac	240
aagaagaaca aaccccgctg cgtctgcgc cccgattgtt ccaacatcac ctggagggt	300
ccagtctgcg ggctggatgg gaaaacctac cgcaatgaat gtgcactcct aaaggcaaga	360
tgtaaagagc agccagaact ggaagtccag taccaggca gatgtaaaaa gacttgtcgg	420
gtatgtttct gtccaggcag ctccacatgt gtgggtggacc agaccaataa tgccactgt	480
gtgaccctgta atcggatttg cccagagccct gtttccctgtc agcaataatct ctgtggaaat	540
gtggaggatca cctactccag tgccctgcac ctgagaaagg ctacccgtc gctggcaga	600
tctattggat tagccatgt gggaaagtgt atcaaagca agtccctgtg agatatccag	660
tgcactgtg ggaaaaaatg ttatggat ttcaagggtt ggagaggccg gtgtccctc	720
tgtgtatgac tggccctgtc cagtaagtgc gatgagccct tctgtgcac tgacaatgcc	780
acttatgcca gcgaggtgtc catgaaggaa gctgcgtc cctcagggt gctactggaa	840
gtaaagcact ccggatctt caac	864
<210> 22	
<211> 876	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 22	
ggaaactgct ggctccgtca agcgaagaac gcccgtgcc aggtcctgta caagaccgaa	60
ctgagcaagg aggagtgcgtc cagcacccgc cggctgagca cctcgtggac cgaggaggac	120
gtgaatgaca acacacttt caagtggatg atttcaacg ggggcgcccc caactgcac	180
ccctgtaaag aaacgtgtga gaacgtggac tggggacatg ggaaaaaatg cccaatgaaac	240
aagaagaaca aaccccgctg cgtctgcgc cccgattgtt ccaacatcac ctggagggt	300
ccagtctgcg ggctggatgg gaaaacctac cgcaatgaat gtgcactcct aaaggcaaga	360
tgtaaagagc agccagaact ggaagtccag taccaggca gatgtaaaaa gacttgtcgg	420

gatttttctt gtcaggcag ctcacatgt gtggggacc agaccaataa tgcctactgt 480
 gtgacctgtatcggattt cccagagctt gcttccttg agcaatatct ctgtggaaat 540
 gatggagtca cctactccag tgcctgcac ctgagaaagg ctacccgtc gctggggcaga 600
 tctattgtat tagcctatgt gggaaagtgt atcaaagcaa agtccctgtga agatatccag 660
 tgcactggat ggaaaaatgt tttatggat ttcaagggtt ggagaggccg gtgtccctc 720
 tgtgatgagc tgtgcccgtga cagaatgtcg gatgagccgtc tctgtgcag tgacaatgcc 780
 acttatgccca gcgagtggtc catgaaggaa gctgcctgtc cctcagggtgt gctactggaa 840
 gtaaaggactt ccggatcttgc caactccatt tcgttg 876

<210> 23
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Неизвестная последовательность

<220>
 <223> Описание неизвестной последовательности: последовательность фоллистинового полипептида

<400> 23
 Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu 1
 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala
 20 25

<210> 24
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Неизвестная последовательность

<220>
 <223> Описание неизвестной последовательности: активатор тканевого плазминогена (TPA)

<400> 24
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly 1
 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro
 20

<210> 25
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Apis mellifera

<400> 25
 Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile 1
 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
 20

<210> 26
 <211> 546
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 26
 Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu 1
 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys
 20 25 30

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr
 35 40 45

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser
 50 55 60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile
 65 70 75 80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu
 85 90 95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn
 100 105 110

035455

Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys
115 120 125

Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala
130 135 140

Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr
145 150 155 160

Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser
165 170 175

Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys
180 185 190

Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly
195 200 205

Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr
210 215 220

Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile
225 230 235 240

Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys
245 250 255

Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu
260 265 270

Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn
275 280 285

Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser
290 295 300

Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Thr Gly Gly
305 310 315 320

Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
325 330 335

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
340 345 350

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
355 360 365

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
370 375 380

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
385 390 395 400

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
405 410 415

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
420 425 430

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
435 440 445

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
450 455 460

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
465 470 475 480

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
485 490 495

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
500 505 510

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
515 520 525

035455

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
530 535 540

Gly Lys
545

<210> 27
<211> 517
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид
<400> 27
Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
50 55 60

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
65 70 75 80

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
85 90 95

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
100 105 110

Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
115 120 125

Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys
130 135 140

Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys
145 150 155 160

Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr
165 170 175

Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg
180 185 190

Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly
195 200 205

Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly
210 215 220

Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu
225 230 235 240

Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala
245 250 255

Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala
260 265 270

Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn
275 280 285

Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
290 295 300

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
305 310 315 320

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
325 330 335

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
340 345 350

035455

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
355 360 365

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
370 375 380

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
385 390 395 400

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
405 410 415

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
420 425 430

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
435 440 445

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
450 455 460

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
465 470 475 480

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
485 490 495

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
500 505 510

Leu Ser Pro Gly Lys
515

<210> 28
<211> 515
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 28
Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr
20 25 30

Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met
35 40 45

Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys
50 55 60

Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys
65 70 75 80

Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp
85 90 95

Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys
100 105 110

Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln
115 120 125

Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly
130 135 140

Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr
145 150 155 160

Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys
165 170 175

Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala
180 185 190

Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys

035455

195

200

205

Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys
210 215 220

Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp
225 230 235 240

Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp
245 250 255

Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser
260 265 270

Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Thr Gly
275 280 285

Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
290 295 300

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
305 310 315 320

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
325 330 335

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
340 345 350

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
355 360 365

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
370 375 380

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
385 390 395 400

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
405 410 415

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
420 425 430

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
435 440 445

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
450 455 460

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
465 470 475 480

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
485 490 495

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
500 505 510

Pro Gly Lys
515

<210> 29
<211> 573
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 29
Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys
20 25 30

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr
35 40 45

035455

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser

50 55 60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile

65 70 75 80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu

85 90 95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn

100 105 110

Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys

115 120 125

Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala

130 135 140

Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr

145 150 155 160

Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser

165 170 175

Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys

180 185 190

Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly

195 200 205

Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr

210 215 220

Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile

225 230 235 240

Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys

245 250 255

Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu

260 265 270

Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn

275 280 285

Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser

290 295 300

Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser

305 310 315 320

Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe

325 330 335

Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Thr Gly Gly Thr His Thr Cys

340 345 350

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

355 360 365

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

370 375 380

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

385 390 395 400

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

405 410 415

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

420 425 430

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

435 440 445

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

450 455 460

035455

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
465 470 475 480

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
485 490 495

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
500 505 510

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
515 520 525

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
530 535 540

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
545 550 555 560

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565 570

<210> 30
<211> 544
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 30
Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
50 55 60

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
65 70 75 80

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
85 90 95

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
100 105 110

Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
115 120 125

Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys
130 135 140

Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys
145 150 155 160

Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr
165 170 175

Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg
180 185 190

Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly
195 200 205

Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly
210 215 220

Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu
225 230 235 240

Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala
245 250 255

Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala
260 265 270

Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn
275 280 285

Ser Ile Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp
290 295 300

Tyr Ser Phe Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Thr Gly Gly Gly Thr
305 310 315 320

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
325 330 335

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
340 345 350

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
355 360 365

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
370 375 380

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
385 390 395 400

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
405 410 415

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
420 425 430

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
435 440 445

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
450 455 460

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
465 470 475 480
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
485 490 495

Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
500 505 510

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
515 520 525

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
530 535 540

<210> 31
<211> 542
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 31
Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr
20 25 30

Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met
35 40 45

Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys
50 55 60

Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys
65 70 75 80

Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp
85 90 95

Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys
100 105 110

035455

Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln
115 120 125

Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly
130 135 140

Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr
145 150 155 160

Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys
165 170 175

Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala
180 185 190

Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys
195 200 205

Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys
210 215 220

Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp
225 230 235 240

Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp
245 250 255

Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser
260 265 270

Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile
275 280 285

Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser
290 295 300

Phe Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Thr Gly Gly Thr His Thr
305 310 315 320

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
325 330 335

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
340 345 350

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
355 360 365

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
370 375 380

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
385 390 395 400

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
405 410 415

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
420 425 430

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
435 440 445

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
450 455 460

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
465 470 475 480

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
485 490 495

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
500 505 510

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
515 520 525

035455

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
530 535 540

<210> 32
<211> 544
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 32
Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys
20 25 30

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr
35 40 45

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser
50 55 60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile
65 70 75 80

Phe Asn Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu
85 90 95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn
100 105 110

Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys
115 120 125

Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala
130 135 140

Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr
145 150 155 160

Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser
165 170 175

Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys
180 185 190

Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly
195 200 205

Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr
210 215 220

Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile
225 230 235 240

Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys
245 250 255

Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu
260 265 270

Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn
275 280 285

Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser
290 295 300

Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Thr Gly Gly
305 310 315 320

Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
325 330 335

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
340 345 350

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

035455

355 360 365

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
370 375 380

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
385 390 395 400

Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
405 410 415

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
420 425 430

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
435 440 445

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
450 455 460

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
465 470 475 480

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
485 490 495

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
500 505 510

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
515 520 525

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
530 535 540

<210> 33
<211> 515
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид
<400> 33
Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
50 55 60

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
65 70 75 80

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
85 90 95

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
100 105 110

Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
115 120 125

Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys
130 135 140

Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys
145 150 155 160

Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr
165 170 175

Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg
180 185 190

Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly
195 200 205

Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly
210 215 220

Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu
225 230 235 240

Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala
245 250 255

Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala
260 265 270

Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn
275 280 285

Thr Gly Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
290 295 300

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
305 310 315 320

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
325 330 335

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
340 345 350

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
355 360 365

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
370 375 380

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
385 390 395 400
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
405 410 415

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
420 425 430

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
435 440 445

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
450 455 460

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
465 470 475 480

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
485 490 495

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
500 505 510

Pro Gly Lys
515

<210> 34
<211> 513
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 34
Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr
20 25 30

Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met
35 40 45

035455

Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys

50 55 60

Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys

65 70 75 80

Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp

85 90 95

Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys

100 105 110

Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln

115 120 125

Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly

130 135 140

Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr

145 150 155 160

Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys

165 170 175

Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala

180 185 190

Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys

195 200 205

Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys

210 215 220

Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp

225 230 235 240

Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp

245 250 255

Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser

260 265 270

Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Thr Gly

275 280 285

Gly Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro

290 295 300

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

305 310 315 320

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

325 330 335

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

340 345 350

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val

355 360 365

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

370 375 380

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

385 390 395 400

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

405 410 415

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

420 425 430

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

435 440 445

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu

450 455 460

035455

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
465 470 475 480

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
485 490 495

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
500 505 510

Lys

<210> 35
<211> 571
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 35
Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys
20 25 30

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr
35 40 45

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser
50 55 60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile
65 70 75 80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu
85 90 95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn
100 105 110
Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys
115 120 125

Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala
130 135 140

Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr
145 150 155 160

Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser
165 170 175

Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys
180 185 190

Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly
195 200 205

Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr
210 215 220

Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile
225 230 235 240

Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys
245 250 255

Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu
260 265 270

Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn
275 280 285

Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser
290 295 300

Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser
305 310 315 320

035455

Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe
325 330 335

Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Thr Gly Gly Val Glu Cys Pro
340 345 350

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
355 360 365

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
370 375 380

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
385 390 395 400

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
405 410 415

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
420 425 430

Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
435 440 445

Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
450 455 460

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
465 470 475 480

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
485 490 495

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
500 505 510

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
515 520 525

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
530 535 540

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
545 550 555 560

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565 570

<210> 36
<211> 542
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 36
Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
50 55 60

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
65 70 75 80

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
85 90 95

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
100 105 110

Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu

035455

115	120	125
Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys		
130	135	140
Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys		
145	150	155
160		
Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr		
165	170	175
Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg		
180	185	190
Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly		
195	200	205
Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly		
210	215	220
Lys Lys Cys Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala		
225	230	235
240		
Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala		
245	250	255
Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala		
260	265	270
Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn		
275	280	285
Ser Ile Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp		
290	295	300
Tyr Ser Phe Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Thr Gly Gly Val		
305	310	315
320		
Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe		
325	330	335
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
340	345	350
Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
355	360	365
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
370	375	380
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val		
385	390	395
400		
Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
405	410	415
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
420	425	430
Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
435	440	445
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
450	455	460
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
465	470	475
480		
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp		
485	490	495
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
500	505	510
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
515	520	525
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Pro Gly Lys		

035455

530 535 540

<210> 37
<211> 540
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 37
Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr
20 25 30

Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met
35 40 45

Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys
50 55 60

Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys
65 70 75 80

Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp
85 90 95

Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys
100 105 110

Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln
115 120 125

Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly
130 135 140

Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr
145 150 155 160

Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys
165 170 175

Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala
180 185 190

Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys
195 200 205

Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys
210 215 220

Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp
225 230 235 240

Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp
245 250 255

Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser
260 265 270

Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile
275 280 285

Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser
290 295 300

Phe Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Thr Gly Gly Val Glu Cys
305 310 315 320

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
325 330 335

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
340 345 350

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
355 360 365

035455

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
370 375 380

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
385 390 395 400

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
405 410 415

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
420 425 430

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
435 440 445

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
450 455 460

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
465 470 475 480

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
485 490 495

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
500 505 510

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
515 520 525

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
530 535 540

<210> 38
<211> 549
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 38
Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys
20 25 30

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr
35 40 45

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser
50 55 60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile
65 70 75 80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu
85 90 95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn
100 105 110

Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys
115 120 125

Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala
130 135 140

Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr
145 150 155 160

Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser
165 170 175

Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys
180 185 190

Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly
195 200 205

Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr
210 215 220

Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile
225 230 235 240

Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys
245 250 255

Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu
260 265 270

Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn
275 280 285

Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser
290 295 300

Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser
305 310 315 320

Thr Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
325 330 335

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
340 345 350

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
355 360 365

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
370 375 380

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
385 390 395 400

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
405 410 415

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
420 425 430

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
435 440 445

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
450 455 460

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
465 470 475 480

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
485 490 495

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
500 505 510

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
515 520 525

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
530 535 540

Leu Ser Pro Gly Lys
545

<210> 39
<211> 520
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 39
Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30

035455

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
50 55 60

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
65 70 75 80

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
85 90 95

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
100 105 110

Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
115 120 125

Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys
130 135 140

Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys
145 150 155 160

Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr
165 170 175

Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg
180 185 190

Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly
195 200 205

Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly
210 215 220

Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu
225 230 235 240

Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala
245 250 255

Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala
260 265 270

Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn
275 280 285

Ser Ile Ser Thr Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
290 295 300

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
305 310 315 320

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
325 330 335

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
340 345 350

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
355 360 365

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
370 375 380

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
385 390 395 400

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
405 410 415

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
420 425 430

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
435 440 445

035455

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
450 455 460

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
465 470 475 480

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
485 490 495

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
500 505 510

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
515 520

<210> 40
<211> 518
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 40
Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr
20 25 30

Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met
35 40 45

Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys
50 55 60

Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys
65 70 75 80

Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp
85 90 95

Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys
100 105 110

Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln
115 120 125

Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly
130 135 140

Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr
145 150 155 160

Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys
165 170 175

Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala
180 185 190

Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys
195 200 205

Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys
210 215 220

Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp
225 230 235 240

Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp
245 250 255

Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser
260 265 270

Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile
275 280 285

Ser Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

035455

290 295 300

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
305 310 315 320

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
325 330 335

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
340 345 350

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
355 360 365

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
370 375 380

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
385 390 395 400

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
405 410

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
420 425 430

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
435 440 445

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
450 455 460

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
465 470 475 480

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
485 490 495

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
500 505 510

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
515

<210> 41
<211> 547
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 41
Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys
20 25 30

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr
35 40 45

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser
50 55 60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile
65 70 75 80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu
85 90 95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn
100 105 110

Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys
115 120 125

Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala
130 135 140

035455

Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr
145 150 155 160

Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser
165 170 175

Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys
180 185 190

Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly
195 200 205

Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr
210 215 220

Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile
225 230 235 240

Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys
245 250 255

Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu
260 265 270

Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn
275 280 285

Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser
290 295 300

Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser
305 310 315 320

Thr Gly Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
325 330 335

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
340 345 350

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
355 360 365

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
370 375 380

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
385 390 395 400

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
405 410 415

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
420 425 430

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
435 440 445

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
450 455 460

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
465 470 475 480

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
485 490 495

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
500 505 510

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
515 520 525

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
530 535 540

Pro Gly Lys
545

<210> 42
 <211> 518
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид
 <400> 42
 Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
 1 5 10 15
 Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
 20 25 30
 Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
 35 40 45
 Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
 50 55 60
 Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
 65 70 75 80
 Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
 85 90 95
 Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
 100 105 110
 Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
 115 120 125
 Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys
 130 135 140
 Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys
 145 150 155 160
 Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr
 165 170 175
 Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg
 180 185 190
 Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly
 195 200 205
 Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly
 210 215 220
 Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu
 225 230 235 240
 Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala
 245 250 255
 Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala
 260 265 270
 Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn
 275 280 285
 Ser Ile Ser Thr Gly Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 290 295 300
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 305 310 315 320
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 325 330 335
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 340 345 350
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln Phe Asn
 355 360 365
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 370 375 380

035455

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
385 390 395 400

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
405 410 415

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
420 425 430

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
435 440 445

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
450 455 460

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
465 470 475 480

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
485 490 495

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
500 505 510

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
515

<210> 43
<211> 516
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 43
Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr
20 25 30

Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met
35 40 45

Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys
50 55 60

Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys
65 70 75 80

Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp
85 90 95

Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys
100 105 110

Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln
115 120 125

Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly
130 135 140

Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr
145 150 155 160

Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys
165 170 175

Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala
180 185 190

Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys
195 200 205

Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys
210 215 220

Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp
225 230 235 240

035455

Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp
245 250 255

Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser
260 265 270

Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile
275 280 285

Ser Thr Gly Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
290 295 300

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
305 310 315 320

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
325 330 335

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
340 345 350

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
355 360 365

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
370 375 380

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
385 390 395 400

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
405 410 415

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
420 425 430

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
435 440 445

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
450 455 460

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
465 470 475 480

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
485 490 495

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
500 505 510

Ser Pro Gly Lys
515

<210> 44
<211> 1641
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 44
atggtcgcg cgagggcaca gcccggggg cttggcctcc tgctgtgtc gctctgccc 60
ttcatggagg acccgagtgc ccaggctggg aactgtggc tccgtcaagc gaagaacggc 120
cgctgccagg tcctgtacaa gaccgaactg agcaaggagg agtgctgcag caccggccgg 180
ctgagcacct cgtggaccga ggaggacgtg aatgacaaca cactctcaa gtggatgatt 240
ttcaacgggg gcgcccccaa ctgcaccccc ttgaaagaaa cgtgtgagaa cgtggactgt 300
ggacctggga aaaaatccgg aatgaaacaag aagaacaaac cccgctgcgt ctgcgcccc 360
gattgttcca acatcacctg gaagggtcca gtctgcggc tggatggaa aacctaccgc 420
aatgaatgtg cactcctaaa ggcaagatgt aaagaggcagc cagaactgga agtccagtac 480
caaggcagat gtaaaaagac ttgtcgggat gttttctgtc caggcagctc cacatgtgt 540
gtggaccaga ccaataatgc ctactgtgtg acctgtatac ggatttgcggc agagccctgt 600
tcctctgagc aataatctctg tggaaatgt gggttacctt actccatgc ctggccacatgt 660

aaaaaggcta cttgcgtcgat	720
aaagcaaagt cctgtgaaga	780
aagggttggg gaggccggtg	840
ttccctctgt gatgactgt	900
gcccgcacag taagtcggat	960
gagccgtctt gtgcgttgat	1020
caatgcactat tatgcccgc	1080
agtgtggcat gaaggaaatgc	1140
gcctgtccctt cagggtgtct	1200
acttggaaatg aagcactccg	1260
gatcttgcacaa caccgggtgt	1320
ggcgtcgact gcccaccgtg	1380
cccagcacca cctgtggcg	1440
gaccgtcagt ctcccttc	1500
cccccaaaac ccaaggacac	1560
cctctatgtatc tccccggacc	1620
ctggaggatc gtgcgtggat	1680
gtgcataatg ccaagacaaa	1720
gcccacggag gaggcattca	1780
acagcacgtt ccgtgtggat	1840
acggtcctca cggcgttgatc	1900
ccaggacttgg ctgaaaggca	1960
aggaggataaaatgtt	2020
gtgcgttgatc cttttttttt	2080
ttttttttttt tttttttttt	2140
ttttttttttt tttttttttt	2200
ttttttttttt tttttttttt	2260
ttttttttttt tttttttttt	2320
ttttttttttt tttttttttt	2380
ttttttttttt tttttttttt	2440
ttttttttttt tttttttttt	2500
ttttttttttt tttttttttt	2560
ttttttttttt tttttttttt	2620
ttttttttttt tttttttttt	2680
ttttttttttt tttttttttt	2740
ttttttttttt tttttttttt	2800
ttttttttttt tttttttttt	2860
ttttttttttt tttttttttt	2920
ttttttttttt tttttttttt	2980
ttttttttttt tttttttttt	3040
ttttttttttt tttttttttt	3100
ttttttttttt tttttttttt	3160
ttttttttttt tttttttttt	3220
ttttttttttt tttttttttt	3280
ttttttttttt tttttttttt	3340
ttttttttttt tttttttttt	3400
ttttttttttt tttttttttt	3460
ttttttttttt tttttttttt	3520
ttttttttttt tttttttttt	3580
ttttttttttt tttttttttt	3640
ttttttttttt tttttttttt	3700
ttttttttttt tttttttttt	3760
ttttttttttt tttttttttt	3820
ttttttttttt tttttttttt	3880
ttttttttttt tttttttttt	3940
ttttttttttt tttttttttt	4000
ttttttttttt tttttttttt	4060
ttttttttttt tttttttttt	4120
ttttttttttt tttttttttt	4180
ttttttttttt tttttttttt	4240
ttttttttttt tttttttttt	4300
ttttttttttt tttttttttt	4360
ttttttttttt tttttttttt	4420
ttttttttttt tttttttttt	4480
ttttttttttt tttttttttt	4540
ttttttttttt tttttttttt	4600
ttttttttttt tttttttttt	4660
ttttttttttt tttttttttt	4720
ttttttttttt tttttttttt	4780
ttttttttttt tttttttttt	4840
ttttttttttt tttttttttt	4900
ttttttttttt tttttttttt	4960
ttttttttttt tttttttttt	5020
ttttttttttt tttttttttt	5080
ttttttttttt tttttttttt	5140
ttttttttttt tttttttttt	5200
ttttttttttt tttttttttt	5260
ttttttttttt tttttttttt	5320
ttttttttttt tttttttttt	5380
ttttttttttt tttttttttt	5440
ttttttttttt tttttttttt	5500
ttttttttttt tttttttttt	5560
ttttttttttt tttttttttt	5620
ttttttttttt tttttttttt	5680
ttttttttttt tttttttttt	5740
ttttttttttt tttttttttt	5800
ttttttttttt tttttttttt	5860
ttttttttttt tttttttttt	5920
ttttttttttt tttttttttt	5980
ttttttttttt tttttttttt	6040
ttttttttttt tttttttttt	6100
ttttttttttt tttttttttt	6160
ttttttttttt tttttttttt	6220
ttttttttttt tttttttttt	6280
ttttttttttt tttttttttt	6340
ttttttttttt tttttttttt	6400
ttttttttttt tttttttttt	6460
ttttttttttt tttttttttt	6520
ttttttttttt tttttttttt	6580
ttttttttttt tttttttttt	6640
ttttttttttt tttttttttt	6700
ttttttttttt tttttttttt	6760
ttttttttttt tttttttttt	6820
ttttttttttt tttttttttt	6880
ttttttttttt tttttttttt	6940
ttttttttttt tttttttttt	7000
ttttttttttt tttttttttt	7060
ttttttttttt tttttttttt	7120
ttttttttttt tttttttttt	7180
ttttttttttt tttttttttt	7240
ttttttttttt tttttttttt	7300
ttttttttttt tttttttttt	7360
ttttttttttt tttttttttt	7420
ttttttttttt tttttttttt	7480
ttttttttttt tttttttttt	7540
ttttttttttt tttttttttt	7600
ttttttttttt tttttttttt	7660
ttttttttttt tttttttttt	7720
ttttttttttt tttttttttt	7780
ttttttttttt tttttttttt	7840
ttttttttttt tttttttttt	7900
ttttttttttt tttttttttt	7960
ttttttttttt tttttttttt	8020
ttttttttttt tttttttttt	8080
ttttttttttt tttttttttt	8140
ttttttttttt tttttttttt	8200
ttttttttttt tttttttttt	8260
ttttttttttt tttttttttt	8320
ttttttttttt tttttttttt	8380
ttttttttttt tttttttttt	8440
ttttttttttt tttttttttt	8500
ttttttttttt tttttttttt	8560
ttttttttttt tttttttttt	8620
ttttttttttt tttttttttt	8680
ttttttttttt tttttttttt	8740
ttttttttttt tttttttttt	8800
ttttttttttt tttttttttt	8860
ttttttttttt tttttttttt	8920
ttttttttttt tttttttttt	8980
ttttttttttt tttttttttt	9040
ttttttttttt tttttttttt	9100
ttttttttttt tttttttttt	9160
ttttttttttt tttttttttt	9220
ttttttttttt tttttttttt	9280
ttttttttttt tttttttttt	9340
ttttttttttt tttttttttt	9400
ttttttttttt tttttttttt	9460
ttttttttttt tttttttttt	9520
ttttttttttt tttttttttt	9580
ttttttttttt tttttttttt	9640
ttttttttttt tttttttttt	9700
ttttttttttt tttttttttt	9760
ttttttttttt tttttttttt	9820
ttttttttttt tttttttttt	9880
ttttttttttt tttttttttt	9940
ttttttttttt tttttttttt	10000

```

<210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 46
Thr Gly Gly
1

<210> 47
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
6xHis-метка

<400> 47
His His His His His
1           5

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий первую аминокислотную последовательность и вторую аминокислотную последовательность, где первая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 15 или 16, где первая аминокислотная последовательность заканчивается на аминокислоте, соответствующей любой из аминокислот 291-302 последовательности SEQ ID NO:4, где вторая аминокислотная последовательность содержит константный домен иммуноглобулина; и где полипептид способен связывать один или более из миостатина, GDF11, активина А или активина В.
2. Полипептид по п.1, где полипептид необязательно содержит линкерный полипептид.
3. Полипептид по п.2, где линкерный полипептид расположен между первой аминокислотной последовательностью и второй аминокислотной последовательностью.
4. Полипептид по п.3, где линкерный полипептид содержит последовательность TGGG.
5. Полипептид по любому из пп.1-4, где вторая аминокислотная последовательность содержит константный домен иммуноглобулина IgG.
6. Полипептид по любому из пп.1-5, где вторая аминокислотная последовательность содержит константный домен иммуноглобулина IgG, который обладает пониженной ADCC-активностью по сравнению с человеческим IgG1.
7. Полипептид по любому из пп.1-6, где вторая аминокислотная последовательность содержит константный домен иммуноглобулина IgG, который обладает пониженной CDC-активностью по сравнению с человеческим IgG1.
8. Полипептид по любому из пп.1-7, где вторая аминокислотная последовательность содержит константный домен иммуноглобулина IgG, выбранного из группы IgG1, IgG2 и IgG4.
9. Полипептид по любому из пп.1-8, где вторая аминокислотная последовательность содержит Fc-часть иммуноглобулина.
10. Полипептид по любому из пп.1-9, где первая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO:15 или 16.
11. Полипептид по любому из пп.1-10, где первая аминокислотная последовательность заканчивается на аминокислоте, соответствующей положению 291 последовательности SEQ ID NO:4.
12. Полипептид по любому из пп.1-11, в котором гибридный белок фоллистатин связывается с одним или несколькими лигандами, выбранными из группы, состоящей из миостатина, фактора дифференцировки роста 11 (GDF-11), активина А и активина В с константой диссоциации (KD) менее 1 нМ, 100, 50 или 10 пМ.
13. Полипептид по любому из пп.1-12, где константный домен IgG является константным доменом IgG1.
14. Полипептид по п.13, где константный домен IgG1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17.
15. Полипептид по любому из пп.1-12, где константный домен IgG является константным доменом IgG2.
16. Полипептид по п.15, где константный домен IgG2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.
17. Полипептид по любому из пп.1-16, где линкер непосредственно соединяет С-концевую часть первой аминокислотной последовательности с N-концевой частью второй аминокислотной последовательности.
18. Полипептид по п.17, где линкер имеет длину 1-10 аминокислот.

19. Полипептид по п.1, где первая аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:15 или 16; где линкер непосредственно соединяет С-концевую часть первой аминокислотной последовательности с N-концевой частью второй аминокислотной последовательности; где линкер имеет длину 1-10 аминокислот; где константный домен IgG является константным доменом IgG2, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.

20. Полипептид по п.19, где линкер состоит из последовательности TGGG.

21. Полипептид по п.1, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43.

22. Полипептид по п.21, где конечный (карбоксиконцевой) лизин (K) последовательности SEQ ID NO:43 отсутствует.

23. Полипептид по п.1, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42.

24. Полипептид по п.23, где конечный (карбоксиконцевой) лизин (K) последовательности SEQ ID NO:42 отсутствует.

25. Полипептид по п.23, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO:42.

26. Димер, содержащий два полипептида по любому одному из пп.1-25.

27. Гомодимер, содержащий два полипептида по любому одному из пп.1-25.

28. Фармацевтический препарат для лечения пациента, имеющего мышечное заболевание или расстройство; где композиция содержит полипептид по любому из пп.1-25 или димер по п.26.

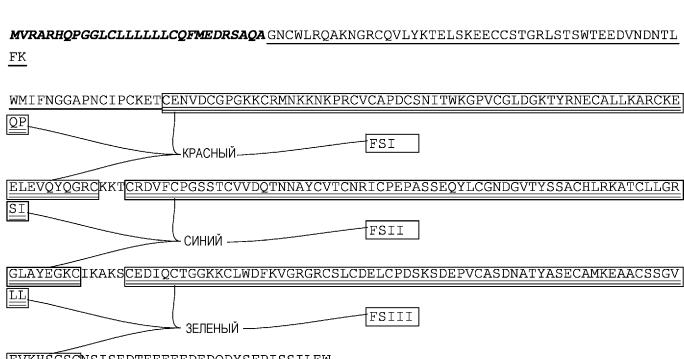
29. Фармацевтический препарат по п.28, где заболевание или расстройство представляет собой амиотрофический боковой склероз.

30. Фармацевтический препарат по п.28, где заболевание или расстройство представляет собой болезнь Шарко-Мари-Тута.

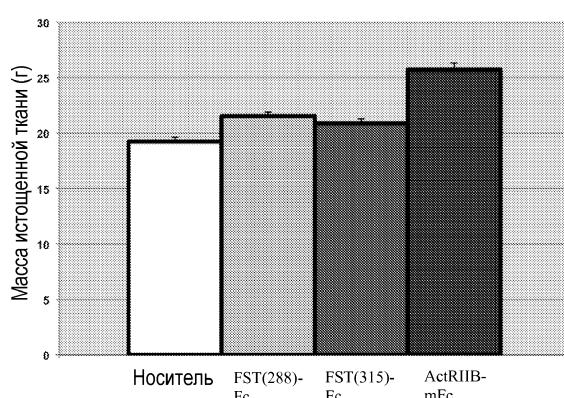
31. Фармацевтический препарат по п.28, где заболевание или расстройство представляет собой плече-лопаточную лицевую мышечную дистрофию.

32. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид по любому одному из пп.1-25.

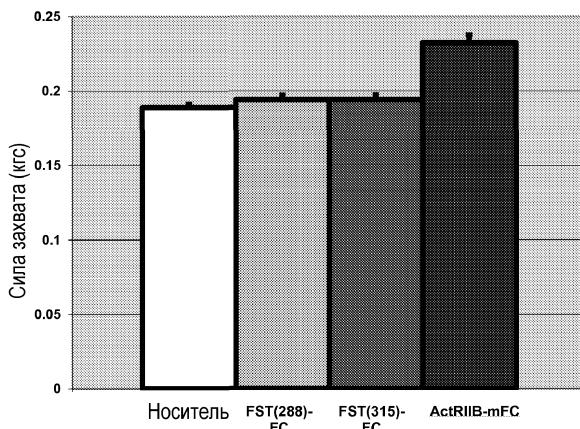
33. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.32.



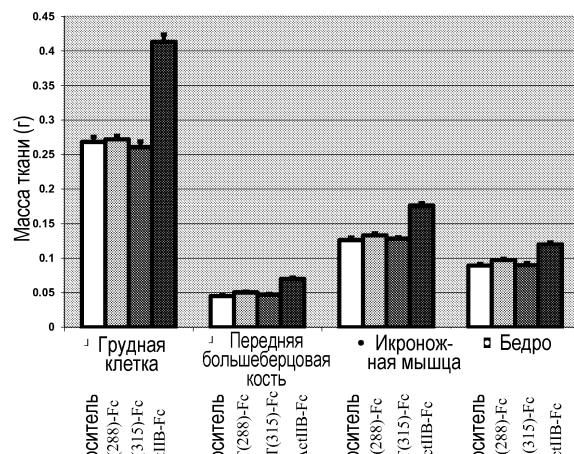
Фиг. 1



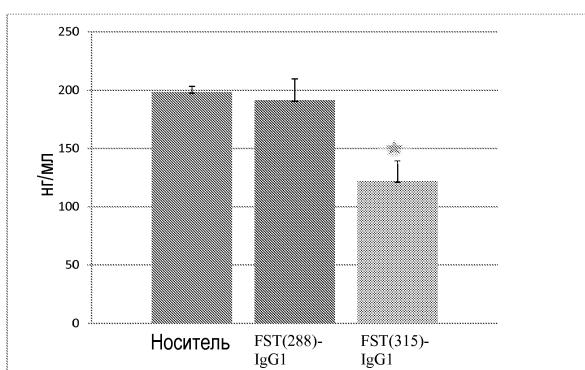
Фиг. 2



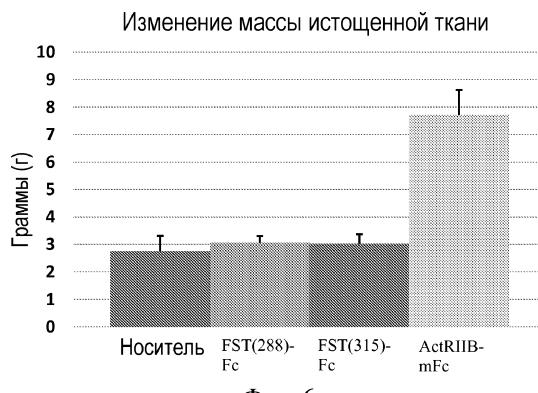
Фиг. 3



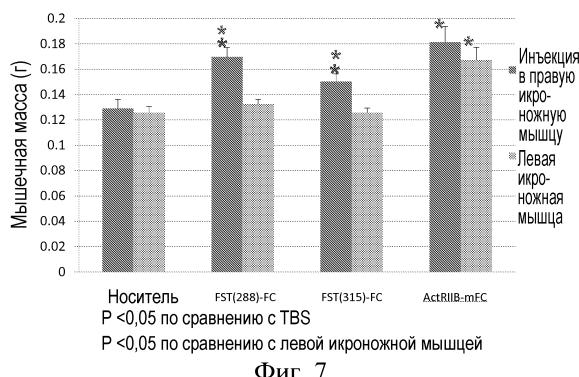
Фиг. 4



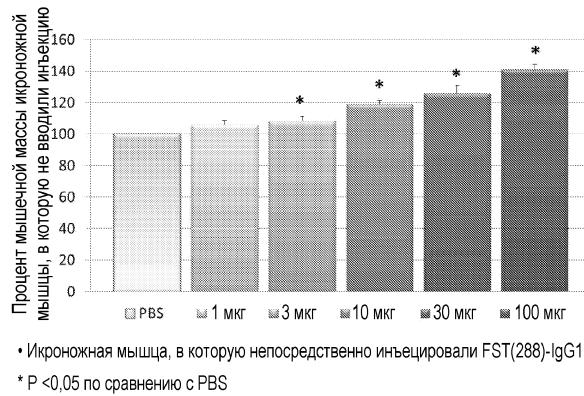
Фиг. 5



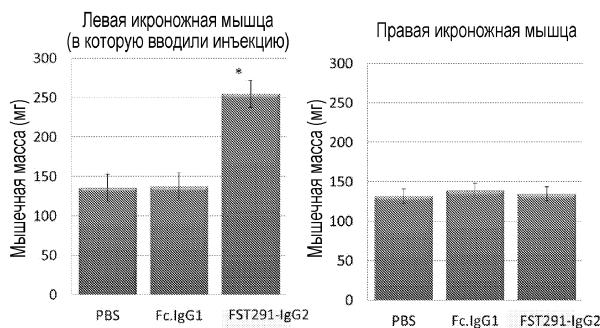
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



* =P <0,05 по сравнению с PBS

Фиг. 9

