

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (22) Přihlášeno: **29.11.2001**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **07.12.2000**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/251954**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.04.2006**
(Věstník č. 4/2006)
(86) PCT číslo: **PCT/US2001/043165**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/046227**

(21) Číslo dokumentu:

2003-1602

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:
ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN, US

(72) Původce:
Glaesner Wolfgang, Indianapolis, IN, US
Micanovic Radmila, Indianapolis, IN, US
Tschang Sheng-Hung Rainbow, Carmel, IN, US

(74) Zástupce:
JUDr. Otakar Švorčík, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název přihlášky vynálezu:
GLP-1 fúzní proteiny

(57) Anotace:
Řešení se týká sloučenin podobných glukagonu-1 fúzovaných na proteiny, které mají účinek prodlužující poločas života peptidů in vivo. Tyto fúzní proteiny mohou být použity pro léčení diabetes mellitus nezávislého na insulinu a řady dalších chorob.

CZ 2003 - 1602 A3

GPL-1 fúzní proteiny

Oblast techniky

Tento vynález se týká peptidů, podobných glukagonu, včetně analogů a jejich derivátů, fúzovaných na proteiny, které mají účinek na poločas života peptidů in vivo. Tyto fúzní proteiny se dají použít pro léčení diabetes mellitus, který ještě není závislý na inzulinu, stejně jako jiných nemocí.

Dosavadní stav techniky

Peptid 1 podobný glukagonu (dále GLP podle anglického názvu "Glucagon-Like Peptide") (GLP-1) obsahuje 37 aminokyselin, a je vylučován L-buňkami střeva podle množství přijímané potravy. Bylo zjištěno, že stimuluje vylučování inzulinu (inzulinotropní účinky), čímž způsobuje spotřebování glukózy buňkami a snižuje koncentraci glukózy v krevním séru (viz, např., Mojsov, S., Int. J. Peptide Protein Research, 40:333-343 (1992)). Nicméně, GLP-1 je málo aktivní. Následné endogenní štěpení mezi šestým a sedmým místem má za následek účinnější biologicky aktivní GLP-1(7-37)OH peptid. Je známo velké množství typů analogů a derivátů GLP-1 a jsou zde citovány jako "sloučeniny GLP-1". Mezi tyto GLP-1 analogy patří exendiny, což jsou peptidy, které se nacházejí v jedu korovce podezřelého (jedovatá ještěrka z jihozápadu USA). Exendiny mají sekvenční homologii s přírodním GPL-1 a mohou se vázat s receptorem GPL-1 iniciovat signální převáděcí kaskádu odpovědnou za řadu aktivit, které mají souvislost s GPL-1(7-37)OH.

Sloučeniny GPL-1 mají řadu fyziologicky signifikantních aktivit. Tak například se zjistilo, že GPL-1 stimuluje uvolňování inzulinu, menší vylučování glukagonu, inhibuje vyprazdňování žaludku a zvyšuje využívání glukózy (Nauck, M. A. a kol. (1993) Diabetologia 36:741-744, Gutniak, M. a kol (1992) New England J. of Med. 326:1316-1322, Nauck, M. A. a kol. (1993) J. Clin Invest. 91:301-307).

GLP-1 je nejslibnější pro léčení diabetes mellitus, který ještě není závislý na inzulinu (NIDDM). Na trhu je řada orálních léčiv pro léčení rezistence vůči inzulinu, spojené s NIDDM. Jak nemoc postupuje, musí pacient přejít na léčiva, která stimulují uvolňování inzulinu a případně i na léčení, které vyžaduje injekční podávání inzulinu. Současné účinné látky, které stimulují uvolňování inzulinu, však mohou způsobovat hypoglykémii stejně jako ji způsobuje podávání inzulinu. Účinnost GLP-1 nicméně je regulována hladinou glukózy v krvi. Když hladina klesne k určité minimální úrovni, GLP-1 není účinný. Z tohoto důvodu není žádné riziko hypoglykémie, které by vyplývalo z léčení pomocí GLP-1.

Nicméně účinnost terapie pomocí GLP-1 peptidů je omezena jejich rychlým odstraněním a krátkým poločasem rozpadu. Například GLP-1 (7-37) má poločas rozpadu séra jen 3 až 5 minut. Když je GLP-1 (7-36) amid podáván subkutánně, má dobu účinnosti kolem 50 minut. Dokonce analogy a deriváty, které jsou odolné proti endogennímu štěpení proteázou, nemají poločas rozpadu tak dlouhý, aby nebylo nutné opakovat podávání v průběhu 24 hodin. Rychlé odstranění terapeutického činidla je pro pacienta nepohodlné v případech, kdy je žádoucí

udržovat v krvi vysokou hladinu účinné látky v prodlouženém časovém intervalu, dokud není podání účinné látky nutné zopakovat. Dále dlouhodobě účinná sloučenina je zejména důležitá pro diabetické pacienty, jejichž léčebný režim vyžaduje pouze podávání orálních léčiv. Tito pacienti se velmi obtížně přizpůsobují režimu, který vyžaduje vícenásobné podávání injekcí nebo léčiv.

Tento vynález překonává problémy spojené s podáváním sloučeniny, která má krátký plazmový poločas. Sloučeniny podle vynálezu zahrnují GLP-1 sloučeniny fúzované na jiné proteiny s dlouhým poločasem oběhu, jako je Fc podíl imunoglobulinu nebo albuminu.

Obecně se s malými terapeutickými peptidy špatně manipuluje neboť i drobné změny v jejich struktuře mohou působit na jejich stabilitu a/nebo biologickou aktivitu. To zejména platí pro GLP-1 sloučeniny, které jsou právě ve vývoji. Například GLP-1(7-37)OH má tendenci ke změně konformace z primárně alfa helixové struktury na primárně beta vrstvenou strukturu. Z této beta vrstvené formy vzniká spojený materiál, o kterém se má za to, že není aktivní. Je proto překvapující, že bylo možno vyvinout biologicky aktivní GLP-1 fúzní proteiny s prodlouženým poločasem. Bylo to zvláště neočekávané proto, že se s GLP-1(7-37)OH obtížně pracuje a v důsledku velikosti fúzované části vůči malému připojenému peptidu GLP-1.

Sloučeniny podle vynálezu patří mezi heterologní fúzní proteiny, zahrnující první polypeptid s N-zakončením a C-zakončením fúzované na druhý polypeptid s N-zakončením a C-

zakončením, kde první polypeptid je GLP-1 sloučenina a druhý polypeptid je zvolen ze skupiny, do které patří

- a) lidský albumin,
- b) analogy lidského albuminu, a
- c) fragmenty lidského albuminu,

a kde C-zakončení prvního polypeptidu je fúzováno k N-zakončení druhého polypeptidu.

Sloučeniny podle vynálezu také zahrnují heterologní fúzní proteiny zahrnující první polypeptid s N-zakončením a C-zakončením fúzované na druhý polypeptid s N-zakončením a C-zakončením, kde první polypeptid je GLP-1 sloučenina a druhý polypeptid je zvolen ze skupiny, do které patří

- a) lidský albumin,
- b) analogy lidského albuminu, a
- c) fragmenty lidského albuminu,

a kde C-zakončení prvního polypeptidu je fúzováno k N-zakončení druhého polypeptidu přes peptidový linker. Je výhodné, aby byl peptidový linker zvolen ze skupiny sestávající z

- a) na glycin bohatého peptidu,
- b) peptidu majícího sekvenci $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser}]_n$, kde n je 1, 2, 3, 4, 5 nebo 6, a
- c) peptidu majícího sekvenci $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser}]_3$.

Mezi další sloučeniny podle vynálezu patří heterologní fúzní proteiny, zahrnující první polypeptid s N-zakončením a C-zakončením fúzované na druhý polypeptid s N-zakončením a C-zakončením, kde první polypeptid je GLP-1 sloučenina a druhý polypeptid je zvolen ze skupiny, do které patří

- a) Fc podíl imunoglobulinu,

- b) analog Fc podílu imunoglobulinu,
 - c) fragmenty Fc podílu imunoglobulinu,
- a kde C-zakončení prvního polypeptidu je fúzováno k N-zakončení druhého polypeptidu. GLP-1 sloučenina může být fúzována k druhému polypeptidu přes peptidový linker. Je výhodné, aby byl peptidový linker zvolen ze skupiny sestávající z
- a) na glycin bohatého peptidu,
 - b) peptidu majícího sekvenci [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n,
kde n je 1, 2, 3, 4, 5 nebo 6, a
 - c) peptidu majícího sekvenci [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃.

Je obvykle je výhodné, aby GLP-1 sloučenina, která je částí heterologního fúzního proteinu, neměla víc než šest aminokyselin, lišících se od odpovídajících aminokyselin ve sloučeninách GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH nebo Exendin-4. Je dokonce ještě výhodnější, aby GLP-1 sloučenina neměla více než pět aminokyselin, lišících se od odpovídajících aminokyselin ve sloučeninách GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH nebo Exendin-4. Nejvýhodnější je, aby GLP-1 sloučenina neměla více než 4, 3 nebo 2 aminokyseliny, lišící se od odpovídajících aminokyselin ve sloučeninách GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH nebo Exendin-4. Výhodně má GLP-1 sloučenina, která je částí heterologního fúzního proteinu, glycin nebo valin v pozici 8.

Tento vynález také zahrnuje polynukleotidy kódující zde popsané heterologní fúzní peptidy, vektory zahrnující tyto polynukleotidy a hostitelské buňky transfektované nebo transformované zde popsanými vektory. Také je zahrnut proces způsob výroby heterologního fúzního proteinu, při kterém se provádějí kroky transkripce a translace zde popsaného

nukleotidu za podmínek, ve kterých se heterologní fúzní protein exprimuje v detekovatelném množství.

Tento vynález také zahrnuje způsob pro normalizaci hladiny krevní glukózy u savců, kteří to potřebují, při kterém se podává terapeuticky účinné množství zde popsaného heterologního fúzního proteinu.

Vynález je dále ilustrován s odkazem na následující vyobrazení:

Obr. 1: Sekvence aminokyseliny IgG1 Fc zahrnující pantovou oblast, CH₂ a CH₃ domény.

Obr. 2: Sekvence aminokyseliny albuminu lidského séra

Obr. 3: A. SDS-PAGE gel a imunoblot stejného gelu, které ilustrují molekulární hmotnost fúzních proteinů IgG1-Fc a GLP-1-Fc (pás 1, MW standardy, pás 2, čištěný Fc, pás 3, transfektované prostředí Mock, pás 4, Val⁸-GLP-1-Fc, pás 5, Exendin-4-Fc). B. SDS-PAGE gel a imunoblot stejného gelu, které ilustrují molekulární hmotnost fúzních proteinů lidského HSA a GLP-1-HSA (pás 1, MW standardy, pás 2, čištěný HSA, pás 3, transfektované prostředí Mock, pás 4, Val⁸-GLP-1-HSA, pás 5, Val⁸-GLP-1-[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃-HSA).

Obr. 4: SDS-PAGE gel čištěného Fc, albumin, a GLP-1 fúzní proteiny (Pás 1, MW standardy; Pás 2, čištěný Fc; Pás 3, Val⁸-GLP-1-Fc; Pás 4, Exendin-4-Fc; Pás 5, MW standard; Pás 6, Val⁸-GLP-1-HSA; Pás 7, Exendin-4-HSA; Pás 8, Exendin-4-[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃HSA).

Obr. 5: Expresní klonující vektor obsahující Fc oblasti znázorněné na Obr. 1.

Obr. 6: Expresní klonující vektor obsahující albumin sekvenci znázorněnou na Obr. 2.

Obr. 7: Expresní klonující vektor obsahující DNA, v níž je zakódován 15 aminokyselinový linker fúzovaný v rámci a 5' albuminové sekvence znázorněné na Obr. 2.

Obr. 8: Aktivita GLP-1 fúzních proteinů na dávku in vitro.

Obr. 9: Farmakokinetika GLP-1 Fc a HSA fúzních proteinů.

Obr. 10: Glukodynamická odezva Exendin-Fc u dvou normálních hladovějících psů.

Obr. 11: Insulinotropní odezva na Exendin-Fc u dvou normálních hladových psů.

Obr. 12: DNA sekvence zahrnující lidskou IgG1 Fc oblast.

Obr. 13: DNA sekvence zahrnující protein lidského albuminu.

Heterologní fúzní proteiny podle vynálezu zahrnují GLP-1 sloučeninu fúzovaný na lidský albumin, analog lidského albuminu, fragment lidského albuminu, Fc část imunoglobulinu, analog Fc části imunoglobulinu, nebo fragment Fc části imunoglobulinu. C-zakončení sloučeniny GLP-1 může být fúzován

přímo, nebo fúzován přes peptidový linker, N-zakončení albuminu nebo Fc protein. Tyto heterologní fúzní proteiny jsou biologicky aktivní a mají prodloužený poločas života se srovnání s nativním GLP-1.

Je výhodné, když GLP-1 sloučeniny, které tvoří část heterologního fúzního proteinu, zahrnuje polypeptidy, které mají od dvaceti pěti do asi třiceti devíti přírodně se vyskytujících nebo nepřírodně se vyskytujících aminokyselin které mají dostatečnou homologii k nativnímu GLP-1(7-37)OH, tak aby projevovaly insulinotropní aktivitu navázáním na GLP-1 receptor na β -buňkách pankreatu. GLP-1 sloučenina obvykle zahrnuje polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci GLP-1(7-37)OH, analog GLP-1 (7-37)OH, fragment GLP-1(7-37)OH nebo fragment analogu GLP-1(7-37)OH. GLP-1(7-37)OH má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1:

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

(SEQ ID NO: 1)

Jak je zvykem v oboru amino zakončení GLP-1(7- 37)OH bylo označeno číslem 7 a karboxylové zakončení číslem 37. Další aminokyseliny v polypeptidu jsou číslovány postupně, jak je ukázáno v SEQ ID NO: 1. Například pozice 12 je fenylalanin a pozice 22 je glycin.

GLP-1 sloučeniny rovněž zahrnují "GLP-1 fragmenty." Tento GLP-1 fragment je polypeptid získaný odstraněním jedné nebo více aminokyselin z N-zakončení a/nebo C- zakončení GLP-1(7-37)OH nebo jejich analogu nebo derivátu. Nomenklatura použitá pro popis GLP-1(7-37)OH je rovněž použitelná pro GLP-1 fragmenty. Například GLP-1(9-36)OH označuje GLP-1 fragment získaný odstraněním dvou aminokyselin z N-zakončení a jedné aminokyseliny z C-zakončení. Aminokyseliny ve fragmentu jsou označeny stejným číslem, jako odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH. Například N-zakončení glutamové kyseliny kyselina v GLP1(9-36)OH je v pozici 9; pozice 12 je obsazena fenylalaninem; a pozice 22 je obsazena glycinem, jako v GLP-1(7-37)OH. Pro GLP-1(7-36)OH je glycin v pozici 37 na GLP-1(7-37)OH zrušen.

GLP-1 sloučeniny rovněž zahrnují polypeptidy v nichž je přidána jedna nebo více aminokyselin k N-zakončení a/nebo C-zakončení GLP-1(7-37)OH, nebo jeho fragmenty nebo analogy. Je výhodné, když GLP-1 sloučeniny tohoto typu mají více než třicet devět aminokyselin. Aminokyseliny v "rozšířené" GLP-1 sloučenině jsou přiřazovány ke stejným číslům, jako odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH. Například N-zakončení aminokyseliny GLP-1 sloučeniny získané přidáním dvou aminokyselin k N-zakončení GLP1(7-37)OH je v pozici 5; a C-zakončení aminokyseliny GLP-1 sloučeniny získané přidáním jedné aminokyseliny k C-zakončení GLP-1(7-37)OH je v pozici 38. V obou těchto "rozšířených" GLP-1 sloučeninách, jako je GLP-1(7-37)OH, je tedy pozice 12 obsazena fenylalaninem a pozice 22 je obsazena glycinem. Aminokyseliny 1-6 rozšířené GLP-1 sloučeniny jsou výhodně stejné nebo dochází ke

konzervativní substituci aminokyseliny v odpovídající pozici GLP-1(1-37)OH. Aminokyseliny 38-45 rozšířené GLP-1 sloučeniny jsou výhodně stejné nebo dochází ke konzervativní substituci aminokyseliny v odpovídající pozici glukagonu nebo Exendinu-4.

GLP-1 sloučeniny podle vynálezu zahrnují "GLP-1 analogy." GLP-1 analog má dostatečnou homologii s GLP-1(7-37)OH nebo fragmentem GLP-1(7-37)OH, takže tento analog má insulinotropní aktivitu. Výhodně má GLP-1 analog sekvenci aminokyseliny GLP-1(7-37)OH nebo jeho fragmentu, modifikovaného tak, že jedna, dvě, tři, čtyři nebo pět aminokyselin se liší od aminokyselin v odpovídající pozici GLP-1(7-37)OH nebo fragmentu GLP-1(7-37)OH. V názvosloví, které je zde použito pro označení GLP-1 sloučenin, substituující aminokyselina a její pozice je určována před hlavní strukturou. Například $\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1(7-37)OH}$ označuje GLP-1 sloučeninu, v níž glycin, který se normálně nachází v pozici 22 sloučeniny GLP-1(7-37)OH, byl nahrazen kyselinou glutamovou; $\text{Val}^8\text{-Glu}^{22}\text{GLP-1(7-37)OH}$ označuje GLP-1 sloučeninu v níž byl alanin, který normálně nachází v pozici 8 a glycin, který se normálně nachází v pozici 22 na GLP-1(7-37)OH, byly zaměněny valinem a kyselinou glutamovou.

GLP-1 sloučeniny podle vynálezu rovněž zahrnují "GLP-1 deriváty." GLP-1 derivát je definován jako molekula, která má sekvenci aminokyseliny GLP-1 nebo analogu GLP-1, ale navíc mají chemickou modifikaci jedné nebo více postranních skupin aminokyselin, α -uhlíkových atomů, koncové aminoskupiny nebo koncové skupiny karboxylové kyseliny. Chemická modifikace zahrnuje, ale ne výlučně, přidávání chemických skupin,

vytváření nových vazeb a odstraňování chemických skupin. Modifikace postranních skupin aminokyselin zahrnuje, bez omezení, acylaci ϵ -aminoskupin lysinu, N-alkylaci argininu, histidinu nebo lysinu, alkylaci glutamové nebo aspartové karboxylové skupiny a deamidaci glutaminu nebo asparaginu. Modifikace koncové aminoskupiny zahrnuje bez omezení des-amino, N-nižší alkyl, N-di-nižší alkyl a N-acyl modifikaci. Modifikace koncové karboxylové skupiny zahrnuje bez omezení amid, nižší alkylamid, dialkylamid, a nižší alkylester modifikaci. Nižší alkyl je C_1 - C_4 alkyl. Dále jedna nebo více postranních skupin nebo koncových skupin může být chráněna chránicími skupinami, které jsou známy odborníkům zkušeným v oboru proteinové chemie. α -uhlík aminokyseliny může být mono- nebo dimethylovaný.

Kterákoliv GLP-1 sloučenin může být částí heterologních fúzovaných proteinů podle vynálezu, jelikož GLP-1 sloučenina sama o sobě je schopna se navázat a indukovat vznik signálu přes GLP-1 receptor. Vazba GLP-1 receptoru a přenos signálu může být posouzen testy in vitro, které jsou popsány v patentu EP 619 322 a U.S. Patent No. 5 120 712.

Řada účinných GLP-1 fragmentů, analogů a derivátů je v oboru známa a jakýkoliv z těchto analogů a derivátů může být rovněž částí heterologních fúzovaných proteinů podle vynálezu. Ve vynálezu jsou poskytnuty některé příklady nových GLP-1 analogů, stejně jako GLP-1 analogů a derivátů známých v oboru.

Některé GLP-1 analogy a GLP-1 fragmenty známé v oboru zahrnují například GLP-1(7-34) a GLP-1(7-35), GLP-1(7-36),

Gln⁹-GLP-1(7-37), D-Gln⁹-GLP-1(7-37), Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1(7-37), a Lys¹⁸-GLP-1(7-37). GLP-1 analogy jako je GLP-1(7-34) a GLP-1(7-35) jsou popsány v U.S. Patentu č. 5 118 666. Rovněž jsou známy biologicky zpracované formy GLP-1, které mají inzulinotropní vlastnosti, jako je GLP-1(7-36). Jiné známé biologicky účinné GLP-1 sloučeniny jsou popsány v U.S. Patentu č. 5 977 071, Hoffmann, et al., U.S. Patentu č. 5 545 618, Buckley, et al., a Adelhorst, et al., J. Biol. Chem. 269:6275 (1994).

Výhodná skupina GLP-1 analogů je sestavena z GLP-1 analogů vzorce I (SEQ ID NO: 2)

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

Vzorec I (SEQ ID NO: 2)

kde :

Xaa v pozici 8 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 9 je Glu, Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 11 je Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 14 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 16 je Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr,
Glu, Asp, Trp, nebo Lys;

Xaa v pozici 17 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 18 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp, Trp, Tyr, nebo Lys;

Xaa v pozici 19 je Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln, nebo Lys; Xaa
v pozici 20 je Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu,
Asp, Met, Trp, Tyr, nebo Lys;

Xaa v pozici 21 je Glu, Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 22 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 23 je Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 24 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg,
Glu, Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 25 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 26 je Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, nebo His; Xaa v
pozici 27 je Leu, Glu, Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 30 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 31 je Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp, nebo Lys; Xaa v
pozici 32 je Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp,
nebo Lys;

Xaa v pozici 33 je Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu,
Asp, nebo Lys;

Xaa v pozici 34 je Asn, Lys, Arg, Glu, Asp, nebo His;
Xaa v pozici 35 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp, nebo Lys;
Xaa v pozici 36 je Gly, Arg, Lys, Glu, Asp, nebo His;
Xaa v pozici 37 je Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val,
Glu, Asp, nebo Lys, nebo je zrušeno;
Xaa v pozici 38 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, nebo His, nebo je
zrušeno;
Xaa v pozici 39 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, nebo His, nebo je
zrušeno;
Xaa v pozici 40 je Gly, Asp, Glu, nebo Lys, nebo je zrušeno;
Xaa v pozici 41 je Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp, nebo Lys,
nebo je zrušeno;
Xaa v pozici 42 je Ser, Pro, Lys, Glu, nebo Asp, nebo je
zrušeno;
Xaa v pozici 43 je Ser, Pro, Glu, Asp, nebo Lys, nebo je
zrušeno;
Xaa v pozici 44 je Gly, Pro, Glu, Asp, nebo Lys, nebo je
zrušeno;
a Xaa v pozici 45 je Ala, Ser, Val, Glu, Asp, nebo Lys, nebo
je zrušeno;

s podmínkou, že pokud je aminokyselina v pozici 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, nebo je 44 zrušena, potom každá další aminokyselina se rovněž ruší.

Je výhodné, aby GLP-1 sloučenina vzorce I obsahovala méně než šest aminokyselin, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH nebo Exendin-4. Je ještě výhodnější, aby se méně než pět aminokyselin lišilo od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH nebo Exendin-4. A je dokonce ještě výhodnější, aby se méně než čtyři aminokyseliny lišily od odpovídající aminokyseliny v GLP1(7-37)OH nebo Exendin-4.

GLP-1 sloučeniny podle vynálezu zahrnují deriváty vzorce I jako je jejich C-1-6-ester, nebo amid, nebo C-1-6-alkylamid, nebo C-1-6-dialkylamid. Mezinárodní patentová publikace WO 99/43 706 popisuje deriváty GLP-1 sloučenin vzorce I a je zde zahrnuta ve své celistvosti. Sloučeniny vzorce I odvozené, jak je popsáno v mezinárodní patentové publikaci WO 99/43 706, a neodvozené jsou také zahrnuty v tomto vynálezu.

Jiná výhodná skupina GLP-1 sloučenin je tvořena GLP-1 analogy vzorce II (SEQ ID NO: 3):

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser-

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Xaa-Xaa-Leu-Glu-Gly-Xaa-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Phe-

29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile-Xaa-Xaa-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-R

Vzorec II (SEQ ID NO: 3)

kde:

Xaa v pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin, 2-amino-histidin, β -hydroxy-histidin, homohistidin, α -fluormethyl-histidin nebo α -metylhistidin;

Xaa v pozici 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, nebo Thr;

Xaa v pozici 9 je: Thr, Ser, Arg, Lys, Trp, Phe, Tyr, Glu, nebo His;

Xaa v pozici 11 je: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, nebo His;

Xaa v pozici 12 je: His, Trp, Phe, nebo Tyr;

Xaa v pozici 16 je: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val,

Tyr, Glu, nebo Ala;

Xaa v pozici 18 je: His, Pro, Asp, Glu, Arg, Ser, Ala, nebo
Lys;

Xaa v pozici 19 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, nebo
Cys;

Xaa v pozici 23 je: His, Asp, Lys, Glu, Gln, nebo Arg;

Xaa v pozici 24 je: Glu, Arg, Ala, nebo Lys;

Xaa v pozici 26 je: Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu, nebo His;

Xaa v pozici 27 je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, nebo
Lys;

Xaa v pozici 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser, nebo His;

Xaa v pozici 31 je: Asp, Glu, Ser, Thr, Arg, Trp, nebo Lys;

Xaa v pozici 33 je: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, nebo Glu;

Xaa v pozici 34 je: Glu, Lys, nebo Asp;

Xaa v pozici 35 je: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp,
Gly, Pro, His, nebo Glu;

Xaa v pozici 36 je: Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu,
nebo His;

R v pozici 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe,
His, Gly, Gly-Pro, nebo je zrušeno.

Jiná výhodná skupina GLP-1 sloučenin je tvořena GLP-1
analogy vzorce III (SEQ ID NO: 4):

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa-Xaa-Glu-Gly-Xaa-Xaa-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-R

Vzorec III (SEQ ID NO: 4)

kde:

Xaa v pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin, 2-amino-histidin, β -hydroxy-histidin, homohistidin, α -fluormethyl-histidin nebo α -methylhistidin;

Xaa v pozici 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, nebo Thr;

Xaa v pozici 11 je: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, nebo His;

Xaa v pozici 12 je: His, Trp, Phe, nebo Tyr;

Xaa v pozici 16 je: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, nebo Ala;

Xaa v pozici 22: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, nebo Cys;

Xaa v pozici 23 je: His, Asp, Lys, Glu, nebo Gln;

Xaa v pozici 24 je: Glu, His, Ala, nebo Lys;

Xaa v pozici 25 je: Asp, Lys, Glu, nebo His;

Xaa v pozici 27 je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, nebo Lys;

Xaa v pozici 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser, nebo His;

Xaa v pozici 33 je: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, nebo Glu;

Xaa v pozici 34 je: Glu, Lys, nebo Asp;

Xaa v pozici 35 je: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, nebo Glu;

Xaa v pozici 36 je: Arg, Glu, nebo His;

R v pozici 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro, nebo je zrušeno .

Jiná výhodná skupina GLP-1 sloučenin je tvořena GLP-1 analogy vzorce IV (SEQ ID NO: 5):

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Xaa-Xaa-Glu-Gly-Thr-Xaa-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Ala-Ala-Xaa-Glu-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37

Ile-Xaa-Trp-Leu-Val-Lys-Xaa-Arg-R

Vzorec IV (SEQ ID NO: 5)

kde:

Xaa v pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desamino-histidin,
2-amino-histidin, α β -hydroxy-histidin, homohistidin, α -
fluormethyl-histidin nebo α -methylhistidin;

Xaa v pozici 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Met, nebo
Thr;

Xaa v pozici 12 je: His, Trp, Phe, nebo Tyr;

Xaa v pozici 16 je: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val,
Glu, nebo Ala;

Xaa v pozici 22 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, nebo
Cys;

Xaa v pozici 23 je: His, Asp, Lys, Glu, nebo Gln;

Xaa v pozici 26 je: Asp, Lys, Glu, nebo His;

Xaa v pozici 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser, nebo His;

Xaa v pozici 35 je: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp,
Gly, Pro, His, nebo Glu;

R v pozici 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe,
His, Gly, Gly-Pro, nebo je zrušeno .

Jiná výhodná skupina GLP-1 sloučenin je tvořena GLP-1
analogy vzorce V (SEQ ID NO: 6):

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Xaa-Xaa-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Xaa-Ala-Lys-Glu-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37

Ile-Xaa-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R

Vzorec V (SEQ ID NO: 6)

kde:

Xaa v pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desamino histidin, 2-amino-histidin, β -hydroxy-histidin, homohistidin, α -fluormethyl-histidin nebo α -methylhistidin;

Xaa v pozici 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, nebo Thr;

Xaa v pozici 22 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, nebo Cys;

Xaa v pozici 23 je: His, Asp, Lys, Glu, nebo Gln;

Xaa v pozici 24 je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, nebo Lys;

Xaa v pozici 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser, nebo His;

R v pozici 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro, nebo je zrušeno.

Mezi výhodné GLP-1 sloučeniny vzorce I, II, III, IV, a V patří GLP-1 analogy nebo fragmenty GLP-1 analogů, kde analogy nebo fragmenty obsahují jinou aminokyselinu, než alanin v pozici 8 (analogy pozice 8). Je výhodné, aby tyto analogy pozice měly jednu nebo více dalších změn v pozicích 9, 11, 12, 16, 18, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 35, 36, a 37 ve srovnání s odpovídající aminokyselinou nativního GLP-1(7-37)OH. Je také výhodné, aby tyto analogy měly 6 nebo méně změn ve srovnání s odpovídající aminokyselinou nativního GLP-1(7-

37)OH nebo GLP-1(7-36)OH. Ještě výhodnější analogy mají 5 nebo méně změn ve srovnání se srovnatelnými aminokyselinami v nativním GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)OH nebo mají 4 nebo GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)OH. Je dokonce ještě výhodnější, když tyto analogy mají 3 nebo méně změn ve srovnání se srovnatelnými aminokyselinami v nativním GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)OH. Nejvýhodnější mají tyto analogy 2 nebo méně změn ve srovnání se srovnatelnými aminokyselinami v nativním GLP-1(7-37)OH.

Bylo zjištěno, že sloučeniny vzorce II, III, IV, a V mají menší sklon ke shlukování a vytváření nerozpustné formy. To je také v kontextu fúzního proteinu, kde si relativně malý GLP-1 peptid si musí udržet účinnou konformaci, přestože je fúzován na mnohem větší protein. Výhodné GLP-1 sloučeniny vzorce II, III, IV, a V obsažené v fúzních proteinech podle vynálezu zahrnují GLP-1 analogy nebo fragmenty GLP-1 analogů, ve kterých glycin v pozici 22 a zejména v pozici 8 jsou nahrazeny jinou aminokyselinou.

Když je v pozici 22 aspartová kyselina, glutamová kyselina, arginin nebo lysin, v pozici 8 je výhodně glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin nebo metionin a ještě výhodněji valin nebo glycin. Když je v pozici 22 sulfonová kyselina, jako je kyselina cysteová, v pozici 8 je výhodně glycin, valin, leucin, isoleucine, serin, threonin nebo metionin a ještě výhodněji valin nebo glycin.

Jiné výhodné GLP-1 sloučeniny zahrnují GLP-1 analogy vzorce IV (SEQ ID NO:5) kde analogy mají sekvenci GLP-1(7-37)OH, s výjimkou toho případu, že aminokyselina v pozici 8 je výhodně glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin, nebo metionin a ještě výhodněji valin nebo glycin a v pozici

30 je kyselina glutamová, kyselina aspartová, serin, nebo histidin a ještě výhodněji kyselina glutamová.

Jiné výhodné GLP-1 sloučeniny zahrnují GLP-1 analogy vzorce IV (SEQ ID NO:5) kde analogy mají sekvenci GLP-1(7-37)OH s výjimkou toho případu, že aminokyselina v pozici 8 je výhodně glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin, nebo metionin a ještě výhodněji valin nebo glycin a v pozici 37 je histidin, lysin, arginin, threonin, serin, glutamová kyselina, aspartová kyselina, tryptofan, tyrosin, fenylalanin a ještě výhodněji histidin.

Jiné výhodné GLP-1 sloučeniny zahrnují GLP-1 analogy vzorce IV (SEQ ID NO:5) kde analogy mají sekvenci GLP-1(7-37)OH s výjimkou toho případu, že aminokyselina v pozici 8 je výhodně glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin, nebo metionin a ještě výhodněji valin nebo glycin a v pozici 22 je glutamová kyselina, lysin, aspartová kyselina, nebo arginin a ještě výhodněji glutamová kyselina nebo lysin a v pozici 23 je lysin, arginin, glutamová kyselina, aspartová kyselina, a histidin a ještě výhodněji lysin nebo glutamová kyselina.

Jiné výhodné GLP-1 sloučeniny zahrnují GLP-1 analogy vzorce V (SEQ ID NO:6) kde analogy mají sekvenci GLP-1(7-37)OH s výjimkou toho případu, že aminokyselina v pozici 8 je výhodně glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin, nebo metionin a ještě výhodněji valin nebo glycin a v pozici 22 je glutamová kyselina, lysin, aspartová kyselina, nebo arginin a ještě výhodněji kyselina glutamová nebo lysin a v pozici 27 je alanin, lysin, arginin, tryptofan, tyrosin, fenylalanin, nebo histidin a ještě výhodněji alanin.

Jiné výhodné GLP-1 sloučeniny zahrnují GLP-1 analogy vzorce II kde analogy mají sekvenci GLP-1(7-37)OH s výjimkou toho případu, že aminokyselina v pozici 8 a jeden, dva nebo tři aminokyseliny vybrané ze skupiny sestávající z pozice 9, pozice 11, pozice 12, pozice 16, pozice 18, pozice 22, pozice 23, pozice 24, pozice 26, pozice 27, pozice 30, pozice 31, pozice 33, pozice 34, pozice 35, pozice 36, a pozice 37, se liší od aminokyseliny na odpovídající pozici nativního GLP-1(7-37)OH.

Jiné výhodné GLP-1 sloučeniny vzorce II zahrnují: Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Arg²²-GLP-1(7-37)OH, Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Cys²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Cys²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Cys²²-GLP-1(7-37)OH, Glu²²-GLP-1(7-36)OH, Asp²²-GLP-1(7-36)OH, Arg²²-GLP-1(7-36)OH, Lys²²-GLP-1(7-36)OH, Cys²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Cys²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Cys²²-GLP-1(7-36)OH, Lys²³-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²³-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²³-GLP-1(7-37)OH, His²⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His²⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His²⁴-GLP-1(7-37)OH, Lys²⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²³-GLP-1(7-37)OH, Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Asp³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Asp³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Asp³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gln³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Gln³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Gln³⁰-GLP-1(7-37)OH, Tyr³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Tyr³⁰-GLP-1(7-37)OH, Ser³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ser³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Ser³⁰-GLP-1(7-37)OH, His³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁰-GLP-1(7-37)OH, Glu³⁴-GLP-1(7-37)OH,

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

Jiná výhodná skupina GLP-1 analogů a derivátů použitelné v tomto vynálezu je tvořena molekulami vzorce VI (SEQ ID NO: 7)

R₁-X-Glu-Gly¹⁰-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp¹⁵-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu²⁰-Y -Gly-Gln-Ala-Ala²⁵-Lys- Z-Phe-Ile-Ala³⁰-Trp-Leu-Val-Lys-Gly³⁵-Arg-R₂

Vzorec VI (SEQ ID NO: 7)

kde:

R₁ je vybrán ze skupiny zahrnující L-histidin, D-histidin, desamino-histidin, 2-aminohistidin, β-hydroxy-histidin, homohistidin, alfafluormethyl-histidin, a alfamethyl-histidin; X je vybrán ze skupiny zahrnující Ala, Gly, Val, Thr, Ile, a alfamethyl-Ala;

Y je vybrán ze skupiny sestávající z Glu, Gln, Ala, Thr, Ser, a Gly;

Z je vybrán ze skupiny sestávající z Glu, Gln, Ala, Thr, Ser, a Gly; a

R₂ je Gly-OH.

Jiná výhodná skupina GLP-1 sloučenin použitelné v tomto vynálezu je popsána v WO 91/11 457, a sestává se v podstatě z GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), nebo GLP-1(7-37), nebo jejich amidových forem, a jejich farmaceuticky přijatelných solí, které mají alespoň jednu modifikaci, vybranou ze skupiny zahrnující:

(a) záměnu glycinu, serinu, cysteinu, threoninu, asparaginu, glutaminu, tyrosinu, alaninu, valinu, isoleucinu, leucinu, metioninu, fenylalaninu, argininu nebo D-lysinu za lysin v pozici 26 a/nebo pozici 34; nebo záměnu glycinu, serinu, cysteinu, threoninu, asparaginu, glutaminu, tyrosinu, alaninu, valinu, isoleucinu, leucinu, metioninu, fenylalaninu, lysinu, nebo D-argininu za arginin v pozici 36;

(b) záměnu oxidačně rezistentní aminokyseliny za tryptofan v pozici 31;

(c) záměnu aspoň jedné ze skupiny záměn: tyrosin za valin v pozici 16; lysin za serin v pozici 18; kyselina aspartová za kyselina glutamová v pozici 21; serin za glycin v pozici 22; arginin za glutamin v pozici 23; arginin za alanin v pozici 24; a glutamin za lysin v pozici 26; a

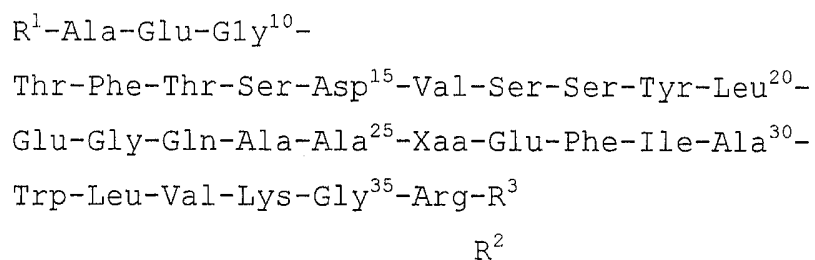
(d) záměnu aspoň jedné ze skupiny záměn: glycin, serin, nebo cystein za alanin v pozici 8; kyselina aspartová, glycin, serin, cystein, threonin, asparagin, glutamin, tyrosin, alanin, valin, isoleucin, leucin, metionin, nebo fenylalanin

za kyselinu glutamovou v pozici 9; serin, cystein, threonin, asparagin, glutamin, tyrosin, alanin, valin, isoleucin, leucin, metionin, nebo fenylalanin za glycin v pozici 10; a kyselina glutamová za kyselinu aspartovou v pozici 15; a

(e) záměnu glycinu, serinu, cysteinu, threoninu, asparaginu, glutaminu, tyrosinu, alaninu, valinu, isoleucinu, leucinu, metioninu nebo fenylalaninu, nebo D nebo N-acylované nebo alkylované formy histidinu za histidin v pozici 7; přičemž v záměnách je (a), (b), (d) a (e), substituované aminokyseliny mohou být popřípadě D-formě a aminokyseliny substituované v pozici 7 mohou popřípadě být v N-acylované nebo N-alkylované formě.

Protože enzym dipeptidyl-peptidáza IV (DPP IV) může být odpovědný za pozorovanou rychlou inaktivaci podávaného GLP-1, [viz např. Mentlein, R., et al., Eur. J. Biochem., 214:829-835 (1993)], jsou v kontextu fúzních proteinů výhodné GLP-1 analogy a deriváty, které jsou chráněny proti aktivitě DPP IV, a ještě výhodnější jsou fúzní proteiny, kde GLP-1 sloučeninou je Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, α-methyl-Ala⁸-GLP-1(7-37)OH, nebo Gly⁸-Gln²¹-GLP-1(7-37)OH.

Jinou výhodnou skupinou GLP-1 sloučenin použitelnou v tomto vynálezu jsou sloučeniny vzorce VII (SEQ ID NO: 8) chráněné v US patentu č. 5 512 549, které je zde výslovně uveden v odkaze.



Vzorec VII (SEQ ID NO: 8)

kde

R^1 je vybrán ze skupiny sestávající z 4-imidazopropionylu, 4-imidazoacetylu nebo 4-imidazo- α,α -dimethylacetylu;

R^2 je vybrán ze skupiny sestávající z C_6 - C_{10} nerozvětveného acylu, nebo chybí;

R^3 je vybrán ze skupiny sestávající z Gly-OH nebo NH_2 ; a

Xaa je Lys nebo Arg.

Ještě výhodnější sloučeniny vzorce IV, použitelné v tomto vynálezu, jsou ty, ve kterých Xaa je Arg a R^2 je C_6 - C_{10} nerozvětvený acyl. Dokonce ještě výhodnější sloučeniny vzorce IV použitelné v tomto vynálezu, jsou ty, ve kterých Xaa je Arg, R^2 je C_6 - C_{10} nerozvětvený acyl, a R^3 je Gly-OH. Jiné vysoce výhodné sloučeniny vzorce IV, použitelné v tomto vynálezu, jsou ty, ve kterých Xaa je Arg, R^2 je C_6 - C_{10} nerozvětvený acyl, R^3 je Gly-OH, a R^1 je 4-imidazopropionyl. A zejména výhodná sloučenina vzorce IV, použitelná v tomto vynálezu, je ta, ve které Xaa je Arg, R^2 je C_8 nerozvětvený acyl, R^3 je Gly-OH, a R^1 je 4-imidazopropionyl.

Výhodně tyto GLP-1 sloučeniny zahrnují GLP-1 analogy, kde základní řetězec těchto analogů nebo fragmentů obsahuje aminokyselinu, jinou než alanin, v pozici 8 (analogy pozice 8). Základní řetězec může rovněž zahrnovat L-histidin, D-histidin, nebo modifikované formy histidinu, jako je desamino histidin, 2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin, α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin v pozici 7. Je výhodné, aby tyto analogy pozice 8 obsahovaly jednu nebo více dalších změn na pozicích 12, 16, 18, 19, 20, 22, 25, 27, 30, 33 a 37 ve srovnání s odpovídající aminokyselinou nativního GLP-1(7-37)OH. Je ještě výhodnější, aby tyto analogy pozice 8 obsahovaly jednu nebo více dalších změn na pozicích 16, 18, 22, 25 a 33 ve srovnání s odpovídající aminokyselinou nativního GLP-1(7-37)OH.

Ve výhodném provedení je GLP-1 analogem GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozici 12 je vybrána ze skupiny sestávající z tryptofanu nebo tyrosinu. Je ještě výhodnější je, když kromě záměny v pozici 12, se aminokyselina v pozici 8 nahradí glycinem, valinem, leucinem, isoleucinem, serinem, threoninem, nebo metioninem a ještě výhodněji valinem nebo glycinem. Je dokonce ještě výhodnější, když kromě záměny v pozicích 12 a 8, se aminokyselina v pozici 22 nahradí kyselinou glutamovou.

V jiném výhodném provedení je GLP-1 analogem GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozici 16 je vybrána ze skupiny sestávající z tryptofanu, isoleucinu, leucinu, fenylalaninu, nebo tyrosinu. Je ještě výhodnější, když kromě záměny v pozicích 16, se aminokyselina v pozici 8 nahradí glycinem, valinem, leucinem, isoleucinem, serinem, threoninem nebo metioninem a ještě výhodněji valinem nebo glycinem. Je dokonce ještě výhodnější, když kromě záměny v pozicích 16 a 8 se aminokyselina v pozici 22 nahradí kyselinou glutamovou. Je také výhodné, když kromě záměny v pozicích 16 a 8, se aminokyselina v pozici 30 nahradí kyselinou glutamovou. Je také výhodné, když kromě záměny v pozicích 16 a 8, se aminokyselina v pozici 37 nahradí histidinem.

V jiném výhodném provedení je GLP-1 analogem GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozici 18 je vybrána ze skupiny sestávající z tryptofanu, tyrosinu, fenylalaninu, lysinu, leucinu nebo isoleucinu, výhodně tryptofanu, tyrosinu a isoleucinu. Je ještě výhodnější, když kromě záměny v pozicích 18, se aminokyselina v pozici 8 nahradí glycinem, valinem, leucinem, isoleucinem, serinem, threoninem nebo metioninem a ještě výhodněji valinem nebo glycinem. Je

dokonce ještě když kromě záměny v pozicích 16 a 8, se aminokyselina v pozici 22 nahradí kyselinou glutamovou.

Je dokonce ještě výhodnější, když kromě záměny v pozicích 16 a 8 se aminokyselina v pozici 30 nahradí kyselinou glutamovou. Je rovněž výhodné, když kromě záměny v pozicích 16 a 8 se aminokyselina v pozici 37 nahradí histidinem.

V jiném výhodném provedení je GLP-1 analogem GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozici 19 je vybrána ze skupiny sestávající z tryptofanu nebo fenylalaninu, výhodně tryptofanu. Je výhodnější, když kromě záměny v pozicích 19 se aminokyselina v pozici 8 nahradí glycinem, valinem, leucinem, isoleucinem, serinem, threoninem nebo metioninem a ještě výhodněji valinem nebo glycinem. Je dokonce ještě výhodnější, když kromě záměny v pozicích 19 a 8 se aminokyselina v pozici 22 nahradí kyselinou glutamovou. Je rovněž výhodné, když kromě záměny v pozicích 19 a 8 se aminokyselina v pozici 30 nahradí kyselinou glutamovou. Je rovněž výhodné, když kromě záměny v pozicích 19 a 8 se aminokyselina v pozici 37 nahradí histidinem.

V jiném výhodném provedení je GLP-1 analogem GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozici 20 je fenylalanin, tyrosin nebo tryptofan. Je výhodnější, když kromě záměny v pozici 20 se aminokyselina v pozici 8 nahradí glycinem, valinem, leucinem, isoleucinem, serinem, threoninem nebo metioninem a ještě výhodněji valinem nebo glycinem. Je dokonce ještě výhodnější, když kromě záměny v pozicích 20 a 8 se aminokyselina v pozici 22 nahradí kyselinou glutamovou. Je rovněž výhodné, když kromě záměny v pozicích 20 a 8 se aminokyselina v pozici 30 nahradí kyselinou glutamovou. Je rovněž výhodné, když kromě záměny v pozicích 20 a 8 se aminokyselina v pozici 37 nahradí histidinem.

V jiném výhodném provedení je GLP-1 analogem GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozici 25 je vybrána ze skupiny sestávající z valinu, isoleucinu a leucinu, výhodně valinu. Je výhodnější, když kromě záměny v pozici 25 se aminokyselina v pozici 8 nahradí glycinem, valinem, leucinem, isoleucinem, serinem, threoninem nebo metioninem a ještě výhodněji valinem nebo glycinem. Je dokonce výhodnější, když kromě záměny v pozicích 25 a 8 se aminokyselina v pozici 22 nahradí kyselinou glutamovou. Je rovněž výhodné, když kromě záměny v pozicích 25 a 8 se aminokyselina v pozici 30 nahradí kyselinou glutamovou. Je rovněž výhodné, když kromě záměny v pozicích 25 a 8 se aminokyselina v pozici 37 nahradí histidinem.

V jiném výhodném provedení je GLP-1 analogem GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozici 27 je vybrána ze skupiny sestávající z isoleucinu nebo alaninu. Je výhodnější, když kromě záměny v pozici 27 se aminokyselina v pozici 8 nahradí glycinem, valinem, leucinem, isoleucinem, serinem, threoninem nebo metioninem a ještě výhodněji valinem nebo glycinem. Je dokonce ještě výhodnější, když kromě záměny v pozicích 27 a 8 se aminokyselina v pozici 22 nahradí kyselinou glutamovou. Je rovněž výhodné, když kromě záměny v pozicích 27 a 8 se aminokyselina v pozici 30 nahradí kyselinou glutamovou. Je rovněž výhodné, když kromě záměny v pozicích 27 a 8 se aminokyselina v pozici 37 nahradí histidinem.

V jiném výhodném provedení je GLP-1 analogem GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozici 33 je isoleucin. Je výhodnější, když kromě záměny v pozici 33 se aminokyselina v pozici 8 nahradí glycinem, valinem, leucinem, isoleucinem, serinem, threoninem nebo metioninem a ještě výhodněji valinem nebo glycinem. Je dokonce výhodnější, když kromě záměny v pozicích 33 a 8 se aminokyselina v pozici 22 nahradí kyselinou

glutamovou. Rovněž je výhodné, když kromě záměny v pozicích 33 a 8 se aminokyselina v pozici 30 nahradí kyselinou glutamovou. Je rovněž výhodné, když kromě záměny v pozicích 33 a 8 se aminokyselina v pozici 37 nahradí histidinem.

GLP-1 sloučeniny mají modifikace na jedné nebo více následujících pozicích: 8, 12, 16, 18, 19, 20, 22, 25, 27, 30, 33 a 37. Tyto GLP-1 sloučeniny vykazují účinnost ve srovnání s GLP-1(7-37)OH a zahrnují sekvenci aminokyseliny vzorce IX (SEQ ID NO:12)

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-
Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Gln-Ala-Xaa₂₅-Lys-Xaa₂₇-
Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Lys-Gly-Arg-Xaa₃₇

Vzorec IX (SEQ ID NO: 12)

kde:

Xaa₇ je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin, 2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin, α -fluormethylhistidin nebo α -methyl-histidin;

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

Xaa₁₂ je: Phe, Trp nebo Tyr;

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

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

Xaa₁₉ je: Tyr, Trp nebo Phe;

Xaa₂₀ je: Leu, Phe, Tyr nebo Trp;

Xaa₂₂ je: Gly, Glu, Asp nebo Lys;

Xaa₂₅ je: Ala, Val, Ile nebo Leu;

Xaa₂₇ je: Glu, Ile nebo Ala;

Xaa₃₀ je: Ala nebo Glu

Xaa₃₃ je: Val, nebo Ile; a

Xaa₃₇ je: Gly, His, NH₂ nebo chybí.

Některé výhodné GLP-1 sloučeniny vzorce IX zahrnují GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Tyr¹²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Tyr¹⁶-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁶-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-

His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂.

Některé výhodné GLP-1 sloučeniny vzorce IX, které mají vícenásobné záměny, zahrnují GLP-1(7-37)OH, kde v pozici 8 je valin nebo glycin, v pozici 22 je kyselina glutamová, v pozici 16 je tyrosin, leucin nebo tryptofan, v pozici 18 je tyrosin, tryptofan nebo isoleucin, v pozici 25 je valin a v pozici 33 je isoleucin. Jiné výhodné GLP-1 sloučeniny zahrnují následující sloučeniny: Val⁸-Tyr¹²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹²-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹²-Phe¹⁹-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Trp¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Leu¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ile¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Phe¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Trp¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Phe¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH a Val⁸-Ile¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH.

GLP-1 sloučeniny podle vynálezu také zahrnují exendinové sloučeniny. Exendin-3 a Exendin-4 jsou biologicky aktivní peptidy, poprvé izolované z jedu ještěrek Helodermatidae a bylo ukázáno, že vážou GLP-1 receptor a stimulují produkci H⁺ závislou na cAMP v parietálních buňkách savců. Exendin-3 a Exendin-4 jsou oba peptidy z 39 aminokyselin, které jsou přibližně z 53 % homologními s GLP-1. Působí jako účinný agonista s aktivitou GLP-1. Lze zaznamenat, že v N-koncové části zkrácený derivát Exendinu, známý jako Exendin(9-39 aminokyselin), je inhibátorem Exendinu-3, Exendinu-4 a GLP-1.

Exendinová sloučenina obvykle obsahuje polypeptid, který má sekvenci aminokyselin Exendinu-3, Exendinu-4 nebo jejich analogů nebo fragmentů. Exendin-3 a Exendin-4 jsou popsány US patentu č. 5 424 286.

Exendin-3 má sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 9:

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser

40 41 42 43 44 45
Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser

(SEQ ID NO: 9)

Exendin-4 má sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 10:

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser

40 41 42 43 44 45
Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser

(SEQ ID NO: 10)

Mezi GLP-1 sloučeniny také patří fragmenty Exendinu, což jsou polypeptidy, získané po zkrácení jedné nebo více

aminokyselin z N-zakončení a/nebo C-zakončení Exendinu nebo analogu Exendinu. Dále mezi GLP-1 sloučeniny patří Exendinové polypeptidy, ve které byla jedna nebo více aminokyselin přidána k N-zakončení a/nebo C-zakončení Exendinu nebo jeho fragmentů. Exendinové sloučeniny tohoto typu mají více než čtyřicet pět aminokyselin.

Mezi GLP-1 sloučeniny také patří "analogy Exendinu". Analog Exendin má dostatečnou homologii s Exendinem-4, Exendinem-3 nebo jejich fragmenty, takovou, že tento analog má inzulinotropní účinnost. Účinnost Exendinových fragmentů a/nebo analogů se dá posoudit s použitím testů in vitro, jako jsou ty, které jsou popsány v EP 619 322 a US patentu č. 5 120 712.

Výhodně má Exendinový analog sekvenci aminokyselin Exendinu-4 nebo jeho fragmentu, modifikovanou tak, aby jedna, dvě, tři čtyři nebo pět aminokyselin lišilo od aminokyselin v odpovídající pozici Exendinu-4 nebo fragmentu Exendinu-4. V názvosloví, které je zde použito pro označování Exendinových sloučenin, se substituující aminokyselina a její pozice je uvedena před výchozí strukturou. Například Val⁸-Exendin-4 znamená Exendinovou sloučeninu, v níž byl glycin, který je normálně v pozici 8 Exendinu-4, zaměněn valinem.

Jiná výhodná skupina GLP-1 sloučenin se sestává z GLP-1/Exendin-4 analogů vzorce VIII (SEQ ID NO:11).

7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Xaa	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Xaa	Ser
18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Xaa	Xaa	Xaa	Glu	Xaa	Xaa	Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37

Ile-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-R

Vzorec VIII (SEQ TD NO: 11)

kde:

Xaa v pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desamino-histidin, 2-amino-histidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin, α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin;

Xaa v pozici 8 je: Gly, Ala, nebo Val;

Xaa v pozici 16 je: Leu nebo Val;

Xaa v pozici 18 je Lys nebo Ser;

Xaa v pozici 19 je: Gln nebo Tyr;

Xaa v pozici 20 je: Met nebo Leu;

Xaa v pozici 22 je: Glu nebo Gln;

Xaa v pozici 23 je: Glu, nebo Gln;

Xaa v pozici 25 je: Val nebo Ala;

Xaa v pozici 26 je: Arg nebo Lys;

Xaa v pozici 27 je Leu nebo Glu;

Xaa v pozici 30 je: Glu nebo Ala;

Xaa v pozici 33 je: Val nebo Lys;

Xaa v pozici 34 je: Asn nebo Lys;

Xaa v pozici 36 je: Gly nebo Arg; a

R v pozici 37 je: Gly, Pro, Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser nebo chybí.

Účinnost 18 různých druhů, které spadají do této skupiny, je uvedena v tabulce 6.

Další Exendinové analogy, které jsou použitelné pro tento vynález, jsou popsány v mezinárodní patentové publikaci PCT WO 99/25728 (Beeley et al.), WO 99/25727 Beeley et al.), WO 98/05351 (Young et al.), WO 99/40788 (Young et al.), WO 99/07404 (Beeley et al), and WO 99/43708 (Knudsen et al).

Fúzní proteiny GLP-1 podle vynálezu mohou zahrnovat glykosylovaná místa. Glykosylace je chemická modifikace, kde jsou sacharidové skupiny přidány k proteinu na určitých místech. Glykosylace proteinů hraje roli při zajištění správného náboje, ověření a stability zralého proteinu a může zaměřit protein na buněčný povrch a způsobit případnou sekreci proteinu. Nejdůležitější je, že glykosylace ovlivňuje rychlost očisty in vivo pro mnoho proteiny. Sacharidy mohou být O-vázané nebo N-vázané. Obecně O-vázané sacharidy jsou navázány ke kyslíku hydroxylové skupiny serinu a threoninu, a N-vázané sacharidy jsou navázány k amidovému dusíku asparaginu. Smluvní místo pro N-glykosylaci je Asn X1 X2, kde X1 je jakákoliv aminokyselina s výjimkou Pro a X2 je Ser nebo Thr.

GLP-1 sloučeniny obvykle nejsou glykosylované in vivo; nicméně je zajímavé, že GLP-1 fúzní proteiny podle vynálezu, mezi které patří GLP-1 sloučenina s C prodlouženým zakončením fúzovaným na Fc sekvenci, je glykosylovaný na posledním serinu v C prodlouženém zakončení (SSGAPPPS*) a na threoninu v pozici 11 v N koncové oblasti Fc (AEPKSCDKTHT*CPPC . . .).

Heterologní Fc fúzní proteiny:

Výše popsané GLP-1 sloučeniny mohou být nafúzovány přímo nebo přes peptidový linker k Fc části imunoglobulinu.

Imunoglobuliny jsou molekuly obsahující polypeptidové řetězce, spojené disulfidovými vazbami, které obvykle mají dva lehké řetězce a dva těžké řetězce. V každém řetězci má jedna doména (V) variabilní sekvenci aminokyselin v závislosti na specifitě molekuly protilátky. Jiné domény (C) mají do značné míry konstantní sekvenci, která je u molekul tohoto typu běžná.

Jak je zde používáno, Fc část imunoglobulinu má význam, který je obecně uváděn v oblasti imunologie. Přesněji řečeno tento termín znamená fragment protilátky, která se získává odstraněním dvou regionů, které vážou antigen (Fab fragmenty), z protilátky. Jedna z cest jak odstranit Fab fragmenty je digestovat imunoglobulin papainovou proteázou. Fc část je tedy vytvořena z přibližně stejně velikých fragmentů z konstantních oblastí obou těžkých řetězců, které jsou spojeny nekovalentními interakcemi a disulfidickými vazbami. Fc část může obsahovat pantové oblasti a prodlužovat se přes CH2 a CH3 domény k C-zakončení protilátky. Příklady pantových oblastí pro lidské a myší imunoglobuliny lze nalézt v publikaci Antibody Engineering, A Practical Guide, Borrebaeck, C.A.K., ed., W.H. Freeman and Co., 1992, a informace o nich jsou zde uvedeny formou odkazu. Fc část může dále obsahovat jednu nebo více glykosylačních míst. Na obrázku 1 je ukázána sekvence aminokyselin reprezentativního Fc proteinu, který obsahuje pantovou oblast, CH2 a CH3 domény a jedno N-glykosylační místo v pozici 82.

Existuje pět typů lidských imunoglobulinových Fc regionů s různými účinky a farmakokinetickými vlastnostmi: IgG, IgA, IgM, IgD a IgE. IgG je nejrozšířenější imunoglobulin v séru. IgG také má ze všech imunoglobulinů v séru nejdelší poločas života (23 dní). Na rozdíl od ostatních imunoglobulinů je IgG účinně recirkulován a následně vázán na Fc receptor. Existují čtyři podtřídy IgG: G1, G2, G3, a G4, z nichž každá má různé účinky a funkce. G1, G2, a G3 může vázat Clq a fixovat doplněk, zatímco G4 nemůže. Přestože G3 je schopen vázat Clq účinněji než G1, G1 je účinnější při zprostředkování doplňujícího buněčného rozkladu. G2 fixuje doplněk velmi neúčinně. Vazebné místo Clq v IgG je umístěno na oblasti karboxylového zakončení CH2 domény.

Všechny IgG podtřídy jsou schopné navazovat se na Fc receptory (CD16, CD32, CD64), přičemž s G1 a G3 jsou účinnější než G2 a G4. Vazná oblast Fc receptoru IgG je tvořena rezidui umístěnými jednak v pantové oblasti a také v oblasti karboxylového zakončení CH2 domény.

IgA může existovat v monomerní a dimerní formě, držící pohromadě J-řetězcem. IgA je druhým nejrozšířenějším Ig v séru, ale má poločas života pouze 6 dnů. IgA má tři účinky a funkce. Váže se k IgA specifickému receptoru na makrofágy a eosinofily, které rozjíždějí fagocytózu a degranulaci. IgA může také fixovat doplněk přes jinou neznámou alternativní cestu.

IgM je exprimován jako pentamer nebo hexamer, držící pohromadě J-řetězcem. IgM má poločas života 5 dnů. Váže se slabě na Clq přes vazné místo lokalizované v jeho CH3 doméně. IgD má poločas života v séru 3 dny. Je nejasné, jaké účinky a funkce náleží tomuto Ig. IgE je monomerní Ig a má poločas

života 2,5 dne. IgE se váže na dva Fc receptory rozjízďejí degranulaci a výsledkem je uvolnění prozánětlivých účinných látek.

V závislosti na požadovaném efektu in vivo mohou heterologní fúzní proteiny podle vynálezu obsahovat jakýkoliv shora popsany isotyp nebo mohou obsahovat změněné Fc regiony, u kterých byl změněn komplement a/nebo vazebné funkce Fc receptoru. Heterologní fúzní proteiny podle vynálezu tedy mohou obsahovat celou Fc část imunoglobulinu, fragmenty Fc části imunoglobulinu nebo jejich analogy fúzované na GLP-1 sloučeninu.

Fúzní proteiny podle vynálezu mohou sestávat z proteinů s jedním řetězcem nebo víceřetězcové polypeptidy. Dva nebo více Fc fúzní proteiny mohou být vyráběny tak, že interagují pomocí disulfidové vazby, která se přirozeně tvoří mezi Fc oblastmi. Tyto multimery mohou být homogenní s ohledem na GLP-1 sloučeninu nebo mohou obsahovat jiné GLP-1 sloučeniny fúzované na N-zakončení Fc části fúzního proteinu.

Bez ohledu na finální strukturu fúzního proteinu, Fc nebo oblasti Fc podobné, musí sloužit k prodloužení poločasu života živé plasmý GLP-1 sloučeniny fúzované na N-zakončení. Dále, fúzovaná GLP-1 sloučenina musí udržovat určitou biologickou aktivitu. Zvětšení poločasu se dá dokázat použitím metody popsané v Příkladu 7, v němž se srovnává poločas života fúzního proteinu s poločasem života samotné GLP-1 sloučeniny. Biologická aktivita se dá zjistit pomocí in vitro a in vivo metod, známých v oboru. Reprezentativní biologické testy jsou popsány jako Příklady 6, 8 a 9.

Vzhledem k tomu, že Fc oblast IgG vyrobená proteolýzou má stejný poločas života in vivo jako intaktní IgG molekula a Fab

fragmenty rychle degradují, má se za to, že příslušná sekvence, prodlužující poločas života, sídlí v CH_2 a/nebo CH_3 doménách. Dále bylo ukázáno v literatuře, že rychlost katabolýzy IgG variant, které neváží s vysokou afinitou Fc receptor nebo Clq , jsou nerozeznatelné od účinnosti vyčištění hlavního divokého typu protilátky, což indikuje, že katabolické místo je odlišné od míst zahrnutých v Fc receptoru nebo Clq vazbě. [Wawrzynczak et al., (1992) Molecular Immunology 29:221]. Studie zaměřené na rozpoznání míst mutageneze, při které se používá murin IgG1 Fc regionu, navrhly, aby místo IgG1 Fc regionu, které kontroluje rychlost katabolýzy, bylo umístěno na mezičlánek $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ domény.

Na základě těchto studií, můžou být Fc regiony za účelem optimalizace poločasu života fúzovaných proteinů modifikovány na katabolickém místě. Je výhodné, aby Fc region, používaný pro heterologní fúzní proteiny podle vynálezu byl odvozen od IgG1 nebo IgG4 Fc regionu. Je výhodnější, aby Fc region byl IgG4 nebo odvozen od IgG4. Je ještě výhodnější, aby IgG Fc region obsahoval CH_2 i CH_3 regiony i pantový region.

Heterologní fúzní proteiny s albuminem:

GLP-1 sloučeniny popsané shora mohou být fúzovány přímo nebo přes peptidový linker na albumin nebo na analog, fragment nebo jejich derivát.

Obecně, albuminové proteiny upravující část fúzovaných proteinů podle vynálezu mohou být odvozeny od albuminu klonovaného od libovolného druhu. Nicméně pro snížení nebezpečí, že se fúzovaný protein stane imunogenní u lidí, je výhodnější použít lidský albumin a fragmenty a jeho analogy. Lidský sérový albumin (HSA) sestává z jednoho

neglykosylovaného polypeptidového řetězce o 585 aminokyselinách se vzorcem o molekulární hmotnosti 66 500. Sekvence aminokyselin lidské HSA je znázorněna na obrázku 2. [Viz Meloun, et al. (1975) FEBS Letters 58:136; Behrens, et al. (1975) Fed. Proc. 34:591; Lawn, et al. (1981) Nucleic Acids Research 9:6102-6114; Minghetti, et al. (1986) J. Biol. Chem. 261:6747]. Byly popsány různé polymorfní varianty a stejně tak analogy a fragmenty albuminu. [Viz Weitkamp, et al., (1973) Ann. Hum. Genet. 37:219]. Například v EP 322 094 vynálezci objevili různé kratší formy HSA. Některé z těchto fragmentů zahrnují HSA(1-373), HSA(1-388), HSA(1-389), HSA(1-369) a HSA(1-419) a fragmenty mezi 1-369 a 1-419. EP 399 666 přináší objev fragmentů albuminu, které zahrnují HSA(1-177) a HSA(1-200) a fragmenty mezi HSA(1-177) a HSA(1-200).

Je třeba vnímat, že heterologní fúzní proteiny podle vynálezu zahrnují GLP-1 sloučeniny, které jsou s jakýmkoliv albuminovým proteinem, včetně fragmentů, analogů a derivátů, v kterých je tento fúzovaný protein biologicky aktivní a má delší plazmový poločas života, než samotná GLP-1 sloučenina. Takže není nutné, aby albuminová část fúzního proteinu měla plazmový poločas života stejný, jako nativní lidský albumin. Fragmenty, analogy a deriváty jsou známy nebo mohou být generovány, aby měly delší poločas života nebo měly délku poločasu života mezi poločasem života nativního lidského albumin a GLP-1 sloučeniny, o kterou jde.

Heterologní fúzní proteiny podle vynálezu zahrnují proteiny, které mají konzervativní aminokyselinovou substituci v GLP-2 sloučenině a/nebo Fc nebo albuminové části fúzního proteinu. "Konzervativní substituce" je nahrazení aminokyseliny jinou aminokyselinou, která má stejný čistý elektrický náboj a přibližně stejnou velikost a tvar. Aminokyseliny s alifatickými nebo substituovanými

alifatickými aminokyselinovými postranními řetězci mají přibližně stejnou velikost, když celkový počet uhlíků heteroatomů v jejich postranním řetězci se neliší o víc než asi čtyři. Mají přibližně stejný tvar, když se počet větší jejich postranního řetězce liší o ne více než jeden. Aminokyseliny s fenylovými nebo substituovanými fenylovými skupinami se považují za přibližně stejně veliké a stejného tvaru. Kromě specificky zde vytvořených, konzervativní substituce se provádějí s přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami.

Výraz "aminokyselina", který se zde používá je míněn v nejširším smyslu a zahrnuje přirozeně se vyskytující aminokyselina, stejně jako nepřirozeně se vyskytující aminokyseliny, včetně analogů a derivátů aminokyselin. Posledně uvedené zahrnují molekuly s aminokyselinovými skupinami. Odborník v oboru rozpozná ve světle této nejširší definice, že zde uvedený odkaz na aminokyselinu zahrnuje například přirozeně se vyskytující proteogenní L-aminokyseliny; D-aminokyseliny; chemicky modifikované aminokyseliny, jako jsou analogy a deriváty aminokyselin; přirozeně se vyskytující neproteogenní aminokyseliny, jako je norleucin, β -alanin, ornithin, GABA atd.; a chemicky připravené sloučeniny, které mají v oboru známé vlastnosti, které tyto aminokyseliny charakterizují. Jak je zde užíváno, výraz "proteogenní" znamená, že aminokyselina může být zabudována v peptidu, polypeptidu nebo proteinu v buňce metabolickou cestou.

Zabudování nepřirodních aminokyselin, včetně syntetických nenativních aminokyselin, substituovaných aminokyselin nebo jedné nebo více D-aminokyselin do heterologních fúzovaných proteinů podle vynálezu může být v mnoha ohledem výhodné. Peptidy obsahující D-aminokyseliny atd. vykazují zvýšenou

stabilitu in vitro nebo in vivo ve srovnání s jejich protějšky obsahujícími L-aminokyseliny. Takže konstrukce peptidů atd. zahrnující D-aminokyseliny může být částečně užitečná, pokud se požaduje větší intracelulární stabilita. Konkrétněji, D-peptidy atd. jsou rezistentní vůči endogenním peptidázám a proteázám, čímž uskutečňují zlepšenou biologickou dostupnost molekule a prodlouženou dobu života in vivo, pokud jsou takové vlastnosti potřebné. Dále, D-peptidy, atd., nemohou být účinně zpracovány pro hlavní komplexní třídu tkáňové kompatibility II-restringové vyjádřené pro pomocné buňky T, a jsou proto schopné vyvolat humorální imunitní odezvu v celém organismu.

Kromě strukturální/funkční analýzy různých peptidů zahrnutých v tomto vynálezu, existuje řada faktorů, které mohou být uvažovány při výběru aminokyselin pro substituci. Jeden z faktorů, který může být uvažován při provádění těchto změn je hydropathický index aminokyselin. Význam hydropathického indexu aminokyselin při interaktivní biologické funkci proteinu byl diskutován v publikaci Kyte a Doolittle (1982, J. Mol. Biol., 157: 105-132). Je akceptováno, že relativní hydropathický charakter aminokyselin přispívá k sekundární struktuře výsledného proteinu. Na druhé straně to má vliv na interakci protein s molekulami, jako jsou enzymy, substráty, receptory, ligandy, DNA, protilátky, antigeny atd. Každá aminokyselina má přiřazen hydropathický index, založený na její hydrofobnosti a charakteristice nábojů: isoleucin (+4,5); valin (+4,2); leucin (+3,8); fenylalanin (+2,8); cystein/cystin (+2,5); methionin (+1,9); alanin (+1,8); glycin (-0,4); threonin (-0,7); serin (-0,8); tryptofan (-0,9); tyrosin (-1,3); prolin (-1,6); histidin (-3,2); glutamát/glutamin/aspartát/asparagin (-3,5); lysin (-3,9) a arginin (-4,5).

Jak je známo z oboru, určité aminokyseliny v peptidu, polypeptidu nebo proteinu se dají nahradit jinými aminokyselinami, které mají podobný hydropathický index nebo stav a jejich efekt má za následek výsledný peptid, atd., který má podobnou nebo zlepšenou biologickou účinnost. Pro provádění těchto změn je výhodné, aby aminokyseliny, které mají hydropathické indexy v rámci hodnot ± 2 jsou navzájem zaměnitelné. Výhodnější substituce jsou ty, ve kterých mají aminokyseliny hydropathické indexy v rozmezí ± 1 . Nejvýhodnější substituce jsou ty, ve kterých aminokyseliny mají hydropathické indexy v rozmezí $\pm 0,5$.

Podobně mohou být aminokyseliny substituovány na základě hydrofilnosti. US. patent č. 4 554 101 vysvětluje, že největší lokální průměrná hydrofilnost proteinu, jak je řízena hydrofilností jeho přiléhajících aminokyselin, koreluje s biologickou vlastností proteinu. Aminokyselinám jsou přiřazeny následující hodnoty hydrofilnosti: arginin/lysin (+3,0); aspartát/glutamát (+3,0 $\pm$ 1); serin (+0,3); asparagin/glutamin (+0,2); glycin (0); threonin (-0,4); prolin (-0,5 $\pm$ 1); alanin/histidin (-0,5); cystein (-1,0); methionin (-1,3); valin (-1,5); leucin/isoleucin (-1,8); tyrosin (-2,3); fenylalanin (-2,5) a tryptofan (-3,4). Jedna aminokyselina v peptidu, polypeptidu nebo protein tedy může být substituována jinou aminokyselinou, která má podobnou index hydrofilnosti a stále produkuje výsledný resultant peptid, atd., který má podobnou biologickou účinnost, t.j. stále si zachovává správnou biologickou funkci. Při provádění takových změn jsou aminokyseliny, které mají hydropathické indexy v rozmezí hodnot ± 2 , se mohou výhodně substituovat navzájem, výhodnější jsou ty, které mají hodnoty v rozmezí ± 1 , a nejvýhodnější jsou ty, které mají hodnoty v rozmezí $\pm 0,5$.

Jak bylo shora podtrženo, substituce aminokyselin v fúzovaných proteinech podle vynálezu může být založena na relativní podobnosti substituentech v postranních řetězcích aminokyselin, například jejich hydrofobicitě, hydrofilnosti, náboji, velikosti atd. Dále mohou být substituce založeny na sekundární strukturní podobnosti. Například helikální aminokyselina může být nahrazena aminokyselinou, která by zachovala helikální strukturu. Uskutečnění konzervativních změn aminokyselin pomocí substitucí, které mají mnohé z předchozích vlastností, má za následek skryté změny v peptidech, atd., a mohou být vybrány ze skupiny, do které náležejí přirozeně se vyskytující aminokyseliny. Aminokyseliny mohou být rozděleny do následujících čtyř skupin: (1) kyselé aminokyseliny; (2) bazické aminokyseliny; (3) neutrální polární aminokyseliny a (4) neutrální nepolární aminokyseliny.

Obecné způsoby výroby heterologních fúzovaných proteinů podle vynálezu.

Ačkoliv heterologní fúzní proteiny podle vynálezu mohou být vyrobeny různými způsoby, výhodné jsou způsoby, které využívají rekombinačních technik. Pro účely tohoto vynálezu, jak je zde vysvětleno a chráněno, dále jsou definovány obecné termíny a zkratky pro molekulární biologii. Termíny a zkratky použité v tomto dokument mají svůj normální význam, pokud není uvedeno jinak. Například "°C" znamená stupně Celsia; "mmolol" znamená milimol nebo milimoly; "mg" znamená miligramy; "µg" znamená mikrogramy; "ml" znamená mililitry a "µl" znamená mikrolitry. Zkratky aminokyselin jsou uvedeny v 37 C.F.R. § 1.822 (b) (2) (1994) .

"Párové báze" nebo "bp" jak je zde používáno, znamená DNA nebo RNA. Zkratky A,C,G a T odpovídají 5'-monofosfatovým

formám deoxyribonukleosidům (deoxy)adenosinu, (deoxy)cytidinu, (deoxy)guanosinu a thymidinu, když se objeví v DNA molekulách. Zkratky U,C,G a A odpovídají 5'.monofosfátovým formám ribonukleosidů uridinu, cytidinu, guanosinu a adenosinu, když se objeví v RNA molekulách. V dvojřetězcové DNA, jsou párové báze spojeny vždy A s T nebo C s G. V DNA/RNA, heteroduplexní párové báze může znamenat spojení A s U nebo C s G. (Viz definice "komplementární", dále.)

"Digesce" nebo "Restrikce" DNA znamená katalytické rozštěpení DNA restrikčním enzymem, který působí jen v některých sekvencích DNA ("sekvenčně specifické endonukleázy"). Různé zde používané restrikční enzymy jsou obchodně dostupné a jejich reakční podmínky, kofaktory a jiné požadavky byly použity, jak jsou známy odborníkovi v oboru. Vhodné pufrů a množství substrátu pro konkrétní restrikční enzymy jsou specifikovány výrobcem nebo se mohou snadno nalézt v literatuře.

"Ligace" znamená způsob výroby fosfodiesterových vazeb mezi dvěma dvouvláknovými fragmenty nukleových kyselin. Pokud není jinak ustanoveno, ligace se dá dosáhnout s použitím známých pufrů a podmínek s použitím DNA ligáz, jako je T4 DNA ligáza.

"Plasmid" znamená extrachromosomální (obvykle) samoreplikující se genetický prvek. Plasmidy jsou obvykle označovány malým písmenem "p", následovaným písmeny a/nebo číslicemi. Zde uvedené výchozí plasmidy jsou dostupné obchodně, obecně a neomezeně dostupné nebo mohou být konstruovány z dostupných plasmidů v souladu s publikovanými postupy. Navíc ekvivaletní plasmidy, podobné těm, které jsou zde popsány, jsou známy v oboru a jsou zřejmě odborníkovi v oboru.

"Klonovací vektor rekombinační DNA", jak je zde používáno, znamená jakýkoliv autonomně se replikující činidlo, které zahrnuje plasmidy a fágy, ale není na ně omezeno. Toto činidlo zahrnuje DNA molekulu, ke které může být přidáno nebo bylo přidáno jeden nebo více dalších segmentů DNA.

"Expresní vektor rekombinační DNA", jak je zde používán, znamená jakýkoliv klonující vektor rekombinační DNA, ve kterém byl zabudován promotor pro řízení transkripce vložené DNA.

"Transkripce" znamená způsob, ve kterém se informace obsažená v nukleotidové sekvenci DNA přenáší do komplementární sekvence RNA.

"Transfekce" znamená vložení expresního vektoru do hostitelské buňky, kde jsou nebo nejsou jakékoliv kódovací sekvence ve skutečnosti exprimovány. Odborníkům v oboru je známo mnoho způsobů transfekce, například společné srážení s fosforečnanem vápenatým, liposomová transfekce a elektroporéza. Úspěšná transfekce je obecně rozpoznává tehdy, když se v hostitelské buňce objeví jakákoliv indikace, že vektor se s vektorem provádí změna.

"Transformace" znamená zavedení DNA do organismu, tak aby DNA byla replikovatelná, buď jako extrachromosomální element nebo chromosomální integrací. Způsoby transformace bakteriálních a eukaryotických hostitelů jsou dobře známy v oboru, mnoho z těchto způsobů, jako je nástřik do jádra, splynutí protoplastů nebo působení vápníku s použitím chloridu vápenatého jsou popsány v J. Sambrook, et al., Molekular Cloning: A Laboratory Manual, (1989). Obecně se zavádí DNA

do kultivačního substrátu, termín transformace se používá jako opak k termínu transfekce.

"Translace" jak je zde používáno, znamená proces, při kterém se používá genetická informace messenger-RNA (mRNA), aby se upřesnila a nasměrovala syntéza řetězce polypeptidu.

"Vektor" znamená sloučeninu nukleové kyseliny, použitou pro transfekci a/nebo transformaci buněk při genové manipulaci, která nese polynukleotidové sekvence, odpovídající příslušným molekulám proteinu, které jsou-li kombinovány s vhodnými řídicími sekvencemi, propůjčují specifické vlastnosti hostitelské buňce, která je transfektována a/nebo transformována. Vhodnými vektory jsou plasmidy, viry a bakteriofágy. Umělé vektory jsou konstruovány sekáním a opětným spojováním DNA molekul z různých zdrojů, přičemž se používán restričních enzymů a ligáz. Termín "vektor", jak je zde používán, zahrnuje klonující vektory rekombinační DNA a expresní vektory rekombinační DNA.

"Komplementární" nebo "Komplementarita", jak je zde používá, znamená párové báze (puriny a pyrimidiny), které se spojují vodíkovými vazbami do dvouřetězcové nukleové kyseliny. Komplementární jsou následující párové báze: guanin a cytosin; adenin a thymin a adenin a uracil.

"Hybridizace", jak je zde používáno, znamená proces, při kterém se řetězec nukleové kyseliny spojuje s komplementárním řetězcem pomocí párování bází. Podmínky používané při hybridizaci dvou neidentických, ale velmi podobných komplementárních nukleových kyselin, se mění v závislosti na stupni komplementarity těchto řetězců a jejich délce. Tyto techniky a podmínky pro jejich provádění jsou dobře známy odborníkům v oboru.

"Izolovaná sekvence aminokyseliny" znamená jakoukoliv sekvenci aminokyseliny, konstruovanou nebo syntetizovanou, která je pozičně odlišná od přírodně se vyskytující sekvence.

"Izolovaná DNA sloučenina" znamená jakoukoliv sekvenci DNA, konstruovanou nebo syntetizovanou, která je pozičně odlišná od přirozené pozice v genomové DNA.

"Izolovaná sloučenina nukleové kyseliny" znamená jakoukoliv sekvenci RNA nebo DNA, konstruovanou nebo syntetizovanou, která je pozičně odlišná od své přirozené pozice.

"Primer" znamená fragment nukleové kyseliny, který funguje jako iniciační substrát pro enzymatické nebo synthetické prodlužování.

"Promotor" znamená sekvenci DNA, která usměrňuje transkripci z DNA na RNA.

"Proba" znamená sloučeninu nukleové kyseliny nebo její fragment, která se hybridizuje s jinou sloučeninou nukleové kyseliny.

"Přesnost" hybridizačních reakcí je snadno stanovitelná odborníkem v oboru a obecně se zjišťuje empirickým výpočtem, závislým na délce proby, teplotě promývání a koncentraci solí. Obecně, delší proby vyžadují vyšší teploty pro správnou teplotní hybridizaci, a kratší proby potřebují nižší teplotu. Hybridizace obecně závisí na schopnosti denaturované DNA znovu hybridizovat, když jsou v médiu přítomny komplementární řetězce pod svou poloviční teplotou denaturace. Čím vyšší je stupeň požadované homologie mezi probou a hybridizovatelnou

sekvencí, tím vyšší teplota se dá použít. Jako výsledek je třeba uvést, že vyšší relativní teploty mají tendenci dělat reakci přesnější, zatímco nižší teploty méně. Pro uvedení dalších podrobností a vysvětlení přesnosti hybridizace viz Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, 1995.

"Přesné podmínky" nebo "vyšší přesnost podmínek", jak jsou zde popsány, mohou být stanoveny tím, že (1) využívají malou iontovou sílu a vysokou teplotu pro promývání, například 15 mmol chlorid sodný/1,5 mmol citrát sodný/0,1 % dodecylsulfát sodný při 50°C; (2) využívají během hybridizace denaturační činidlo, jako je formamid, například 50 % (v/v) formamid s 0,1 % albumin hovězího séra /0,1 % fikol/0,1 % polyvinylpyrrolidon/50 mmol pufr s fosforečnanem sodným při pH 6,5 s 750 mmol chlorid sodný/75 mmol citrát sodný při 42 °C; nebo (3) využívá 50 % formamid, 5X SSC (750 mmol chlorid sodný, 75 mmol citrát sodný), 50 mmol fosforečnan sodný (pH 6,8), 0,1 % difosforečnan sodný, 5X Denhardtův roztok, DNA ze spermatu lososa upraveného ultrazvukem (50 µg/ml), 0,1 % SDS, a 10 % dextransulfát při 42 °C s promytím při 42 °C v 0,2X SSC (30 mmol sodný chlorid sodný /3 mmol citrát sodný) a 50 % formamidem při 55°C, následovaným intenzivním promytím s pomocí 0,1 X SSC obsahujícího EDTA při 55°C.

"Středně přesné podmínky" jsou popsány v Sambrook et al. [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, (1989)], a zahrnují použití promývacích roztoků a hybridizačních podmínek (tj. teploty, iontové síly a % SDS) méně přísných, než bylo popsáno dříve. Příkladem těchto podmínek je inkubace přes noc při 37°C v roztoku, který obsahuje: 20% formamidu, 5X SSC (750 mmol chlorid sodný, 75 mmol citrát sodný), 50 mmol fosforečnan sodný při pH 7,6, 5X Denhardtův roztok, 10 % dextransulfát a 20 mg/ml DNA lososího

spermatu, narušeného denaturací, po němž následuje promytí v 1X SSC při přibližně 37-50°C. Odborník v oboru snadno rozpozná, jak nastavit teplotu, iontovou sílu atd. pokud je nutné přizpůsobit různé faktory, jako je délka proby a podobně.

"PCR" znamená známou polymerační reakci řetězce, která využívá teplotně stabilní polymerázu DNA.

"Vedoucí sekvence" znamená sekvenci aminokyseliny, která může být enzymaticky nebo chemicky odstraněna, aby se dal vyrobit požadovaný polypeptid, o který nám jde.

"Vylučovací signální sekvence" znamená aminokyselinovou sekvenci, obecně přítomnou na N-koncové oblasti většího polypeptidu, která funguje jako iniciátor spojení tohoto polypeptidu membránovými součástmi buňky, jako je endoplasmatické retikulum a vyloučení tohoto polypeptidu přes plazmovou membránu.

Konstrukce DNA kódující heterologní fúzní proteiny podle vynálezu:

Standardní albuminové a imolunoglobulinové proteinů lze získat z mnoha zdrojů. Například lze tyto proteiny získat z cDNA knihovny, připravené z tkání a buněk, které obsahují mRNA, o niž nám jde, v detekovatelném množství. Knihovny lze prohledávat pomocí prob, vyrobených s použitím známých DNA nebo proteinových sekvencí pro nalezení sekvence pro konkrétní protein, který nás zajímá. Například imolunoglobulin light nebo heavy chain constant regions jsou popsány v Adams, et al. (1980) Biochemistry 19:2711-2719; Goughet, et al. (1980) Biochemistry 19:2702-2710; Dolby, et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6027-6031; Rice et

al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7862-7862; Falkner, et al. (1982) Nature 298:286-288 a Morrison, et al. (1984) Ann. Rev. Immunol. 2:239-256. Některé odkazy popisující albuminové proteiny a DNA sekvence jsou obsaženy v Meloun, et al. (1975) FEBS Letters 58:136; Behrens, et al. (1975) Fed. Proc. 34:591; Lawn, et al. (1981) Nucleic Acides Research 9:6102-6114 a Minghetti, et al. (1986) J. Biol. Chem. 261:6747.

Screening cDNA nebo genomové knihovny s vybranou probou může být prováděno s použitím standardních postupů, které jsou popsány v Sambrook et al., Molekular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989). Alternativním prostředkem pro izolaci genů kódujících albuminový nebo imunoglobulinový protein, je způsob PCR [Sambrook et al., supra; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1995)]. PCR primery lze konstruovat na základě známých sekvencí.

Obecně, standardní sekvence s plnou délkou klonovaná z konkrétních druhů může sloužit jako matrice pro vytvoření analogů, fragmentů a derivátů, které si udržují schopnost přenášet delší dobu života na GLP-1 sloučeniny, které jsou částí fúzovaných proteinů. Je výhodné, aby Fc a albuminové části heterologních fúzovaných proteinů podle vynálezu byly odvozeny od nativní lidské sekvence za účelem snížit riziko potenciální imunogenicity fúzovaných proteinů u lidí.

Zejména je výhodné, aby imunoglobulinová část fúzního proteinu podle vynálezu obsahovala pouze Fc fragment imunoglobulinu. V závislosti na tom, zda je žádoucí konkrétní účinek nebo funkce a na strukturních vlastnostech fúzního proteinu, může Fc fragment obsahovat pantovou oblast spolu s

CH2 a CH3 doménami nebo některé jejich další kombinace. Tyto Fc fragmenty mohou být konstruovány s použitím PCR technik s primery určenými k hybridizaci sekvencí, odpovídajících požadovanému konci fragmentu. Pokud jsou podobně požadovány fragmenty albuminu, jsou použity PCR primery, které jsou komplementární s interními albuminovými sekvencemi. Mohou být rovněž vytvořeny PCR primery, které tvoří restrikční enzymové místo, aby se dosáhlo klonování do expresního vektoru.

DNA kódující GLP-1 sloučeniny podle vynálezu může být vyrobena mnoha různými způsoby, včetně způsobů klonování, které byly popsány shora, stejně jako chemickou syntézou DNA. Chemická syntéza může být atraktivní, aby poskytla krátkou délku kódovaného peptidu. Byla publikována aminokyselinová sekvence pro GLP-1, stejně jako sekvence preproglukagonového genu. [Lopez, et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80:5485-5489; Bell, et al. (1983) Nature, 302:716-718; Heinrich, G., et al. (1984) Endocrinol, 115:2176-2181; Ghigllione, M., et al. (1984) Diabetologia 27:599-600]. Primery tedy mohou být vytvořeny pro PCR nativní GLP-1 sloučeniny a jejich fragmenty.

Gen kódující fúzovaný protein může být konstruován ligací DNA kódující GLP-1 sloučeninu s DNA kódující albumin nebo Fc protein. Gen kódující GLP-1 sloučeninu a gen kódující albumin nebo Fc protein mohou být rovněž připojeny přes DNA kódující linkerový peptid.

Funkce a stabilita heterologních fúzovaných proteinů podle vynálezu in vivo může být zlepšena přidáním malých peptidových linkerů pro prevenci potenciálních nežádoucích interakcí domén. Ačkoliv tyto linkery mohou mít potenciálně jakoukoliv délku a obsahovat jakoukoliv kombinaci aminokyselin, je výhodné, když jejich délka není větší, než

jaká je nezbytná pro prevenci nežádoucích interakcí domén a/nebo optimalizaci biologické aktivity a/nebo stability. Obecně by linkery neměly obsahovat aminokyseliny s extrémně velkými postranními řetězci nebo aminokyseliny, způsobilými zavést signifikantní sekundární strukturu. Je výhodné, aby linker byl serin-glycin a měl délku kratší než 30 aminokyselin. Je výhodnější, když linker má délku kratší než 20 aminokyselin. Je dokonce ještě výhodnější, když má linker délku kratší než 15. Výhodný linker obsahuje opakování sekvence Gly-Gly-Gly-Gly-Ser. Je výhodné, když má mezi 2 až 6 opakování této sekvence. Je dokonce ještě výhodnější, když má mezi 3 a 4 opakováními sekvence.

DNA kódující divoký typ GLP-1, albuminu a Fc polypeptidu a jejich fragmenty, může být mutována buď před ligací nebo v kontextu cDNA, kódující celý fúzovaný protein. V oboru je známo mnoho mutagenních technik. Například, mutagenní metoda PCR využívá protažení překrývaného řetězce, aby se vytvořily specifické mutace bází za účelem změny specifických aminokyselinových sekvencí v odpovídajícím protein. Tato PCR mutagenese vyžaduje použití čtyř primerů, dvou v přední orientaci (primery A a C) a dvou v zadní orientaci (primery B a D). Mutatovaný gen se zesiluje z vzorku divokého typu ve dvou různých krocích. První reakce zesiluje gen z poloviny tím, že se provádí reakce A a B a reakcí, která separuje C od D, kde B a C primery jsou zaměřeny na oblast genu, který má být mutován. Když se tyto primery srovnají s cílovou oblastí area, obsahují nesprávně sdružené báze, které se mají změnit. Jakmile jsou reakce A a B a C a D reakce dokončeny, jsou reakční produkty izolovány a smíchány pro použití jako vzorek pro reakci A a D. Výtěžkem této reakce je potom plně mutovaný produkt.

Jakmile byl vyroben gen kódující celý fúzovaný protein, může být klonován do vhodného expresního vektoru. Specifické strategie, kterou mohou být použity k vytvoření GLP-1 fúzovaných proteinů podle vynálezu jsou popsány v příkladu 1.

Obecné způsoby pro rekombinanční exprimaci heterologních fúzovaných proteinů podle vynálezu:

Hostitelské buňky jsou transfektované nebo transformované zde popsanými expresními nebo klonujícími vektory pro výrobu heterologního fúzního proteinu a kultivovány v běžném živném roztoku upraveném pro budící promotory, vybrané transformanty nebo zesílení genů kódujících požadované sekvence. Kultivační podmínky, jako je prostředí, teplota, pH a podobně, mohou být zvoleny odborníkem v oboru bez nadměrného počtu experimentů. Obecně lze principy, postupy a praktické techniky pro maximalizování výtěžků buněčných kultur nalézt v publikaci Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) a Sambrook, et al., supra. Způsoby transfekce jsou známy odborníkům v oboru, například, CaPO_4 a elektroporace. Obecné aspekty systému transformace hostitelských buněk savců byly popsány v US Patent č. 4 399 216. Transformace do produktu je obvykle prováděna podle metody Solingen et al., J Bact. 130(2): 946-7 (1977) a Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (8) : 3829-33 (1979) . Rovněž mohou být použity další způsoby pro zavádění DNA do buňky, jako je jaderná mikroinjekce, elektroporace, fúze bakteriálního protoplastu s intaktní buňkou nebo polykationty, například, polybren nebo polyomithin. Pro různé techniky transformace buněk savců viz Keown, et al., Methods in Enzymology 185: 527-37 (1990) a Mansour, et al., Nature 336(6197): 348-52 (1988).

Vhodné hostitelské buňky pro klonování a expresi nukleových kyselin (např. DNA) ve vektorech zde zahrnují prokaryota, kvasinky nebo vyšší eukaryotické buňky. Mezi vhodná prokaryota patří (aniž by byl výčet těchto prokaryot na tyto buňky omezen) eubakterie, jako jsou Gram-negativní nebo Gram-pozitivní organismy, například, Enterobacteriacea jako je *E. coli*. Různé kmeny *E. coli* jsou běžně dostupné, jako například *E. coli* K12 kmen MM294 (ATCC 3 1.446); *E. coli* X1 776 (ATCC 3 1.537); *E. coli* kmen W3 110 (ATCC 27.325) a K5 772 (ATCC 53.635). Mezi jiné vhodné prokaryotické hostitelské buňky patří Enterobacteriaceae jako je *Escherichia*, např. *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, např. *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, např. *Serratia marcescans* a *Shigella*, stejně jako *Bacilli* jako je *B. subtilis* a *B. licheniformis* (např. *B. licheniformis* 4 1 P popsáný v DD266,7 10, publikovaný 12. dubna 1989), *Pseudomonas* jako je *P. aeruginosa* a *Streptomyces*. Tyto příklady se spíše dají považovat za ilustrativní, než za omezující. Zejména výhodný jako hostitel nebo základní hostitel je kmen W3110, protože se jedná o nejběžnější hostitelský kmen pro fermentaci produktů rekombinační DNA. Hostitelská buňka s výhodou vylučuje minimální množství proteolytických enzymů. Například, proto aby se dosáhlo genetické mutace v genech kódujících proteiny, endogenní vůči hostiteli, může být modifikován kmen W3 110, přičemž příklady těchto hostitelů zahrnují *E. coli* W3110 kmen 1A2, který má kompletní genotyp *ronA*; *E. coli* W3 110 kmen 9E4, který má kompletní genotyp *ton4 ptr3*; *E. coli* W3110 kmen 27C7 (ATCC 55,244), který má kompletní genotyp *tonA, ptr3 phoA El5 (argF-lac) I69 degP ompT /can'*; *E. coli* W3110 kmen 40B4, což je kmen 37D6, který je má non-kanamycin rezistentní *degP* deleční mutaci; a *E. coli* kmen, který má mutovanou periplasmickou proteázu, popsanou v US. Patentu č. 4 946 783, vydaném 7. srpna 1990. Alternativně jsou vhodné způsoby

klonování in vivo, např. PCR nebo jiné reakce polymeráz s nukleovými kyselinami.

Vhodnými klonujícími nebo expresními hostiteli pro vektory fúzovaných proteinů jsou kromě prokaryot eukaryotické mikroby, jako jsou vláknité houby nebo kvasinky. Nejběžněji používaným nižším eukaryotickým hostitelským mikroorganismem je *Saccharomyces cerevisiae*. Mezi jiné patří *Schizosaccharomyces pombe* [Beach and Nurse, Nature 290: 140-3 (1981); EP 139,383 publikovaný 2. květen 1995]; *Muyveromyces hosts* [US Patent č. 4 943 529; Fleer, et al., Bio/Technology 9(10): 968-75 (1991)] jako je např. *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574) [de Louvencourt et al., J. Bacteriol. 154(2): 737-42 (1983)]; *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906) [Van den Berg et al., Bio/Technology 8(2): 135-9 (1990)]; *K. thermotolerans* a *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070) [Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol. 28(4): 265-78 (1988)]; *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa* [Case, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(10): 5259-63 (1979)]; *Schwanniomyces* jako je *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394 538 publikováno 31. října 1990) a vláknité houby jako jsou např. *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publikováno 10. ledna 1991) a *Aspergillus* hostitel jako je *A. nidulans* [Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 112(1): 284-9 (1983)]; Tilburn, et al., Gen 26(2-3): 205-21 (1983); Melton, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(5): 1470-4 (1984)] a *A. niger* [Kelly and Hynes, EMBO J. 4(2): 475-9 (1985)]. Methylotrópní kvasinky jsou zvoleny mezi druhy, mezi které patří *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* a *Rhodotorula*. Seznam specifických druhů, který je příkladem

této třídy kvasinek lze nalézt v publikaci C. Antony, The Biochemistry of Methylophilic 269 (1982).

Vhodné hostitelské buňky pro expresi fúzovaných proteinů podle vynálezu jsou odvozeny od vícebuněčných organismů. Příklady buňky bezobratlých (invertebrata) jsou buňky hmyzu, jako je *Drosophila* S2 a *Spodoptera* Sp, *Spodoptera* high5, stejně jako rostlinné buňky. Příklady vhodných savčích hostitelských buněčných linií jsou vaječníky čínského křečka (CHO) a COS buňky. Konkrétnějšími příklady jsou linie CV1 z opičích ledvin, transformovaná SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linie z ledvin lidských embryí [293 nebo 293 buňky subklonované pro růst suspenzní kultury, Graham, et al., J. Gen Virol., 36(1): 59-74 (1977)]; buňky vaječníku čínského křečka/-DHFR [CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(7): 4216-20 (1980)]; buňky myši (sertoli) [TM4, Mather, Biol. Reprod. 23(1):243-52 (1980)]; lidské plicní buňky (W138, ATCC CCL 75); lidské jaterní buňky (Hep G2, HB 8065) a tumor myši prsní žlázy (MMT 060562, ATCC CCL51). Domníváme se, že výběr vhodné hostitelské buňky je pro odborníka v oboru snadný.

Fúzovaný protein podle vynálezu může být rekombinačně vyroben přímo nebo jako protein, který má signální sekvenci nebo jiné další sekvence, které tvoří specifické štěpné místo na N-zakončení zralého fúzního proteinu. Obecně může být signální sekvence složkou vektoru nebo může být částí DNA kódující fúzovaný protein, která je zavedena do vektoru. Signální sekvence může být prokaryotickou signální sekvencí vybranou například ze skupiny, do které patří alkalická fosfatáza, penicillináza, lpp nebo tepelně stabilní enterotoxinové II zavaděče. Pro vylučování kvasinek může být signální sekvencí např. zavaděč kvasinkové invertázy, zavaděč alfa faktoru (včetně zavaděčů *Saccharomyces* a *Kluyveromyces* cc-faktoru, přičemž druhý je popsán v US Patentu č. 5 010 182)

nebo zavaděč kyselé fosfatázy, zavaděč glukamylázy C. albicans (EP 362,179) nebo signál, popsáný v publikaci WO 90/13 646. Při expresi savčích buněk mohou být použity pro kontrolu vylučování proteinu savčí signální sekvence, jako jsou signální sekvence z vylučovaných polypeptidů stejných nebo příbuzných druhů, stejně jako vylučovací zavaděče virů.

Expresní i klonovací vektory obsahují sekvenci nukleové kyseliny, která umožňuje, aby se vektor replikoval v jedné nebo více vybraných hostitelských buňkách. Takové sekvence jsou dobře známy pro různé bakterie, kvasinky a viry. Pro většinu Gram-negativních bakterií je vhodný původ replikace z plasmidu pBR322, původ z plasmidu 2u je vhodný pro kvasinky a klonovací vektory v savčích buňkách je vhodný původ z různých virů (SV40, polyoma, adenovirus, VSV nebo BPV).

Expresní a klonovací vektory obvykle obsahují selekční gen, rovněž označovaný jako volitelný marker. Obvyklé selekční geny kódují proteiny, které (a) dávají rezistenci antibiotikům nebo jiným toxinům, např. ampicilinu, neomycinu, methotrexátu nebo tetracyklinu, (b) doplňují autotrofní nedostatky nebo (c) dodávají kritické živiny, které nejsou dostupné v komplexním médiu např. gen kódující D-alanin racemázu pro Bacilli.

Příkladem vhodných volitelných markerů pro savčí buňky jsou ty, které jsou schopné rozpoznat buňky způsobilé převzít nukleovou kyselinu kódující fúzovaný protein, jako je as DHFR nebo thymidinkináza. Pokud je použit divoký typ DHFR, je vhodnou hostitelskou buňkou buněčná linie CHO s nedostatečnou aktivitou DHFR, vyrobená a šířená, jak je popsáno [Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(7): 4216-20 (1980)]. A vhodným selekčním genem pro použití v kvasinkách je trp1 gen

přítomný v kvasinkovém plasmidu YRp7 [Stinchcomb, et al., Nature 282(5734): 39-43 (1979); Kingsman, et al., Gen 7 (2) : 141-52 (1979) ; Tschumper, et al. , Gen 10 (2) : 157-66 (1980)]. Tento trp1 gen uskutečňuje selekční marker pro a mutovaný kmen kvasinek, u kterých chybí schopnost růstu v tryptofanu, například, ATCC No. 44076 nebo PEPC1 [Jones, Genetics 85: 23-33 (1977)].

Expresní a klonující vektory obvykle obsahují promotor operabilně napojený sekvenci nukleové kyseliny kódující fúzovaný protein, aby řídila syntézu mRNA. Promotory rozpoznané řadou potenciálně hostitelských buněk jsou dobře známy. Mezi promotory vhodné pro použití s prokaryotickými hostiteli patří β -laktamáza a laktozové promotorové systémy [Chang, et al., Nature 275 (5681) : 617-24 (1978); Goeddel, et al. , Nature 281 (5732) 544-8 (1979)], alkalická fosfatáza a tryptofan (up) promotorový systém [Goeddel, Nukleic Acids Res. 8(18): 4057-74 (1980); EP 36,776 publikovaný 30. září 1981], a hybridní promotory, jako je tento promotor [deBoer, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1) : 21-5 (1983)]. Promotory pro použití v bakteriálních systémech také obsahují sekvenci Shine-Dalgarno (S. D.) operabilně navázanou na DNA kódující fúzovaný protein.

Mezi příklady vhodných promotorových sekvencí pro použití s kvasinkovými hostiteli patří 3-fosfoglycerátkináza [Hitzeman, et al. , J. Biol. Chem. 255 (24) : 12073-80 (1980)] nebo jiné glykolytické enzymy [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry 17(23): 49007 (1978)], jako jsou enoláza, glyceraldehyde-3-fosfátdehydrogenáza, hexokináza, pyruvátdekarboxyláza, fosfofruktokináza, glukosa-6-fosfát isomeráza, 3-fosfoglycerátmutáza, pyruvátkináza, triosefosfátisomeráza, fosfoglukosoisomeráza a glukokináza.

Jiné kvasinkové promotory, které jsou indukujícími promotory, které mají další výhody spočívající v transkripčně řízených růstových podmínkách, jsou promotorovými regiony pro alkoholdehydrogenázu 2, isocytochrom C, kyselou fosfatázu, degradativní enzymy spojené metabolismem dusíku, metallothionein, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázou a enzymy zodpovědnými za využití maltózy a galaktózy. Vhodné vektory a promotory použitelné pro expresi kvasinek jsou dále popsány v EP 73 657. Transkripce mRNA kódující fúzovaný protein z vektorů v savčích hostitelských buňkách může být řízena například promotory, získanými z genomů virů, jako jsou virus polyomu, fowlpox virus, adenovirus (jako je Adenovirus 2), virus hovězího papilomu, virus ptačího sarkomu, cytomegalovirus a retrovirus, virus hepatitis-B a Virus Simian 40 (SV40), z heterologních savčích promotorů např. aktinový promotor nebo imunoglobulinový promotor a promotory vzniklé tepelným šokem, za podmínky, že takové promotory jsou kompatibilní se systémem hostitelské buňky.

Transkripce polynukleotidu, kódujícího fúzovaný protein vyššími eukaryoty, může být zvýšena vložením zesilovací sekvence do vektoru. Zesilovače jsou elementy DNA působící cis mechanismem, obvykle od 10 do 300 bp, které působí na promotor tak, že zvyšují jeho transkripci. Ze savčích genů je známo mnoho zesilovacích sekvencí (globin, elastáza, albumin, α -ketoprotein a insulin). Obvykle se v tomto případě použije zesilovač z eukaryotických buněk viru. Mezi příklady patří zesilovač SV40 na posledním replikačním místě (bp 100-270), raný promotor zesilovač cytomegaloviru, zesilovač polyomu na posledním replikačním místě a zesilovač adenoviru. Zesilovač může být zapojen vektor v pozici 5' nebo 3' kódovací sekvence fúzního proteinu, ale je výhodně umístěn na místě 5' od promotoru.

Expresní vektory používané eukaryotických hostitelských buňkách (kvasinky, houby, hmyz, rostliny, zvířata, člověk nebo buňky s jádrem z jiných mnohobuněčných organismů) také obsahují sekvence nutné pro ukončení transkripce a pro stabilizaci mRNA. Takové sekvence jsou všeobecně dostupné z 5' a případně 3' netranslatovaných regionů eukaryot nebo DNA nebo cDNA virů. Tyto regiony obsahují nukleotidové segmenty transkribované jako polyadenylované fragmenty v netranslatovaném podílu mRNA kódující fúzovaný protein.

Různé formy fúzovaných proteinů mohou být získány z kultivačního média nebo lyzátů hostitelských buněk. Pokud jsou vázány na membránu, mohou z ní být uvolněny s použitím vhodného roztoku detergentu (např. Triton-X 100) nebo enzymatickým štěpením. Buňky využívané při expresi fúzního proteinu mohou být porušeny různými fyzikálním nebo chemickými prostředky, jako je cyklus zmrazování a rozmrazování, působení ultrazvuku, mechanické rozrušení nebo činidla pro lýzi buněk.

Čištění heterologních fúzovaných proteinů podle vynálezu:

Jakmile jsou heterologní fúzní proteiny podle vynálezu exprimovány v odpovídající hostitelské buňce, je možné izolovat a čistit analogy. Vhodnými čistícími procedurami jsou: frakcionace na karboxymethylcelulóze; gelová filtrace, například na Sephadexu G-75; výměna na aniontové pryskyřici, například na DEAF nebo Mono-Q; kationtová výměna například na CM nebo Mono-S; protein A sefaróza pro odstranění kontaminantů, například IgG; kovové chelatační kolony, které vážou epitopem značené formy polypeptidu; HPLC s reverzní fází; chromatofokusing; sílikagel; srážení etanolem a srážení síranem amonným.

Pro čištění proteinů může být použita řada způsobů a tyto metody jsou známy v oboru a jsou popsány například v Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-9 (1990) a Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982). Vybraný(é) čistící krok(y) závisí na povaze vybraného způsobu výroby a konkrétním vyráběném fúzním proteinu. Například, fúzní proteiny obsahující Fc fragment mohou být účinně čištěny s použitím matrice afinity Protein A nebo Protein G. Pro vymytí fúzního proteinu z afinitní matrice lze použít pufrů pro nízké nebo vysoké pH. Mírné eluční podmínky napomáhají předcházení nevratné denaturace fúzního proteinu. Rovněž mohou být použity pufrů obsahující imidazol. Příklad 3 popisuje některé úspěšné protokoly, při kterých se čistí fúzní proteiny podle vynálezu.

Charakterizace heterologních fúzovaných proteinů podle vynálezu:

Pro charakterizaci fúzovaných proteinů podle vynálezu existuje řada způsobů. Mezi tyto způsoby patří: SDS-PAGE spojená s metodami barvení proteinu nebo imunobloting s použitím anti-IgG nebo anti-HSA protilátky. Jiné způsoby zahrnují maticí asistovaná laserová desorpce/ionizační hmotnostní spektrometrie (MALDI-MS), kapalinová chromatografie/hmotnostní spektrometrie, isoelektrické zesilování, analytická výměna aniontů, chromatofokusing a cirkulární dichroismus, pokud se mají vyjmenovat alespoň několik málo hlavních způsobů. Reprezentativní množství heterologních fúzovaných proteinů bylo charakterizováno s použitím metody SDS-PAGE spojené s imunoblotingem, stejně jako hmotnostní spektrometrií (viz příklady 4 a 5 a obr. 3 a 4).

Například tab. 3 (viz příklad 5) ilustruje výpočet molekulární hmotnosti reprezentativního počtu fúzovaných proteinů a stejně tak hmotnost stanovenou hmotnostní spektrometrií. Kromě toho obr. 3 a 4 ilustrují molekulární hmotnosti reprezentativního počtu fúzovaných proteinů, jak byly stanoveny testem SDS PAGE. Všechny zkoušené heterologní fúzní proteiny byly okamžitě exprimovány a vylučovány. Aby byly získány proteiny s přesným N-zakončením, byla štěpena signální sekvence Igx

Dále tabulka 3 ilustruje, že v některých případech je hmotnost stanovená hmotnostní spektrometrií větší, než očekávaná. To je důsledkem glykosylace Fc části a prodloužení C-zakončení. Enzymatická digesce fúzovaných proteinů následovaná HPLC s reverzní fází a hmotnostní spektrometrií může identifikovat peptidové frakce, které obsahují sacharidové skupiny. Tyto frakce pak mohou být sekvencovány na N-koncové aminokyselinovy, aby se identifikovalo potenciální glykosylační místo. Například, charakterizace Exendinu-4-Fc (SEQ ID NO: 29) ukazuje, že serin v pozici 39 a threonin v pozici 50 má glykosylovanou O-vazbu a asparagin v pozici 122 má glykosylovanou N-vazbu.

Reprezentativní počet GLP-1 fúzovaných proteinů byl také zkoušen an aktivitu. Pro detekci GLP-1 aktivity in vitro a in vivo existuje řada metod (viz příklady 6, 7, 8 a 9). Tabulka 4 (příklad 6) ilustruje aktivitu GLP-1 receptoru spojený s několika GLP-1 fúzemi. Čísla jsou vyjádřena relativně vůči aktivitě, spojené s Val⁸-GLP-1(7-37)OH. Všechny testované fúzní proteiny měly aktivitu GLP-1 receptoru. Nízká hodnota aktivity in vitro není nutně indikací pro slabý efekt in vivo. Vzhledem k výraznému zvýšení poločasu života u těchto fúzovaných proteinů, neznamena malá aktivita in vitro obecně předpověď malé účinnosti in vivo. Obrázek 7 a příklad 7

ilustrují prodloužený poločas života, spojený s fúzovanými proteiny podle vynálezu. Například, Val⁸-GLP-1-Fc má poločas života u opic přibližně 45 hodin, Val⁸-GLP-1-HSA má poločas života u opic přibližně 87

hodin, Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 má poločas života po IV podávání u psů přibližně 55 hodin a Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 má poločas života po SC podávání u psů přibližně 38 hodin.

Složení vynálezu:

Podstatným znakem léčivých proteinových formulací je také fyzikální stabilita. GLP-1 sloučeniny je těžké vyrobit a formulovat v důsledku strukturálních změn, které se objevují v průběhu výroby. Například některé GLP-1 sloučeniny mají obecně sklon ke shlukování. Navíc bylo ukázáno, že některé GLP-1 sloučeniny konvertují z rozpustné a účinné α -helixové formy na nerozpustnou potenciálně neúčinnou β -vrstevovou. Fúze GLP-1 sloučenin na velké proteiny jako je Fc region IgG nebo albuminu nepřispívá jen z prodloužení poločasu života GLP-1 sloučeniny, ale také přispívá k fyzikální a konformační stabilitě GLP-1 sloučeniny. Například, Val⁸-GLP-1-Linker-HSA v PBS je stabilní při 37°C po dobu přibližně 30 dnů.

Heterologní fúzní proteiny podle vynálezu mohou být formulovány s jedním nebo více přísadami. Účinné fúzní proteiny podle vynálezu mohou být kombinovány s farmaceuticky přijatelným pufrům a pH upraveným na takovou hodnotu, která zajistí přijatelnou stabilitu a pH přijatelné pro podávání, jako je parenterální podávání.

Případně může být přidán jeden nebo více farmaceuticky-přijatelný antimikrobiální prostředek. Výhodnými farmaceuticky-přijatelnými mikrobiálními prostředky jsou meta-

kresol a fenol. Pro upravení iontové síly a tonicity může být přidána jedna nebo více farmaceuticky-přijatelných solí. Pro další úpravu isotonicity formulace může být přidána jedna nebo více přísad. Příkladem přísady, která upravuje isotonicitu je glycerin. Farmaceuticky přijatelné znamená, že tento prostředek je vhodný pro podávání lidem nebo jiným živočichům a tak neobsahuje toxické prvky nebo nežádoucí kontaminanty a neruší v nich účinnost aktivních sloučenin.

V tomto vynálezu se dá použít farmaceuticky-přijatelná solná forma heterologních fúzovaných proteinů podle vynálezu. Běžně používanými kyselinami pro výrobu adičních solí s kyselinami jsou anorganické kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková, kyselina bromovodíková, kyselina jodovodíková, kyselina sírová, kyselina fosforečná a podobně, a organické kyseliny, jako je p-toluensulfonová kyselina, methansulfonová kyselina, kyselina šťavelová, p-bromfenyl-sulfonová kyselina, kyselina uhličitá, kyselina jantarová, kyselina citronová, kyselina benzoová, kyselina octová a podobně. Výhodné adiční soli s kyselinami jsou ty, kterou tvoří minerální kyseliny jako je kyselina chlorovodíková a bromovodíková.

Mezi adiční soli s bázemi patří ty, které jsou odvozeny od anorganických zásad, jako je hydroxidy, uhličitany, hydrogenuhlíčitany amonné, alkalické nebo kovů alkalických zemin a podobně. Zásady používané pro výrobu solí podle vynálezu zahrnují hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid amonný, uhličitany draselný a podobně.

Podávání kompozic:

Podávání může uskutečněno jakoukoliv cestou, o níž je lékařům známo, že je účinná. Metody podávání mohou být vnější a vnitřní. Parenterálním podáváním se obecně v lékařské

literatuře rozumí injekce dávky do těla sterilní stříkačkou nebo jiným mechanickým zařízením, jako je infusní pumpa. Periferní parenterální cesty zahrnují intravenózní, intramuskulární, subkutánní a intraperitoneální cesty podávání.

Heterologní fúzní proteiny podle vynálezu mohou být rovněž podávány orálně, rektálně, nasálně, nižšími dýchacími cestami, což jsou neparenterální cesty. Mezi těmito neparenterálními cestami jsou výhodná cesta přes nižší dýchací cesty a orálně.

Fúzní proteiny podle vynálezu mohou být použity pro léčení řady nemocí a stavů. Fúzní proteiny podle vynálezu primárně projevují svůj biologický účinek působením na receptor, o kterém se zde mluví jako o "GLP-1 receptoru". Subjekty s nemocemi a/nebo stavy pak odpovídají na stimulaci GLP-1 receptoru nebo na podávání GLP-1 sloučeniny příznivě a mohou tak být léčeny pomocí GLP-1 fúzovaných proteinů podle vynálezu.

O těchto subjektech se hovoří jako o těch, které "potřebují léčení GLP-1 sloučeninami" nebo "potřebují stimulaci GLP-1 receptoru". Mezi tyto subjekty patří subjekty s diabetem, který nevyžaduje léčení insulinem, diabetes, který vyžaduje léčení insulinem (viz WO 00/16797), infarkt myokardu (viz WO 98/08531), obezita (viz WO 8/19698), katabolické změny po chirurgickém zásahu (vize US. Patent č. 6 006 753), funkční dyspepsie a syndrom dráždivého tračníku (viz WO 99/64060). Mezi subjekty rovněž patří ty, které potřebují profylaktické léčení GLP-1 sloučeninami, např. subjekty, u nichž je nebezpečí, že se u nich vyvine diabetes nezávislý na insulinu (viz WO 00/07617). Mezi subjekty, u kterých je riziko rozvinutí diabetu nezávislého na insulinu patří subjekty s

porušenou tolerancí glukózy nebo s poruchou glykémie, subjekty, jejichž tělesná hmotnost je o přibližně 25 % nad normální tělesnou hmotností, odpovídající výšce a tělesné stavbě subjektu, dále subjekty částečnou pankreatektomií, subjekty, u nichž jeden nebo oba rodiče měli diabetes nezávislý na insulinu, subjekty s těhotenským diabetem a subjekty s akutní nebo chronickou pankreatitidou.

"Účinné množství" GLP-1 sloučeniny je množství, které má za následek požadovaný léčebný a/nebo profylaktický účinek, aniž by způsobil nežádoucí vedlejší účinky při podávání subjektu, který potřebuje stimulaci GLP-1 receptoru. "Požadovaný terapeutický účinek" představuje jeden nebo více následujících dějů 1) zlepšení příznaků spojených s nemocí nebo stavem, 2) odložení náběhu příznaků spojených s nemocí nebo stavem; 3) prodloužení délky života porovnaná se stavem, kdy se neléčí; a 4) vyšší kvalita života porovnaná se stavem, kdy se neléčí. Například "účinné množství" GLP-1 sloučeniny pro léčení diabetu je množství, které může mít za následek lepší řízení koncentrace krevní glukózy, než když se neléčí, v důsledku čehož dojde k opožděnému nástupu komplikací diabetu, jako je retinopatie, neuropatie nebo nemoci ledvin. "Účinné množství" GLP-1 sloučenina pro prevenci diabetu je množství, které zpomalí v porovnání se situací, kdy se neléčí, nástup vyšších hladin krevní glukózy, které vyžadují léčení pomocí anti-hypoglykemických léčiv, jako jsou sulfonylmočoviny, thiazolidindiony, insulin a/nebo bisguanidiny.

Dávka fúzního proteinu, která je dostatečná pro normalizaci hladiny glukózy, závisí na mnoha faktorech, mezi něž patří, aniž by na ně byly omezeny, pohlaví subjektu, váhu a věk, závažnost neschopnosti regulovat krevní glukózu, způsob podávání a biologická dostupnost, farmakokinetický profil fúzního proteinu, účinnost a formulace.

Tento vynález zahrnuje GLP-1 sloučeniny, které mají zlepšené biochemické a biofyzikální vlastnosti díky tomu, že jsou fúzovány na albuminový protein, albuminový fragment, albuminový analog, Fc protein, Fc fragment, nebo Fc analog. Tyto heterologní proteiny mohou být úspěšně exprimovány v hostitelské buňce, přičemž zachovávají signální aktivitu spojenou s aktivací GLP-1 receptoru a mají prodloužený poločas života.

Následující příklady jsou uváděny za tím účelem, aby byl popsán tento vynález. Rozsah tohoto vynálezu se neomezuje na tyto příklady. Odborník v oboru rozpoznat, že konkrétní popsané reakční činidla, zařízení a postupy jsou pouze ilustrativní a nejsou míněny tak, že by měly omezovat v nějakém směru rozsah vynálezu jakýmkoliv způsobem.

Příklad 1: Konstrukce DNA kódující heterologní fúzní proteiny

Příklad 1a Konstrukce DNA kódující Val⁸-GLP-1(7-37)Fc:

Podíl Fc lidského IgG1 byl izolován z knihovny cDNA a obsahoval plný pantový region a CH2 a CH3 domény. Fragment obsahující 696 párových bází tohoto Fc podílu lidského IgG1 byl subklonován do míst NheI a Eco47III savčího expresního vektoru pJB02, aby se vytvořil pJB02/Fc (viz Obr. 5). DNA kódující IgK sekreční signální sekvenci fúzovanou na Val⁸-GLP-1(7-37) byla vytvořena in vitro hybridizací čtyř přesahujících a komplementárních oligonukleotidů:

5'-CTAGCCACCAT~GAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTT
CCAGGTTCCACTGGTGACCAGTG - 3' [SEQ ID NO:12]

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

5'- TGAAGGTGCCCTCCACGTGGTCACCAGTGGAACTGGAACCCAGAGCAGCAGTA
CCCATAGCAGGAGTGTGTCTGTCTCCATGGTGG - 3' [SEQ ID NO:14]

5'- GCCTCTTCCCTTCACCAGCCAGGCGATGAACTCCTTGGCGGCCTGGCCCTCCAGA
TAGGAGGACACGTCGGAGG - 3' [SEQ ID NO:15]

Hybridizační reakce byla prováděna s použitím ekvivalentních množství každého oligonukleotidu (1 pm/ul konečné koncentrace každého oligonukleotidu). Směs oligonukleotidů byla zahřívána 5 min při 100°C v prodlužovacím pufru (50 mmolol Tris-HCl, pH 7,5, 10 mmol MgCl² 10 mmol DTT, 1 mmol ATP, 25 µg/ml albumin hovězího séra) a potom chlazen po dobu nejméně 2 hodin na 30 °C.

Výsledný hybridizační produkt byl ligován po dobu 2 hodin při pokojové teplotě nebo přes noc při 16°C to the pJB02/Fc hlavní řetězec vektoru, který byl digestován pomocí NheI a Eco47III. Produkty ligace byly pak použity, aby se transformovaly příslušné XL-1 modré buňky (Stratagen). U rekombinantních plasmidů byl digestováním klonů pomocí NcoI (kódující sekvence Kozak a první Met signálního peptidu) a sekvencováním prováděn screening na přítomnost peptidu kódujícího inserty. Výsledný expresní plasmid, použitý pro transfekční testy byl označen pJB02-V8-GLP-1-Fc (Obr. 5).

Příklad 1b Konstrukce DNA kódující Val⁸-GLP-1(7-37)HSA:

Plasmid HSA/pcDNA3.1GS byl získán od Invitrogen (Catalog # H-M12523M-pcDNA3.1/GS) a použit jako šablona pro izolaci cDNA kódující albumin lidského séra (HSA). HSA cDNA byl připraven s použitím PCR, kde byly z konce 5' odstraněny DNA

kódující hlavní sekvenci, stejně jako pro-peptid se šesti aminokyselinami. Navíc byly přidány stop kodony přímo na konec 3' HSA kódovací sekvence. Nakonec byla na koncích 5' a 3' vytvořena místa restrikčních enzymů, aby se docílilo klonování. DNA sekvence HSA přítomná v původním vektor, získaném od firmy Invitrogen, obsahovala samostatnou bázi změněnou v regionu 3' genu (pozice 667), ve srovnání s nativní lidskou sekvencí. Tato změna má za následek vznik kodonu pro Asn namísto Asp. Tedy, použitím kmene přesahujícího PCR shora diskutované mutagenní metody, kodon byl zaměněn tak, aby kódoval Asp na této pozici. Výsledný HSA kódující DNA byl klonován na NheI a HindIII místa pJB02, aby vznikl pJB02-HSA (Obr. 6).

Hlavní sekvence Ig α fúzovaná na Val⁸-GLP-1(7-37) sekvenci byla vytvořena jak bylo uvedeno v Příkladu 1a. Tato DNA byla ligována na NheI a FspI místa pJB02-HSA, aby vznikl pJB02-Val⁸-GLP-1-HSA.

Příklad 1c Konstrukce DNA kódující Val⁸-GLP-1(7-37) linker-HSA:

Vektor pJB02-HSA byl připraven jak bylo uvedeno v Příkladu 1b. DNA kódující linkerovou sekvenci [GGGGS]₃ byla ligována v rámci na 5' konec HSA kódující DNA, aby vznikl pJB02-linker-HSA (Obr. 7). DNA kódující hlavní sekvenci Ig γ c a fúzovaná na sekvenci Val⁸-GLP-1(7-37) a 5' část linkerové sekvence byla vytvořena, jak bylo uvedeno v Příkladu 1a. Tato DNA byla ligována na NheI a BspEI místa pJB02, aby vznikl pJB02-Val⁸-GLP-1-linker-HSA.

Příklad 1d Konstrukce DNA kódující Exendin-4-Fc:

Plasmid pJB02/Fc byl připraven, jak je popsáno v

Příkladu 1a. DNA kódující Igx signální sekvenci, fúzovanou na Exending-4, byla vytvořena in vitro hybridizací následujících přesahujících a komplementárních oligonukleotidů:

- 5' - CTAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTG
GGTTCCAGGTTCCACCGGTCAC - 3' [SEQ ID NO:16]
- 5' - GGAGAGGGAACCTTCACCAGCGACCTGAGCAAGCAGATGGAGGAGGAGGCCGT
GAGACTG - 3' [SEQ ID NO:17]
- 5' - TTCATCGAGTGGCTGAAGAACGGAGGACCAAGCAGCGGAGCCCCCTCCTCCT
AGC - 3' [SEQ ID NO:18]
- 5' - GAACCTGGAACCCAGAGCAGCAGTACCCATAGCAGGAGTGTGTCTGTCTCCA
TGGTGG - 3' [SEQ ID NO:19]
- 5' - CTCCTCCTCCATCTGCTTGCTCAGGTCGCTGGTGAAGGTTCCCTCTCCGTGA
CCGGTG - 3' [SEQ ID NO:20]
- 5' - GCTAGGAGGAGGGGCTCCGCTGCTTGGTCCTCCGTTCTTCAGCCACTCGAT
GAACAGTCTCACGGC - 3' [SEQ ID NO:21]

Hybridizační reakce byla prováděna, jak je popsáno v Příkladu 1a. Hybridizovaný produkt byl ligován na pJB02 vektor, který byl digestován pomocí NheI a Eco47III, jak je popsáno v Příkladu 1a, aby vznikl pJB02-Exendin-4-Fc.

Příklad 1e Konstrukce DNA kódující Exendin-4-HSA:

Plasmid pJB02-HSA byl připraven, jak je popsáno v Příkladu 1b. DNA kódující Igx signální sekvenci, fúzovanou na Exending-4, byla vytvořena in vitro hybridizací stejných přesahujících a komplementárních oligonukleotidů, jako jsou popsány v Příkladu 1d. Hybridizační reakce byly rovněž

prováděny, jak je popsáno shora. DNA byla klonována na unikátní NheI a FspI místa v pJB02-HSA, aby vznikl pJB02-Exendin-4HSA.

Příklad 1f Konstrukce DNA kódující Exendin-4-linker-HSA:

Plasmid pJB02-linker-HSA byl konstruován, jak je popsáno v Příkladu 1c. DNA kódující Igx signální sekvenci, fúзованou na Exendin-4 a 5' část linkerové sekvence, byla vytvořena jako v Příkladu 1d. Tato DNA byla klonována na unikátní NheI a BspEI místa v pJB02-linker-HSA, aby vznikl pJB02-Exendin-4-linker-HSA.

Příklad 1g Konstrukce DNA kódující ValB-GLP-1/C-Ex-Fc:

Plasmid pJB02-Exendin-4-Fc byl připraven, jak je popsáno v Příkladu 1d. Exendin-4 kódující DNA byl odstraněn z vektoru pomocí Agel a Eco471II. Val8-GLP-1/C-Ex kódující DNA byla vytvořena in vitro hybridizací následujících přesahujících a komplementárních oligonukleotidů:

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

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

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

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

Hybridizační reakce byla prováděna, jak je popsáno v Příkladu 1a. Hybridizovaný produkt byl ligován na místě Exendinu-4 v pJB02-Exendin-4-Fc expresním vektoru, aby vznikl pJB02-Val⁸-GLP-1/C-Ex-Fc.

Příklad 1h Konstrukce DNA kódující Val⁸-Glu22-GLP-1-Fc:

Plasmid pJB02-Exendin-4-Fc byl připraven, jak je popsáno v Příkladu 1d. Exendin-4 kódující DNA byla odstraněna z vektoru pomocí Agel a Eco47III. Val⁸-Glu22-GLP-1 kódující DNA byla vytvořena in vitro hybridizací následujících přesahujících a komplementárních oligonukleotidů:

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

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

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

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

Hybridizační reakce byla prováděna, jak je popsáno v Příkladu 1a. Hybridizovaný produkt byl ligován v místě Exendin-4 v pJB02-Exendin-4-Fc expresního vektoru, aby vznikl pJB02-Val⁸-Glu²²-GLP-1-Fc.

Příklad 1i Konstrukce DNA kódující Val⁸-Glu²²-GLP-1/CEX-Fc:

Plasmid pJB02-Exendin-4-Fc byl připraven, jak je popsáno v Příkladu 1d. Exendin-4 kódující DNA byla

vyseknuta z vektor pomocí Agel a Eco47III. Val⁸-Glu²²-GLP-1/C-Ex kódující DNA byla vytvořena in vitro hybridizací následujících přesahujících a komplementárních oligonukleotidů:

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

5' - AGGAATTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGGCAGCAGCGGA
CCCCCTCCTCCTAGC - 3' [SEQ ID NO:31]

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

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

Hybridizační reakce byla prováděna, jak je popsáno v Příkladu 1a. Hybridizovaný produkt byl ligován v místě Exendinu-4 v pJB02-Exendin-4-Fc expresním vektoru, aby vznikl pJB02-Val⁸-Glu²²-GLP-1/C-Ex-Fc.

Příklad 1j: Konstrukce DNA kódující Gly⁸-GAP-1-Fc:

Plasmid pJB02-Exendin-4-Fc byl připraven, jak je popsáno v Příkladu 1d. Exendin-4 kódující DNA byla odstraněna z vektoru pomocí Agel a Eco47III. Gly⁸-GLP-1 kódující DNA byla vytvořena in vitro hybridizací následujících a přesahujících a komplementárních oligonukleotidů:

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

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

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

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

Hybridizační reakce byla prováděna, jak bylo popsáno v Příkladu 1a. Hybridizovaný produkt byl ligován v místě Exendinu-4 v pJB02-Exendin-4-Fc expresním vektoru, aby vznikl pJB02-Gly⁸-GLP-1-Fc.

Příklad 2: Exprimace heterologních fúzovaných proteinů

Exprimace fúzovaných proteinů kódovaných DNA, konstruovanými v Příkladu 1, byla provedena přechodnými transfekčními buňkami HEK 293EBNA (jak přisedlé, tak v suspenzi). Buňky byly počítány a očkovány 24 hodiny před transfekcí. Transfekční koktejl byl připraven mícháním transfekčního činidla FuGeneTM6 (Roche Molecular Biochemicals, katalog # 1814443) s OptiMEM (Gibco/BRL) a inkubován při pokojové teplotě 5 min, což je teplota, při které byla přidána DNA a koktejl byl inkubován dalších 15 min. Bezprostředně před transfekcí bylo na desku nanášeno čerstvé kultivační médium. Další detaily transfekce jsou uvedeny v tabulce 1 a 2.

Tabulka 1: Činidla použitá při transientní transfekci buněk 293EBNA

Tkáňová kultivační nádobka	Počet očkováných buněk	DNA (μg)	FuGene (μl)	OptiMEM media (ml)	Objem kult. media (ml)
35 mm	5×10^5	1,5	9	0,102	2
100 mm	2×10^6	12	73	0,820	10
700 cm ² (RB)	2×10^7	65	400	4,0	100

Tabulka 2: Složení media

Růstové a transfekční medium	Kultivační medium
DMEM F12 3:1	Hybritech báze
5 % FBS	1 mmol Ca ²⁺
20 mmol HEPES	20 mmol HEPES
2 mmol L-glutamin	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Nuselin (lidský insulin)
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ geneticin (G418 NEO)	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lidský transferrin
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tobromycin	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tobromycin

Pro transfekce malého rozsahu (35 mm-10 mm nádoby), byly buňky propláchnuty PBS a převedeny do kultivačního média 24 hodiny po transfekci a medium bylo shromážděno a vyměňováno za čerstvé každých 24 hodiny po několik dnů. V případě transfekcí velkého rozsahu (700 cm² válcová baňka), byly válcové baňky vypláchnuty PBS 48 hodiny po transfekci a buňky byly převedeny do kultivačního media. Medium bylo shromažďováno a vyměňováno za čerstvé každých 24 hodin po nejméně 10 po sobě následujících dnů. Obvykle bylo pro následné čištění proteinu použito 10 sklizní.

Příklad 3: Čištění heterologních fúzovaných proteinů

Příklad 3a Čištění Val⁸-GLP-1-Fc

Přibližně 4,5 litrů kondiciovaného media (hladina exprese fúzovaných proteinů přibližně 20 µg/ml) z transfekce velkého rozsahu bylo filtrováno s použitím filtračního systému CUNO a koncentrováno na 250 ml s použitím filtračního systému ProFlux s tangenciálním tokem s 10 K filtrační membránou. Val⁸-GLP-1-Fc byly zachyceny na koloně 5 ml HiTrap protein A v 1x PBS, pH 7,4 při průtoku 2 ml/min a eluovány 50 mmol kyseliny citronové pH 3,3. Frakce (1 ml) byly shromážděny ve zkumavkách obsahujících 4 ml 1x PBS a 100 µl 1 M Tris pH 8.

Frakce obsahující fúzovaný protein, jak byl stanoven pomocí SDS-PAGE a HPLC s reverzní fází na Zorbax C8, byly dány dohromady a nanесeny na kolonu Superdex 75 60/60 v 1x PBS pH 7,4 s průtokem 10 ml/min. Pozitivní frakce (20 ml/zkumavku) byly shromážděny. Spojené frakce byly potom podrobeny chromatografii s C4 reverzní fází v 0,1 % TFA ve vodě při průtoku 3 ml/min. Val⁸-GLP-1-Fc byl eluován s gradientem od 5 % B (0,1 % TFA v acetonitrilu) do 100 % B v průběhu 70 min. Eluované frakce (3 ml/zkumavka) byly shromážděny. Acetonitril byl odstraněn vakuovým sušením a byl přidán 1 ml H₂O. Vyčištěný vzorek (přibližně 32 ml) byl dvakrát dialyzován se 4 litry 1x PBS pH 7,4.

Dialyzovaný vzorek byl potom filtrován s použitím filtrační jednotky MILLEX-GV 0,22 µm a koncentrace byla stanovena s použitím absorpce při 280 nm.

Příklad 3b Čištění Val⁸-GLP-1-HSA nebo Val⁸-GLP-1-Linker-HSA

Přibližně 6,5 litrů kondiciovaného media (hladina exprese fúzovaných proteinů přibližně 10 µg/ml) bylo filtrováno s použitím filtračního systému CUNO a koncentrováno na 380 ml s použitím filtračního systému ProFlux s tangenciálním tokem s 10 K filtrační membránou.

Fúzní proteiny byly zachyceny s použitím 50 ml Q kolony s rychlým tokem (Pharmacia) v 20 mmol Tris pH 7,4 při průtoku 5ml/min. Protein byl eluován s použitím gradientu: od 0 % do 50 % 20 mmol Tris pH 7,4, 1M NaCl v 10 CV, potom na 100 % B v 2 CV.

Frakce obsahující fúzní protein byly spojeny a podrobeny C4 chromatografii s reverzní fází v 0,1 % TFA ve vodě při průtoku 5 ml/min. Fúzní protein byl eluován s použitím gradientu od 20 % B (0,1 % TFA v acetonitrilu) do 90 % B v průběhu 120 min. Frakce (3,5 ml/zkumavka) byly shromážděny. Acetonitril byl odstraněn vakuovým sušením.

Přibližně 9 ml shromážděného vzorku bylo zředěno 1x PBS pH 7,4 na 40 ml a dialyzováno s 4 litry 1x PBS pH 7,4 přes noc. Vzorek byl filtrován a koncentrace byla stanovena absorpcí při 280 nm.

Příklad 3c Čištění Exendinu-4-Fc:

Přibližně 4 litry kondiciovaného media Přibližně 6,5 litrů kondiciovaného media (hladina exprese fúzních proteinů přibližně 8 µg/ml) bylo filtrováno s použitím filtračního systému CUNO a koncentrováno na 250 ml s použitím filtračního systému ProFlux s tangenciálním tokem s 30 K filtrační membránou.

Exendin-4-Fc byl zachycen 5 ml HiTrap protein A kolonou v 1x PBS, pH 7,4 při průtoku 2 ml/min a eluován 50 mmol kyseliny citronové pH 3,3. Frakce obsahující fúzní protein byly shromážděny, filtrovány a dialyzovány s 4 litry 1 x PBS přes noc. Dialyzovaný vzorek byl potom nanesen na kolonu Superdex 75 60/60 v 1x PBS pH 7,4, 0,5M NaCl při průtoku 10 ml/min. Frakce (20 ml/zkumavka) obsahující fúzní protein byly shromážděny koncentrovány na přibližně 1 mg/ml. Koncentrované vzorky byly potom filtrovány s použitím filtrační jednotky MILLEX-GV 0.22 um.

Příklad 3d Čištění Exendin-4-HSA a Exendin-4linker-HSA:

Přibližně 1,1 litru kondiciovaného media (hladina exprese fúzních proteinů přibližně 6 µg/ml) byl filtrován s použitím CUNO filtračního systému a koncentrováno na 175 ml s použitím filtračního systému ProFlux s tangenciálním tokem s 30 K filtrační membránou.

Fúzní protein byl zachycen s použitím 5 ml kolony HiTrap Q sepharose (Pharmacia) v 20 mmol Tris pH 7,4 při průtoku 2 ml/min. Protein byl eluován s použitím gradientu od 0 % do 50 % 20 mmol Tris pH 7,4, 1M NaCl v 12 CV a potom na 100 % B v 4 CV.

Frakce obsahující fúzní protein byly shromážděny a podrobeny C4 chromatografií s reverzní fází v 0,1 % TFA ve vodě při průtoku 5 ml/min. Fúzní protein byl eluován s použitím gradientu od 10 % B (0,1% TFA v acetonitrilu) do 100 % B v průběhu 70 min. Frakce (10 ml/zkumavka) obsahující fúzní protein byly shromážděny. Acetonitril byl odstraněn s použitím vakuové sušičky.

Přibližně 8 ml shromážděných vzorků bylo dialyzováno s 4 litrů 1x PBS pH 7,4 přes noc. Vzorek byl filtrován a koncentrace byla stanovena absorpcí při 280nm. Dialyzovaný vzorek byl potom nanesen na kolonu Superdex 200 26/60 v 1x PBS pH 7,4, 0,5 M NaCl při průtoku 2 ml/min. Frakce (3 ml/zkumavka) obsahující fúzní protein byly shromážděny, koncentrovány a filtrovány.

Příklad 4: Charakterizace fúzních proteinů pomocí SDS PAGE:

Pro analýzu čištěného fúzního proteinu a kondiciovaného media z buněk transfektovaných různými

expresními vektory fúzních proteinů byly použity SDS-PAGE, následovaný imunoblotingem. SDS-PAGE byl proveden v systému Novex Powerease 500 s použitím Novex 16% Tris-glycinových předem vyrobených gelů (EC6498), provozního pufru (10 x, LC2675) a vzorkového pufru (L 2676). Vzorky byly redukovány s 50 mmol DTT a zahřívány 3-5 min při 95°C před naplněním.

Po použití SDS-PAGE gelu, byla použita voda a transferový pufr (1X Tris-Glycin Seprabuff (Owl Scientific Cat. No. ER26-S) s 20 % methanolem) pro vymytí SDS z gelů. Byl použit transferové zařízení Novex s PVDF (BioRad, Cat. No. 162-0174) a nitrocelulózové membrány (BioRad, Cat. No. 1703965 nebo 1703932). Transfer byl proveden při pokojové teplotě po dobu 90 min při 30-35 V. Membrány byly uzavřeny v 1X PBS s 0,1 % Tween-20 (Sigma, Cat. No. P7949) a 5 % mléce (BioRad, Cat. No. 170-6404) po dobu 1-12 hodiny při 4°C. Protilátky byly zředěny v 1X PBS +5 % mléka a bloty byly inkubovány v těchto roztocích po dobu 1-2 h při 4°C. Mezi inkubacemi byly bloty promyty čtyřikrát po dobu 5 min, pokaždé s 1X PBS a 0,2 % Tween-20 při pokojové teplotě. PBS byl vyroben z buď z GIBCO 10X PBS (Cat No. 70011), aby vznikla konečná kompozice 1 mmol jednosytného fosforečnanu draselného, 3 mmol monohydrogenfosforečnanu sodného, 153 mmol chloridu sodného, pH 7,4 nebo byl PBS získán od Sigma (Cat. No. 10003), což poskytlo 120 mmol NaCl, 2,7 mmol KCl a 10 mmol fosforečnanu, pH 7,4 při 25°C.

Primární protilátky byly buď polyklonální koží anti-IgG1 nebo králičí anti-HSA. Sekundární protilátky byly buď anti-koží IgG HRP nebo anti-králičí TgG HRP. Sekundární protilátka byla zředěna 1:5000. Pro vyvíjení blotů by použit ECL systém (Amersham Pharmacia Biotech, Cat. No. RN2108 a Cat. No. RPN1674H).

Obr. 3A porovnává čištěný Fc protein s kondiciovaným médiem z pJB02-Val⁸-GLP-1-Fc a pJB02-Exendin-4-Fc transfektovaných buněk. Zvýšení mobility je konzistentní se zvyšující se velikostí v důsledku GLP-1 části fúzního proteinu. Obr. 3B podobně porovnává čištěný HSA s kondiciovaným médiem z buněk transfektovaných pJB02-Val⁸-GLP-2-HSA, pJB02-Val⁸-GLP-1-Linker-HSA, pJB02-Exendin-4-HSA, nebo pJB02-Exendin-4-Linker-HSA. Obr. 4 ukazuje čištěné fúzní proteinové přípravky.

Příklad 5: Charakterizace fúzních proteinů s použitím hmotnostní spektrometrie:

Všechny experimenty byly prováděny na Micromass TofSpec2E hmotnostním spektrometru, vybaveném elektronikou pro úpravou časové prodlevy, Reflectronu (použitým při analýze 0-8000 Da peptidového rozpětí), lineárním detektorem (použitým během vysokohmotnostní a dobrý signál poskytující analýze) a Post Acceleration Detector (nebo P.A.D., použitý při vysokohmotnostní a mimořádně slabý signál poskytující analýze). Délka účinné cesty zařízení v lineárním modu je 1,2 metru, v modu Reflectron je 2,3 metru. Pro detekci lineárním a reflectronovým modu byly použity dva duální mikrokanálové deskové detektory. Byl použit dusíkový laser firmy Laser Science Inc. VSL-3371 pracující 337 nm při 5 laserových záblescích za sekundu. Všechny data byla získána s použitím 2 GHz, 8 bit interního digitalizačního zařízení a více než 50 laserový záblesků bylo použito jako průměr na spektrum.

Zařízení pracovalo v lineárním modu pro analýzu GLP-1 fúzních proteinů, o které se jedná. Lineární detektor je zařízení, které detekuje ionty, které cestují dolů s světelnou trubicí zařízení MALDI-ToF-MS. To měří četnost iontů v čase a posílá signál do zařízení pro převádění na číselné hodnoty.

Tento digitalizér konvertuje analogový signál na digitální, což umožňuje, aby byl signál z hmotnostního spektrometru převeden do počítače, kde je převeden do použitelného m/z spektra.

Jako ionizační matrice byl použit rekrystalizovaný nasycený roztok kyselina sinapové (zředěné v 50/50 Acn / H₂O a 0,1 % TFA). Kyselina sinapová je vhodnou matricí pro proteiny větší než 10 kDa. Pro vnější a vnitřní kalibrační soubory, která mají sloužit pro přesná měření hmotnosti analyzovaných vzorků, byly použity referenční proteiny s vhodnou hmotností. Vzorky byly všechny analyzovány s použitím vzorku o zředění 1:2 vůči matrici. Zařízení bylo nejprve nastaveno na následující lineární detekční podmínky.

Zdroj napětí: 20,0 keV	Napěťové pulzy: 3,0 keV
Vytažené napětí: 20,0 keV	Laserová četnost: 50
Zasílení napětí: 16,0 keV	Laserová jemnost: 50
Lineární detektor: 3,7 keV	
P.A.D.: (off line)	

Tato nastavení byla upravována (pokud to bylo nutné) tak, aby bylo dosaženo nejlepšího poměru signál/šum nejvyššího rozlišení. Tabulka 3 poskytuje vlastnosti odlišných GLP-1 fúzních proteinů.

Tabulka 3

Fúzní protein	Očekávaná hmotnost (kDa)	Hmotnost stanovená hmotnostní spektrometrií (kDa)
Val ⁸ -GLP-1-IgG1	59,08	61,94
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1-IgG1	59,23	63,61
Gly ⁸ -GLP-1-IgG1	59,00	62,93

Val ⁸ -GLP-1-CEX-IgG1	60,45	65,1-65,6
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-IgG1	60,69	65,86
Exendin-4-IgG1	60,69	65,86
Val ⁸ -GLP-1-Linker-HSA	70,70	69,89, 70,74
Exendin-4-HSA	70,56	70,62
Exendin-4-Linker-HSA	71,56	71,62

CEX znamená C-koncové prodloužení a představuje sekvenci Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser.

Linkerem je Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly--Gly-Gly-Ser.

Příklad 6: Aktivita heterologních fúzních proteinů:

Schopnost fúzních proteinů podle vynálezu aktivovat GLP-1 receptor byla posouzena s použitím in vitro testů, které jsou jako takové popsány v EP 619 322 Gelfand, et al. a v US patentu č. 5 120 712. Aktivita těchto sloučenin vůči aktivitě Val⁸-GLP-1(7-37)OH je uvedena v Tabulce 4. Obr. 8 představuje křivku odezvy na dávky in vitro na Val⁸-GLP-1 a Exendin-4 fúzní proteiny. Dále tabulka 5a a 5b ukazuje in vitro aktivitu velké skupiny GLP-1 analogů, které mohou být fúzovány na Fc nebo albuminový protein s cílem vyrobit biologicky aktivní fúzní proteiny. Tyto aktivity jsou porovnány s GLP-1(7-37)OH.

Tabulka 4: In vitro aktivita GLP-1 fúzních proteinů

Fúzní protein	In Vitro Aktivita (% Val ⁸ -GLP-1)
Val ⁸ -GLP-1-IgG1	1
Exendin-4-IgG1	240
Val ⁸ -GLP-1-Linker-HSA	0,2
Exendin-4-HSA	20
Exendin-4-Linker-HSA	90
Exendin-4	500

Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1-IgG1	3,7
Gly -GLP-1-IgG1	3,3
Val ⁸ -GLP-1-CEX-IgG1	3,3
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-IgG1	29
Gly ⁸ - Glu ²² -GLP-1-C2-IgG1	75
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-Linker-IgG1	150
Exendin-4-C2-IgG1	250
Exendin-4-Linker-IgG1	330
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-Linker-HSA	4
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-Linker-IgG4	80

CEX znamená C-koncové prodloužení a představuje sekvenci Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser.

Linkerem je Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-GlyGly-Gly-Ser.

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

Aminokyselinové sekvence fúzních proteinů, které jsou popsány v tabulkách 3 a 4 jsou uvedeny od SED ID NO: 13 po SEQ ID NO: 31.

Aminokyselinová sekvence Val⁸-GLP-1-lidského sérového albuminu je uvedena pod SEQ ID NO: 13.

```

1  HVEGTFTSDV  SSYLEGQAAK  EFlAWLVKGR  GDAHKSEVAH  RFKDLGEENF
KALVLIIFAQ
61  YLQQCPFEDH  VKLVNEVTEF  AKTCVADESA  ENCDKSLHTL  FGDKLCTVAT
LRETYGEMAD
121  CCAKQEPERN  ECFLQHKDDN  PNLPRLV RPE  VDMCTAFHD  NEETFLKKYL
YEIARRHPYF
181  YAPELLFFAK  RYKAAFTECC  QAADKAAACL  PKLDEL RDEG  KASSAKQRLK
CASLQKFGER

```

241 AFKAWAVARL SQRFPKAEFA EVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADDRAD
LAKYICENQD
301 SISSKLKECC EKPLLEKSHC IAEVENDEMP ADLPSLAADF VESKDVCKNY
AEAKDVFLGM
361 FLYEYARRHP DYSVVLLLRL AKTYETTLEK CCAAADPHEC YAKVFDEFKP
LVEEPQNLIK
421 QNCELFEQLG EYKFQNALLV RYTKKVPQVS TPTLVEVSRN LGKVGSKCCK
HPEAKRMPCA
481 EDYLSVVLNQ LCVLHEKTPV SDRVTKCCTE SLVNR RPCFS ALEVDETYVP
KEFNAETFTF
541 HADICTLSEK ERQIKKQTAL VELVKHKPKA TKEQLKAVMD DFAAFVEKCC
KADDKETCFA
601 EEGKKLVAAS QAALGL [SEQ ID NO: 13]

Aminokyselinová sekvence Val⁸-GLP-1-Linker-lidského sérového albuminu je uvedena pod SEQ ID NO: 14.

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR GGGGSGGGG SGGGGS DAHK
SEVAHRFKDL
61 GEENFKALVL IAFAQYLQQC PFEDHVKLVN EVTEFAKTCV ADESAENCDK
SLHTLFGDKL
121 CTVATLRETY GEMADCCAKQ EPERNECFLO HKDDNPNLPR LVRPEVDVMC
TAFHDNEETF
181 LKKYLYEIR RHPYFYAPEL LFFAKRYKAA FTECCQAADK AACLLPKLDE
LRDEGKASSA
241 KQRLKASLQ KFGERAFAKAW AVARLSQRFP KAFAEVSKL VTDLT KVHTE
CCHGDLLECA
301 DDRADLAKYI CENQDSISSK LKECCEKPLL EKSHCIAEVE NDEMPADLPS
LAADFVESKD
361 VCKNYAEAKD VFLGMFLY EY ARRHPDYSW LLLRLAKTYE TTLEKCCAAA
DPHECYAKVF
421 DEFKPLVEEP QNLIKQNC EL FEQLGEYKFQ NALLVRYTKK VPQVSTPTLV
EVSRLGKVG

481 SKCKHPEAK RMPCAEDYLS WLNQLCVLH EKTPVSDRVT KCCTESLVNR
RPCFSALEVDE

541 ETYVPKEFNA ETFTFHADIC TLSEKERQIK KQTALVELVK HKPKATKEQL
KAVMDDFAAF

601 VEKCKADDDK ETCFAEEGKK LVAASQAALG L [SEQ ID NO: 14]

Aminokyselinová sekvence Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-lidského
sérového albuminu je uvedena pod SEQ ID NO: 15.

1 HEGGTFTSDV SSYLEEQAAK EFIAWLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGS
GGGSDAHKS

61 EVAHRFKDLG EENFKALVLI AFAQYLQQCP FEDHVKLVNE VTEFAKTCVA
DESAENCDKS

121 LHTLFGDKLC TVATLRETYG EMADCCAKQE PERNECFLOH KDDNPNNLRL
VRPEVDVMCT

181 AFHDNEETFL KKYLYEIARR HPYFYAPELL FFAKRYKAAF TECCQAADKA
ACLLPKLDEL

241 RDEGKASSAK QRLKASLQK FGERAFKAWA VARLSQRFPK AEFAEVSKLV
TDLTKVHTEC

301 CHGDLLECAD DRADLAKYIC ENQDSISSKL KECCEKPLLE KSHCIAEVEN
DEMPADLPSL

361 AADFVESKDV CKNYAEAKDV FLGMFLYEYA RRHPDYSWL LLRLAKTYET
TLEKCCAAAD

421 PHECYAKVFD EFKPLVEEPQ NLIKQNCSELF EQLGEYKFQN ALLVRYTKKV
PQVSTPTLVE

481 VSRNLGKVGK KCKKHPEAKR MPCAEDYLSV VLNQLCVLHE KTPVSDRVTK
CCTESLVNRR

541 PCFSALEVDE TYVPKEFNAE TFTFHADICT LSEKERQIKK QTALVELVKH
KPKATKEQLK

601 AVMDDFAAFV EKCKADDDK ETCFAEEGKKL VAASQAALGL

[SEQ ID NO 15]:

Aminokyselinová sekvence Exendin-4-lidského sérového albuminu
je uvedena pod SEQ ID NO: 16.

1 HEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSD AHKSEVAHRE
KDLGEENFKA
61 LVLIAFAQYL QQCPFEDHVK LVNEVTEFAK TCVADESAEN CDKSLHTLFG
DKLCTVATLR
121 ETYGEMADCC AKQEPERNEC FLQHKDDNPN LPRLVRPEVD VMCTAFHDNE
ETFLKKYLYE
181 IARRHPYFYA PELLFFAKRY KAAFTECCQA ADKAACLLPK LDELREDEGKA
SSAKQRLKCA
241 SLQKFGERAF KAWAVARLSQ RFPKAEFAEV SKLVTDLTKV HTECCHGDDL
ECADDRADLA
301 KYICENQDSI SSKLKECCEK PLLEKSHCIA EVENDEMPAD LPSLAADFVE
SKDVCKNYAE
361 AKDVFLGMFL YEYARRHPDY SWLLLRLLAK TYETTLEKCC AAADPHECYA
KVFDEFKPLV
421 EEPQNLIKQN CELFEQLGEY KFQNALLVRY TKKVPQVSTP TLVEVSRNLG
KVGSKCKHP
481 EAKRMPCAED YLSWLNQLC VLHEKTPVSD RVTKCCTESL VNRRPCFSAL
EVDETWPKE
541 FNAETFTFHA DICTLSEKER QIKKQTALVE LVKHKPKATK EQLKAVMDDF
AAFVEKCKKA
601 DDKETCFEAE GKKLVAASQA ALGL [SEQ ID NO: 16]

Aminokyselinová sekvence Exendin-4-Linker-lidského sérového albuminu je uvedena pod SEQ ID NO: 17.

1 HEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSG GGGSGGGGS
GGGGSDAHKS
61 EVAHRFKDLG EENFKALVLI AFAQYLQQCP FEDHVKLVNE VTEFAKTCVA
DESAENCCKS
121 LHTLFGDKLC TVATLRETYG EMADCCAKQE PERNECFLQH KDDNPNLPRL
VRPEVDMCT
181 AFHDNEETFL KKYLYEIAARR HPYFYAPELL FFAKRYKAAF TECCQAADKA
ACLLPKLDEL

241 RDEGKASSAK QRLKCASLQK FGERAFKAWA VARLSQRFPK AEFAEVSKLV
TDLTKVHTEC

301 CHGDLLECAD DRADLAKYIC ENQDSISSKL KECCEKPLLE KSHCIAEVEN
DEMPADLPSL

361 AADFVESKDV CKNYAEAKDV FLGMFLYEYA RRHPDYSWL LLRLAKTYET
TLEKCCAAAD

421 PHECYAKVFD EFKPLVEEPQ NLIKQNCSELF EQLGEYKFQN ALLVRYTKKV
PQVSTPTLVE

481 VSRNLGKVGs KCKKHPEAKR MPCAEDYLSV VLNQLCVLHE KTPVSDRVTK
CCTESLVNRR

541 PCFSALEVDE TYVPKEFNAE TFTFHADICT LSEKERQIKK QTALVELVKH
KPKATKEQLK

601 AVMDDFAAAFV EKCKADDKE TCFAEEGKKL VAASQAALGL
[SEQ ID NO: 17]

Aminokyselinová sekvence Val⁸-GLP-1-IgG1 je uvedena pod
SEQ ID NO: 18.

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR GAEPKSCDKT HTCPPCPAPE
LLGGPSVFLF

61 PPKPKDTLMI SRTPEVTCW VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRW

121 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
SREEMTKNQV

181 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD
KSRWQQGNVF

241 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK [SEQ ID NO: 18]

Aminokyselinová sekvence Val⁸-GLP-1-Cex-IgG1 je uvedena pod
SEQ ID NO: 19.

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR GSSGAPPPSA EPKSCDKTHT
CPPPCPAPELL

61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH
NAKTKPREEQ

121 YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
PQWTLPPSR

181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF
LYSKLTVDKS

241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK [SEQ ID NO: 19]

Aminokyselinová sekvence Val⁸-Glu²²-GLP-1-IgG1 je uvedena pod
SEQ ID NO:20.

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFIAWLVKGR GAEPKSCDKT HTCPCPAPE
LLGGPSVFLF

61 PPKPKDTLMI SRTPEVTCW VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRW

121 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQWTLPP
SREEMTKNQV

181 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD
KSRWQQGNVF

241 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK [SEQ ID NO: 20]

Aminokyselinová sekvence Val⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-IgG1 je uvedena
pod SEQ ID NO: 21.

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFIAWLVKGR GSSGAPPPSA EPKSCDKTHT
CPPCPAPELL

61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCWVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH
NAKTKPREEQ

121 YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
PQWTLPPSR

181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF
LYSKLTVDKS

241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK [SEQ ID NO: 21],

Aminokyselinová sekvence Gly⁸-Glu²²-GLP-1-C2-IgG1 je uvedena
pod SEQ ID NO: 22.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAQK EFLAWLVKGR GSSGASSGAA EPKSCDKTHT
 CPPCPAPELL
 61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQ
 121 YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
 PQWTLPPSR
 181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGGSFF
 LYSKLTVDKS
 241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP GK [SEQ ID NO: 22]

Aminokyselinová sekvence Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 je
 uvedena pod SEQ ID NO: 23.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAQK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGSG
 GGSAEPKSC
 61 DKHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD
 121 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RWSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK
 181 GQPREPQWT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
 YKTPPVLD
 241 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
 [SEQ ID NO: 23]

Aminokyselinová sekvence Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG4 je
 uvedena pod SEQ ID NO: 24.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAQK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGSG
 GGSAESKYG
 61 PPCPSCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCW VDVSQEDPEV
 QFNWYVDGVE

121 VHNAKTKPRE EQFNSTYRW SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE
KTISKAKGQP
181 REPQVYTLPP SQEEMTKNOV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS
241 FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
[SEQ ID NO: 24]

Aminokyselinová sekvence Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEx-2Linker-IgG1 je
uvedena pod SEQ ID NO: 25.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGSG
GGGSGGGGSG
61 GGGSGGGGSA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
TPEVTCWVD
121 VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRWSV LTVLHQDWLN
GKEYKCKVSN
181 KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQWTLPPSR EEMTKNOVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG
241 QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH
YTQKSLSLSP 301 GK [SEQ ID NO: 25]

Aminokyselinová sekvence Gly⁸-Glu²²-GLP-1-2Linker-IgG1 je
uvedena pod SEQ ID NO: 26.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GGGGSGGGG SGGGSGGGG
SGGGSGGGG
61 SAEPKSCDKT HTPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCW
VDVSHEDPEV
121 KFNQYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRW SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV
SNKALPAPIE
181 KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNOV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
NGQPENNYKT

241 TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
SPGK
[SEQ ID NO: 26]

Aminokyselinová sekvence Gly⁸-Glu²²-GLP-1-2CEx-IgG1 je uvedena
pod SEQ ID NO: 27.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSS SGAPPPSAEP
KSCDKTHTCP
61 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
YVDGVEVHNA
121 KTKPREEQYN STYRWSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
KAKGQPREPQ
181 WTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV
LDSGGSFFLY
241 SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
[SEQ ID NO: 27]

Aminokyselinová Gly⁸-Glu²²-Val²⁵-Ile³³-GLP-1-CEX-Linker-IgG1
sekvence je uvedena pod SEQ ID NO: 28.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAVK EFLAWLIKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGSG
GGGSAEPKSC
61 DKHTCTPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD
121 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RWSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK
181 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTPPVLD
241 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
[SEQ ID NO: 28]

Aminokyselinová sekvence Exendin-4-IgG1 je uvedena pod
SEQ ID NO: 29.

18.02.04

1 HEGTFTSDL SKQEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSA EPKSCDKTHT
 CPPCPAPELL
 61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH
 NAKTKPREEQ
 121 YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
 PQWTLPPSR
 181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGGSFF
 LYSKLTVDKS
 241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YQKSLSLSP GK [SEQ ID NO: 29]

Aminokyselinová sekvence Exendin-4-C2-IgG1 je uvedena pod
 SEQ ID NO: 30.

1 HEGTFTSDL SKQEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGASSGAA EPKSCDKTHT
 CPPCPAPELL
 61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH
 NAKTKPREEQ
 121 YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSR
 181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGGSFF
 LYSKLTVDKS
 241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YQKSLSLSP GK [SEQ ID NO: 30]

Aminokyselinová sekvence Exendin-4-Linker-IgG1 je uvedena pod
 SEQ ID NO: 31.

1 HEGTFTSDL SKQEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSG GGGSGGGGSG
 GGGSAPKSC
 61 DKHTTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNQYVD
 121 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RWSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK

181 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTTPVLDS

241 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

[SEQ ID NO: 31]

Tabulka 5a: Aktivita GLP-1 analogu in vitro

GLP-1 sloučenina

Aktivace GLP-1 receptoru

GLP-1(7-37) OH	1,0
Val ⁸ -GLP-1(7-37) OH	0,47
	(n = 6)
Gly ⁸ -His ¹¹ -GLP-1(7-37) OH	0,282
Val ⁸ -Ala ¹¹ -GLP-1(7-37) OH	0,021
Val ⁸ -Lys ¹¹ -GLP-1(7-37) OH	0,001
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1(7-37) OH	0,81
Val ⁸ -Glu ¹⁶ -GLP-1(7-37) OH	0,047
Val ⁸ -Ala ¹⁶ -GLP-1(7-37) OH	0,112
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -GLP-1(7-37) OH	1,175
Val ⁸ -Lys ²⁰ -GLP-1(7-37) OH	0,33
Gln ²² -GLP-1(7-37) OH	0,42
Val ⁸ -Ala ²² -GLP-1(7-37) OH	0,56
Val ⁸ -Ser ²² -GLP-1(7-37) OH	0,50
Val ⁸ -Asp ²² -GLP-1(7-37) OH	0,40
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37) OH	1,29
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-37) OH	0,58
Val ⁸ -Pro ²² -GLP-1(7-37) OH	0,01
Val ⁸ -His ²² -GLP-1(7-37) OH	0,14
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-36) NH ₂	0,53
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-36) NH ₂	1,0
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37) OH	1,07
Val ⁸ -Lys ²³ -GLP-1(7-37) OH	0,18
Val ⁸ -His ²⁴ -GLP-1(7-37) OH	0,007
Val ⁸ -Lys ²⁴ -GLP-1(7-37) OH	0,02
Val ⁸ -His ²⁶ -GLP-1(7-37) OH	1,6
Val ⁸ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37) OH	1,5
Val ⁸ -His ²⁷ -GLP-1(7-37) OH	0,37

Val ⁸ -Ala ²⁷ -GLP-1 (7-37) OH	0,47
Gly ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1 (7-37) OH	0,29
Val ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1 (7-37) OH	0,29
Val ⁸ -Asp ³⁰ -GLP-1 (7-37) OH	0,15
Val ⁸ -Ser ³⁰ -GLP-1 (7-37) OH	0,19
Val ⁸ -His ³⁰ -GLP-1 (7-37) OH	0,19
Val ⁸ -Glu ³³ -GLP-1 (7-37) OH	0,039
Val ⁸ -Ala ³³ -GLP-1 (7-37) OH	0,1
Val ⁸ -Gly ³³ -GLP-1 (7-37) OH	0,01
Val ⁸ -Glu ³⁴ -GLP-1 (7-37) OH	0,17
Val ⁸ -Pro ³⁵ -GLP-1 (7-37) OH	0,094
Val ⁸ -His ³⁵ -GLP-1 (7-37) OH	0,41
Val ⁸ -Glu ³⁵ -GLP-1 (7-37) OH	0,15
Val ⁸ -Glu ³⁶ -GLP-1 (7-37) OH	0,11
Val ⁸ -His ³⁶ -GLP-1 (7-37) OH	0,22
Val ⁸ -His ³⁷ -GLP-1 (7-37) OH	0,33
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -Glu ²⁶ -GLP-1 (7-37) OH	0,23
Val ⁸ -Lys ²² -Glu ³⁰ -GLP-1 (7-37) OH	0,37
Val ⁸ -Lys ²² -Glu ²³ -GLP-1 (7-37) OH	0,35
Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1 (7-37) OH	1,02
Val ⁸ -Glu ²² -Lys ²³ -GLP-1 (7-37) OH	1,43
Val ⁸ -Lys ³³ -Val ³⁴ -GLP-1 (7-37) OH	0,08
Val ⁸ -Lys ³³ -Asn ³⁴ -GLP-1 (7-37) OH	0,09
Val ⁸ -Gly ³⁴ -Lys ³⁵ -GLP-1 (7-37) OH	0,34
Val ⁸ -Gly ³⁶ -Pro ³⁷ -GLP-1 (7-37) NH ₂	0,53

Tabulka 5b. Aktivita GLP-1 analogu in vitro

GLP-1 sloučenina	Aktivace GLP-1 receptoru
GLP-1(7-37)OH	1,0
Val ⁸ -GLP-1(7-37)OH	0,47
Gly ⁸ -GLP-1(7-37)OH	0,80
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1(7-37)OH	0,80
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1(7-36)NH ₂	0,52
Val ⁸ -Trp ¹² -GLP-1(7-37)OH	0,52
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	0,52
Val ⁸ -Val ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	0,52
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	1,18
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,03
Val ⁸ -Leu ²⁵ -GLP-1(7-37)OH	0,24
Val ⁸ -Tyr ¹² -Tyr ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	0,70
Val ⁸ -Trp ¹² -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	0,80
Val ⁸ -Tyr ¹² -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,27
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -Phe ¹⁹ -GLP-1(7-37)OH	1,32
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,69, 1,79
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	2,30, 2,16
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	2,02
Val ⁸ -Ile ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,55
Val ⁸ -Phe ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,08
Val ⁸ -Trp ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,50, 3,10
Val ⁸ -Tyr ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	2,40, 2,77
Val ⁸ -Phe ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	0,94
Val ⁸ -Ile ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,88
Val ⁸ -Lys ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,18
Val ⁸ -Trp ¹⁹ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,50
Val ⁸ -Phe ¹⁹ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	0,70
Val ⁸ -Phe ²⁰ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,27

Val ⁸ -Glu ²² -Leu ²⁵ -GLP-1 (7-37) OH	1,32
Val ⁸ -Glu ²² -Ile ²⁵ -GLP-1 (7-37) OH	1,46
Val ⁸ -Glu ²² -Val ²⁵ -GLP-1 (7-37) OH	2,21, 1,36
Val ⁸ -Glu ²² -Ile ²⁷ -GLP-1 (7-37) OH	0,94
Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1 (7-37) OH	1,03
Val ⁸ -Glu ²² -Ile ³³ -GLP-1 (7-37) OH	2,21, 1,79, 1,60
Val ⁸ -Asp ⁹ -Ile ¹¹ -Tyr ¹⁶ -Glu ²² - GLP-1 (7-37) OH	2,02
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -Trp ¹⁹ -Glu ²² -GLP-1 (7- 37) OH	1,64
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -Val ²⁵ -Ile ³³ - GLP-1 (7-37) OH	2,35
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -Ile ³³ -GLP-1 (7- 37) OH	1,93
Val ⁸ -Glu ²² -Val ²⁵ -Ile ³³ -GLP-1 (7- 37) OH	2,30, 2,73, 3,15
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -Val ²⁵ -GLP-1 (7- 37) OH	2,07
Val ⁸ -Cys ¹⁶ -Lys ²⁶ -GLP-1 (7-37) OH	1,97
Val ⁸ -Cys ¹⁶ -Lys ²⁶ -Arg ³⁴ -GLP-1 (7- 37) OH	2,4,1,9

Tabulka 6: Aktivita GLP/Exendin analogů in vitro

Sekvence peptidu	Aktivita in vitro (% Val ⁸ -GLP- 1 (7-37) OH)
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGP-NH2	6,21
HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPP PS-NH2	6,75,3,25
HVEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIAWLVKGRG	2,86
HVEGTFTSDVSSYLEEEAVRLFIAWLVKGRG	1,47
HVEGTFTSDLSKQMEGQAAKEFIAWLVKGRG	0,11



HVEGTFTSDVSKQMEGQAAKEFIAWLVKGRG	0,04
HGEGTFTSDLKQMEGQAAKEFIEWLKNGGP-NH2	1,44
HGEGTFTSDLKQMEEEEAAKEFIEWLKNGGP-NH2	2,80
HGEGTFTSDVSSYLEEEAAVRLFIEWLKNGGP-NH2	5,40
HGEGTFTSDLSSYLEEEAAVRLFIEWLKNGGP-NH2	5,07
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRPSSGAPPPS-NH2	3,30
HAEGTFTSDVSKQLEEEAAKEFIAWLVKGRG	2,15
HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLKNGGP-NH2	2,36
HGEGTFTSDLKQMEEEAAVRLFIAWLVKGRG	3,25
HVEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVKGRG	1,00
HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKNGRG	0,20
HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	1,00
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	2,12

Příklad 7: Farmakokinetika Val⁸-GLP-1-IgG1 a Val⁸-GLP-1-HSA in vivo:

Farmakokinetická studie Val⁸-GLP-1-IgG1 a Val⁸-GLP-1-HSA byla provedena u opic druhu cynomologus. Opicím bylo dávkováno 5,6 nmolů/kg buď čištěného Val⁸-GLP-1-IgG1/nebo Val⁸-GLP-1-HSA. Sloučeniny byly podávány jako intravenózními pilulkami. Byla shromažďována krev před dávkováním a v čase 0,083, 0,25, 0,5, 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, a 216 hodin po dávkování do trubiček obsahujících EDTA. Koncentrace imunoreaktivního Val⁸-GLP-1 v plazmě byla stanovena s použitím radioimunologických testů, které využívají polyklonální antisérum, které má primární specifitu pro region N-zakončení (7-16) Val⁸-GLP-1(7-37).

Obr. 9 zobrazuje koncentraci Val⁸-GLP-1-Fc a Val⁸-GLP-1-Linker-HSA v plazmě po podání jednotlivé intravenózní dávky dvěma opicích druhu cynomologus. Fc fúzní proteiny mají poločas života přibližně 45 hodin a albuminový fúzní protein má poločas života přibližně 87 hodin.

Příklad 8: Farmakodynamika Exendinu-4-IgG1 in vivo:

Byli studováni dva normální samci psů beagle s trvale zavedenou kanylou, poté co přes noc hladověli. Byly otevřeny arteriální a venózní vaskulární přístupové cesty a byl zaveden katétr perkutánně do hlavové žíly a stabilizován. Zvířata byla umístěna v klecích a jejich katétr byl napojen na otočný upevňovací systém. Roztok obsahující fúzní protein Exendin-4-IgG1 (11.8 µM) byl vstříknut injekčně intravenózně (1,0 nmol/kg) katétrem hlavové žíly. Katétr byl pak vyčištěn 10 ml slaného roztoku. Po dvou hodinách byla aktivována hyperglykemická svorka (150 mg/dl) a pokračovalo se tři hodiny. Během této pětihodinové periody byly odebírány vzorky arteriální krve stanovení koncentrace fúzního proteinu, glukózy a insulinu v plazmě.

Výsledky této studie byly porovnány s výsledky podobné dříve provedené studie, ve které zvířata obdržela dávku slaného roztoku a o tři hodiny později byla zvířata testována s použitím tříhodinové hyperglykemické svorky (150 mg/dl).

V obou uvedených studiích byla koncentrace glukózy v plazmě stanovena Beckman glukózovým analyzátozem. Koncentrace insulinu v plazmě byly stanoveny v Linco Research, Inc. s použitím soupravy RIA, vyvinutých v jejich laboratořích. Výsledky jsou znázorněny na obrázcích 10 a 11.

Příklad 9: Farmakokinetika Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1

Dvě skupiny tří normálních psích samců beagle byla podána subkutánně (SC) nebo intravenózně (IV) dávka 0,1 mg/kg Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1. Koncentrace Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 v plazmě a imunoreaktivita byly stanoveny radioimunoologickým testem ve vzorcích shromažďovaných 30 minut před dávkováním a 216 hodin po dávkování ve skupinách IV a SC. Tyto koncentrace byly poté použity pro stanovení zde uváděných farmakokinetických parameterů. Střední doba odstranění poloviny dávky při intravenózním podávání Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 byla přibližně 55 hodin a celková doba odstranění z těla bylo 1,5 ml/h/kg. Střední doba odstranění poloviny dávky při subkutánním podávání Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 byla přibližně 38 hodin.

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Heterologní fúzní protein, zahrnující první polypeptid s N-zakončením a C-zakončením fúzovaný na druhý polypeptid s N-zakončením a C-zakončením, kde první polypeptid je GLP-1 sloučenina a druhý polypeptid je vybrán ze skupiny, do které patří

- a) lidský albumin;
- b) analogy lidského albuminu; a
- c) fragmenty lidského albuminu,

a kde C-zakončení prvního polypeptidu je fúzováno na N-zakončení druhého polypeptidu.

2. Heterologní fúzní protein, zahrnující první polypeptid s N-zakončením a C-zakončením, fúzovaný na druhý polypeptid s N-zakončením a C-zakončením, kde první polypeptid je GLP-1 sloučenina a druhý polypeptid je vybrán ze skupiny, do které patří

- a) lidský albumin;
- b) analogy lidského albuminu; a
- c) fragmenty lidského albuminu,

a kde C-zakončení prvního polypeptidu je fúzováno na N-zakončení druhého polypeptidu přes peptidový linker.

3. Heterologní fúzní protein podle nároku 2, kde peptidový linker je vybrán ze skupiny, do které patří:

- a) glycinem bohatý peptid;
- b) peptid, který má sekvenci [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n, kde n je 1, 2, 3, 4, 5 nebo 6; a
- c) peptid, který má sekvenci [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃.

4. Heterologní fúzní protein podle nároků 1, 2 nebo 3,
kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci
vzorce 1 [SEQ ID NO: 2]

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
His-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Phe-Thr-Xaa-Asp-Xaa-Xaa

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
Ile-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

40 41 42 43 44 45
Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

Vzorec I (SEQ ID NO: 2)

kde:

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

Xaa na pozici 9 je Glu, Asp nebo Lys;

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

Xaa na pozici 14 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 16 je Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr,
Glu, Asp, Trp nebo Lys;

Xaa na pozici 17 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,

Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 18 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,

Asp, Trp, Tyr nebo Lys;

Xaa na pozici 19 je Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln nebo Lys;

Xaa na pozici 20 je Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu,

Asp, Met, Trp, Tyr nebo Lys;

Xaa na pozici 21 je Glu, Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 22 je Gly, Ala, Ser, Thr, ~Leu, Ile, Val, Glu,

Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 23 je Gln, Asn, Arg, Glu, Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 24 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg,

Glu, Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 25 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,

Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 26 je Lys, Arg, Gln, Glu, Asp nebo His;

Xaa na pozici 27 je Leu, Glu, Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 30 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,

Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 31 je Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 32 je Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu,

Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 33 je Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu,

Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 34 je Asn, Lys, Arg, Glu, Asp nebo His;

Xaa na pozici 35 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,

Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 36 je Gly, Arg, Lys, Glu, Asp nebo His;

Xaa na pozici 37 je Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val,

Glu, Asp nebo Lys nebo chybí;

Xaa na pozici 38 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp nebo His,
nebo chybí;

Xaa na pozici 39 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp nebo His,
nebo chybí;

Xaa na pozici 40 je Gly, Asp, Glu nebo Lys nebo chybí;

Xaa na pozici 41 je Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp nebo Lys,
nebo chybí;

Xaa na pozici 42 je Ser, Pro, Lys, Glu nebo Asp nebo chybí;

Xaa na pozici 43 je Ser, Pro, Glu, Asp nebo Lys nebo chybí;

Xaa na pozici 44 je Gly, Pro, Glu, Asp nebo Lys nebo chybí;

a

Xaa na pozici 45 je Ala, Ser, Val, Glu, Asp nebo Lys,
nebo chybí

s podmínkou, že když aminokyselina na pozici 37, 38, 39,
40, 41, 42, 43 nebo 44 chybí, potom každá aminokyselina za
touto aminokyselinou rovněž chybí.

5. Heterologní fúzní protein podle nároků 1, 2 nebo 3,
kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci
vzorce II (SEQ ID NO: 3)

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Xaa-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile-Xaa-Xaa-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

Vzorec II (SEQ ID NO: 3)

kde:

Xaa na pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin,
2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin,
 α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin;

Xaa na pozici 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa na pozici 9 je: Thr, Ser, Arg, Lys, Trp, Phe, Tyr, Glu
nebo His;

Xaa na pozici 11 je: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys nebo His;

Xaa na pozici 12 je: His, Trp, Phe nebo Tyr;

Xaa na pozici 16 je: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val,
Tyr, Glu nebo Ala;

Xaa na pozici 18 je: His, Pro, Asp, Glu, Arg, Ser, Ala nebo
Lys;

Xaa na pozici 22 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg nebo
Cys;

Xaa na pozici 23 je: His, Asp, Lys, Glu, Gln nebo Arg;

Xaa na pozici 24 je: Glu, Arg, Ala nebo Lys;

Xaa na pozici 26 je: Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu nebo His;

Xaa na pozici 27 je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg nebo
Lys;

Xaa na pozici 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

Xaa na pozici 31 je: Asp, Glu, Ser, Thr, Arg, Trp nebo Lys;

Xaa na pozici 33 je: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly nebo Glu;

Xaa na pozici 34 je: Glu, Lys nebo Asp;

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

Xaa na pozici 36 je: Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu
nebo His;

Xaa na pozici 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,
Phe, His, Gly, Gly-Pro nebo chybí.

6. Heterologní fúzní protein podle nároků 1, 2 nebo 3,
kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci

vzorce III (SEQ ID NO: 4)

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa-Xaa-Glu-Gly-Xaa-Xaa-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

Vzorec III (SEQ ID NO: 4)

kde:

Xaa na pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin,
2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin,
 α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin;

Xaa na pozici 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa na pozici 11 je: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys nebo His;

Xaa na pozici 12 je: His, Trp, Phe nebo Tyr;

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

Xaa na pozici 22: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg nebo Cys;

Xaa na pozici 23 je: His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

Xaa na pozici 24 je: Glu, His, Ala nebo Lys;

Xaa na pozici 25 je: Asp, Lys, Glu nebo His;

Xaa na pozici 27 je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg
nebo Lys;

Xaa na pozici 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

Xaa na pozici 33 je: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly nebo Glu;

Xaa na pozici 34 je: Glu, Lys nebo Asp;

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

Xaa na pozici 36 je: Arg, Glu nebo His;

Xaa na pozici 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro nebo chybí.

7. Heterologní fúzní protein podle nároku 1, 2 nebo 3, kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci vzorce IV (SEQ ID NO: 5)

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa-Xaa-Glu-Gly-Thr-Xaa-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Ala-Ala-Xaa-Glu-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile-Xaa-Trp-Leu-Val-Lys-Xaa-Arg-Xaa

Vzorec IV (SEQ ID NO: 5)

kde:

Xaa na pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin, 2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin, α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin;

Xaa na pozici 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa na pozici 12 je: His, Trp, Phe nebo Tyr;

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

Xaa na pozici 22 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg nebo Cys;

Xaa na pozici 23 je: His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

Xaa na pozici 26 je: Asp, Lys, Glu nebo His;

Xaa na pozici 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

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

Xaa na pozici 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,

Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro nebo Gly-Pro-NH₂ nebo chybí.

8. Heterologní fúzní protein podle nároků 1, 2 nebo 3,
kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci
vzorce V (SEQ ID NO: 6)

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa-Xaa-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Ala-Ala-Lys-Xaa-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile-Xaa-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Xaa

Vzorec V (SEQ ID NO: 6)

kde:

Xaa na pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin,
2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin,
 α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin;

Xaa na pozici 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa na pozici 22 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg
nebo Cys;

Xaa na pozici 23 je: His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

Xaa na pozici 24 je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg
nebo Lys

Xaa na pozici 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

Xaa na pozici 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,
Phe, His, Gly, Gly-Pro nebo chybí.

9. Heterologní fúzní protein podle nároků 1, 2 nebo 3,
kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci
vzorce VIII (SEQ ID NO: 11).

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa-Xaa-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Xaa-Xaa-Xaa-Glu-Xaa-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Xaa-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa

Vzorec VIII (SEQ ID NO: 11)

kde:

Xaa na pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin,
2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin,
 α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin;

Xaa na pozici 8 je: Gly, Ala nebo Val;

Xaa na pozici 16 je: Leu nebo Val;

Xaa na pozici 18 je Lys nebo Ser;

Xaa na pozici 19 je: Gln nebo Tyr;

Xaa na pozici 20 je: Met nebo Leu;

Xaa na pozici 22 je: Glu nebo Gln;

Xaa na pozici 23 je: Glu nebo Gln;

Xaa na pozici 25 je: Val nebo Ala;

Xaa na pozici 26 je: Arg nebo Lys;

Xaa na pozici 27 je Leu nebo Glu;

Xaa na pozici 30 je: Glu nebo Ala;

Xaa na pozici 33 je: Val nebo Lys;

Xaa na pozici 34 je: Asn nebo Lys;

Xaa na pozici 36 je: Gly nebo Arg; a

Xaa na pozici 37 je: Gly, Pro, Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-
Pro-Ser nebo chybí.

10. Heterologní fúzní protein podle nároků 1 až 9, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 6 aminokyselin, které jsou odlišné od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH nebo Exendinu-4.

11. Heterologní fúzní protein podle nároku 10, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 5 aminokyselin, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH nebo Exendinu-4.

12. Heterologní fúzní protein podle nároku 11, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 4 aminokyseliny, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH nebo Exendinu-4.

13. Heterologní fúzní protein podle nároku 12, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 3 aminokyseliny, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH nebo Exendinu-4.

14. Heterologní fúzní protein podle nároku 13, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 2 aminokyseliny, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH nebo Exendinu-4.

15. Heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14, kde Xaa na pozici 8 je glycin nebo valin.

16. Heterologní fúzní protein podle nároku 8, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 2 aminokyseliny, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)OH a Xaa na pozici 8 je glycin nebo valin a Xaa na pozici 30 je alanin, kyselina glutamová, kyselina aspartová, serin nebo histidin.

17. Heterologní fúzní protein podle nároku 16, kde Xaa na pozici 30 je kyselina glutamová.

18. Heterologní fúzní protein podle nároku 8, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 2 aminokyseliny, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)OH a Xaa na pozici 8 je glycin nebo valin a Xaa na pozici 37 je histidin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, kyselina aspartová, kyselina glutamová, serin, threonin, arginin nebo lysin.

19. Heterologní fúzní protein podle nároku 18, kde Xaa na pozici 37 je histidin.

20. Heterologní fúzní protein podle nároku 8, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 2 aminokyseliny, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)OH a Xaa na pozici 8 je glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin nebo metionin a Xaa na pozici 22 je kyselina aspartová, kyselina glutamová, lysin, arginin, asparagin, glutamin nebo histidin.

21. Heterologní fúzní protein podle nároku 20, kde Xaa na pozici 22 je lysin nebo kyselina glutamová.

22. Heterologní fúzní protein podle nároku 8, kde GLP-1 sloučeninou je Val⁸-GLP-1(7-37).

23. Heterologní fúzní protein podle nároku 8, kde GLP-1 sloučeninou je Gly⁸-GLP-1(7-37).

24. Heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 23, kde druhým polypeptidem je lidský albumin.

25. Heterologní fúzní protein podle nároku 24, kde druhý polypeptid má sekvenci SEQ ID NO: 34.

26. Heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 23, kde druhý polypeptid je fragment albuminu s N-zakončením.

27. Heterologní fúzní protein zahrnující první polypeptid s N-zakončením a C-zakončením fúzovaný na druhý polypeptid s N-zakončením a C-zakončením, kde první polypeptid je GLP-1 sloučenina a druhý polypeptid je vybrán ze skupiny, do které patří

- a) Fc část imunoglobulinu;
- b) analog Fc části imunoglobulinu; a
- c) fragmenty Fc části imunoglobulinu, a

kde C-zakončení prvního polypeptidu je fúzováno na N-zakončení druhého polypeptidu.

28. Heterologní fúzní protein zahrnující první polypeptid s N-zakončením a C-zakončením fúzovaný na druhý polypeptid s N-zakončením a C-zakončením, kde první polypeptid je GLP-1 sloučenina a druhý polypeptid je vybrán ze skupiny, do které patří

- a) Fc část imunoglobulinu;
- b) analog Fc části imunoglobulinu; a
- c) fragmenty Fc části imunoglobulinu,

a kde C-zakončení prvního polypeptidu je fúzováno na N-zakončení druhého polypeptidu přes peptidový linker.

29. Heterologní fúzní protein podle nároku 28, kde peptidový linker je vybrán ze skupiny, do které patří:

- a) glycinem bohatý peptid;
- b) peptid, který má sekvenci $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser}]_n$, kde n je 1, 2, 3, 4, 5 nebo 6; a

c) peptid, který má sekvenci [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃.

30. Heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 27, 28 nebo 29, kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci vzorce 1 [SEQ ID NO: 2].

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
His-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Phe-Thr-Xaa-Asp-Xaa-Xaa

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
Ile-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

40 41 42 43 44 45
Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

Vzorec I (SEQ ID NO: 2)

kde:

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

Xaa na pozici 9 je Glu, Asp nebo Lys;

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

Xaa na pozici 14 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 16 je Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr,
Glu, Asp, Trp nebo Lys;

Xaa na pozici 17 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp nebo Lys;

Xaa na pozici 18 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp, Trp, Tyr nebo Lys;

Xaa na pozici 19 je Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln nebo Lys;
Xaa na pozici 20 je Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu,
Asp, Met, Trp, Tyr nebo Lys;
Xaa na pozici 21 je Glu, Asp nebo Lys;
Xaa na pozici 22 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp nebo Lys;
Xaa na pozici 23 je Gln, Asn, Arg, Glu, Asp nebo Lys;
Xaa na pozici 24 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg,
Glu, Asp nebo Lys;
Xaa na pozici 25 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp nebo Lys;
Xaa na pozici 26 je Lys, Arg, Gln, Glu, Asp nebo His;
Xaa na pozici 27 je Leu, Glu, Asp nebo Lys;
Xaa na pozici 30 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, ,Glu,
Asp nebo Lys;
Xaa na pozici 31 je Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp nebo Lys;
Xaa na pozici 32 je Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu,
Asp nebo Lys;
Xaa na pozici 33 je Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu,
Asp nebo Lys;
Xaa na pozici 34 je Asn, Lys, Arg, Glu, Asp nebo His;
Xaa na pozici 35 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp nebo Lys;
Xaa na pozici 36 je Gly, Arg, Lys, Glu, Asp nebo His;
Xaa na pozici 37 je Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val,
Glu, Asp nebo Lys nebo chybí;
Xaa na pozici 38 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp nebo His
nebo chybí;
Xaa na pozici 39 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp nebo His nebo
chybí;
Xaa na pozici 40 je Gly, Asp, Glu nebo Lys nebo chybí;
Xaa na pozici 41 je Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp nebo Lys
nebo chybí;
Xaa na pozici 42 je Ser, Pro, Lys, Glu nebo Asp nebo chybí;

Xaa na pozici 43 je Ser, Pro, Glu, Asp nebo Lys nebo chybí;
 Xaa na pozici 44 je Gly, Pro, Glu, Asp nebo Lys nebo chybí; a
 Xaa na pozici 45 je Ala, Ser, Val, Glu, Asp nebo Lys nebo
 chybí;

s podmínkou, že pokud aminokyselina na pozici 37, 38, 39,
 40, 41, 42, 43 nebo 44 chybí, potom každá aminokyselina za
 touto aminokyselinou rovněž chybí.

31. Heterologní fúzní protein podle nároků 27, 28 nebo
 29, kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci
 vzorce II (SEQ ID NO: 3)

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
 Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
 Xaa-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37
 Ile-Xaa-Xaa-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

Vzorec II (SEQ ID NO: 3)

kde:

Xaa na pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin,
 2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin,
 α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin;

Xaa na pozici 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa na pozici 9 je: Thr, Ser, Arg, Lys, Trp, Phe, Tyr, Glu
 nebo His;

Xaa na pozici 11 je: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys nebo His;

Xaa na pozici 12 je: His, Trp, Phe nebo Tyr;

Xaa na pozici 16 je: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val,

Tyr, Glu nebo Ala;

Xaa na pozici 18 je: His, Pro, Asp, Glu, Arg, Ser, Ala
nebo Lys;

Xaa na pozici 22 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg
nebo Cys;

Xaa na pozici 23 je: His, Asp, Lys, Glu, Gln nebo Arg;

Xaa na pozici 24 je: Glu, Arg, Ala nebo Lys;

Xaa na pozici 26 je: Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu nebo His;

Xaa na pozici 27 je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg
nebo Lys;

Xaa na pozici 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

Xaa na pozici 31 je: Asp, Glu, Ser, Thr, Arg, Trp nebo Lys;

Xaa na pozici 33 je: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly nebo Glu;

Xaa na pozici 34 je: Glu, Lys nebo Asp;

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

Xaa na pozici 36 je: Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu
nebo His;

Xaa na pozici 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,
Phe, His, Gly, Gly-Pro nebo chybí.

32. Heterologní fúzní protein podle nároků 27, 28 nebo
29, kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci
vzorce III (SEQ ID NO: 4)

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa-Xaa-Glu-Gly-Xaa-Xaa-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-R

vzorec III (SEQ ID NO: 4)

kde:

Xaa na pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin,
2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin,
 α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin;

Xaa na pozici 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa na pozici 11 je: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys nebo His;

Xaa na pozici 12 je: His, Trp, Phe nebo Tyr;

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

Xaa na pozici 22: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg nebo Cys;

Xaa na pozici 23 je: His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

Xaa na pozici 24 je: Glu, His, Ala nebo Lys;

Xaa na pozici 25 je: Asp, Lys, Glu nebo His;

Xaa na pozici 27 je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg
nebo Lys;

Xaa na pozici 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

Xaa na pozici 33 je: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly nebo Glu;

Xaa na pozici 34 je: Glu, Lys nebo Asp;

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

Xaa na pozici 36 je: Arg, Glu nebo His;

Xaa na pozici 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,
Phe, His, Gly, Gly-Pro nebo chybí.

33. Heterologní fúzní protein podle nároku 27, 28 nebo
29, kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci

vzorce IV (SEQ ID NO: 5):

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Xaa-Xaa-Glu-Gly-Thr-Xaa-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Ala-Ala-Xaa-Glu-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37

Ile-Xaa-Trp-Leu-Val-Lys-Xaa-Arg-Xaa

Vzorec IV (SEQ ID NO: 5)

kde:

Xaa na pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin,
2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin,
 α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin;

Xaa na pozici 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa na pozici 12 je: His, Trp, Phe nebo Tyr;

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

Xaa na pozici 22 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg
nebo Cys;

Xaa na pozici 23 je: His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

Xaa na pozici 26 je: Asp, Lys, Glu nebo His;

Xaa na pozici 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

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

Xaa na pozici 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,
Phe, His, Gly, Gly-Pro nebo chybí.

34. Heterologní fúzní protein podle nároků 27, 28 nebo
29, kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci
vzorce V (SEQ ID NO: 6)

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Xaa-Xaa-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Ala-Ala-Lys-Xaa-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile-Xaa-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Xaa

Vzorec V (SEQ ID NO: 6)

kde:

Xaa na pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin,
2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin,
 α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin;

Xaa na pozici 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa na pozici 22 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg
nebo Cys;

Xaa na pozici 23 je: His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

Xaa na pozici 24 je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg
nebo Lys

Xaa na pozici 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

Xaa na pozici 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,
Phe, His, Gly, Gly-Pro nebo chybí.

35. Heterologní fúzní protein podle nároků 27, 28 nebo
29, kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci
vzorce VIII (SEQ ID NO: 11).

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa-Xaa-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Xaa-Xaa-Xaa-Glu-Xaa-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Xaa-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-R

Vzorec VIII (SEQ ID NO: 11)

kde:

Xaa na pozici 7 je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin,
2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin,
 α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin;

Xaa na pozici 8 je: Gly, Ala nebo Val;

Xaa na pozici 16 je: Leu nebo Val;

Xaa na pozici 18 je Lys nebo Ser;

Xaa na pozici 19 je: Gln nebo Tyr;

Xaa na pozici 20 je: Met nebo Leu;

Xaa na pozici 22 je: Glu nebo Gln;

Xaa na pozici 23 je: Glu nebo Gln;

Xaa na pozici 25 je: Val nebo Ala;

Xaa na pozici 26 je: Arg nebo Lys;

Xaa na pozici 27 je Leu nebo Glu;

Xaa na pozici 30 je: Glu nebo Ala;

Xaa na pozici 33 je: Val nebo Lys;

Xaa na pozici 34 je: Asn nebo Lys;

Xaa na pozici 36 je: Gly nebo Arg; a

Xaa na pozici 37 je: Gly, Pro, Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-
Pro-Ser nebo chybí.

36. Heterologní fúzní protein podle nároků 27 až 35, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 6 aminokyselin, které jsou odlišné od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH nebo Exendinu-4.

37. Heterologní fúzní protein podle nároku 36, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 5 aminokyselin, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH nebo Exendinu-4.

38. Heterologní fúzní protein podle nároku 37, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 4 aminokyseliny, které se liší od

odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH nebo Exendinu-4.

39. Heterologní fúzní protein podle nároku 38, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 3 aminokyselin, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH nebo Exendinu-4.

40. Heterologní fúzní protein podle nároku 39, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 2 aminokyseliny, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH nebo Exendinu-4.

41. Heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 27 až 40, kde Xaa na pozici 8 je glycin nebo valin.

42. Heterologní fúzní protein podle nároku 34, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 2 aminokyselin, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)OH a Xaa na pozici 8 je glycin nebo valin a Xaa na pozici 30 je alanin, kyselina glutamová, kyselina aspartová, serin nebo histidin.

43. Heterologní fúzní protein podle nároku 42, kde Xaa na pozici 30 je kyselina glutamová.

44. Heterologní fúzní protein podle nároku 34, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 2 aminokyseliny, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)OH a Xaa na pozici 8 je glycin nebo valin a Xaa na pozici 37 je histidin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, kyselina aspartová, kyselina glutamová, serin, threonin, arginin nebo lysin.

45. Heterologní fúzní protein podle nároku 44, kde Xaa na pozici 37 je histidin.

46. Heterologní fúzní protein podle nároku 34, kde GLP-1 sloučenina nemá více než 2 aminokyseliny, které se liší od odpovídající aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)OH a Xaa na pozici 8 je glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin nebo methionin a Xaa na pozici 22 je kyselina aspartová, kyselina glutamová, lysin, arginin, asparagin, glutamin nebo histidin.

47. Heterologní fúzní protein podle nároku 46, kde Xaa na pozici 22 je lysin nebo kyselina glutamová.

48. Heterologní fúzní protein podle nároku 34, kde GLP-1 sloučenina je Val⁸-GLP-1(7-37).

49. Heterologní fúzní protein podle nároku 34, kde GLP-1 sloučenina je Gly⁸-GLP-1(7-37).

50. Heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 27 až 49, kde druhý polypeptid je Fc část Ig vybraného ze skupiny, do které patří: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD nebo IgM.

51. Heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 27 až 50, kde druhý polypeptid je Fc část Ig vybraného ze skupiny, do které patří: IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4.

52. Heterologní fúzní protein podle nároku 51, kde druhý polypeptid je část IgG1 imunoglobulinu.

53. Heterologní fúzní protein podle nároku 51, kde druhý polypeptid je Fc část IgG4 imunoglobulinu.

54. Heterologní fúzní protein podle nároků 50 až 53, kde IgG je lidský.

55. Heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 27 až 54, kde Fc část zahrnuje pantovou oblast, CH2, CH3 domény.

56. Heterologní fúzní protein podle nároku 52, kde druhý polypeptid má sekvenci SEQ ID NO: 32.

57. Polynukleotid kódující heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 56.

58. Vektor zahrnující polynukleotid podle nároku 57.

59. Hostitelská buňka zahrnující vektor podle nároku 58.

60. Hostitelská buňka, exprimující alespoň jeden heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 56.

61. Hostitelská buňka podle nároku 60, kde uvedená hostitelská buňka je buňka CHO.

62. Způsob výroby heterologního fúzního proteinu zahrnující kroky transkripce a translace polynukleotidu podle nároku 57 za podmínek, při kterých heterologní fúzní protein je exprimován v detekovatelném množství.

63. Způsob normalizace hladiny krevní glukózy u savců, kteří to potřebují, zahrnující podávání terapeuticky účinného množství heterologního fúzního proteinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 56.

64. Způsob léčení pacienta, který má diabetes mellitus nezávislý na inzulinu, zahrnující podávání terapeuticky účinného heterologního fúzního proteinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 56.

65. Způsob léčení obezity zahrnující podávání terapeuticky účinného množství heterologního fúzního proteinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 56.

66. Použití heterologního fúzního proteinu podle z kteréhokoliv z nároků 1 až 56 pro výrobu prostředku k léčení pacientů, kteří mají diabetes mellitus nezávislý na isulinu.

67. Použití heterologního fúzního proteinu podle z kteréhokoliv z nároků 1 až 56 pro výrobu prostředku k léčení pacientů, kteří jsou obézní.

68. Farmaceutická formulace přizpůsobená pro léčení pacientů, kteří mají diabetes mellitus nezávislý na isulinu, zahrnující heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 1 až 56.

69. Heterologní fúzní protein podle nároků 1, 2 nebo 3, kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci vzorce I [SEQ.ID NO: 12]

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser
Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Gln-Ala-Xaa₂₅-Lys-Xaa₂₇-
Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Lys-Gly-Arg-Xaa₃₇

Vzorec IX (SEQ ID NO: 12)

kde:

Xaa₇ je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin,

2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin,
 α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin;

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

Xaa₁₂ je : Phe, Trp nebo Tyr;

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

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

Xaa₁₉ je : Tyr, Trp nebo Phe;

Xaa₂₀ je: Leu, Phe, Tyr nebo Trp;

Xaa₂₂ je: Gly, Glu, Asp nebo Lys;

Xaa₂₅ je: Ala, Val, Ile nebo Leu;

Xaa₂₇ je: Glu, Ile nebo Ala;

Xaa₃₀ je: Ala nebo Glu

Xaa₃₃ je: Val nebo Ile; a

Xaa₃₇ je: Gly, His, NH₂ nebo chybí.

70. Heterologní fúzní protein podle nároku 69, kde druhým polypeptidem je lidský albumin.

71. Heterologní fúzní protein podle nároku 70, kde druhý polypeptid má sekvenci SEQ ID NO: 34.

72. Heterologní fúzní protein podle nároku 69, kde druhý polypeptid je fragment albuminu s N-zakončením.

73. Heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 27, 28 nebo 29, kde GLP-1 sloučenina zahrnuje sekvenci vzorce IX [SEQ ID NO: 12]

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-
Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Gln-Ala-Xaa₂₅-Lys-Xaa₂₇-
Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Lys-Gly-Arg-Xaa₃₇

Vzorec IX (SEQ ID NO: 12)

kde:

Xaa₇ je: L-histidin, D-histidin, desaminohistidin,
2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin,
 α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin ;

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

Xaa₁₂ je: Phe, Trp nebo Tyr;

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

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

Xaa₁₉ je: Tyr, Trp nebo Phe;

Xaa₂₀ je: Leu, Phe, Tyr nebo Trp;

Xaa₂₂ je: Gly, Glu, Asp nebo Lys;

Xaa₂₅ je: Ala, Val, Ile nebo Leu;

Xaa₂₇ je: Glu, Ile nebo Ala;

Xaa₃₀ je: Ala nebo Glu

Xaa₃₃ je: Val nebo Ile; a

Xaa₃₇ je: Gly, His, NH₂ nebo chybí.

74. Heterologní fúzní protein podle nároku 73, kde druhým polypeptidem je Fc část Ig vybraného ze skupiny, do které patří: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD nebo IgM.

75. Heterologní fúzní protein podle nároku 73 nebo 74, kde druhým polypeptidem je Fc část Ig vybraného ze skupiny, do které patří: IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4.

76. Heterologní fúzní protein podle nároku 75, kde druhým polypeptidem je Fc část IgG1 imunoglobulinu.

77. Heterologní fúzní protein podle nároku 75, kde druhým polypeptidem je Fc část IgG4 imunoglobulinu.

78. Heterologní fúzní protein podle nároků 73 až 78, kde IgG je lidský.

79. Heterologní fúzní protein podle nároku 75, kde druhý polypeptid má sekvenci SEQ ID NO: 32.

80. Heterologní fúzní protein podle kteréhokoliv z nároků 69 až 79, kde GLP-1 sloučenina je vybrána ze skupiny, do které patří Gly⁸-GLP-1(7-37), Val⁸-Tyr¹²-GLP-1(7-37), Val⁸-Tyr¹²-GLP-1(7-36), Val⁸-Trp¹²-1(7-37), Val⁸-Leu¹⁶-GLP-1(7-37), Val⁸-Val¹⁶-GLP-1(7-37), Val⁸-Tyr¹⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Leu²⁵-GLP-1(7-37), Val⁸-Tyr¹²-Tyr¹⁶-GLP-1(7-37), Val⁸-Trp¹²-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Tyr¹²-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Tyr¹⁶-Phe¹⁹-GLP-1(7-37), Val⁸-Tyr¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Trp¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Leu¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Ile¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Phe¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Trp¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Tyr¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Phe¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Ile¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Lys¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Trp¹⁹-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Phe¹⁹-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Phe²⁰-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Glu²²-Leu²⁵-GLP-1(7-37), Val⁸-Glu²²-Ile²⁵-GLP-1(7-37), Val⁸-Glu²²-Val²⁵-GLP-1(7-37), Val⁸-Glu²²-Ile²⁷-GLP-1(7-37), Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37), Val⁸-Glu²²-Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸-Asp⁹-Ile¹¹-Tyr¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Tyr¹⁶-Trp¹⁹-Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸-Trp¹⁶-Glu²²-Val²⁵-Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸-Trp¹⁶-Glu²²-Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸-Glu²²-Val²⁵-Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸-Trp¹⁶-Glu²²-Val²⁵-GLP-1(7-37) a Val⁸-Cys¹⁶-Lys²⁶-GLP-1(7-37).

RJW03-1602
18.02.04

1/17

Obr. 1

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

[SEQ ID NO: 32]

2/17

Obr. 2

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

72001-169
18.02.04

3/17

Obr. 2 pokračování

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

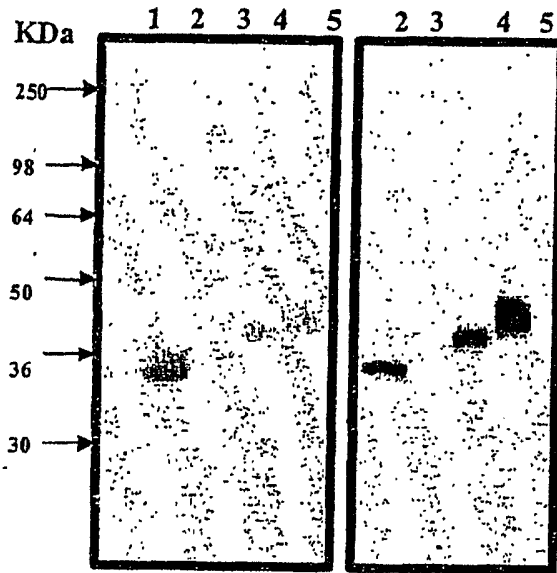
[SEQ ID NO: 34]

18.02.04

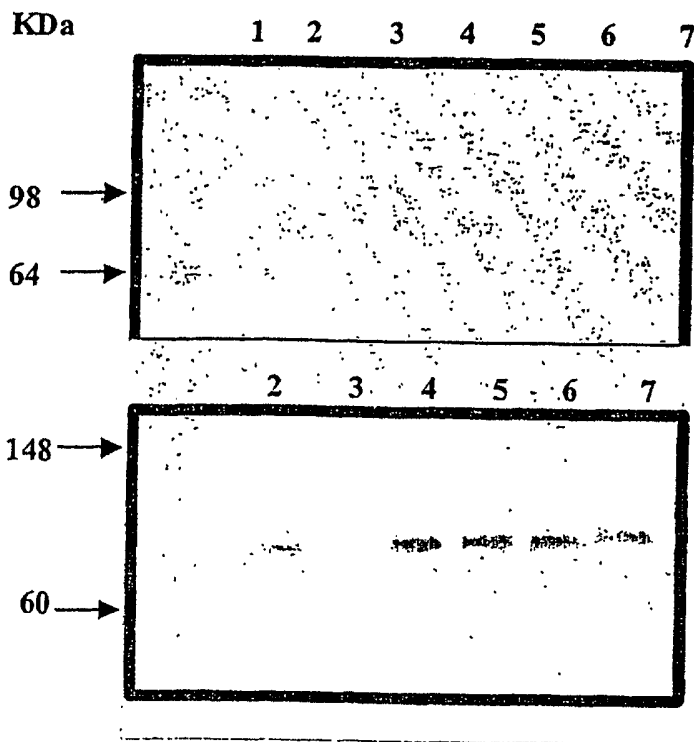
4/17

Obr. 3

A.



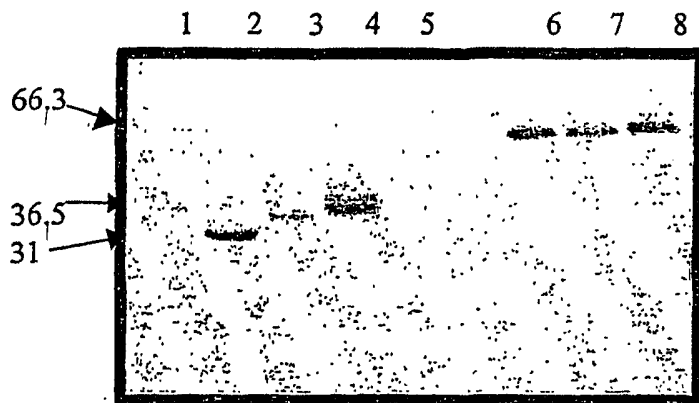
B.



Р2003-1602
18.02.04

5/17

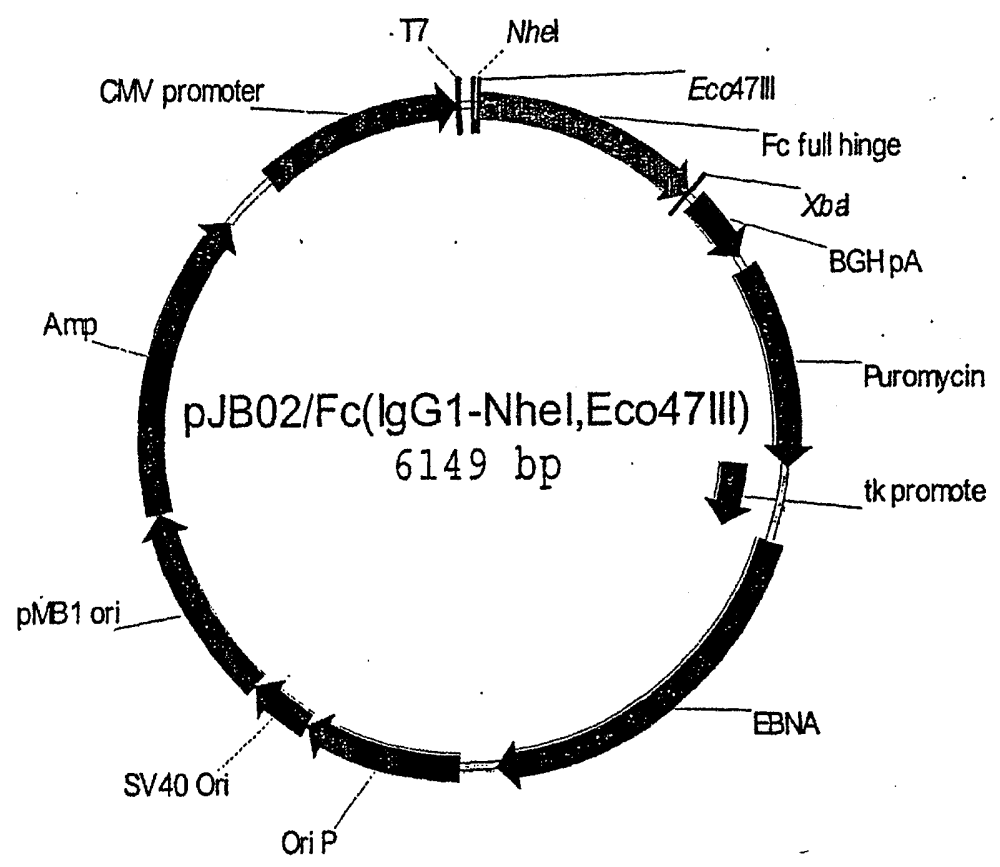
Обр. 4



RJ 2003-1602
18.02.04

6/17

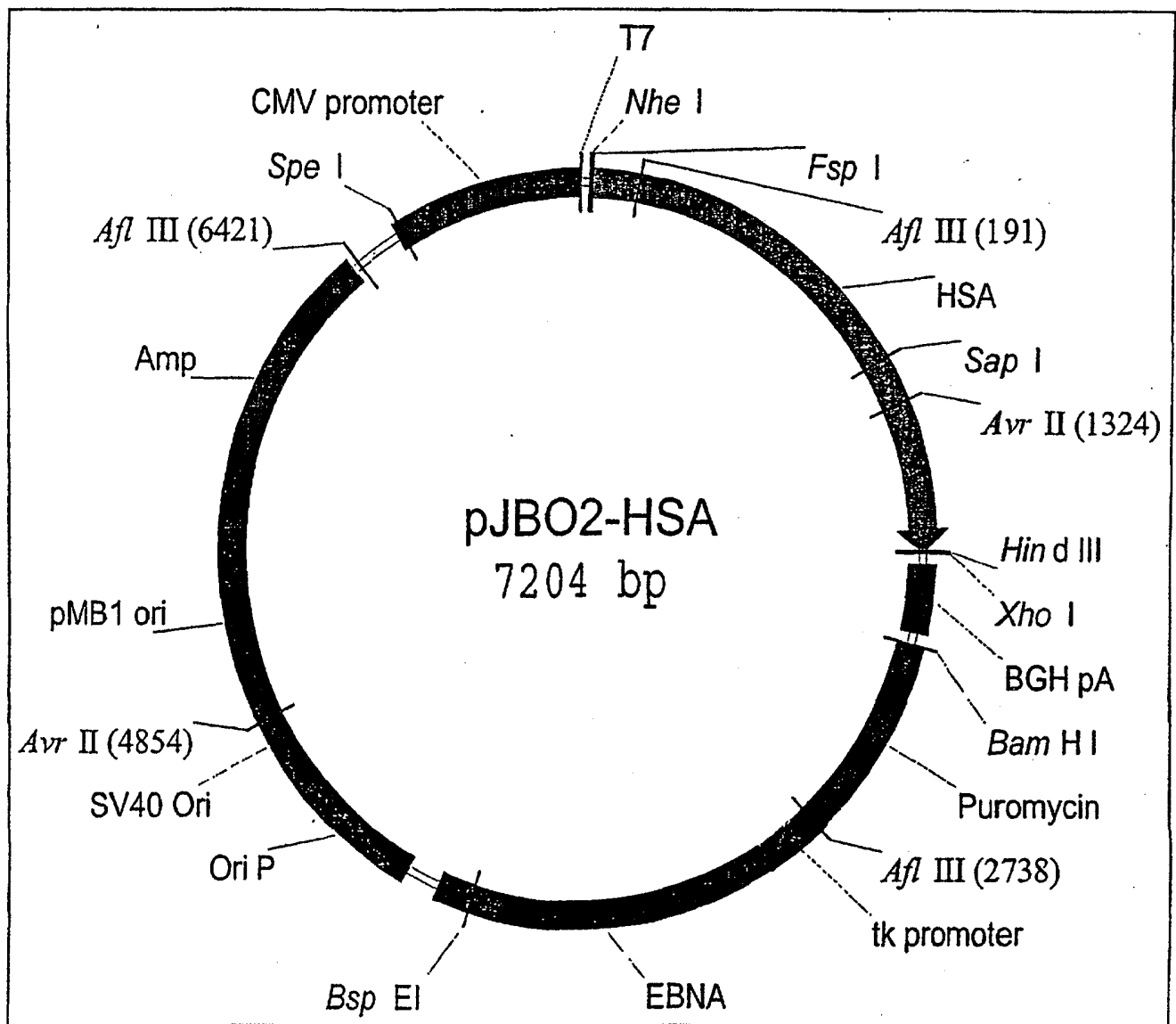
Obr. 5



72053-16 02
18.02.04

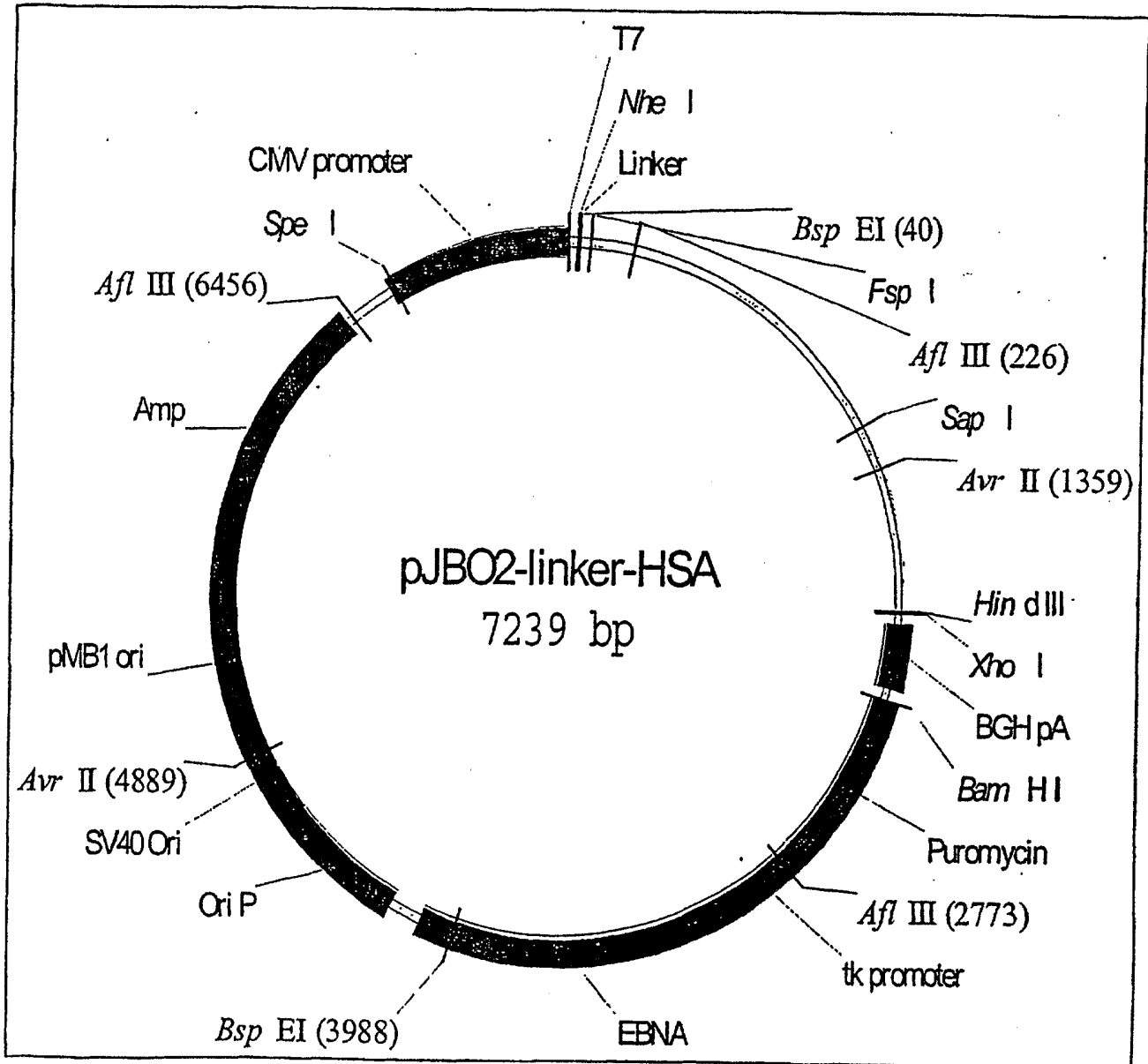
7/17

Obr. 6



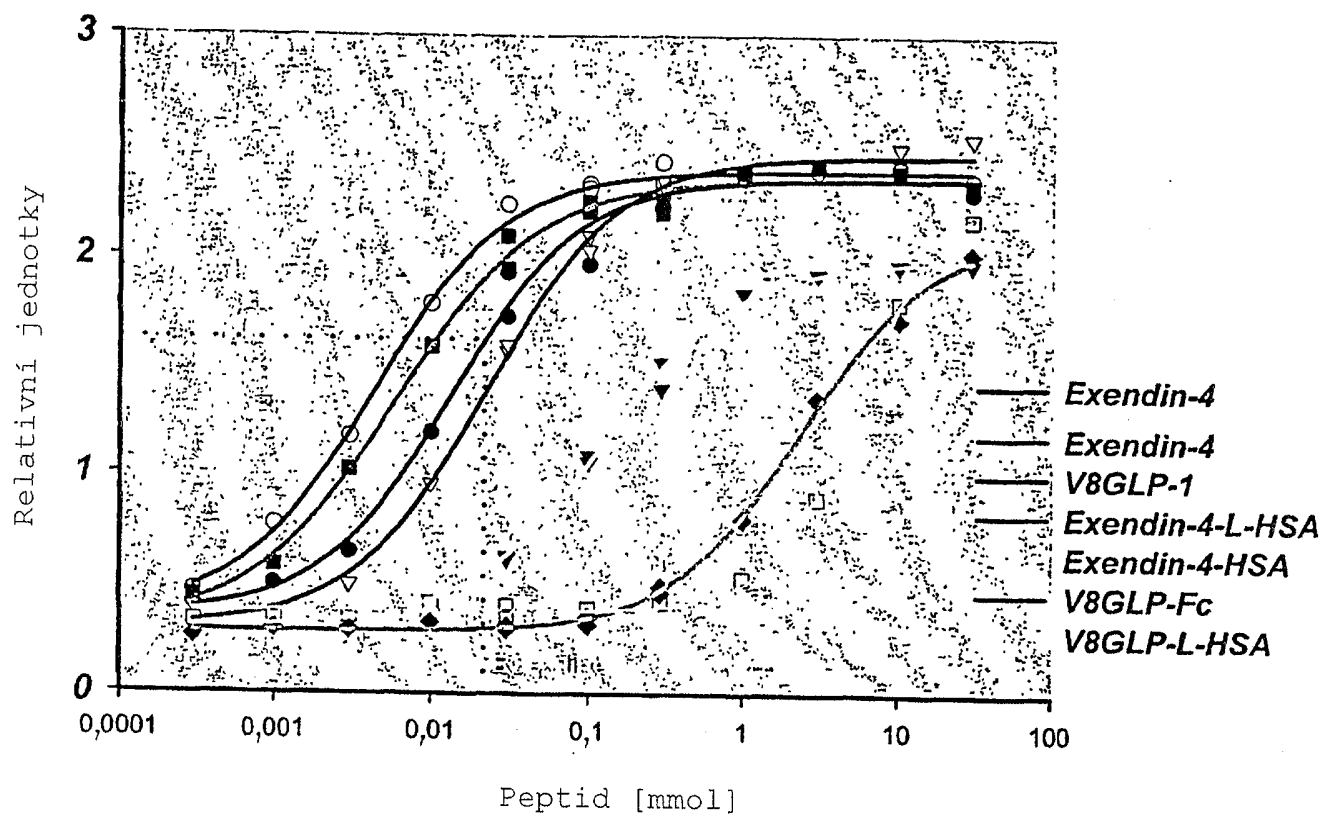
8/17

Obr. 7



9/17

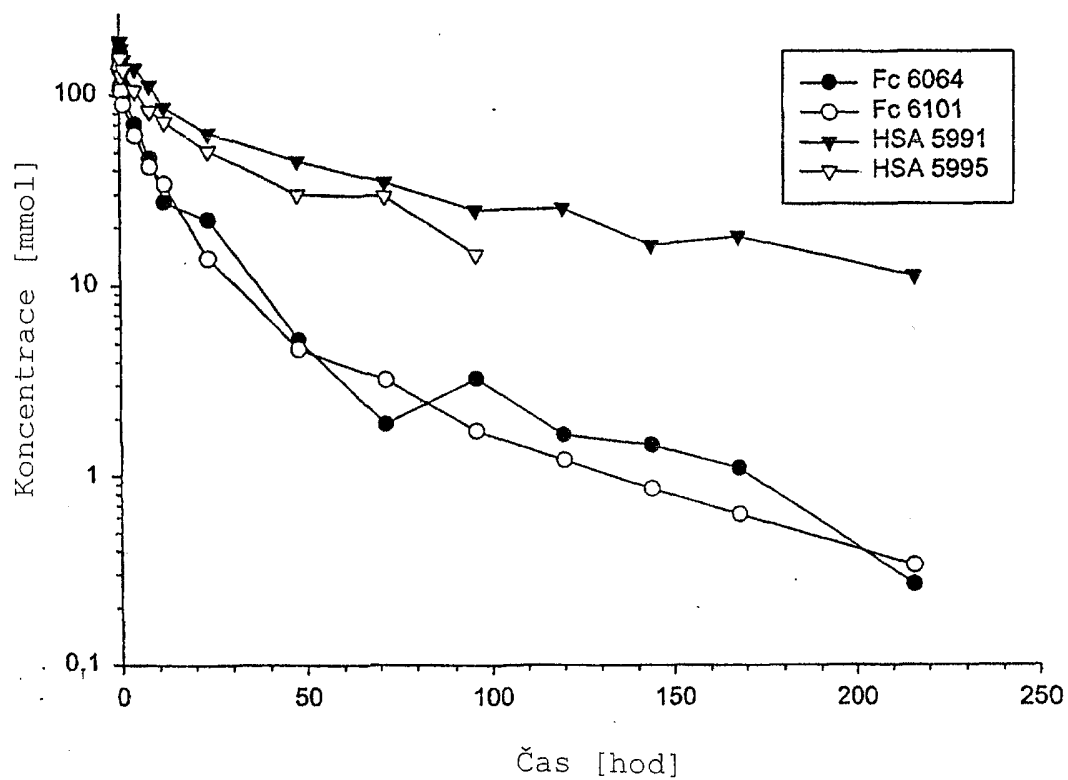
Obr. 8



70203-1602
18.02.04

10/17

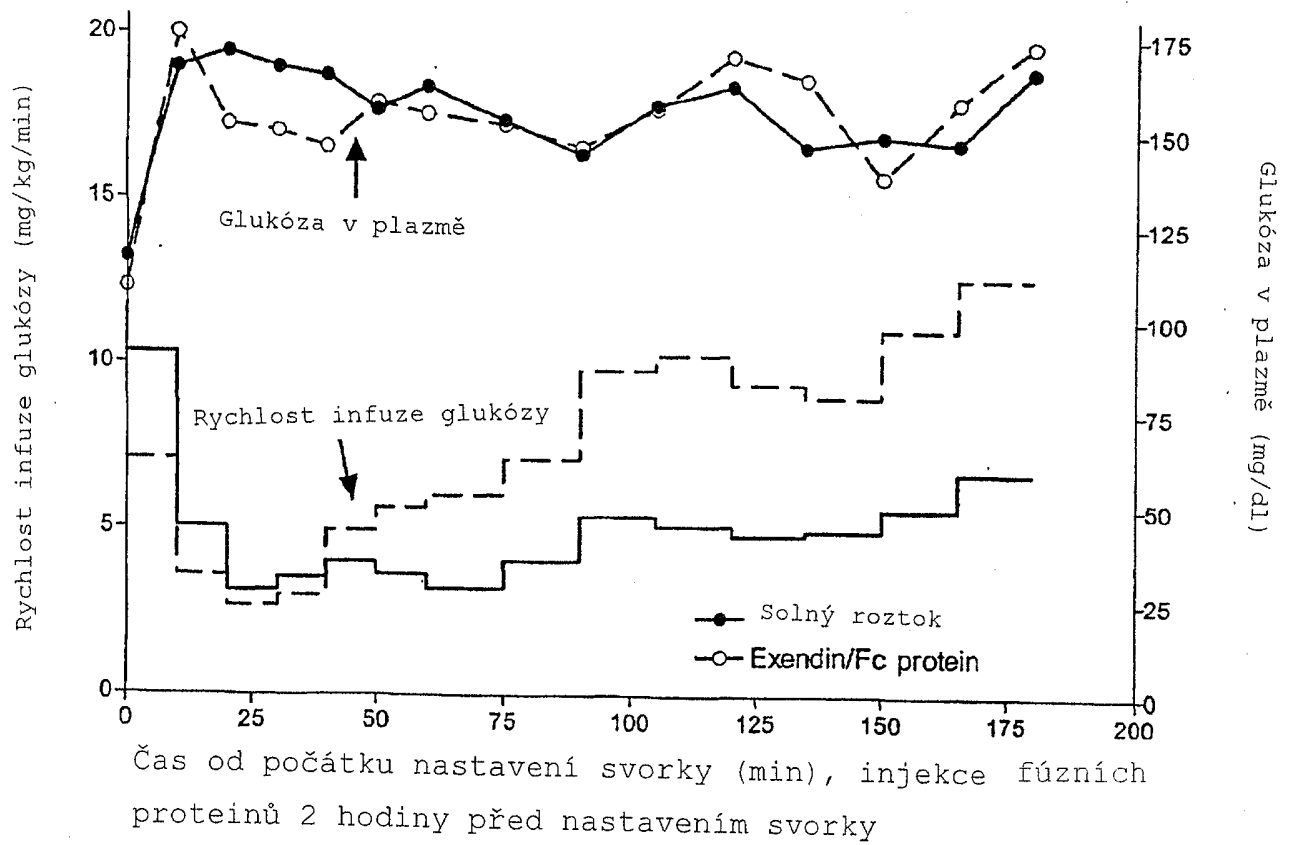
Obr. 9



11/17

Obr. 10

A.

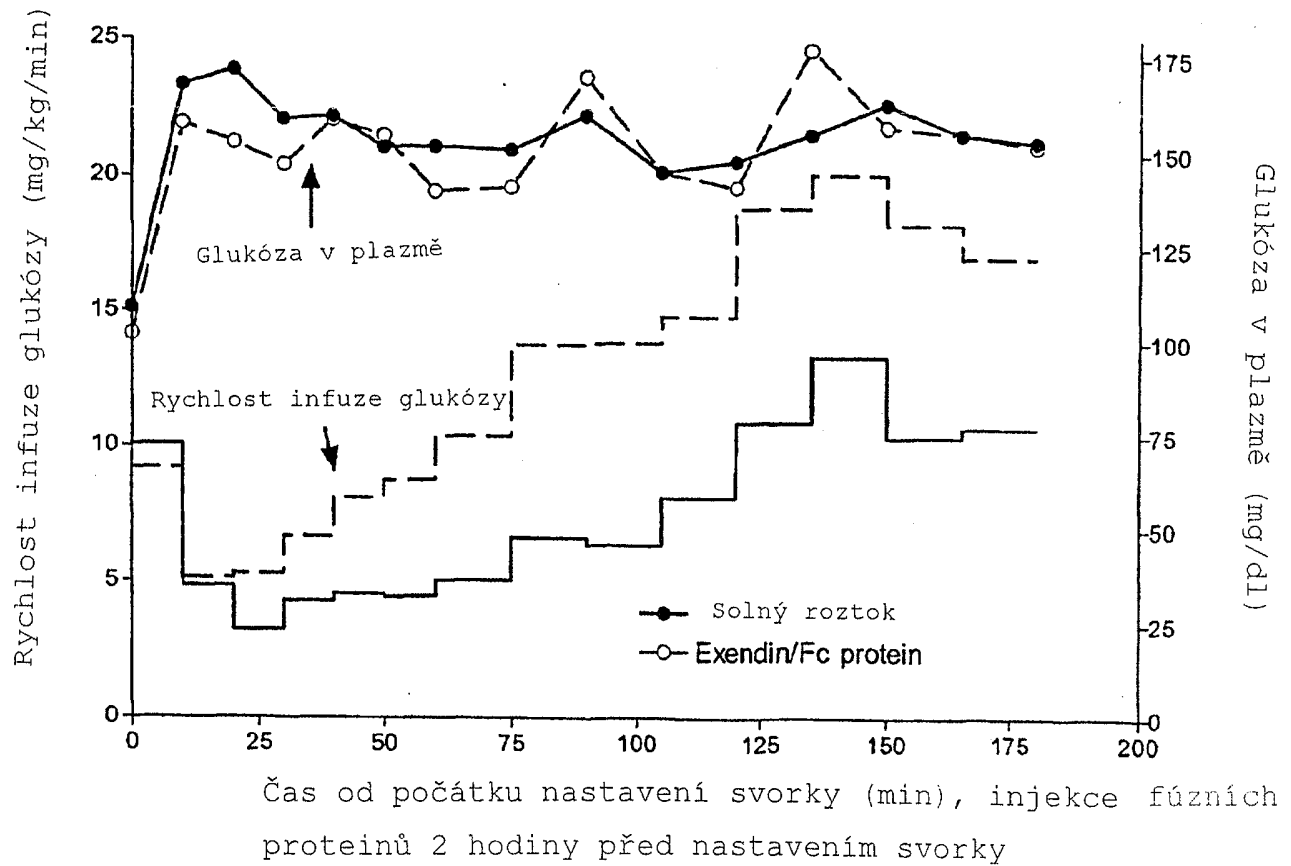


PO 2003 - 1602
18.02.04

12/17

Obr. 10

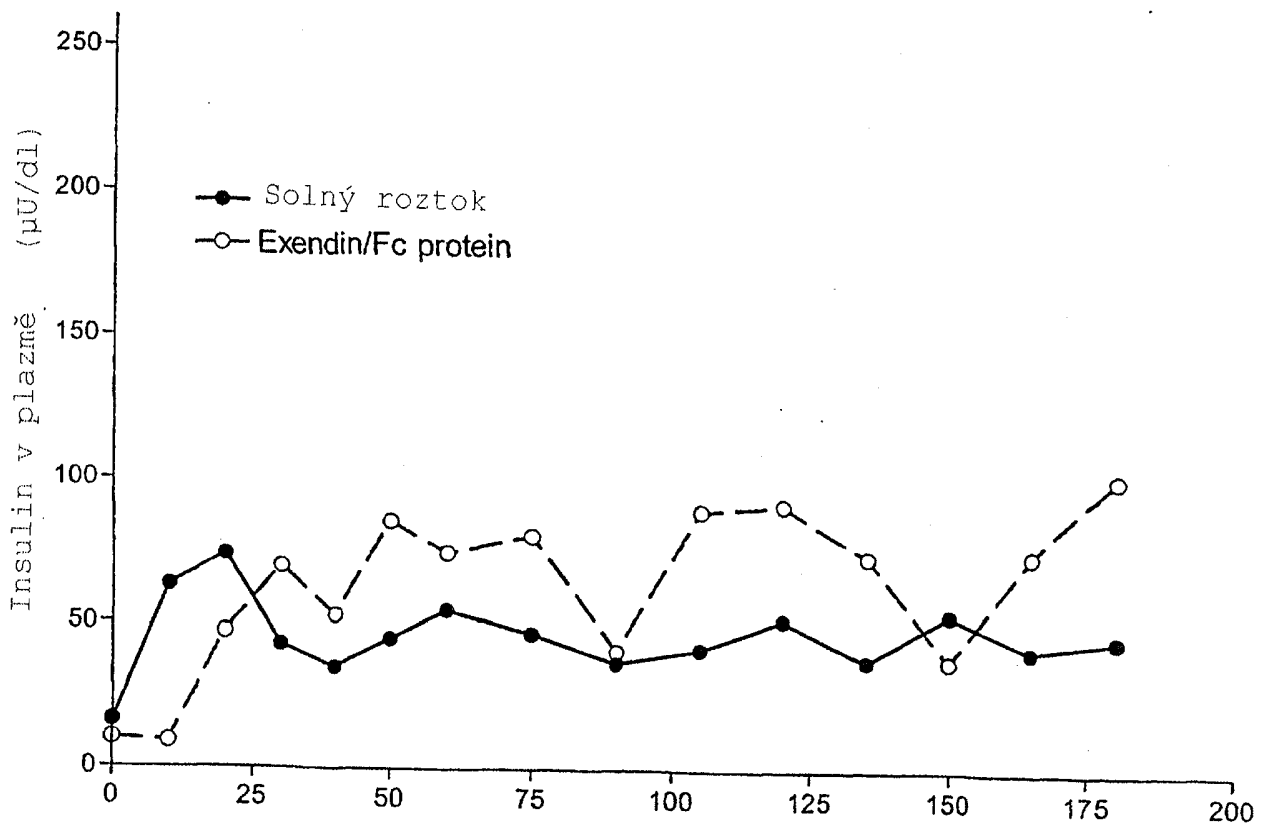
B.



13/17

Obr. 11

A.

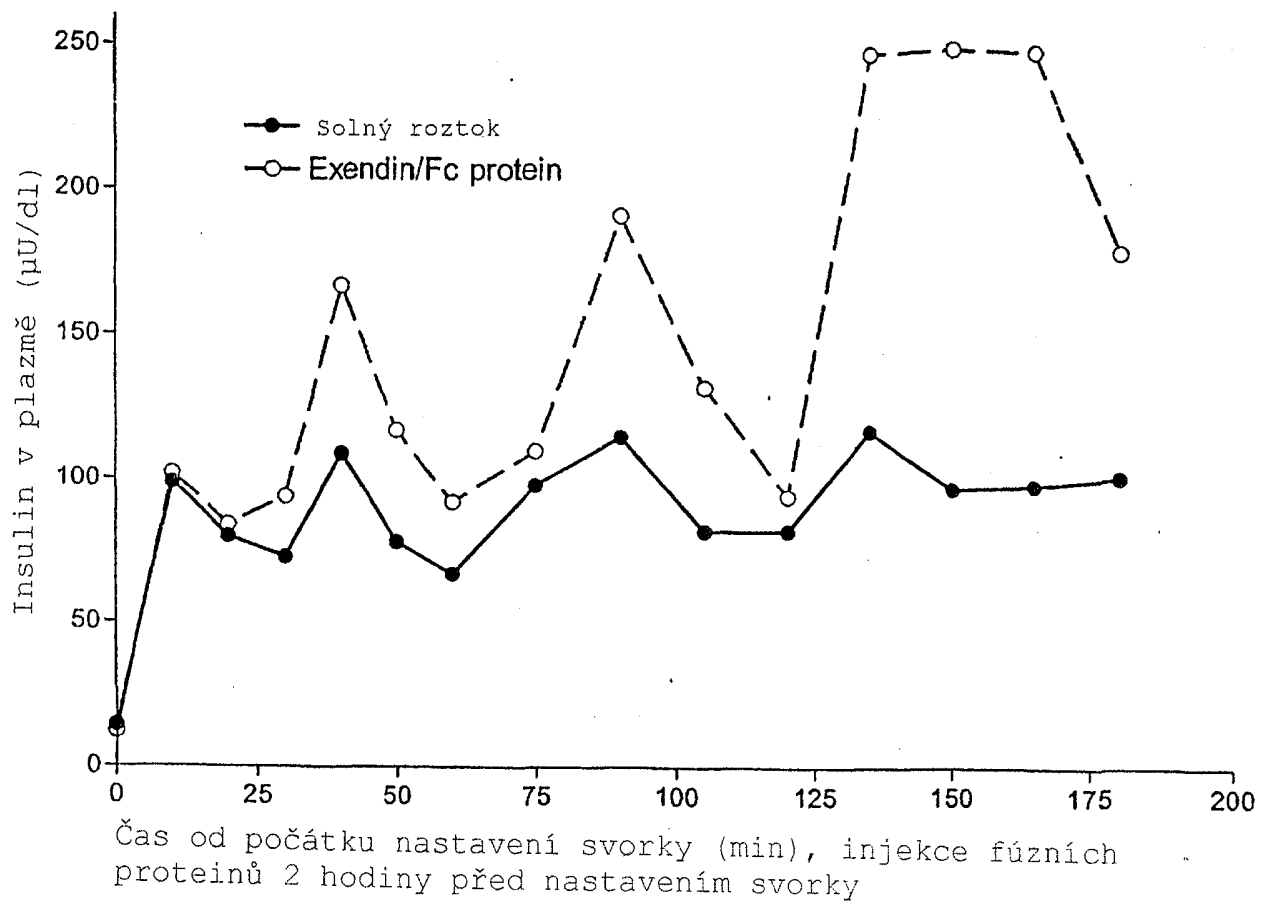


Čas od počátku nastavení svorky (min), injekce fúzních proteinů 2 hodiny před nastavením svorky

14/17

Obr. 11

B.



18.02.04
70205-1602

15/17

Obr. 12

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

18.02.04
R 205-162

16/17

Obr. 13

1
GATGCGCACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTGTTGGGAGAAGA
50
AAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGT
100
GTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCA
150
AAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCA
200
TACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCT
250
ATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAA
300
TGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCCGATTGGTGAG
350
ACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACAT
400
TTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTAT
450
GCCCCGGAACCTCCTTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGA
500
ATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATG
550
AACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGT
600
GCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGC
650
TCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGT
700
TAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTG
750
CTTGAAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAA
800
TCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGT
850
TGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAATAATGATGAGATGCCTGCT
900
GACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAA
950
AAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAAT
1000
ATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGAGACTTGCC

17/17

Obr. 13 pokračování

1050
AAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCA
1100
TGAATGCTATGCCAAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGC
1150
CTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAG
1200
TACAAATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCA
1250
AGTGTCAACTCCAACCTCTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGG
1300
GCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAA
1350
GACTATCTATCCGTGGTCCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAAC
1400
GCCAGTAAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACA
1450
GGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAA
1500
GAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTTC
1550
TGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACTGCACTTGTTGAGCTCGTGA
1600
AACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGAT
1650
TTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTG
1700
CTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAAGTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAG
1750
GCTTATAATGAC [SEQ ID NO: 35]

Přehled sekvencí

<110> Eli Lilly and Company

<120> GLP-1 FÚZNÍ PROTEINY

<130> X-13991

<150> US 60/251,954

<151> 2000-06-12

<160> 35

<170> Verze patentu 3.1

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> syntetický konstrukt

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (2) . . (2)

<223> Xaa na pozici 2 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, val,

Glu, Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (3) . . (3)

<223> Xaa na pozici 3 je Glu, Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (5) . . (5)

<223> Xaa na pozici 5 je Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, val, Glu,
Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa na pozici 8 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, val, Glu,
Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa na pozici 10 je val, Ala, Gly, ser, Thr, Leu, Ile, Tyr,
Glu, Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (11) .. (11)

<223> Xaa na pozici 11 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, val, Glu,
Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

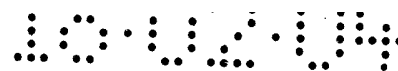
<222> (12) .. (12)

<223> Xaa na pozici 12 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, val, Glu,
Asp, Lys, Trp nebo Tyr;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (13) .. (13)



<223> Xaa na pozici 13 je Tyr, Phe, Trp, G7u, Asp, Gln nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (14)..(14)

<223> Xaa na pozici 14 je Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, val, Glu, Asp, Met, Lys, Trp nebo Tyr;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (15)..(15)

<223> Xaa na pozici 15 je Glu, Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na pozici 16 je Gly, Ala, ser, Thr, Leu, Ile, val, Glu, Asp, Trp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (17)..(17)

<223> Xaa na pozici 17 je Gln, Asn, Arg, Glu, Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (18)..(18)

<223> Xaa na pozici 18 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, val, Arg, Glu, Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (19)..(19)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (20)..(20)



<223> Xaa na pozici 20 je Lys, Arg, Gln, Glu, Asp nebo His;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (21) . . (21)

<223> Xaa na pozici 21 je Leu, Glu, Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (24) . . (24)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (25) .. (25)

<223> Xaa na pozici 25 je Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (26) . . (26)

<223> Xaa na pozici 26 je Leu, Gly, Ala, ser, Thr, Ile, val, Glu,
Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (27) .. (27)

<223> Xaa na pozici 27 je Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu,
Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (28) .. (28)

<223> Xaa na pozici 28 je Asn, Lys, Arg, Glu, Asp nebo His;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (29) .. (29)

<223> Xaa na pozici 29 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (30)..(30)

<223> Xaa na pozici 30 je Gly, Arg, Lys, Glu, Asp nebo His;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na pozici 31 je Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val,
Glu,

Asp nebo Lys nebo chybí;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222>

<223> Xaa na pozici 32 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp nebo His nebo
chybí;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (33)..(33)

<223> Xaa na pozici 33 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp nebo His nebo
chybí;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (34)..(34)

<223> Xaa na pozici 34 je Gly, Asp, Glu nebo Lys nebo chybí;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (35)..(35)

<223> Xaa na pozici 35 je Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp nebo Lys
nebo chybí;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (36)..(36)

<223> Xaa na pozici 36 je Ser, Pro, Lys, Glu nebo Asp nebo
chybí;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (37)..(37)

<223> Xaa na pozici 37 je Ser, Pro, Glu, Asp nebo Lys nebo
chybí;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (38)..(38)

<223> Xaa na pozici 38 je Gly, Pro, Glu, Asp nebo Lys nebo
chybí;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (39)..(39)

<223> Xaa na pozici 39 je Ala, Ser, val, Glu, Asp nebo Lys nebo
chybí ;

<400> 2

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

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

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
						35

<210> 3

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> syntetický konstrukt

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na pozici 1 je L-histidin, D-histidin nebo chybí.



<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (2)..(2)

<223> Xaa na pozici 2 je Gly, Ala, val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (3)..(3)

<223> Xaa na pozici 3 je Thr, Ser, Arg, Lys, Trp, Phe, Tyr, Glu
nebo His;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (5)..(5)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (6)..(6)

<223> Xaa na pozici 6 je His, Trp, Phe nebo Tyr;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (10)..(10)

<223> Xaa na pozici 10 je Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val,
Tyr, Glu nebo Ala;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (12)..(12)

<223> Xaa na pozici 12 je His, Pro, Asp, Glu, Arg, Ser, Ala nebo
Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (13)..(13)

<223> Xaa na pozici 13 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys,
Arg nebo Cys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (17)..(17)

<223> Xaa na pozici 17 je His, Asp, Lys, Glu, Gln nebo Arg;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (18)..(18)

<223> Xaa na pozici 18 je Glu, Arg, Ala nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (20)..(20)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (21)..(21)

<223> Xaa na pozici 21 je Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg nebo
Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (24)..(24)

<223> Xaa na pozici 24 je Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (25)..(25)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (27)..(27)

<223> Xaa na pozici 27 je Asp, Arg, val, Lys, Ala, Gly nebo Glu;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (28)..(28)

<223> Xaa na pozici 28 je Glu, Lys nebo Asp;

<220>



<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (29)..(29)

<223> Xaa na pozici 29 je Thr, ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His nebo Glu;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (30)..(30)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na pozici 31 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (32)..(32)

<223> Xaa na pozici 31 je Pro nebo chybí.

<400> 3

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

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

<210> 4

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> syntetický konstrukt

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na pozici 1 je L-histidin, D-histidin nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (2) . . (2)

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

<220>

<222> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (5) . . . (5)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (6) . . (6)

<223> Xaa na pozici 6 je His, Trp, Phe nebo Tyr;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (10) . . (10)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (16) . . (16)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (17) . . (17)

<223> Xaa na pozici 17 je His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (18) . . (18)

<223> Xaa na pozici 18 je Glu, His, Ala nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (19) . . (19)

<223> Xaa na pozici 19 je Asp, Lys, Glu nebo His;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (21)..(21)

<223> Xaa na pozici 21 je Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg nebo
Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (24)..(24)

<223> Xaa na pozici 24 je Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (27)..(27)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (28)..(28)

<223> Xaa na pozici 28 je Glu, Lys nebo Asp;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (29)..(29)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (30)..(30)

<223> Xaa na pozici 30 je Arg, Glu nebo His;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na pozici 31 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,
Phe, His, Gly nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY



<222> (32)..(32)

<223> Xaa na pozici 32 je Pro nebo chybí.

<400> 4

Xaa Xaa Glu Gly Xaa Xaa Thr Ser Asp Xaa Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1

5

10

15

Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20

25

30

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> syntetický konstrukt

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na pozici 1 je L-histidin, D-histidin nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (2)..(2)

<223> Xaa na pozici 2 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Met nebo Thr;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (6)..(6)

<223> Xaa na pozici 6 je His, Trp, Phe nebo Tyr;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (10)..(10)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY



<222> (16)..(16)

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

<220>

<221> RÚZNÉ ZNAKY

<222> (17)..(17)

<223> Xaa na pozici 17 je His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

<220>

<221> RÚZNÉ ZNAKY

<222> (20)..(20)

<223> Xaa na pozici 20 je Asp, Lys, Glu nebo His;

<220>

<221> RÚZNÉ ZNAKY

<222> (24)..(24)

<223> Xaa na pozici 24 je Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

<220>

<221> RÚZNÉ ZNAKY

<222> (29)..(29)

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

<220>

<221> RÚZNÉ ZNAKY

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na pozici 31 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,
Phe, His, Gly nebo chybí.

<220>

<221> RÚZNÉ ZNAKY

<222> (32)..(32)

<223> Xaa na pozici 32 je Pro nebo chybí.

<400> 5

Xaa Xaa Glu Gly Thr Xaa Thr Ser Asp Xaa Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1

5

10

15



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

<210> 6
<211> 32
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> syntetický konstrukt
<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (1)..(1)
<223> Xaa na pozici 1 je L-histidin, D-histidin nebo chybí.

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (2)..(2)
<223> Xaa na pozici 2 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (16)..(16)
<223> Xaa na pozici 16 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg nebo Cys;

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (17)..(17)
<223> Xaa na pozici 17 je His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (18)..(18)
<223> Xaa na pozici 18 je Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg nebo Lys;

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (24)..(24)
<223> Xaa na pozici 24 je Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na pozici 31 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp,
Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (32)..(32)

<223> Xaa na pozici 32 je Pro nebo chybí.

<400> 6

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

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

<210> 7

<211> 31

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> syntetický konstrukt

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na pozici 1 je L-histidin, D-histidin nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (2)..(2)

<223> Xaa na pozici 2 je Ala, Gly, Val, Thr, Ile,
a alfa-methyl-Ala;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (15)..(15)

<223> Xaa na pozici 15 je Glu, Gln, Ala, Thr, Ser a Gly;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (21)..(21)

<223> Xaa na pozici 21 je Glu, Gln, Ala, Thr, Ser a Gly;

<400> 7

Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Xaa Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Xaa Phe Ile Ala Trp Leu val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> syntetický konstrukt

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (19)..(19)

<223> Xaa na pozici 19 je Lys nebo Arg;

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> ACETYLACE

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (30) . . (30)

<223> Xaa na pozici 30 je Gly;

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> AMIDACE

<400> 8

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

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

<210> 9

<211> 39

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> syntetický konstrukt

<400> 9

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> syntetický konstrukt

<400> 10

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 11

<211> 39

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> syntetický konstrukt

<224>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (1) . . (1)

<223> Xaa na pozici 1 je L-histidin, D-histidin nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa na pozici 2 je Gly, Ala nebo Val;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa na pozici 10 je Leu nebo Val;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (12) . . (12)

<223> Xaa na pozici 12 je Lys nebo Ser;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (13) .. (13)

<223> Xaa na pozici 13 je Gln nebo Tyr;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (14) .. (14)

<223> Xaa na pozici 14 je Met nebo Leu;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (16)..(16)
<223> Xaa na pozici 16 je Glu nebo Gln;

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (17)..(17)
<223> Xaa na pozici 17 je Glu nebo Gln;

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (19)..(19)
<223> Xaa na pozici 19 je Val nebo Ala;

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (20)..(20)
<223> Xaa na pozici 20 je Arg nebo Lys;

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (21)..(21)
<223> Xaa na pozici 21 je Leu nebo Glu;

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (24)..(24)
<223> Xaa na pozici 24 je Glu nebo Ala;

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (27) . . (27)
<223> Xaa na pozici 27 je Val nebo Lys;

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (28)..(28)
<223> Xaa na pozici 28 je Asn nebo Lys;

<220>
<221> RŮZNÉ ZNAKY
<222> (30)..(30)

<223> Xaa na pozici 30 je Gly nebo Arg; a

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na pozici 31 je Gly nebo Pro;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (32)..(32)

<223> Xaa na pozici 32 je Ser nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (33)..(33)

<223> Xaa na pozici 33 je Ser nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (34)..(34)

<223> Xaa na pozici 34 je Gly nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (35)..(35)

<223> Xaa na pozici 35 je Ala nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (36)..(36)

<223> Xaa na pozici 36 je Pro nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (37)..(37)

<223> Xaa na pozici 37 je Pro nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (38)..(38)

<223> Xaa na pozici 38 je Pro nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (39)..(39)

<223> Xaa na pozici 39 je Pro nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (39)..(39)

<223> Xaa na pozici 39 je Ser nebo chybí.

<400> 11

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

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

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
						35

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> syntetický konstrukt

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na pozici 1 je L-histidin, D-histidin nebo chybí.

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (2)..(2)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (6)..(6)

<223> Xaa na pozici 6 je Phe, Trp nebo Tyr;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (10)..(10)

<223> Xaa na pozici 10 je Val, Trp, Ile, Leu, Phe nebo Tyr;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (12)..(12)

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

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (13)..(13)

<223> Xaa na pozici 13 je Tyr, Trp nebo Phe;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (14)..(14)

<223> Xaa na pozici 14 je Leu, Phe, Tyr nebo Trp;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na pozici 16 je Gly, Glu, Asp nebo Lys;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (19)..(19)

<223> Xaa na pozici 19 je Ala, Val, Ile nebo Leu;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (21)..(21)

<223> Xaa na pozici 21 je Glu, Ile nebo Ala;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (24)..(24)

<223> Xaa na pozici 24 je Ala nebo Glu;

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (27)..(27)

<223> Xaa na pozici 27 je Val nebo Ile; a

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> AMIDACE

<220>

<221> RŮZNÉ ZNAKY

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na pozici 31 je Gly, His nebo chybí.

<400> 12

Xaa Xaa Glu Gly Thr Xaa Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa

1 5 10 15

Gln Ala Xaa Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Lys Gly Arg Xaa

20 25 30

<210> 13

<211> 616

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
610 615

<210> 14

<211> 631

<212> PRT

<213> Umělá sekvence,

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 14

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

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

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

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

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

11

Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala
 355 360 365

Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His
 370 375 380

Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu
 385 390 395 400

Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr
 405 410 415

Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn
 420 425 430

Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys
 435 440 445

Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val
 450 455 460

Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly
 465 470 475 480

Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu
 485 490 495

Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys
 500 505 510

Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val
 515 520 525

Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val
 530 535 540

Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys
 545 550 555 560

Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val
 565 570 575

Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala
 580 585 590

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

Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala
 610 615 620

Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
625 630

<210> 15

<211> 640

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 624

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 16

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

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

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

Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys
305 310 315 320

Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu
325 330 335

Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys
340 345 350

Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met
355 360 365

Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu
370 375 380

Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys
385 390 395 400

Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe
405 410 415

Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu
420 425 430

Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val
435 440 445

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

Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro
465 470 475 480

Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu
485 490 495

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

Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
515 520 525

Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu
530 535 540

Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
545 550 555 560

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

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

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

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

<210> 17

<211> 640

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu
 195 200 205

Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys
 210 215 220

Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu
 225 230 235 240

Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala
 245 250 255

Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala
 260 265 270

Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys
 275 280 285

Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp
 290 295 300

Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys
 305 310 315 320

Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys
 325 330 335

Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu
 340 345 350

Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys
 355 360 365

Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met
 370 375 380

Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu
 385 390 395 400

Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys
 405 410 415

Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe
 420 425 430

Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu
435 440 445

Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val
450 455 460

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

Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro
485 490 495

Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu
500 505 510

Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val
515 520 525

Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
530 535 540

Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu
545 550 555 560

Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
565 570 575

Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro
580 585 590

Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
595 600 605

Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala
610 615 620

Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
625 630 635 640

<210> 18

<211> 264

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 18

37

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

<210> 19

<211> 272

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20

<211> 264

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
145 150 155 160

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
165 170 175

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
180 185 190

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
195 200 205

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
225 230 235 240

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
245 250 255

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260

<210> 21

<211> 272

<212> PRT

<213> Umělá sekvence :

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 21

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

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

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

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

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 85 90 95
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 100 105 110
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 115 120 125
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 130 135 140
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 145 150 155 160
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 165 170 175
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 180 185 190
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 195 200 205
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 210 215 220
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 225 230 235 240
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 245 250 255
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 260 265 270

<210> 22

<211> 272

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 22

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

18.02.04

42

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 287

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 225 230 235 240

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 260 265 270

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 275 280 285

<210> 24

<211> 284

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 24

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

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 50 55 60

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 100 105 110

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

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 130 135 140

Val₁₄₅ Leu His Gln Asp Trp₁₅₀ Leu Asn Gly Lys Glu₁₅₅ Tyr Lys Cys Lys Val₁₆₀

Ser Asn Lys Gly Leu₁₆₅ Pro Ser Ser Ile Glu₁₇₀ Lys Thr Ile Ser Lys Ala₁₇₅

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val₁₈₅ Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln₁₉₀

Glu Glu Met₁₉₅ Thr Lys Asn Gln Val₂₀₀ Ser Leu Thr Cys Leu Val₂₀₅ Lys Gly

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala₂₁₅ Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro₂₂₀

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu₂₃₅ Asp Ser Asp Gly Ser₂₄₀

Phe Phe Leu Tyr Ser₂₄₅ Arg Leu Thr Val Asp₂₅₀ Lys Ser Arg Trp Gln Glu₂₅₅

Gly Asn Val Phe₂₆₀ Ser Cys Ser Val Met₂₆₅ His Glu Ala Leu His₂₇₀ Asn His

Tyr Thr Gln₂₇₅ Lys Ser Leu Ser Leu₂₈₀ Ser Leu Gly Lys

<210> 25

<211> 302

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 25

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val₁₀ Ser Ser Tyr Leu Glu Glu₁₅

Gln Ala Ala Lys₂₀ Glu Phe Ile Ala Trp₂₅ Leu Val Lys Gly Arg Gly Ser₃₀

Ser Gly Ala₃₅ Pro Pro Pro Ser Gly₄₀ Gly Gly Gly Ser Gly₄₅ Gly Gly Gly

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly₅₅ Gly Gly Gly Ser Gly₆₀ Gly Gly Gly Ser

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

<210> 26

<211> 294

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290

<210> 27

<211> 280

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
145 150 155 160

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
180 185 190

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
195 200 205

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

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
245 250 255

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
260 265 270

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280

<210> 28

<211> 287

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
225 230 235 240

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
260 265 270

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280 285

<210> 29

<211> 272

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 30

<211> 272

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31

<211> 287

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Syntetický konstrukt

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
225 230 235 240

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
260 265 270

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280 285

<210> 32

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

Ala Pro Glu Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Lys Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

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

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

<210> 33

<211> 703

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

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

<210> 34

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Asn Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 35

<211> 1762

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

gatgcgacaca agagtgaggt tgctcatcgg tttaaagatt tgggagaaga aaatttcaaa	60
gccttggtgt tgattgcctt tgctcagtat cttcagcagt gtccatttga agatcatgta	120
aaattagtga atgaagtaac tgaatttgca aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa	180
aattgtgaca aatcacttca tacccttttt ggagacaaat tatgcacagt tgcaactctt	240
cgtgaaacct atggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaaac aagaacctga gagaaatgaa	300
tgcttcttgc aacacaaaga tgacaaccca aacctcccc gattggtgag accagaggtt	360
gatgtgatgt gactgcttt tcatgacaat gaagagacat ttttgaaaa atacttatat	420
gaaattgccga gaagacatcc ttacttttat gccccggaac tccttttctt tgctaaaagg	480
tataaagctg cttttacaga atgttgccaa gctgctgata aagctgcctg cctgttgcca	540
aagctcgatg aacttcggga tgaaggggaag gcttcgtctg ccaaacagag actcaagtgt	600

gccagtctcc aaaaatttgg agaaagagct ttcaaagcat gggcagtagc tcgcctgagc	660
cagagatttc ccaaagctga gtttgcagaa gtttccaagt tagtgacaga tcttaccaaa	720
gtccacacgg aatgctgcc tggagatctg cttgaatgtg ctgatgacag ggcggacctt	780
gccaagtata tctgtgaaaa tcaagattcg atctccagta aactgaagga atgctgtgaa	840
aaacctctgt tggaaaaatc ccactgcatt gccgaagtgg aaaatgatga gatgcctgct	900
gacttgccctt cattagctgc tgattttgtt gaaagtaagg atgtttgcaa aaactatgct	960
gaggcaaagg atgtcttcct gggcatgttt ttgtatgaat atgcaagaag gcctcctgat	1020
tactctgtcg tgctgctgct gagacttgcc aagacatatg aaaccactct agagaagtgc	1080
tggtgccgctg cagatcctca tgaatgctat gccaaagtgt tcgatgaatt taaacctctt	1140
gtggaagagc ctcaagaattt aatcaaaca aattgtgagc tttttgagca gcttgagag	1200
tacaaattcc agaatgcgct attagtctgt tacaccaaga aagtacccca agtgtcaact	1260
ccaactcttg tagaggtctc aagaaaccta ggaaaagtgg gcagcaaattg ttgtaaacat	1320
cctgaagcaa aaagaatgcc ctgtgcagaa gactatctat ccgtgggtcct gaaccagtta	1380
tggtgtttgc atgagaaaac gccagtaagt gacagagtca ccaaattgctg cacagaatcc	1440
ttggtgaaca ggcgaccatg cttttcagct ctggaagtgc atgaaacata cgttcccaaa	1500
gagtttaatg ctgaaacatt caccttccat gcagatatat gcacactttc tgagaaggag	1560
agacaaatca agaaacaaac tgcacttggt gagctcgtga aacacaagcc caaggcaaca	1620
aaagagcaac tgaaagctgt tatggatgat ttcgcagctt ttgtagagaa gtgctgcaag	1680
gctgacgata aggagacctg ctttgccgag gagggtaaaa aacttgttgc tgcaagtcaa	1740
gctgccttag gcttataatg ac	1762