

(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 ПОЛИПЕПТИДОВ

(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, гематопоз, 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 ингибирование 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 лиганды фоллистатина (например, активин А, активин В, 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, 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, который обладает пониженной CDC-активностью по сравнению с человеческим IgG1. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, константный домен 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 гибриды 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, кодирующим 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 избытком 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 мишенями. В результате этого системные эффекты фоллистатина могут не наблюдаться. Так, например, размер или сила мышцы, которая является контралатеральной 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 непротрансформированная 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 трисом 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 трисом 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 трисом 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 трисом 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 уровней 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 уровни 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 трисом 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 трисом 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 мышцей, проводимой два раза в неделю путем внутримышечной инъекции различных доз FST(288)-IgG1 в правую икроножную мышцу, на массу икроножной мышцы у мышцей, 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 \pm 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 мышцей, 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 \pm 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 мышцей, 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 экспрессируется почти во всех тканях высших животных. Впервые он был выделен из фолликулярной жидкости и идентифицирован как белковая фракция, которая ингибирует секрецию фолликулостимулирующего гормона (FSH) из передней доли гипофиза, а поэтому он был назван FSH-ингибирующим 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 А, активином В) 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 (нефоллистатиновой) 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 фоллистатиновые домены I-III (FSI, FSII, FSIII) подчеркнуты двойной чертой

MVRARHQPGGLCLLLLLLQCFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCS
NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEOPELEVOYOGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDOTNNA
YCVTCNRICPEPASSEYOYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGS
 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

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
OPELEVOYOGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDOTNNAYCVTCNRICPEPASSEYOYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGS CN (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 AАH04107.1; 344 аминокислоты)

MVRARHQPGGLCLLLLLLQCFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCS
NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEOPELEVOYOGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDOTNNA
YCVTCNRICPEPASSEYOYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGS
 CNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW (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

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
OPELEVOYOGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDOTNNAYCVTCNRICPEPASSEYOYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGS CNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
 (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 tandem, 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 KCRMNKKNKPR (SEQ ID NO: 5). Этот гепаринсвязывающий домен может быть представлен как BBXBXXBBXBXB (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 делетированы, как показано, например, ниже (SEQ ID NO: 8)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNC
IPCKET (SEQ ID NO:7) .
CWLRLQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIP
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

CENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P V C G L D G K T Y R N E C A L L K A R C K E Q
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

CWLRLQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P V C G L D G K T Y R N E C A L L K A R C K E Q P
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

CWLRLQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P V C G L D G K T Y R N E C A L L K A R C K E Q P
ELEVQYQGRCKKTCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P V C G L D G K T Y R N E C A L
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

CENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P V C G L D G K T Y R N E C A L L K A R C K E Q
PELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA
CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC (SEQ ID NO:12) .
CWLRLQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P V C G L D G K T Y R N E C A L L K A R C K E Q P
ELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA
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 непротессированный (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)

MVRARHQPGGLCLLLLLLQCFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLQFKWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCS
NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA
YCVTCNCRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGS
CNSIS (SEQ ID NO:14) .

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLQFKWMI FNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA YCVTCNCRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSIS (SEQ ID NO:15) .

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLQFKWMI FNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA YCVTCNCRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDPE
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSIS (SEQ ID NO:16) .

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к ингибированию 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 А, активин В, 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 (А, В и АВ), которые представляют собой го-мо/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 С и Е, 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. SocExp. 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 А (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Было высказано предположение, что активин А 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 мышцей 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 Kambadur 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 общепринятом 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, фоллистатиновый вариант согласно изобретению может связываться с лигандом фоллистатина (например, активинном А, активинном АВ, активинном В и GDF8) и ингибировать его функцию. Фоллистатиновый полипептид модулирует, но необязательно, рост тканей, а в частности мышц. Примерами фоллистатиновых 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 фоллистатиновых полипептидах начинается с последовательности SEQ ID NO: 1 независимо от того, присутствует ли нативная лидерная последовательность или нет.

Как описано выше, фоллистатин характеризуется тремя цистеинбогатыми областями (то есть FS-доменами I-III), которые, очевидно, опосредуют связывание фоллистатина 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 фоллистатина (например, к миостатину) и являются биологически активными *in vivo* (см. Nakatani et al., The FASEB Journal, Vol. 22477-487 (2008)). Поэтому варианты фоллистатиновых полипептидов согласно изобретению могут содержать одну или более активных частей фоллистатинового 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 фоллистатиновые варианты могут быть объединены друг с другом или с гетерологичными аминокислотными последовательностями различными способами. Так, например, варианты фоллистатиновых 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 фоллистатинового полипептида согласно изобретению при условии, что такие рекомбинантные белки могут сохранять нужную активность, включая, например, активность связывания с лигандом фоллистатина (например, с миостатином) и биологическую активность (например, способность индуцировать увеличение мышечной массы или мышечной силы). Примерами таких вариантов фоллистатиновых полипептидов являются, например, полипептиды, имеющие доменные структуры, такие как FSDI-FSDII-FSDIII, FSDI-FSDIII, FSDI-FSDI-FSDIII, FSDI-FSDII, FSDI-FSDI, FSN-FSDI-FSDII-FSDIII, FSN-FSDI-FSDII, FSN-FSDI-FSDI, FSN-FSDI-FSDIII, FSN-FSDI-FSDI-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 фоллистатиновые варианты согласно изобретению обладают пониженной аффинностью связывания с одним или более лигандами фоллистатина или вообще не обладают такой аффинностью. В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к фоллистатиновым вариантам, которые обладают пониженной аффинностью связывания с активинном или вообще не обладают такой аффинностью. В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к фоллистатиновым вариантам, которые обладают пониженной аффинностью связывания с активинном или вообще не обладают такой аффинностью, но сохраняют высокую аффинность связывания с миостатином.

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

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

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

К фоллистатиновому 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 фоллистатиновой 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 фоллистатиновый 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 фоллистатинового полипептида в целях повышения терапевтической эффективности или стабильности (например, повышения срока хранения *ex vivo* и повышения резистентности к протеолитическому расщеплению *in vivo*). Модифицированные фоллистатиновые 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 фоллистатинового полипептида приводит к образованию функционального гомолога, может быть легко подтвержден путем оценки способности варианта фоллистатинового полипептида вырабатывать ответ в клетках по механизму, аналогичному ответу, продуцируемому фоллистатиновым полипептидом дикого типа, или связываться с одним или более лигандами, такими как активин или миостатин, по механизму, аналогичному механизму, осуществляемому фоллистатином дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рассматриваются специфические мутации фоллистатиновых 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-треонин" (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 фоллистатинового 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) приводит к устранению гликозилирования в модифицированной трипептидной последовательности. Другим способом увеличения числа углеводных групп на фоллистатиновом полипептиде является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к фоллистатиновому 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 глутамин. 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 фоллистатинового 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 Nakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное расщепление углеводных групп на фоллистатиновых полипептидах может быть достигнуто с использованием ряда эндо- и экзогликозидаз, как описано Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. Последовательность фоллистатинового 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 НЕК293 или СНО, 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 А), и клетки могут быть трансфицированы 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 СНО, 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 А, 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 фоллистатиновых 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-тус. 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 фоллистатиновый полипептид присоединяют к домену, который стабилизирует этот фоллистатиновый 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 мултимеризующие (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 фоллистатиновые 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 фоллистатиновым 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 настоящее изобретение входят любые из этих вариантов, которые могут быть использованы в качестве предпочтительных компонентов гибридного фоллистатинового 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
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:17) .

IgG2

VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (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, фоллистатиновый 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) CH1-домен, CH2-домен и CH3-домен, 2) CH1-домен и CH2-домен, 3) CH1-домен и CH3-домен, 4) CH2-домен и CH3-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, CH2-домен и CH3-домен иммуноглобулина, а предпочтительно не содержит CH1-домена. Следует также отметить, что фоллистатиновый полипептид может содержать только один домен иммуноглобулина, такой как CH1-домен, CH2-домен или CH3-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 (Ig γ) (γ -подкласса 1, 2, 3 или 4). При этом могут быть использованы иммуноглобулины и других классов, а именно IgA (Ig α), IgD (Ig δ), IgE (Ig ϵ) и IgM (Ig μ). 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 CH₃-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 CH2-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 (РАСЕ). Для идентификации сайтов протеолитического расщепления может быть проведен компьютерный анализ (с использованием коммерчески доступной программы, например, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.). Альтернативно, такие фоллистатиновые полипептиды могут быть получены из природных или рекомбинантно продуцированных полноразмерных фоллистатиновых 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, кодирующим 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.)

```
atggtccgcgcgagaccagccgggtgggtcttgcctcctgctgctgctgctgcca
gttcatggaggaccgcagtgcccaggtgggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgc
tgccaggtcctgtacaagaccgaactgagcaaggaggagtgctgcagcaccggccgctgagca
cctcgtggaccgagaggagcgtgaatgacaacacactcttcaagtggtgatgtttcaacggggg
cgcccccaactgcacccctgtaaaagaacgtgtgagaacgtggactgtggacctgggaaaaa
tgccgaatgaacaagaacaaccccgctgctgtcgcgcccgattgttccaacatcacct
ggaagggtccagtcgtcgggctggatgggaaacctaccgcaatgaatgtgactcctaaggc
aagatgtaagagcagccagaactggaagtcagtcaccaaggcagatgtaaaagacttgtcgg
gatgtttctgtccaggcagctccacatgtgtggtagcagaccaataatgcctactgtgtga
cctgtaatcggtttgcccagagcctgcttctcctgagcaatatctctgtgggaatgatggagt
cacctactccagtcctgccacctgagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggatta
gcctatgagggaaagtgtatcaaaagcaagctcctgtgaagatatccagtgactggtggaaaa
aatgtttatgggatttcaagggtgggagagccggtgtccctctgtgatgagctgtgcctga
cagtaagtgcggtagcctgtctgtgacagtgacaatgccacttatgccagcagtggtgccatg
aaggaagctgcctgctcctcaggtgtgctactggaagtaagcactccggatcttgcaactcaa
tttcggaagacaccgaggaagaggaggaatgaagaccaggactacagcttctctatatcttc
tattctagagtgg.
```

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

```
gggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtacaagaccga
actgagcaaggaggagtgctgcagcaccggccggtgagcacctcgtggaccgaggaggagctg
aatgacaacacactcttcaagtggatgatttcaacggggcgcccccaactgcacccctgta
aagaaacgtgtgagaacgtggactgtggacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaaca
accccgctgctgtcgcgcccgattgttccaacatcacctggaagggtccagtcgtcgggctg
gatgggaaaaacctaccgcaatgaatgtgactcctaaggcaagatgtaagagcagccagaac
tggaagtcagtcaccaaggcagatgtaaaagacttgtcgggatgtttctgtccaggcagctc
cacatgtgtggtggaccagaccaataatgcctactgtgtgacctgtaatcggtattgccagag
cctgcttctcctgagcaatatctctgtgggaatgatggagtccactactccagtcgctgccacc
tgagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggattagcctatgagggaaagtgtatcaa
agcaaaagtccctgtgaagatatccagtgactggtgggaaaaaatgtttatgggatttcaaggtt
gggagagccggtgttccctctgtgatgagctgtgccctgacagtaagtcggatgagcctgtct
gtgccaagtgaatgccacttatgccagcagtggtgccaatgaaggaagctgcctgctcctcagg
tgtgctactggaagtaagcactccggatcttgcaactccatttcggaagacaccgaggaagag
gaggaagatgaagaccaggactacagcttctctatatcttctattctagagtgg.
```

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

```
gggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtacaagaccga
actgagcaaggaggagtgctgcagcaccggccggtgagcacctcgtggaccgaggaggagctg
aatgacaacacactcttcaagtggatgatttcaacggggcgcccccaactgcacccctgta
aagaaacgtgtgagaacgtggactgtggacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaaca
accccgctgctgtcgcgcccgattgttccaacatcacctggaagggtccagtcgtcgggctg
gatgggaaaaacctaccgcaatgaatgtgactcctaaggcaagatgtaagagcagccagaac
tggaagtcagtcaccaaggcagatgtaaaagacttgtcgggatgtttctgtccaggcagctc
cacatgtgtggtggaccagaccaataatgcctactgtgtgacctgtaatcggtattgccagag
cctgcttctcctgagcaatatctctgtgggaatgatggagtccactactccagtcgctgccacc
tgagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggattagcctatgagggaaagtgtatcaa
agcaaaagtccctgtgaagatatccagtgactggtgggaaaaaatgtttatgggatttcaaggtt
gggagagccggtgttccctctgtgatgagctgtgccctgacagtaagtcggatgagcctgtct
gtgccaagtgaatgccacttatgccagcagtggtgccaatgaaggaagctgcctgctcctcagg
tgtgctactggaagtaagcactccggatcttgcaactccatttcggaagacaccgaggaagag
tgtgctactggaagtaagcactccggatcttgcaactccatttcggaagacaccgaggaagag
```

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

```
gggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtacaagaccga
actgagcaaggaggagtgctgcagcaccggccgctgagcacctcgtggaccgaggagcgtg
aatgacaacacactcttcaagtggatgatttcaacggggcgccccaactgcatccctgtg
aagaaactgtgagaactggtgactgtgacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagacaa
accccgctgcgtctgcgcccgattgttccaacatcacctggaaggggtccagctgcgggctg
gatgggaaaacctaccgcaatgaatgtgcactcctaaggcaagatgtaaagagcagccagaac
tggaagtcagttaccaaggcagatgtaaaagactgtcgggatgtttctgtccaggcagctc
cacatgtgtggtggaccagaccaataatgcctactgtgtgacctgtaatcggtattgccagag
cctgcttccctctgagcaatatctctgtgggaatgatggagtcacctactccagtgctgccacc
tgagaaaggctacctgctgctgggcagatctattggattagcctatgagggaaagtgtatcaa
agcaaatcctgtgaagatatccagtgcactggtgggaaaaaatgtttatgggatttcaaggtt
gggagagccgggttccctctgtgatgagctgtgccctgacagtaagtcggatgagcctgtct
gtgccagtgacaaatgccacttatgccagcagtggtgccatgaaggaaagctgctgctcctcagg
tgtgctactggaagtaagcactccggtatcttgaactccatttctgtg.
```

Следует отметить, что в некоторых аспектах изобретения рассматриваемые нуклеиновые кислоты, кодирующие фоллистатиновые 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 среднего 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 кодоном гистидина) могут продуцировать "молчащие" мутации, 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 эписоме, такой как плаزمид, 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, присутствующей 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.

Репрезентативные 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; предранний промотор аденовируса или цитомегаловируса; 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 скрепления дрожжей- α ; полиэдроновый промотор бакуловirusной 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 pNyg. 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 транзientной 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, трансфецированным 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, трансфецированные 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 мембранной фракции клеток, которые затем собирают, подвергают лизису и выделяют белок. Клеточная культура включает клетки-хозяева, среду и другие побочные продукты. Среда, подходящая для культивирования клеток, хорошо известна 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, гелефильтрацию, ультрафильтрацию, электрофорез и иммуноаффинную очистку с использованием антител, специфичных к конкретным эпитопам 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 лигирования по тупым концам или липким концам; посредством гидролиза рестриктирующими ферментами с образованием соответствующих концов; достраивания липких концов, если это необходимо; обработки щелочной фосфатазой для предотвращения нежелательного связывания и ферментативного лигирования. 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 фоллистатинового полипептида и/или лиганда фоллистатина (например, GDF8). Эти заболевания, расстройства или состояния обычно называются здесь "состояниями, ассоциированными с фоллистатином". В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способам лечения или предупреждения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, путем введения указанному индивидууму терапевтически эффективного количества фоллистатинового 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 "фоллистатин-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 фоллистатином, 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 фоллистатиновых полипептидов, являются мышечная дистрофия Дюшенна (МДД), мышечная дистрофия Беккера (МДБ), мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса (МДЭД), мышечная дистрофия тазового 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 Стейнера), 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 фибро жировой тканью.

МДБ возникает в результате различных мутаций в гене дистрофина. У пациентов с МДБ присутствует некоторое количество дистрофина, но этот дистрофин 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 фоллистатина) *in vivo* могут быть эффективно достигнуты путем устранения, по меньшей мере, некоторых симптомов у пациентов с МДД и МДБ. Таким образом, рассматриваемые фоллистатиновые полипептиды могут действовать как ингибиторы (антагонисты) GDF8 и представлять собой альтернативные средства для блокирования функций GDF8 *in vivo* у пациентов с МДД и МДБ.

Аналогичным образом, рассматриваемые фоллистатиновые 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 могут ронять 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 апиогенной 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, каши, 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 каши 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, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; (3) увлажнители, 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, микроэмульсии, 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, солюбилизующие 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 адъюванты, 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, пластыри 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, фоллистатинового 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. Спреи 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 фоллистатиновых 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 инъекруемыми растворами или дисперсиями, и которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, сообщающие препарату изотоничность с кровью рассматриваемого реципиента, или суспендирующие 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 адъюванты, 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 инъекруемой 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, фоллистатиновых полипептидов). Указанные различные факторы зависят от типа заболевания, подвергнутого лечению.

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

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

лони (MoMuLV), вирус мышинной саркомы Харви (HaMuSV), мышинный вирус опухоли молочной железы (MuMTV) и вирус саркомы Рауса (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 вектор вводят в клетки/ткани костей, хряща, мышц или нейронов.

Альтернативно, клетки тканевой культуры могут быть непосредственно трансфицированы 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, микросферы, 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 фосфатидиловые 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
MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQA (SEQ ID NO: 23)
- (2) Тканевый активатор плазминогена (TPA)
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (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 непротессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

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

MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCS
NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRGCSLDELCPDSKSDPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGS
CNTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Зрелый FST(288)-IgG1 (SEQ ID NO:27)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK.

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

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLDELCPDSKSDP
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK.

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

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

MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCS
NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRGCSLDELCPDSKSDPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGS
CNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEWTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK.

Зрелый FST(315)-IgG1 (SEQ ID NO:30)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
TGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

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

```
CWLRLQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKMI FNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKRCRNMKNKPRCVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVVYQGRCKKTCRDVFCPSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDPEP
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVHKHSGSCNSISEDTEEEDEDEDQDYSFPISILEWTG
GGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCLSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.
```

Белки были экспрессированы в клетках НЕК-293 или CHO 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 активинем 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 сигналпередающих 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 уровне 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 контралатеральную 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 мышцами, 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 контралатеральной мышцы. Таким образом, было установлено, что в противоположность эффектам, наблюдаемым 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 мишенями.

Заявителями был также проведен тщательный мониторинг уровней гибридного белка "фоллистатин-Fc" в сыворотке после i.m. введения. Обработка белком FST(288)-IgG1 давала уровни лекарственного 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, наблюдаемые 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 контралатеральной 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 непротессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

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

```
MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCS
NITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGS
CNTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSGFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.
```

Этот белок кодируется нижеследующей последовательностью нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 44)

```
atggtccgcgcgagggaccagccgggtgggctttgcctcctgctgctgctgctgcca
gttcattgagagaccgagtgcccaggtgggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgc
tgccaggtcctgtacaagaccgaactgagcaaggagagtgctgcagcaccggccggctgagca
cctcgtggaccgagggagcgtgaatgacaacacactcttcaagtggatgatattcaacggggg
cgccccaactgcattcccctgtaaagaacgctgtgagaacgtggactgtggacctgggaaaaa
tgccgaatgaacaagaagaacaaacccgctgcgtctgcgccccgattgttccaacatcacct
ggaaggggtccagctgcgggctggatgggaaaacctaccgcaatgaatgtgactcctaaaggc
aagatgtaagagcagccagaactggaagtcagtagcaaggcagatgtaaaagactgtcgg
gatgtttctgtccaggcagctccacatgtgtggtggaccagaccaataatgcctactgtgtga
cctgtaatcggtatttcccagagcctgcttctctgagcaatatctctgtgggaatgatggagt
cacctactccagtgctgccacctgagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggatta
gcctatgagggaaagtgtatcaaagcaaagtcctgtgaagatatccagtgactggtgggaaaa
aatgtttatgggatttcaaggttgggagagggcggtgttccctctgtgatgagctgtgccctga
cagtaagtcggatgagcctgtctgtgccagtgaacatgccacttatgccagcagtggtgccatg
aaggaaagctgctgctcctcaggtgtgctactggaagtaagcactccggtatcttgcaacaccg
gtggtgagtcgagtgcccaccgtgccagcaccacctgtggcaggaccgtcagctcttctctt
ccccccaaaaccaaggacacccctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtggtggtg
gacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata
atgccaaagacaaagccagggagagcagttcaacagcagcttccgtgtggtcagcgtcctcac
cgtcgtgcaccaggaactggctgaacggcaaggagtagaagtgcaaggtctccaacaaaggcctc
ccagccccatcgaaaaaccatctccaaaccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtaca
ccctgcccccatcccgaggagagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaag
cttctacccagcagacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaaactacaag
accacacctcccatgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacctgggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaacca
ctacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatgagaattc.
```

Зрелый FST(288)-IgG2 (SEQ ID NO: 33)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
 I PKKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
 QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSS
 ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSD
 EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK.

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

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
 CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
 ELEVVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSAC
 HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSD
 VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKPD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW
 LNKKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSLSPGK.

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

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

MVRARHQPGGLCLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
 RLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCS
 NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNN
 YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
 GGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSDPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGS
 CNSISEDTEEEEDQDYSPFISSILEWTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKPD TLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLSPGK

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

atggctcgcgcgagggaccagccgggtgggctttgctcctgctgctgctgctgctgcca
 gttcatggagaccgcagtgccaggtgggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgc
 tgccaggtcctgtacaagaccgaactgagcaaggaggagtgctgcagcaccggccgctgagca
 cctcgtggaccgagggagcgtgaatgacaacacactcttcaagtggatgatttcaacggggg
 tgccccaactgcatccctgttaagaaactgtgagaactggactgtggacctgggaaaaaa
 tgccgaatgaacaagaacaacaccccgctgctgtgcgccccgattgttccaacatcacct
 ggaagggtccagctgcgggctggatgggaaacctaccgcaatgaatgtgactcctaaaggc
 aagatgtaaaagcagccgaactggaagtccagtaaccaaggcagatgtaaaagactgtgcg
 gatgttttctgtccaggcagctccacatgtgtggtggaccagaccaataatgcctactgtgtga
 cctgtaatcggatttgccagagcctgcttctctgagcaatatctctgtgggaatgatggagt
 cacctactccagtgccctgccactgagaaaggctacctgctgctgggcagatctattggatta
 gcctatgagggaaaagtgtatcaagcaaatcctgtgaagatatccagtgactgtgggaaaa
 aatgtttatgggatttcaaggttggagaggccggtgttccctctgtgatgagctgtgccctga
 cagtaagtgcgatgagcctgtctgtgccagtgacaatgccacttatgccagcagtggtgccatg
 aaggaaactgcctgctcctcaggtgtgctactggaagttaagcactccgagctcttgcaactcca
 ttctggaagaccgaggaagaggaggaatgaagaccaggactacagctttcctatatcttc
 tattctagagtgagccggtgtggagtcgagtgccaccgtgccagcaccacctgtggcagga
 ccgtcagttctctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggacccctgagg
 tcacgtgcgtggtgtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtgga
 cggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccacggggaggagcagttcaacagcacgttccgt
 gtggtcagcgtcctcaccgtcgtgcaccagactggctgaacggcaaggagtacaagtgcgaagg
 tctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaacacatctccaaacaaagggcagccccg
 agaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctg
 acctgcctgtcaaaggcttctacccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagc
 cggagaacaactacaagaccacacctccctgctggactccgacggctccttctctctacag
 caagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcat
 gaggctctgcacaaccactacacgcagaagacctctccctgtctccgggtaaatgagaattc.

Зрелый FST(315)-IgG2 (SEQ ID NO: 36)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
 IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNPRCVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARCKE
 QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSS
 ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSD
 EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW
 TGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV
 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

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

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
 CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNPRCVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
 ELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSAC
 HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSDPEP
 VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEWTG
 GGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYT
 LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Белки были экспрессированы в клетках НЕК-293 или CHO 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 непротессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

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

MVRARHQPGGLCLLLLLLQCFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
 RLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNPRCVCAPDCS
 NITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAY
 CVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
 GGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVVKHSGS
 CNSISTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Зрелый FST(291)-IgG1 (SEQ ID NO: 39)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
 IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNPRCVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARCKE
 QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSS
 ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSD
 EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVVKHSGSCNSISTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK.

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

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSD
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVHKHSGSCNSISTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK.

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

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

MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCS
NITWKGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNN
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVHKHSGS
CNSISTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Зрелый FST(291)-IgG2 (SEQ ID NO: 42)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVHKHSGSCNSISTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTV
VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK.

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

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSD
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVHKHSGSCNSISTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK.

Белки были экспрессированы в клетках НЕК-293 или CHO и очищены из кондиционированной 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.

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 мышцами, 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 мышцах mdx и на мышцах 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 фоллистатиновых полипептидов

<130> PNRH-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

035455

<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 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

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 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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa 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

<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

<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

035455

```

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

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
 <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

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> DHK
 <213> Homo sapiens

 <400> 19
 atgggtccg cgaggcacca gccgggtggg ctttgcctcc tgcgtctgct gctctgccag 60
 ttcattggagg accgcagtcg ccaggctggg aactgctggc tccgtcaagc gaagaacggc 120
 cgtgccagg tcctgtacaa gaccgaactg agcaaggagg agtgcctgag caccggccgg 180
 ctgagcacct cgtggaccga ggaggacgtg aatgacaaca cactcttcaa gtggatgatt 240
 ttcaacgggg gcgccccaa ctgcatcccc tgtaagaaa cgtgtgagaa cgtggactgt 300
 ggacctggga aaaaatgccg aatgaacaag aagaacaaac cccgctgcgt ctgcgccccg 360
 gattgttcca acatcacctg gaagggtcca gtctgcgggc tggatgggaa aacctaccgc 420
 aatgaatgtg cactcctaaa ggcaagatgt aaagagcagc cagaactgga agtcagttac 480
 caaggcagat gtaaaaagac ttgtcgggat gttttctgtc caggcagctc cacatgtgtg 540
 gtggaccaga ccaataatgc ctactgtgtg acctgtaatc ggatttggcc agagcctgct 600
 tcctctgagc aatatctctg tgggaatgat ggagtcacct actccagtgc ctgccacctg 660
 agaaaggcta cctgcctgct gggcagatct attggattag cctatgaggg aaagtgtatc 720
 aaagcaagt cctgtgaaga tatccagtgc actggtggga aaaaatgttt atgggatttc 780
 aaggttggga gaggccgggtg ttccctctgt gatgagctgt gccctgacag taagtcggat 840
 gagcctgtct gtgccagtga caatgccact tatgccagcg agtgtgccat gaagggaagct 900

gcctgctcct cagggtgtgct actggaagta aagcactccg gatcttgcaa ctccatttcg 960
 gaagacaccg aggaagaggga ggaagatgaa gaccaggact acagcttttc tatatcttct 1020
 attctagagt gg 1032

<210> 20
 <211> 945
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 gggaactgct ggctccgtca agcgaagaac ggccgctgcc aggtcctgta caagaccgaa 60
 ctgagcaagg aggaagtgtg cagcaccggc cggctgagca cctcgtggac cgaggaggac 120
 gtgaatgaca acacactctt caagtggatg attttcaacg ggggcgcccc caactgcatc 180
 ccctgtaaa gaaacgtgtga gaacgtggac tgtggacctg ggaaaaaatg ccgaatgaac 240
 aagaagaaca aaccccgctg cgtctgcgcc cgggattgtt ccaacatcac ctggaagggt 300
 ccagtcctgc ggctggatgg gaaaacctac cgcaatgaat gtgactcct aaaggcaaga 360
 tgtaagagc agccagaact ggaagtccag taccaaggca gatgtaaaa gacttgctcg 420
 gatgttttct gtccaggcag ctccacatgt gtggaggacc agaccaataa tgcctactgt 480
 gtgacctgta atcggatttg cccagagcct gcttcctctg agcaatatct ctgtgggaat 540
 gatggagtca cctactcag tgcctgccac ctgagaaagg ctacctgcct gctgggcaga 600
 tctattggat tagcctatga gggaaagtgt atcaaaagcaa agtcctgtga agatatccag 660
 tgcactgggt ggaaaaaatg tttatgggat ttcaagggtg ggagaggccg gtgttccctc 720
 tgtgatgagc tgtgccctga cagtaagtcg gatgagcctg tctgtgccag tgacaatgcc 780
 acttatgcca gcgagtgtgc catgaaggaa gctgcctgct cctcagggtg gctactggaa 840
 gtaaagcact ccgcatcttg caactccatt tcggaagaca ccgagggaaga ggaaggaaagt 900
 gaagaccagg actacagctt tcctatatct tctattctag agtgg 945

<210> 21
 <211> 864
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 gggaactgct ggctccgtca agcgaagaac ggccgctgcc aggtcctgta caagaccgaa 60
 ctgagcaagg aggaagtgtg cagcaccggc cggctgagca cctcgtggac cgaggaggac 120
 gtgaatgaca acacactctt caagtggatg attttcaacg ggggcgcccc caactgcatc 180
 ccctgtaaa gaaacgtgtga gaacgtggac tgtggacctg ggaaaaaatg ccgaatgaac 240
 aagaagaaca aaccccgctg cgtctgcgcc cgggattgtt ccaacatcac ctggaagggt 300
 ccagtcctgc ggctggatgg gaaaacctac cgcaatgaat gtgactcct aaaggcaaga 360
 tgtaagagc agccagaact ggaagtccag taccaaggca gatgtaaaa gacttgctcg 420
 gatgttttct gtccaggcag ctccacatgt gtggaggacc agaccaataa tgcctactgt 480
 gtgacctgta atcggatttg cccagagcct gcttcctctg agcaatatct ctgtgggaat 540
 gatggagtca cctactcag tgcctgccac ctgagaaagg ctacctgcct gctgggcaga 600
 tctattggat tagcctatga gggaaagtgt atcaaaagcaa agtcctgtga agatatccag 660
 tgcactgggt ggaaaaaatg tttatgggat ttcaagggtg ggagaggccg gtgttccctc 720
 tgtgatgagc tgtgccctga cagtaagtcg gatgagcctg tctgtgccag tgacaatgcc 780
 acttatgcca gcgagtgtgc catgaaggaa gctgcctgct cctcagggtg gctactggaa 840
 gtaaagcact ccgcatcttg caac 864

<210> 22
 <211> 876
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 gggaactgct ggctccgtca agcgaagaac ggccgctgcc aggtcctgta caagaccgaa 60
 ctgagcaagg aggaagtgtg cagcaccggc cggctgagca cctcgtggac cgaggaggac 120
 gtgaatgaca acacactctt caagtggatg attttcaacg ggggcgcccc caactgcatc 180
 ccctgtaaa gaaacgtgtga gaacgtggac tgtggacctg ggaaaaaatg ccgaatgaac 240
 aagaagaaca aaccccgctg cgtctgcgcc cgggattgtt ccaacatcac ctggaagggt 300
 ccagtcctgc ggctggatgg gaaaacctac cgcaatgaat gtgactcct aaaggcaaga 360
 tgtaagagc agccagaact ggaagtccag taccaaggca gatgtaaaa gacttgctcg 420

```

gatgttttct gtccaggcag ctccacatgt gtggaggacc agaccaataa tgcctactgt      480
gtgacctgta atcggatttg cccagagcct gcttcctctg agcaatatct ctgtgggaat      540
gatggagtca cctactccag tgcctgccac ctgagaaagg ctacctgcct gctgggcaga      600
tctattggat tagcctatga gggaaagtgt atcaaagcaa agtcctgtga agatatccag      660
tgcactggtg ggaaaaaatg tttatgggat ttcaagggtg ggagaggccg gtgttccttc      720
tgtgatgagc tgtgccctga cagtaagtcg gatgagcctg tctgtgccag tgacaatgcc      780
acttatccca gcgagtgtgc catgaaggaa gctgcctgct ctcagggtgt gctactggaa      840
gtaaagcact ccggatcttg caactccatt tcgtgg                                876

```

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

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

<400> 23
 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
 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 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 Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe
 325 330 335
 Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Thr Gly 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

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 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 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 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 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 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

035455

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 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

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 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 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 Glu Asp Glu Asp Gln Asp 290 295 300		
Tyr Ser Phe Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Thr Gly 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 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 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 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

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 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

035455

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 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 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

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 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
 405 410 415
 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 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 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 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 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

035455

<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 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 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

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

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 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
atggtccgcg cgaggcacca gccgggtggg ctttcctcc tgcgtctgct gctctgccag 60
ttcatggagg accgcagtgc ccaggctggg aactgctggc tccgtcaagc gaagaacggc 120
cgctgccagg tcctgtacaa gaccgaactg agcaaggagg agtgctgcag caccggccgg 180
ctgagcacct cgtggaccga ggaggacgtg aatgacaaca cactcttcaa gtggatgatt 240
ttcaacgggg gcgcccccaa ctgcatcccc tgtaagaaaa cgtgtgagaa cgtggactgt 300
ggacctggga aaaaatgccg aatgaacaag aagaacaac cccgctgcgt ctgcgccccg 360
gattgttcca acatcacctg gaagggtcca gtctcggggc tggatgggaa aacctaccgc 420
aatgaatgtg cactcctaaa ggcaagatgt aaagagcagc cagaactgga agtccagtac 480
caaggcagat gtaaaaagac ttgtcgggat gttttctgtc caggcagctc cacatgtgtg 540
gtggaccaga ccaataatgc ctactgtgtg acctgtaac ggatttgccc agagcctgct 600
tcctctgagc aatatctctg tgggaatgat ggagtcacct actccagtgc ctgccacctg 660

```

agaaggcta cctgcctgct gggcagatct attggattag cctatgaggg aaagtgtatc 720
aaagcaaaagt cctgtgaaga tatccagtgc actggtggga aaaaatgttt atgggatttc 780
aaggttggga gaggccgggtg ttccctctgt gatgagctgt gccctgacag taagtcggat 840
gagcctgtct gtgccagtga caatgccact tatgccagcg agtgtccat gaaggaaagt 900
gcctgctcct cagggtgtgct actggaagta aagcactccg gatcttgcaa caccggtgggt 960
ggagtcgagt gcccaccgtg cccagacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc 1020
ccccaaaa ccaaggacac cctcatgac tccggaccc ctgaggtcac gtgcgtgggtg 1080
gtggacgtga gccacgaaga cccgagggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1140
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt cgtgtggtc 1200
agcgtcctca ccgtcgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1260
tccaacaaag gcctccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc 1320
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tccggggagg agatgacca gaaccaggtc 1380
agcctgacct gcctggtaaa aggccttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1440
aatgggcagc cgagaacaaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc 1500
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1560
tcatgctcgg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcaagaagag cctctccctg 1620
tctccgggta aatgagaatt c 1641

```

<210> 45

<211> 1722

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 45

```

atggtccgcg cgaggacca gccgggtggg ctttgctcc tgctgctgct gctctgccag 60
ttcatggagg accgcagtgc ccaggctggg aactgctggc tccgtcaagc gaagaacggc 120
cgctgccagg tcctgtacaa gaccgaactg agcaaggagg agtgctgcag caccggccgg 180
ctgagcacct cgtggaccga ggaggacgtg aatgacaaca cactcttcaa gtggatgatt 240
ttcaacgggg gtgcccccaa ctgcatcccc tgtaaagaaa cgtgtgagaa cgtggactgt 300
ggacctggga aaaaatgccg aatgaacaag aagaacaaac cccgctgctg ctgcgccccg 360
gattgttcca acatcacctg gaagggtcca gtctgcgggc tggatgggaa aacctaccgc 420
aatgaatgtg cactcctaaa ggcaagatgt aaagagcagc cagaactgga agtcagtac 480
caaggcagat gtaaaaagac ttgtcgggat gttttctgtc caggcagctc cacatgtgtg 540
gtggaccaga ccaataatgc ctactgtgtg acctgtaatc ggatttgccc agagcctgct 600
tcctctgagc aatatctctg tgggaatgat ggagtcacct actccagtgc ctgccacctg 660
agaaggcta cctgcctgct gggcagatct attggattag cctatgaggg aaagtgtatc 720
aaagcaaaagt cctgtgaaga tatccagtgc actggtggga aaaaatgttt atgggatttc 780
aaggttggga gaggccgggtg ttccctctgt gatgagctgt gccctgacag taagtcggat 840
gagcctgtct gtgccagtga caatgccact tatgccagcg agtgtccat gaaggaaagt 900
gcctgctcct cagggtgtgct actggaagta aagcactccg gatcttgcaa ctccatttcg 960
gaagacaccg aggaaggagg ggaagatgaa gaccaggact acagctttcc tatatcttct 1020
attctagagt ggaccgggtg tggagtcgag tgcccaccgt gccagcacc acctgtggca 1080
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa ccaaggaca ccctcatgat ctccgggacc 1140
cctgaggcca cgtgcgtgggt ggtggacgtg agccacgaag acccgagggt ccagttcaac 1200
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc 1260
aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc accgtcgtgc accaggactg gctgaacggc 1320
aaggagtaca agtgcaagggt ctccaacaaa ggcctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1380
tccaacaa ccaaggcagcc ccgagaacca cagggtgaca ccctgcccc atccggggag 1440
gagatgacca agaaccagggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta cccagcgac 1500
atgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacacctccc 1560
atgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1620
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggcctctga caaccactac 1680
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aatgagaat tc 1722

```

```

<210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 46
Thr Gly 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 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 nM, 100, 50 или 10 pM.

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.

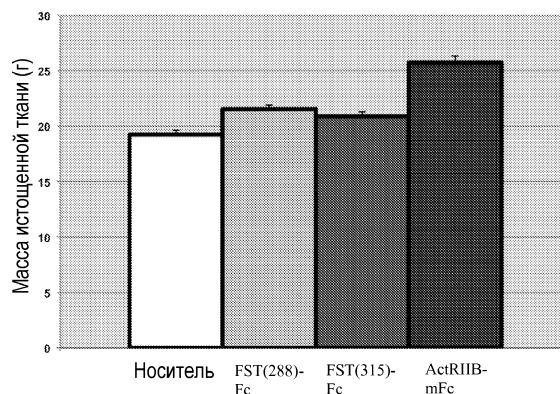
31. Фармацевтический препарат по п.28, где заболевание или расстройство представляет собой плече-лопаточную лицевою мышечную дистрофию.

32. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид по любому одному из пп.1-25.

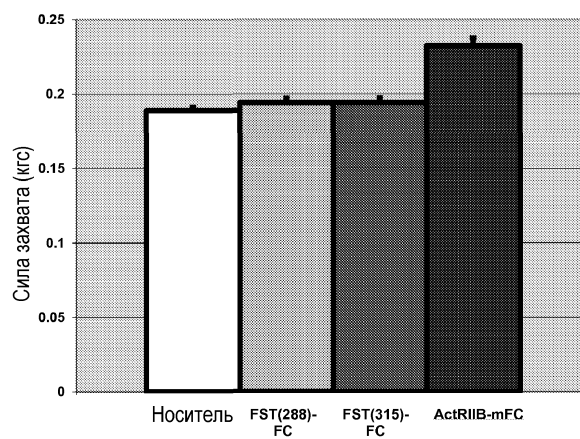
33. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.32.



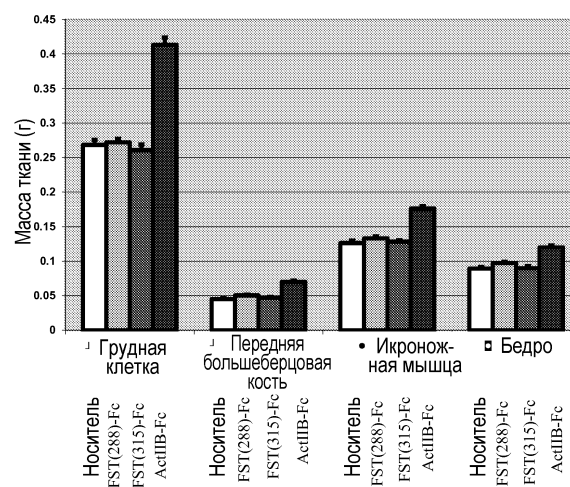
Фиг. 1



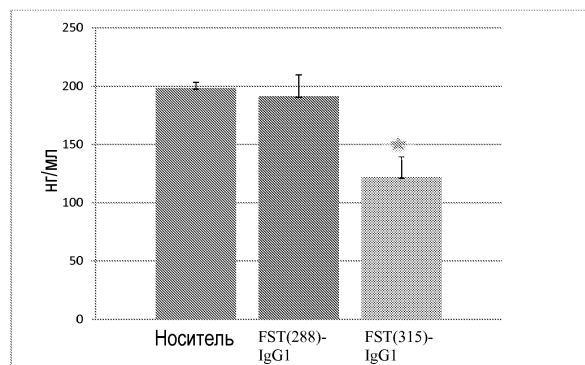
Фиг. 2



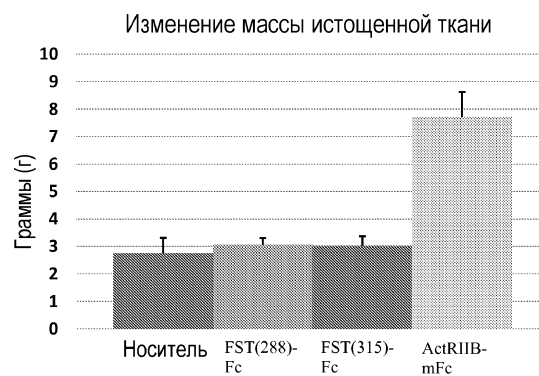
Фиг. 3



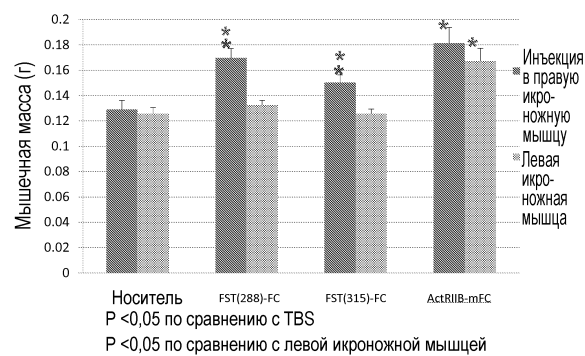
Фиг. 4



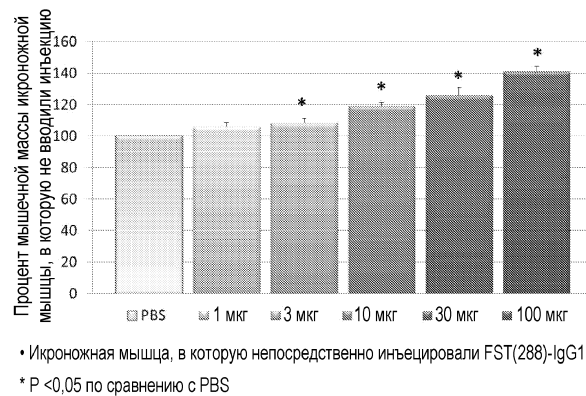
Фиг. 5



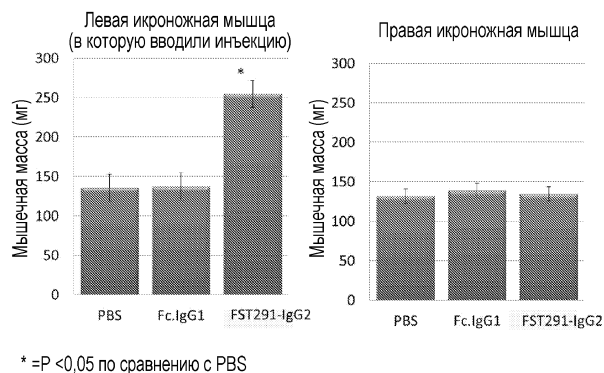
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2