

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201792199** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2018.03.30**

(51) Int. Cl. **C07K 14/62** (2006.01)  
**A61K 38/28** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2016.04.28**

**(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ**

(31) **62/158,079**

(32) **2015.05.07**

(33) **US**

(86) **PCT/US2016/029807**

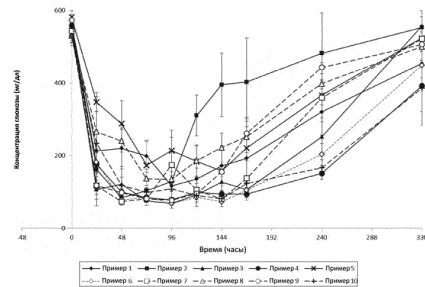
(87) **WO 2016/178905 2016.11.10**

(71) Заявитель:  
**ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:  
**Болдуин Дэвид Брюс, Билз Джон Майкл, Дэй Джонатан Уэсли, Дикинсон Крейг Дуэйн, Коритко Эндрю Игорь, Лазар Григори Алан (US)**

(74) Представитель:  
**Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Христофоров А.А., Строкова О.В., Карпенко О.Ю., Гизатуллина Е.М. (RU)**

(57) Данное изобретение относится к слитым белкам, содержащим агонист рецептора инсулина, слитый с Fc-участком IgG человека посредством применения пептидного линкера, и применению таких белков при лечении диабета. Слитый белок согласно данному изобретению имеет расширенный временный профиль действия и полезен для обеспечения регуляции базального уровня глюкозы в течение длительного периода времени.



**201792199**  
**A1**

**201792199**  
**A1**

## СЛИТЫЕ БЕЛКИ

Данное изобретение относится к слитым белкам для применения при лечении диабета. Более конкретно, данное изобретение относится к слитым белкам, содержащим агонист рецептора инсулина, слитый с Fc-участком IgG человека с пептидным линкером, и применению таких белков при лечении диабета. Слитые белки согласно данному изобретению имеют расширенный временный профиль действия и полезны для обеспечения длительной регуляции базального уровня глюкозы и подавления выброса глюкозы из печени.

Сахарный диабет является хроническим заболеванием, характеризующимся гипергликемией, вызванной дефектами секреции инсулина, действия инсулина или и тем, и другим. Пациенты с сахарным диабетом 1 типа характеризуются незначительной или отсутствующей способностью секретировать инсулин, и пациенты с сахарным диабетом 1 типа нуждаются в инсулине для выживания. Сахарный диабет 2 типа характеризуется повышенными уровнями глюкозы в крови, вызванными нарушением секреции инсулина, инсулинорезистентностью, избыточным выходом глюкозы из печени и/или вкладом от всего вышеперечисленного. У по меньшей мере одной трети пациентов с сахарным диабетом 2 типа болезнь прогрессирует до абсолютной необходимости в терапии инсулином.

Чтобы достичь нормальной гликемии, необходима инсулинозаместительная терапия, как можно более близкая, к схеме эндогенной секреции инсулина у обычных людей. Ежедневная физиологическая потребность в инсулине колеблется и может быть разделена на две фазы: (а) фаза приема пищи, требующая выброса (болюса) инсулина для утилизации скачков уровня глюкозы в крови, и (б) фаза между приемами пищи, требующая поддерживающего (базального) количества инсулина для регуляции выхода глюкозы из печени для поддержания оптимального уровня глюкозы в крови натощак.

Поскольку пациенты с диабетом типа 1 продуцируют мало или вообще не продуцируют инсулин, эффективная терапия инсулином для диабетиков типа 1 обычно включает использование двух типов экзогенно вводимого инсулина: быстродействующий инсулин для приема пищи, полученный путем болюсных инъекций, и базальный инсулин длительного действия, вводится один или два раза в сутки для контроля уровня глюкозы в крови между приемами пищи. Лечение пациентов с диабетом типа 2 обычно начинается с предписанной потери веса, физических упражнений и диабетической диеты, но когда эти

меры не устраняют повышенный уровень сахара в крови, тогда могут понадобиться пероральные препараты и терапия на основе инкретина, такая как введение агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1), и/или ингибиторов дипептидилпептидазы 4 (DPP-4), которые позволяют увеличить уровни инкретинов. Когда эти препараты все еще недостаточны, рассматривается лечение инсулином. Пациенты с диабетом типа 2, чье заболевание прогрессировало до такой степени, что требуется инсулиновая терапия, обычно начинают с однократной ежедневной инъекции базального инсулина длительного действия, хотя при необходимости инъекции инсулинов быстрого действия могут быть включены, по мере необходимости, в некоторых случаях.

В данное время доступно несколько типов базальных инсулинов. Инсулин гларгин, продаваемый под торговой маркой LANTUS®, содержит модифицированную структуру инсулина, в которой аспарагин в положении 21 в А-цепи инсулина заменен на глицин, и к С-концу В-цепи добавлены два аргинина. Инсулин детемир, продаваемый под торговой маркой LEVEMIR®, содержит модифицированную структуру инсулина, в которой треонин в положении 30 В-цепи был удален, а лизин в положении 29 В-цепи был дериватизирован через ковалентную связь 14-углерода, миристоил-жирная кислота в  $\epsilon$ -аминовую группу лизина при В29. Инсулин деглюдек, доступный в Европе и Японии под торговой маркой TRESIBA®, содержит модифицированную структуру инсулина, в которой треонин в положении 30 В-цепи был удален, а  $\epsilon$ -аминогруппа лизина в положении 29 из В-цепи ковалентно дериватизирована гексадекандиовой кислотой через линкера  $\gamma$ -L-глутаминовой кислоты. Все эти инсулины указаны для однократного суточного приема.

Лекарственные схемы, включающие ежедневные инъекции существующих инсулиновых терапий, могут быть сложными и болезненными для введения и могут приводить к нежелательным побочным эффектам, таким как гипогликемия и увеличение веса. Таким образом, многие пациенты с диабетом не желают или не могут выполнить или неспособны соблюдать терапию инсулином, необходимую для поддержания строгого контроля уровня глюкозы в крови. Плохой гликемический контроль повышает риск развития серьезных осложнений, связанных с диабетом, включая сердечные заболевания, инсульт, повреждение нервов, ампутацию нижних конечностей, потерю зрения и заболевание почек. Ведутся исследования по выявлению продуктов инсулина с более длительной продолжительностью действия; таким образом, требующим меньше

инъекций, чем имеющиеся в данное время продукты инсулина, чтобы улучшить прием и соблюдение режима.

В CN103509118 описывают белки с В-цепью человеческого инсулина и А-цепь человеческого инсулина, соединенными последовательностью присоединения С-пептида от 4 до 50 аминокислот, и с А-цепью инсулина, непосредственно присоединенной без дополнительного линкера к Fc-участку иммуноглобулина, и в нем заявлено, что тестирование на мышах показывает, что такие белки имеют период полужизни *in vivo* около 3 дней. В KR101324828 описаны аналоги проинсулина, связанные с Fc-участками иммуноглобулина, с использованием непептидных линкеров и указано, что такие белки обеспечивают увеличенный период полувыведения из сыворотки по сравнению с существующими терапиями. В публикации заявлено, что непептидные линкеры представляют собой улучшение по сравнению с пептидными линкерами, утверждая, что слитые белки с использованием пептидных линкеров не могут увеличить период полувыведения активного лекарственного средства в крови, потому что пептидные линкеры легко разрушаются ферментами в организме.

Несмотря на описанные выше раскрытия и/или в любых других публикациях, авторы данного изобретения преодолели множество препятствий для обнаружения слитых белков, включая агонисты рецептора инсулина, пептидные линкеры и Fc-участка IgG человека, которые отвечают текущей потребности в продукте снижения глюкозы с увеличенной продолжительностью действия, достаточные для менее частых дозировок, чем доступные в данное время продукты для инсулина, включая нечастое дозирование такое, как раз в неделю. Например, для достижения требуемого продолжительного временного профиля действия необходимо было разработать гибридные белки с ослабленной эффективностью, чтобы избежать быстрого опосредованного рецептором клиренса, основного пути клиренса инсулина, но который все еще обладает достаточной энергией для обеспечения достаточного снижения уровня глюкозы. Кроме того, для того, чтобы свести к минимуму почечный клиренс, другой важный путь клиренса инсулина и регулировать периферический выход с помощью гидродинамической размер-ограниченной парацеллюлярной диффузии, необходимо было сконструировать слитые белки, которые были достаточно большими и у которых не было бы агониста рецептора инсулина протеолитически отщепляемого от Fc-участка IgG человека после введения, так как такое отщепление приведет к более быстрому, чем желаемый почечный клиренс агониста рецептора инсулина, даже если бы Fc-участок IgG человека оставался в

кровоотоке. Кроме того, Fc-домены IgG эволюционировали для самоассоциации с образованием стабильных димеров, и когда такой димер образуется из двух слитых белков, каждый из которых содержит инсулиновую часть, слитую с Fc-участком IgG, две части инсулина приводятся в непосредственной близости друг к другу, позволяя самоассоциацию или димеризацию фрагментов инсулина, опосредованных через области самоассоциации В-цепи инсулина. Такие димеры инсулина неактивны, поэтому существует необходимость сконструировать слитые белки с уменьшенной самоассоциацией фрагментов агониста рецептора инсулина. Были решены многочисленные дополнительные проблемы для создания слитого белка, подходящего для коммерческого производства и составов в качестве терапевтического средства. Данное изобретение относится к слитым белкам, которые имеют увеличенную продолжительность действия по сравнению с существующими методами лечения инсулином, что позволяет использовать менее частые инъекции, чем существующие продукты инсулина, в том числе до одного раза в неделю, тем самым уменьшая сложность и боль, связанные с существующими схемами лечения, включающими более частые инъекции. Слитые белки согласно данному изобретению имеют плоский фармакокинетический профиль и ограниченное периферическое воздействие, что приводит к низкой ежедневной изменчивости и минимальной частоте гипогликемии, в том числе при их сочетании с дополнительным диабетическим препаратом, таким как терапия, основанная на инкретине. Слитые белки согласно данному изобретению также могут обеспечить длительную продолжительность действия без увеличения веса.

В данном изобретении предложен слитый белок, содержащий:

- a) агонист рецептора инсулина, имеющий общую формулу  $Z_1$ - $Z_2$ - $Z_3$ , где
  - i)  $Z_1$  представляет собой аналог В-цепи инсулина, содержащий аминокислотную последовательность:

$X_1X_2X_3QHLCGSHLVEALX_4LVCGERGFYX_5YX_6X_7X_8X_9$

где  $X_1$  представляет собой F, Q или A;  $X_2$  представляет собой V или G;  $X_3$  представляет собой N, K, D, G, Q, A или E;  $X_4$  представляет собой E, Y, Q, или H;  $X_5$  представляет собой H или F;  $X_6$  представляет собой G, T, S, H, V или отсутствует;  $X_7$  представляет собой G, E, P, K, D, S, H или отсутствует;  $X_8$  представляет собой G, E, K, P, Q, D, H или отсутствует;  $X_9$  представляет собой G, T, S, E, K, A или отсутствует, при условии, что аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из

аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub> (SEQ ID NO 1);

- ii) Z<sub>2</sub> представляет собой первый пептидный линкер, содержащий от 5 до 10 аминокислот, причем по меньшей мере 5 из указанных аминокислот представляют собой остатки G; и
- iii) Z<sub>3</sub> представляет собой аналог А-цепи инсулина, содержащий аминокислотную последовательность:

GIVEQCCTSX<sub>1</sub>CSLX<sub>2</sub>QLENYCX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>

X<sub>1</sub> представляет собой T или I; X<sub>2</sub> представляет собой D, Y, Q или E; X<sub>3</sub> представляет собой G, N, S или A; и X<sub>4</sub> представляет собой любую встречающуюся в природе аминокислоту или отсутствует, при условии, что если X<sub>3</sub> представляет собой N, когда X<sub>4</sub> должен представлять собой аминокислоту, отличную от G или N (SEQ ID NO 2);

- b) второй пептидный линкер; и
- c) Fc-участок IgG человека;

где С-концевой остаток агониста рецептора инсулина непосредственно слит с N-концевым остатком второго пептидного линкера, а С-концевой остаток второго пептидного линкера непосредственно слит с N-концевым остатком Fc-участка IgG.

В данном изобретении также предложен слитый белок, состоящий из:

- a) агонист рецептора инсулина, имеющий общую формулу Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub>-Z<sub>3</sub>, где
  - i) Z<sub>1</sub> представляет собой аналог В-цепи инсулина, имеющий аминокислотную последовательность:

X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>QHLCGSHLVEALX<sub>4</sub>LVCGERGFX<sub>5</sub>YX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>

где X<sub>1</sub> представляет собой F, Q или A; X<sub>2</sub> представляет собой V или G; X<sub>3</sub> представляет собой N, K, D, G, Q, A или E; X<sub>4</sub> представляет собой E, Y, Q, или H; X<sub>5</sub> представляет собой H или F; X<sub>6</sub> представляет собой G, T, S, H, V или отсутствует; X<sub>7</sub> представляет собой G, E, P, K, D, S, H или отсутствует; X<sub>8</sub> представляет собой G, E, K, P, Q, D, H или отсутствует; X<sub>9</sub> представляет собой G, T, S, E, K, A или отсутствует, при условии, что аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub> (SEQ ID NO 1);

- ii) Z<sub>2</sub> представляет собой первый пептидный линкер, содержащий от 5 до 10 аминокислот, причем по меньшей мере 5 из указанных аминокислот представляют собой остатки G; и

- iii)  $Z_3$  представляет собой аналог А-цепи инсулина, имеющий аминокислотную последовательность:

GIVEQCCTSX<sub>1</sub>CSLX<sub>2</sub>QLENYCX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>

X<sub>1</sub> представляет собой T или I; X<sub>2</sub> представляет собой D, Y, Q или E; X<sub>3</sub> представляет собой G, N, S или A; и X<sub>4</sub> предлагает собой любую встречающуюся в природе аминокислоту или отсутствует, при условии, что если X<sub>3</sub> представляет собой N, когда X<sub>4</sub> должен представлять собой аминокислоту, отличную от G или N (SEQ ID NO 2);

- b) второй пептидный линкер; и
- c) Fc-участок IgG человека;

где С-концевой остаток агониста рецептора инсулина непосредственно слит с N-концевым остатком второго пептидного линкера, а С-концевой остаток второго пептидного линкера непосредственно слит с N-концевым остатком Fc-участка IgG.

Данное изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей слитый белок согласно данному изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

Данное изобретение также относится к способу лечения пациента, больного сахарным диабетом, ожирением, дислипидемией или метаболическим синдромом, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества слитого белка согласно данному изобретению. Данное изобретение также относится к способу лечения или профилактики связанного с диабетом состояния, выбранного из группы, состоящей из болезни сердца, инсульта, нефропатии, ретинопатии и заболевания почек, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества слитого белка согласно данному изобретению.

В изобретении также предложен слитый белок согласно данному изобретению для применения в терапии.

В данном изобретении также предложено применение слитого белка согласно данному изобретению при изготовлении лекарственного средства.

В данном изобретении также предложены полинуклеотиды, кодирующие слитый белок согласно данному изобретению.

В данном изобретении также предложен способ получения слитого белка согласно данному изобретению, причем указанный способ включает стадии:

1. культивирования клетки-хозяина млекопитающего, содержащего полинуклеотид, кодирующий слитый белок согласно данному изобретению, в условиях, при которых указанный слитый белок экспрессируется; и
2. извлечения из указанной клетки-хозяина слитого белка.

В данном изобретении также предложен слитый белок, полученный способом, описанным выше.

**Фигура 1.** На Фиг. 1 представлены фармакодинамические данные для иллюстративных слитых белков согласно данному изобретению в крысиной модели с диабетом, леченным стрептозотоцином (STZ).

**Фигура 2.** На Фиг. 2 представлена схема конфигураций белков, описанных в данном документе. Следует отметить, что конкретные фигуры (например, овалы, полукруги и т.д.), используемые на диаграммах на Фиг. 2, не предназначены для описания или характеристики и не должны использоваться для толкования, значения или структуры отдельных компонентов слитых белков согласно данному изобретению.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>4</sub> или X<sub>5</sub> SEQ ID NO 1, и по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере две модификации из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> и X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO 1, где X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> каждый представляет собой G.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>4</sub> и X<sub>5</sub> SEQ ID NO 1.



В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина имеет последовательность SEQ ID NO 1, где: X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой V; X<sub>3</sub> представляет собой N или D; X<sub>4</sub> представляет собой E; X<sub>5</sub> представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в каждой из позиций X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> и X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит последовательность SEQ ID NO 1, где: X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой V; X<sub>3</sub> представляет собой N или D; X<sub>4</sub> представляет собой E; X<sub>5</sub> представляет собой H; и X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> каждый представляет собой G.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог А-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в X<sub>1</sub> или X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог А-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в обоих X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог А-цепи инсулина имеет последовательность SEQ ID NO 2, где: X<sub>1</sub> представляет собой I или T; X<sub>2</sub> представляет собой D; X<sub>3</sub> представляет собой G; и X<sub>4</sub> отсутствует.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог А-цепи инсулина имеет последовательность SEQ ID NO 2, где X<sub>3</sub> представляет собой N и где X<sub>4</sub> представляет собой аминокислоту, отличную от G, N, S, V L или P.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>4</sub> или X<sub>5</sub> SEQ ID NO 1, и по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в X<sub>1</sub> или X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере две модификации из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина

содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в X<sub>1</sub> или X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> и X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в X<sub>1</sub> или X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO 1, где X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> каждый представляет собой G; и аналог А-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в X<sub>1</sub> или X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>4</sub> и X<sub>5</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в X<sub>1</sub> или X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит последовательность SEQ ID NO 1, где: X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой V; X<sub>3</sub> представляет собой N или D; X<sub>4</sub> представляет собой E; X<sub>5</sub> представляет собой H; и аналог А-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в X<sub>1</sub> или X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в каждой из позиций X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> и X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в X<sub>1</sub> или X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина имеет последовательность SEQ ID NO 1, где: X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой V; X<sub>3</sub> представляет собой N или D; X<sub>4</sub> представляет собой E; X<sub>5</sub> представляет собой H; и X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> каждый представляет собой G; и аналог А-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в X<sub>1</sub> или X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>4</sub> или X<sub>5</sub> SEQ ID NO 1, и по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в обоих X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере две модификации из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в обоих X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> и X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в обоих X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO 1 где X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> каждый представляет собой G; и аналог А-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в обоих X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>4</sub> и X<sub>5</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в обоих X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит последовательность SEQ ID NO 1, где: X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой V; X<sub>3</sub> представляет собой N или D; X<sub>4</sub> представляет собой E; X<sub>5</sub> представляет собой H; и аналог А-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в обоих X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина

человека в каждой из позиций X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> и X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в обоих X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина имеет последовательность SEQ ID NO 1, где: X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой V; X<sub>3</sub> представляет собой N или D; X<sub>4</sub> представляет собой E; X<sub>5</sub> представляет собой H; и X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> каждый представляет собой G; и аналог А-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в обоих X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> SEQ ID NO 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>4</sub> или X<sub>5</sub> SEQ ID NO 1, и по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина имеет последовательность SEQ ID NO 2, где: X<sub>1</sub> представляет собой I или T; X<sub>2</sub> представляет собой D; X<sub>3</sub> представляет собой G; и X<sub>4</sub> отсутствует.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере две модификации из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина имеет последовательность SEQ ID NO 2, где: X<sub>1</sub> представляет собой I или T; X<sub>2</sub> представляет собой D; X<sub>3</sub> представляет собой G; и X<sub>4</sub> отсутствует.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> и X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина имеет последовательность SEQ ID NO 2, где: X<sub>1</sub> представляет собой I или T; X<sub>2</sub> представляет собой D; X<sub>3</sub> представляет собой G; и X<sub>4</sub> отсутствует.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO 1, где X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> каждый представляет собой G, где: X<sub>1</sub> представляет собой I или T; X<sub>2</sub> представляет собой D; X<sub>3</sub> представляет собой G; и X<sub>4</sub> отсутствует.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит модификации из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>4</sub> и X<sub>5</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина имеет последовательность

SEQ ID NO 2, где: X<sub>1</sub> представляет собой I или T; X<sub>2</sub> представляет собой D; X<sub>3</sub> представляет собой G; и X<sub>4</sub> отсутствует.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит последовательность SEQ ID NO 1, где: X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой V; X<sub>3</sub> представляет собой N или D; X<sub>4</sub> представляет собой E; X<sub>5</sub> представляет собой H; и аналог А-цепи инсулина имеет последовательность SEQ ID NO 2, где: X<sub>1</sub> представляет собой I или T; X<sub>2</sub> представляет собой D; X<sub>3</sub> представляет собой G; и X<sub>4</sub> отсутствует.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в каждой из позиций X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> и X<sub>9</sub> SEQ ID NO 1; и аналог А-цепи инсулина имеет последовательность SEQ ID NO 2, где: X<sub>1</sub> представляет собой I или T; X<sub>2</sub> представляет собой D; X<sub>3</sub> представляет собой G; и X<sub>4</sub> отсутствует.

В некоторых вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина имеет последовательность SEQ ID NO 1, где: X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой V; X<sub>3</sub> представляет собой N или D; X<sub>4</sub> представляет собой E; X<sub>5</sub> представляет собой H; и X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> каждый представляет собой G; и аналог А-цепи инсулина имеет последовательность SEQ ID NO 2, где: X<sub>1</sub> представляет собой I или T; X<sub>2</sub> представляет собой D; X<sub>3</sub> представляет собой G; и X<sub>4</sub> отсутствует.

В некоторых вариантах реализации изобретения первый пептидный линкер (Z<sub>2</sub>) содержит аминокислотную последовательность: X<sub>1</sub>GX<sub>2</sub>GGGG, где X<sub>1</sub> представляет собой G или отсутствует; и X<sub>2</sub> представляет собой G, S или отсутствует (SEQ ID NO 3).

В некоторых вариантах реализации изобретения агонист рецептора инсулина, т.е., Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub>-Z<sub>3</sub> в слитом белке, описанном выше, содержит аминокислотную последовательность:

X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>QHLCGSHLVEALX<sub>4</sub>LVCGERGFX<sub>5</sub>YX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>GX<sub>11</sub>GGGGGIVEQCCTSX<sub>12</sub>CSLX<sub>13</sub>QL  
ENYCX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>

где X<sub>1</sub> представляет собой F, Q или A; X<sub>2</sub> представляет собой V или G; X<sub>3</sub> представляет собой N, K, D, G, Q, A или E; X<sub>4</sub> представляет собой E, Y, Q или H; X<sub>5</sub> представляет собой H или F; X<sub>6</sub> представляет собой G, T, S, H, V или отсутствует; X<sub>7</sub> представляет собой G, E, P, K, D, S, H или отсутствует; X<sub>8</sub> представляет собой G, E, K, P, Q, D, H или отсутствует; X<sub>9</sub> представляет собой G, T, S, E, K, A или отсутствует; X<sub>10</sub> представляет собой G или отсутствует; X<sub>11</sub> представляет собой G, S или отсутствует; X<sub>12</sub> представляет собой T или I; X<sub>13</sub> представляет собой D, Y, Q или E; X<sub>14</sub> представляет собой G, N, S или A; и X<sub>15</sub>

представляет собой любую встречающуюся в природе аминокислоту, или отсутствует, при условии, что по меньшей мере один из X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub> должен представлять собой другую аминокислоту, чем обнаруженная, соответственно, в положении В<sub>16</sub>, В<sub>25</sub>, В<sub>27</sub>, В<sub>28</sub>, В<sub>29</sub> или В<sub>30</sub> В-цепи молекулы инсулина человека и, кроме того, при условии, что если X<sub>14</sub> представляет собой N, тогда X<sub>15</sub> должен представлять собой аминокислоту, отличную от G или N (SEQ ID NO 4).

В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения агонист рецептора инсулина, т.е., Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub>-Z<sub>3</sub> в слитом белке, описанном выше, имеет следующую аминокислотную последовательность:

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCQLDQLENYCG (SEQ ID NO 5).

В некоторых вариантах реализации изобретения второй пептидный линкер представляет собой пептид, содержащий от 10 до 25 аминокислот, причем по меньшей мере 50% указанных аминокислот представляют собой остатки G. В некоторых вариантах реализации изобретения второй пептидный линкер представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность [GGGGX]<sub>n</sub>, где X представляет собой Q, E или S; и где n равен 2-5. В некоторых вариантах реализации изобретения второй пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность:

GGGGX<sub>1</sub>GGGGX<sub>2</sub>GGGGX<sub>3</sub>GGGGX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>

где X<sub>1</sub> представляет собой Q или E; X<sub>2</sub> представляет собой Q или E; X<sub>3</sub> представляет собой Q или E; X<sub>4</sub> представляет собой G, E, Q или отсутствует; X<sub>5</sub> представляет собой G или отсутствует; и X<sub>6</sub> представляет собой G или отсутствует (SEQ ID NO 6).

В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения второй пептидный линкер имеет аминокислотную последовательность:

GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (SEQ ID NO 7) .

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-участок IgG человека содержит фрагменты из одной тяжелой цепи антитела IgG. Схематическая диаграмма слитого белка, содержащего такую область IgG, представлена на диаграмме (А) на Фиг. 2. В других вариантах реализации изобретения Fc-участок IgG человека содержит фрагменты из двух тяжелых цепей антитела IgG. Схематическая диаграмма слитого белка, содержащего такую область IgG, представлена на диаграмме (В) на Фиг. 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-участок IgG человека представляет собой Fc-участок из антитела IgG1, IgG2 или IgG4.

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-участок IgG человека представляет собой Fc-участок из антитела IgG1, содержащий следующую аминокислотную последовательность:

CPPCPAPELLGGPSVX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>PPKPKDTLMISRTPEVTCX<sub>3</sub>VX<sub>4</sub>DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYX<sub>5</sub>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX<sub>6</sub>

где X<sub>1</sub> представляет собой F, Q или E; X<sub>2</sub> представляет собой F, Q или E; X<sub>3</sub> представляет собой V или T; X<sub>4</sub> представляет собой V или T; X<sub>5</sub> представляет собой N, D или Q; и X<sub>6</sub> представляет собой K или отсутствует. (SEQ ID NO 8)

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-участок IgG содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 8 и дополнительно содержит некоторые или все аминокислоты, которые могут быть найдены в последовательности Fc IgG1 дикого типа с N-концевой частью остатка C в положении 1 в SEQ ID NO 8.

Предпочтительно Fc-участок IgG человека представляет собой антитело IgG2 или IgG4.

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-участок IgG человека представляет собой Fc-участок из антитела IgG4, содержащий следующую аминокислотную последовательность:

PCPPCPAPEAAGGPSVX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>PPKPKDTLMISRTPEVTCX<sub>3</sub>VX<sub>4</sub>DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFX<sub>5</sub>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSX<sub>6</sub>LTVDKSRWQEGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLX<sub>7</sub>

где X<sub>1</sub> представляет собой F, Q или E; X<sub>2</sub> представляет собой F, Q или E; X<sub>3</sub> представляет собой V или T; X<sub>4</sub> представляет собой V или T; X<sub>5</sub> представляет собой N, D или Q; X<sub>6</sub> представляет собой R или K; X<sub>7</sub> представляет собой K или отсутствует. (SEQ ID NO 9)

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-участок IgG содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 9 и дополнительно содержит некоторые или все аминокислоты, которые могут быть найдены в последовательности Fc IgG4 дикого типа с N-концевой частью остатка C в положении 1 в SEQ ID NO 9. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-участок IgG человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 9, где X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой F;

X<sub>3</sub> представляет собой V; X<sub>4</sub> представляет собой V; X<sub>5</sub> представляет собой N; X<sub>6</sub> представляет собой R; и X<sub>7</sub> отсутствует.

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-участок IgG2 человека представляет собой Fc-участок из антитела IgG4, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

ECPPCPAPPVAGPSVX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>PPKPKDTLMISRTPEVTCX<sub>3</sub>VX<sub>4</sub>DVSHEDPEVQFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQFX<sub>5</sub>STFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK  
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX<sub>6</sub>

где X<sub>1</sub> представляет собой F, Q или E; X<sub>2</sub> представляет собой F, Q или E; X<sub>3</sub> представляет собой V или T; X<sub>4</sub> представляет собой V или T; X<sub>5</sub> представляет собой N, D или Q; и X<sub>6</sub> представляет собой K или отсутствует. (SEQ ID NO 10)

В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-участок IgG содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 10 и дополнительно содержит некоторые или все аминокислоты, которые могут быть найдены в последовательности Fc IgG2 дикого типа с N-концевой частью остатка E в положении 1 в SEQ ID NO 10. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-участок IgG человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 10, где X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой F; X<sub>3</sub> представляет собой V; X<sub>4</sub> представляет собой V; X<sub>5</sub> представляет собой N; и X<sub>6</sub> отсутствует.

В некоторых вариантах реализации изобретения слитый белок содержит аминокислотную последовательность:

X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>QHLCGSHLVEALX<sub>4</sub>LVCGERGFYX<sub>5</sub>YX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>GX<sub>11</sub>GGGGGIVEQCCTSX<sub>12</sub>CSLX<sub>13</sub>QL  
ENYCX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GGGGX<sub>16</sub>GGGGX<sub>17</sub>GGGGX<sub>18</sub>GGGGX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>CPPCPAPX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>AGX<sub>25</sub>PSVFLFP  
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVX<sub>26</sub>EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTX<sub>27</sub>RVVSVL  
TVX<sub>28</sub>HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>IEKTIISKX<sub>31</sub>KGQPREPQVYTLPPSX<sub>32</sub>EEMTKNQVS  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX<sub>33</sub>LDSDGSFFLYSX<sub>34</sub>LTVDKSRWQX<sub>35</sub>GNVFS  
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSX<sub>36</sub>G

где X<sub>1</sub> представляет собой F, Q или A; X<sub>2</sub> представляет собой V или G; X<sub>3</sub> представляет собой N, K, D, G, Q, A или E; X<sub>4</sub> представляет собой E, Y, Q, или H; X<sub>5</sub> представляет собой H или F; X<sub>6</sub> представляет собой G, T, S, H, V или отсутствует; X<sub>7</sub> представляет собой G, E, P, K, D, S, H или отсутствует; X<sub>8</sub> представляет собой G, E, K, P, Q, D, H или отсутствует; X<sub>9</sub> представляет собой G, T, S, E, K, A или отсутствует, при условии, что по



меньшей мере один из X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, или X<sub>9</sub> представляет собой аминокислоту, отличную от той, которая присутствует, соответственно, в положении В<sub>16</sub>, В<sub>25</sub>, В<sub>27</sub>, В<sub>28</sub>, В<sub>29</sub> или В<sub>30</sub> В-цепи инсулина человека; X<sub>10</sub> представляет собой G или отсутствует; X<sub>11</sub> представляет собой G, S или отсутствует; X<sub>12</sub> представляет собой T или I; X<sub>13</sub> представляет собой D, Y, Q или E; X<sub>14</sub> представляет собой G, N, S или A; X<sub>15</sub> представляет собой любую встречающуюся в природе аминокислоту, или отсутствует, при условии, что если X<sub>14</sub> представляет собой N, тогда X<sub>15</sub> должен представлять собой аминокислоту, отличную от G или N; X<sub>16</sub> представляет собой Q или E; X<sub>17</sub> представляет собой Q или E; X<sub>18</sub> представляет собой Q или E; X<sub>19</sub> представляет собой G, E, Q или отсутствует; X<sub>20</sub> представляет собой G или отсутствует; X<sub>21</sub> представляет собой G или отсутствует; X<sub>22</sub> представляет собой E или P; X<sub>23</sub> представляет собой E или P; X<sub>24</sub> представляет собой A или V; X<sub>25</sub> представляет собой G или отсутствует; X<sub>26</sub> представляет собой Q или H; X<sub>27</sub> представляет собой Y или F; X<sub>28</sub> представляет собой L или V; X<sub>29</sub> представляет собой S или A; X<sub>30</sub> представляет собой S или P; X<sub>31</sub> представляет собой A или T; X<sub>32</sub> представляет собой Q или R; X<sub>33</sub> представляет собой V или M; X<sub>34</sub> представляет собой R или K; X<sub>35</sub> представляет собой E или Q и X<sub>36</sub> представляет собой L или P (SEQ ID NO 11).

В некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к слитому белку, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 22, SEQ ID NO 23 и SEQ ID NO 24.

В предпочтительном варианте реализации изобретения слитый белок имеет аминокислотную последовательность:

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS					
130	140	150	160	170	180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHVDWLNGKEYKCKVSNKG					
190	200	210	220	230	240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP					
250	260	270	280	290	
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG					

(SEQ ID NO:12).

В некоторых вариантах реализации изобретения слитые белки согласно данному изобретению присутствуют в форме димера. Схематическая диаграмма такого димера приведена на диаграмме (С) на Фиг. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения димер представляет собой гомодимер, причем аминокислотные последовательности двух слитых белков, которые образуют димер, являются одинаковыми. В некоторых вариантах реализации изобретения димер представляет собой гетеродимер, причем аминокислотные последовательности двух слитых белков, которые составляют димер, различны.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция согласно данному изобретению содержит слитый белок согласно данному изобретению, буферный агент, поверхностно-активное вещество и изотонический агент. В некоторых вариантах реализации изобретения буферный агент представляет собой лимонную кислоту и/или цитрат, поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80, а изотонический агент представляет собой маннит. В некоторых вариантах реализации изобретения рН композиции составляет от около 5,5 до около 8,0. В некоторых вариантах реализации изобретения рН составляет от около 6,0 до около 7,4. В некоторых вариантах реализации изобретения рН составляет от около 6,0 до 6,75.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительный активный ингредиент. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный активный ингредиент представляет собой терапию на основе инкретина. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения терапия на основе инкретина представляет собой агонист GLP-1R. Предпочтительно, агонист GLP-1R представляет собой дулаглютид.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ согласно данному изобретению включает введение терапевтически эффективного количества слитого белка один раз в сутки. В предпочтительных вариантах реализации изобретения терапевтически эффективное количество слитого белка вводят один раз в неделю. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтически эффективное количество слитого белка вводят один раз в месяц. В некоторых вариантах реализации изобретения данное изобретение относится к способу лечения пациента, больного сахарным диабетом при снижении риска гипогликемии и/или увеличения веса, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка согласно данному изобретению.

Данное изобретение также относится к способу лечения пациента, больного сахарным диабетом, ожирением, дислипидемией и/или метаболическим синдромом, включающему введение терапевтически эффективного количества слитого белка согласно данному изобретению в сочетании с дополнительным активным ингредиентом. Слитый белок и дополнительный активный ингредиент в таких вариантах реализации изобретения можно вводить одновременно, последовательно или в одном комбинированном составе. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный активный ингредиент представляет собой терапию на основе инкретина. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения терапия на основе инкретина представляет собой агонист GLP-1R. Предпочтительно, агонист GLP-1R представляет собой дулаглютид. В некоторых вариантах реализации изобретения комбинацию вводят один раз в сутки. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения комбинацию вводят один раз в неделю. В некоторых вариантах реализации изобретения комбинацию вводят один раз в месяц.

В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложен слитый белок согласно данному изобретению для применения при лечении сахарного диабета, ожирения, дислипидемии или метаболического синдрома. В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложен слитый белок согласно данному изобретению для применения при лечении или предотвращении связанного с диабетом состояния, выбранного из группы, состоящей из болезни сердца, инсульта, нефропатии, ретинопатии и заболевания почек. В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложен слитый белок согласно данному изобретению для применения при лечении пациента, больного сахарным диабетом, одновременно снижая риск гипогликемии и/или увеличения веса, включая введение пациенту слитого белка согласно данному изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретения предложен слитый белок согласно данному изобретению для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с другим активным ингредиентом. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный активный ингредиент представляет собой терапию на основе инкретина. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения терапия на основе инкретина представляет собой агонист GLP-1R.

В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложено применение слитого белка согласно данному изобретению при изготовлении лекарственного средства для лечения сахарного диабета, ожирения, дислипидемии или метаболического синдрома.

В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложено применение слитого белка согласно данному изобретению при изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики связанного с диабетом состояния, выбранного из группы, состоящей из болезни сердца, инсульта, нефропатии, ретинопатии и заболевания почек. В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложено применение слитого белка согласно данному изобретению при изготовлении лекарственного средства для лечения сахарного диабета при одновременном снижении риска гипогликемии и/или увеличения веса, включающее введение пациенту слитого белка согласно данному изобретению. В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложено применение слитого белка согласно данному изобретению при изготовлении лекарственного средства для лечения сахарного диабета, ожирения, дислипидемии или метаболического синдрома, причем лекарственное средство должно вводиться одновременно, отдельно или последовательно в сочетании с другим активным ингредиентом.

При в данном документе термин «агонист рецептора инсулина» относится к белку, который связывается с рецептором инсулина и активирует его, что приводит к снижению уровня глюкозы в крови и/или подавлению выхода глюкозы из печени, характеристик, которые можно тестировать и измерять с использованием известных методов, таких как показанные в исследованиях, описанных ниже.

Часть, содержащая агонист рецептора инсулина слитых белков согласно данному изобретению включает аналог В-цепи инсулина и аналог А-цепи инсулина. При использовании в данном документе термины «А-цепь инсулина» и «В-цепь инсулина» относятся к цепям А и В молекулы инсулина человека (каталожный № 11061-68-0), чьи нативные последовательности дикого типа хорошо известны. А-цепь инсулина человека состоит из 21 аминокислоты, упоминаемых в данной области техники как A<sub>1</sub>-A<sub>21</sub>, имеет следующую последовательность:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO 13).

В-цепь инсулина человека состоит из 30 аминокислот, упоминаемых в данной области техники как B<sub>1</sub>-B<sub>30</sub>, имеет следующую последовательность:

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO 14).

В молекуле инсулина человека А- и В-цепи соединяются двумя дисульфидными связями – CysA7-CysB7 и CysA20-CysB19. А-цепь имеет внутрцепочечную дисульфидную связь в CysA6-CysA11.

Для достижения желаемого расширенного временного профиля действия агонист рецептора инсулина слитого белка согласно данному изобретению должен оставаться в кровотоке и быть способным взаимодействовать с рецептором инсулина в течение длительного периода времени. Для того чтобы слитые белки согласно данному изобретению оставались в кровотоке в течение требуемого периода времени, элиминация слитых белков должна быть ослаблена. Двумя основными путями элиминации инсулина являются почечный клиренс и опосредованный инсулиновым рецептором клиренс. См. Iglesias P, et al. *Diabetes Obes. Metab.* 2008;10:811-823. Чтобы минимизировать почечный клиренс, необходима молекула с гидродинамическим размером, равным по меньшей мере, около человеческого сывороточного альбумина, и такой гидродинамический размер обеспечивается в слитых белках согласно данному изобретению с помощью Fc-участка IgG человека. Что касается опосредованного рецептором клиренса, слитый белок не может быть настолько сильным в рецепторе инсулина, что он приводит к более быстрому опосредованному рецептором клиренсу, чем необходимо, но слитый белок должен быть достаточно сильным, чтобы обеспечить достаточный контроль глюкозы в дозах, которые являются коммерчески осуществимыми. Таким образом, эффективность слитого белка должна быть тщательно сбалансирована, а структура слитого белка согласно данному изобретению позволяет достичь такого баланса.

Молекулы инсулина имеют тенденцию к самоассоциации в димеры и гексамеры. Было предложено множество ролей для эволюционно-консервативных тенденций самоассоциации инсулина, в том числе: (1) химическая и термическая стабилизация молекулы при внутриклеточном хранении в вакуоли; (2) защита мономерного инсулина от фибрилляции *in vivo*; (3) замена для шаперон-опосредованной стабилизации и фолдинга при внутриклеточной экспрессии; и/или (4), необходимость для секреторного переноса. Однако активная форма инсулина представляет собой мономер.

Тенденция молекулы инсулина к самоассоциации и неактивность таких самоассоциированных молекул имеет отношение к данному изобретению, поскольку Fc-участок IgG человека также склонны к самоассоциации с образованием димеров, обычно связанных ковалентно через дисульфидные связи в шарнирной области, и такие димеры образуются из Fc-участков IgG человека в слитых белках согласно данному изобретению. В результате димеризации Fc-участков IgG человека два «плеча» агониста рецептора инсулина находятся в непосредственной близости друг от друга и, следовательно, существуют при относительно высокой локальной концентрации. В случае инсулина

человека такая тесная близость, как правило, способствует самоассоциации или димеризации фрагментов инсулина, влияющих на активность молекул. На схеме (D) на Фиг. 2 приведена схематическая диаграмма Fc-слитого белкового димера с плечами фрагментов инсулина, которые стали самоассоциированными или димеризованными. Тенденция молекулы инсулина к самоассоциации также может приводить к самоассоциации или димеризации фрагментов инсулина из более чем одного Fc-слитого белкового димера; схема димера двух димеров Fc-слитого белка с самоассоциированными или димеризованными фрагментами инсулина представлена на диаграмме (E) на Фиг. 2. Кроме того, фрагменты инсулина более чем в двух димерах Fc-слитого белка могут также самоассоциироваться таким образом, чтобы образовывать, например, тример, состоящий из трех димеров или даже более высокоуровневые агрегаты, состоящие из более чем трех димеров.

Однако часть слитого белка, содержащая агонист рецептора инсулина согласно данному изобретению имеет уменьшенную тенденцию к самоассоциации или димеризации, и, следовательно, димеры слитых белков, состоящие из слитых белков согласно данному изобретению, имеют тенденцию благоприятствовать структуре, изображенной на диаграмме (C) на Фиг. 2, в отличие от структур, изображенных на диаграммах (D) и (E) на Фиг. 2. Таким образом, хотя в данном изобретении предложен димер двух слитых белков, агонист рецептора инсулина каждого слитого белка в димере поддерживает преимущественно мономерное состояние, как показано, например, на диаграмме (C) на Фиг. 1, и, таким образом является, более способный взаимодействовать с рецептором инсулина.

В слитых белках согласно данному изобретению аналог В-цепи инсулина в агонисте рецептора инсулина содержит одну или более модификаций аминокислотной последовательности В-цепи инсулина человека. В частности, чтобы уменьшить склонность частей агониста рецептора инсулина к самоассоциации или димеризации, аналог В-цепи инсулина содержит одну или более модификаций из В-цепи молекулы инсулина человека в положениях В16, В25 или В27-30, которые представлены в SEQ ID NO 1 в качестве позиций X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> и X<sub>6-9</sub>, соответственно. Например: X<sub>4</sub> (что соответствует В<sub>16</sub> в В-цепи молекулы инсулина человека) может быть заменен на Е, Q или Н; X<sub>5</sub> (что соответствует В<sub>25</sub> в В-цепи молекулы инсулина человека) может быть заменен на Н; X<sub>6</sub> (что соответствует В<sub>27</sub> в В-цепи молекулы инсулина человека) может быть удален или заменен на G, S, H или V; X<sub>7</sub> (что соответствует В<sub>28</sub> в В-цепи молекулы инсулина

человека) может быть удален или заменен на G, E, K, D, S или H; X<sub>8</sub> (что соответствует B<sub>29</sub> в В-цепи молекулы инсулина человека) может быть удален или заменен на G, E, P, Q, D или H; и X<sub>9</sub> (что соответствует B<sub>30</sub> в В-цепи молекулы инсулина человека) может быть удален или заменен на G, S, E или K. В дополнение к снижению склонности частей агониста рецептора инсулина к самоассоциации, модификации позиций B<sub>16</sub> и B<sub>25</sub> в аналоге В-цепи инсулина – X<sub>4</sub> и X<sub>5</sub> SEQ ID NO 1, соответственно, также могут быть сделаны для корректировки активности, улучшения экспрессии, улучшения химической и/или физической стабильности, улучшения легкости, с которой слитые белки могут быть объединены с другими широко используемыми эксципиентами и/или для устранения дезамидирования. По этим причинам аналог В-цепи инсулина может также содержать дополнительные модификации. Ссылаясь на переменные в SEQ ID NO 1, такие дополнительные модификации включают следующее: модификация X<sub>1</sub> (что соответствует B<sub>1</sub> в В-цепи молекулы инсулина человека) в Q или A; модификация X<sub>2</sub> (что соответствует B<sub>2</sub> в В-цепи молекулы инсулина человека) в G; и/или модификации X<sub>3</sub> (что соответствует B<sub>3</sub> в В-цепи молекулы инсулина человека) в K, D или G.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения аналог В-цепи инсулина содержит более одной модификации аминокислотной последовательности В-цепи инсулина человека в положениях X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> и X<sub>6-9</sub> SEQ ID NO 1. В предпочтительном варианте реализации изобретения, X<sub>4</sub> представляет собой E и X<sub>5</sub> представляет собой H. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность X<sub>6-9</sub> SEQ ID NO 1 выбрана из группы, состоящей из: GGES, GGGS, GGDS, GGEG, GGGG, SSES, SSGS, GGEE, GGGE, GGEK, GGGK, TPGS, TGGS, HGES, GHES, GGHS, GGEN, HGGS, GHGS, GGGH, GGDD, VGES, TEET, TKPT, GGGG, TGGG, TPGG, EPKT, TDKT, TPGS, EGGS, EGES, EEES, EPES, EPEP и GGDD. В предпочтительных вариантах реализации изобретения последовательность этих четырех аминокислот представляет собой GGGS, GGGG или TEET. В особенно предпочтительных вариантах реализации изобретения X<sub>4</sub> представляет собой E, X<sub>5</sub> представляет собой H и X<sub>6-9</sub> представляет собой GGGG.

Следует отметить, что, хотя X<sub>6-9</sub> SEQ ID NO 1 описаны выше как содержащие С-концевой аналог В-цепи инсулина (Z<sub>1</sub>), эти аминокислоты не являются критическими для активности слитых белков у рецептора инсулина и, таким образом, могут альтернативно рассматриваться как расширение первого пептидного линкера (Z<sub>2</sub>). Например, в контексте

SEQ ID NO 4, X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> могут считаться либо частью аналога В-цепи инсулина, либо первого пептидного линкера в этом агонисте рецептора инсулина.

В слитых белках согласно данному изобретению аналог А-цепи инсулина в части агониста рецептора инсулина может содержать одну или более модификаций аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека, предназначенной для улучшения химической и физической стабильности, корректировки активности и/или усиления экспрессии. Ссылаясь на переменные в SEQ ID NO 2, эти модификации включают следующее: модификацию X<sub>1</sub> (что соответствует A<sub>10</sub> в А-цепи молекулы инсулина человека) в Т; модификацию X<sub>2</sub> (который соответствует A<sub>14</sub> в А-цепи молекулы инсулина человека) в D, Q или E; и / или модификацию X<sub>3</sub> (который соответствует A<sub>21</sub> в А-цепи молекулы инсулина человека) в G, S или A. В предпочтительном варианте реализации изобретения X<sub>1</sub> представляет собой Т, X<sub>2</sub> представляет собой D, а X<sub>3</sub> представляет собой G.

Кроме того, чтобы избежать дезамидирования, а также химического и/или протеолитического расщепления, если аминокислота, которая находится в положении 21 в аналоге А-цепи инсулина в агонисте рецептора инсулина, то есть X<sub>3</sub> в SEQ ID NO 2, представляет собой N - аминокислоту, которая присутствует в соответствующем положении в молекуле инсулина человека, за ней не должны немедленно следовать на С-конце некоторые аминокислоты, такие как G или N, или, в определенных варианты реализации изобретения – P, S, V или L. См., например, Vlasak J, Ionescu R., MAbs. 2011 May-Jun;3(3):253-63. *Fragmentation of Monoclonal Antibodies*. Следует отметить, что хотя это требование описано в первом слитом белке, описанном выше, в контексте вариантов для позиций X<sub>4</sub> и X<sub>5</sub> в SEQ ID NO 2, который относится к аналогу А-цепи инсулина, не является критическим для остатка не глицина после остатка аспарагина в положении 21 в аналоге А-цепи инсулина, чтобы считаться частью агониста рецептора инсулина, в противоположность ко второму пептидному линкеру. Например, в контексте SEQ ID NO 11, остаток, соответствующий положению 21 в аналоговом участке А-цепи, представлен X<sub>14</sub>, и следующая аминокислота X<sub>15</sub> может быть либо рассмотрена как часть агониста рецептора инсулина, либо второго пептидного линкера.

Как описано выше, в слитых белках согласно данному изобретению С-концевой остаток аналога В-цепи инсулина непосредственно слит с N-концевым остатком первого пептидного линкера, а С-концевой остаток первого пептидного линкера непосредственно слит с N-концевым остатком аналога В-цепи инсулина. Первый пептидный линкер должен



обеспечивать достаточную гибкость для аналогов А-цепи и В-цепи инсулина для достижения структуры, необходимой для связывания с рецептором инсулина, но не должен быть настолько длинным, чтобы он чрезмерно мешал этому связыванию. Длина и состав первого пептидного линкера можно регулировать для того, чтобы регулировать активность и/или экспрессию слитых белков. В некоторых вариантах реализации изобретения первый пептидный линкер имеет длину от 5 до 10 аминокислот, по меньшей мере 5 из которых являются остатками G. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность первого пептидного линкера выбирается из группы, состоящей из: GGGGGG, GGGGG, EGGGG, GEGGG, GGEGG, GGGEGG, GGGGGE, KGGGG, GKGGG, GGKGG, GGGKGG, GGGGKG, GGGGGK, HGGGG, GHGGG, GGHGG, GGGHG, GGGGGH, GGGGGA, GGGGGR, SGGGG, GSGGG, GGSGG, GGSGGK, GSGGGG и GGSGG. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения последовательность первого пептидного линкера содержит SEQ ID NO 3. Наиболее предпочтительно, чтобы последовательность первого пептидного линкера была GGSGGG (SEQ ID NO 15). Часть слитых белков, содержащая агонист рецептора инсулина согласно данному изобретению также содержит дисульфидные связи, обнаруженные в молекуле инсулина человека, как описано выше, а именно две дисульфидные связи, соединяющие аналогии А-цепи и В-цепи инсулина с CysA7- CysB7 и CysA20-CysB19, и внутрицепочечную дисульфидную связь в аналоге А-цепи инсулина в CysA6-CysA11.

Как описано выше, С-концевой остаток части слитых белков, содержащей агонист рецептора инсулина согласно данному изобретению слита с N-концевым остатком второго пептидного линкера, а С-концевой остаток второго пептидного линкера слит непосредственно с N-концевым остатком Fc-части. Предпочтительно, чтобы второй пептидный линкер был богатым глицином, чтобы обеспечить достаточную конформационную гибкость. Предпочтительно, второй пептидный линкер имеет длину менее 30 аминокислот. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения второй пептидный линкер имеет длину от 10 до 25 аминокислот, причем по меньшей мере 50% аминокислот являются остатками глицина. Предпочтительный второй пептидный линкер содержит последовательность  $(GGGGX_{15})_n$  где  $X_{15}$  представляет собой Q, E или S, и  $n = 2-5$ . Более предпочтительный второй пептидный линкер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO 6. Наиболее предпочтительный второй

пептидный линкер имеет аминокислотную последовательность GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (SEQ ID NO 7).

Используемый в данном документе термин «Fc-участок IgG человека» имеет значение, обычно используемое для термина в области иммунологии. В частности, этот термин относится к фрагменту антитела IgG человека, который получают путем удаления двух антигенсвязывающих областей (Fab-фрагментов) из антитела. В частности, Fc-участок содержит константные участки CH2 и CH3 антитела и может также содержать часть или весь шарнирный участок.

Как описано выше, в некоторых вариантах реализации слитого белка согласно данному изобретению Fc-участок IgG человека содержит фрагменты константного участка из одной тяжелой цепи антитела IgG, схематическое изображение которого представлено на диаграмме (A) на Фиг. 2, а в других вариантах реализации изобретения Fc-участок IgG человека содержит фрагменты константных участков из двух тяжелых цепей антитела IgG, схематическое изображение которых представлено на диаграмме (B) на Фиг. 2. В данном варианте реализации изобретения константные участки двух тяжелых цепей связаны друг с другом посредством нековалентных взаимодействий и дисульфидных связей.

Существует четыре подкласса IgG (G1, G2, G3 и G4), каждый из которых имеет разные структуры и биологические функции, известные как эффекторные функции. Эти эффекторные функции, как правило, опосредуются посредством взаимодействия с Fc-рецептором (FcγR) или фактором связывания комплемента C1q. Связывание с FcγR может приводить к антителозависимому клеточно-опосредованному цитолизу, тогда как связывание с факторами комплемента может привести к клеточному лизису, опосредованному комплементом. Структуры и свойства Fc-участков подклассов IgG известны в данной области техники. Слитые белки согласно данному изобретению могут содержать Fc-участки из любого из подклассов IgG, хотя G2 и G4 имеют более низкую активность рецепторного связывания и эффекторной функции, чем антитела G1 и G3, и поэтому являются предпочтительными.

При использовании в данном документе термин «Fc-участок IgG человека» также включает варианты таких фрагментов антител, которые были модифицированы, удлинены и/или усечены, например, для изменения свойств или характеристик, таких как функции связывания комплемента и/или Fc-рецептора, эффекторные функции, образование дисульфидной связи, гликозилирование, антителозависимая клеточно-опосредованная

цитотоксичность (ADCC), технологичность и/или стабильность. Например, Fc-участки IgG человека слитых белков согласно данному изобретению могут быть модифицированы для уменьшения или удаления N-связанного сайта гликозилирования, что уменьшит аффинность связывания с C1q и цитотоксичность и которые могут способствовать иммуногенности, влияют на конформационную стабильность и скорость клиренса *in vivo* и/или изменяют эффекторные функции. Fc-участки IgG человека слитых белков согласно данному изобретению могут также иметь часть или всю шарнирную область, удаленную для упрощения Fc-димеризации, опосредованной дисульфидом. Другие примеры изменений включают фосфорилирование, сульфатирование, ацилирование, гликозилирование, метилирование, ацетилирование, амидирование и/или модификации, для обеспечения получения гетеродимерных молекул. Методики для модификации структур и свойств Fc-участков подклассов IgG известны в данной области техники.

Независимо от конечной структуры слитого белка Fc-участок IgG человека должен служить для продления периода полувыведения *in vivo* агониста рецептора инсулина. При получении гетерологичных Fc-слитых белков, в которых часть Fc используется для ее способности продлевать период полувыведения, важно минимизировать любую эффекторную функцию. Кроме того, агонист слитого рецептора инсулина должен оставаться способным связываться с рецептором инсулина и активировать его, чтобы приводить к снижению уровня глюкозы в крови и/или подавлению выхода глюкозы из печени – характеристик, которые можно тестировать и измерять с использованием известных методов, таких как показанные в исследованиях, описанных ниже. Длительный период полувыведения в слитых белках согласно данному изобретению может быть продемонстрирован с использованием, например, способов, описанных ниже.

Одним из предпочтительных Fc-участков IgG человека является Fc-участок IgG4, модифицированный для дальнейшего снижения эффекторной функции, способствующий формированию гомодимера и имеющий часть удаляемого шарнира, как в SEQ ID NO 9, где X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой F; X<sub>3</sub> представляет собой V; X<sub>4</sub> представляет собой V; X<sub>5</sub> представляет собой N; X<sub>6</sub> представляет собой R; и X<sub>7</sub> отсутствует.

Другим предпочтительным Fc-участком IgG человека является Fc-участок IgG2, имеющий частично удаленный шарнирный участок, как в SEQ ID NO 10, где X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой F; X<sub>3</sub> представляет собой V; X<sub>4</sub> представляет собой V; X<sub>5</sub> представляет собой N; и X<sub>6</sub> отсутствует.

Следует отметить, что, хотя аминокислотные последовательности предпочтительных Fc-участков IgG человека, описанные выше, имеют части шарнирного участка, удаленные для упрощения дисульфидной опосредованной димеризации, эти шарнирные участки могут присутствовать в некоторых вариантах реализации изобретения. Например, Fc-участок дикого типа IgG2 содержит шесть аминокислотных последовательностей ERKCCV на своем N-конце, и хотя эти аминокислоты не перечислены в последовательности Fc-участка IgG2, представленной в SEQ ID NO 10, предполагается, что Fc-участок IgG человека, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 10 может дополнительно содержать некоторые или все из шести аминокислотных последовательностей ERKCCV на своем N-конце. Аналогично, Fc-участок IgG человека, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 9 может дополнительно содержать некоторые или все из шести аминокислот, обнаруженных на N-конце Fc-участка IgG4, а именно ESKYGP. Также, Fc-участок IgG человека, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO 8 может дополнительно содержать некоторые или все из десяти аминокислот, обнаруженных на N-конце Fc-участка IgG1, а именно: EPKSCDKTHT. Более того, точное разграничение между тем, какая аминокислота представляет С-концевой конец второго пептидного линкера и какая аминокислота представляет собой N-концевой конец Fc-участка IgG человека, не имеет решающего значения для структуры или функции слитого белка согласно данному изобретению. Например, в контексте SEQ ID NO 11, остатки, соответствующие положениям X<sub>19</sub>-X<sub>22</sub>, можно охарактеризовать как С-концевой конец второго пептидного линкера, или N-концевое удлинение Fc-участка IgG человека.

Как описано выше, данное изобретение также относится к полинуклеотидам, которые кодируют любой из слитых белков согласно данному изобретению. Полинуклеотиды, кодирующие вышеописанные слитые белки, могут быть в форме РНК или ДНК, которая включает кДНК и синтетическую ДНК и которая может быть двухцепочечной или одноцепочечной. Кодирующие последовательности, которые кодируют белки согласно данному изобретению, могут варьировать в результате избыточности или вырождения генетического кода.

Полинуклеотиды, которые кодируют слитые белки согласно данному изобретению, могут содержать следующее: только кодирующая последовательность для белков, кодирующая последовательность для белков и дополнительная кодирующая

последовательность, такая как лидерная или секреторная последовательность или про-белковая последовательность; кодирующую последовательность для белков и некодирующую последовательность такую, как интроны или некодирующая последовательность 5' и/или 3' кодирующая последовательность для белков. Таким образом, термин «полинуклеотид, кодирующий белок» включает полинуклеотид, который может содержать не только кодирующую последовательность для белков, но также полинуклеотид, который содержит дополнительную кодирующую и/или некодирующую последовательность.

Полинуклеотиды согласно данному изобретению будут экспрессироваться в клетке-хозяине после того, как последовательности функционально связываются с последовательностью, контролирующей экспрессию. Экспрессионные векторы обычно реплицируются в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессионные векторы будут содержать селекционные маркеры, чтобы можно было обнаружить эти клетки, трансформированные желаемыми последовательностями ДНК.

Слитые белки согласно данному изобретению могут быть легко получены в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO, NSO, HEK293, ВНК или COS; в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, *Bacillus subtilis* или *Pseudomonas fluorescense*; в клетках насекомых или в грибных или дрожжевых клетках, которые культивируют с использованием способов, известных в данной области. Однако насекомые и дрожжи или другие грибные клетки продуцируют нечеловеческие N-гликаны, поэтому белки с N-связанным гликозилированием, продуцируемые в таких клетках, могут вызывать иммуногенные реакции при введении пациентам. Таким образом, продуцирование в таких клетках требует устранения N-связанных сайтов гликозилирования и/или генной инженерии клеток для продуцирования N-гликанов человека с использованием способов, известных в данной области. См., например, Hamilton SR, et al., *Production of complex human glycoproteins in yeast*, 301 SCIENCE (5637): 1244–6 (August 2003). Продуцирование в клетках млекопитающих является предпочтительным, а предпочтительной клеткой-хозяином млекопитающего является клеточная линия CHO1SV, содержащая систему экспрессии глутаминсинтетазы (GS) (см. патент США № 5122464).

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (например, слитых белков и последовательности контроля экспрессии), могут быть перенесены в клетку-хозяин с помощью известных способов,

которые варьируются в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансформация хлоридом кальция обычно используется для прокариотических клеток, тогда как обработка фосфатом кальция или электропорация могут использоваться для других клеток-хозяев.

Могут быть использованы различные способы очистки белка, и такие способы известны в данной области и описаны, например, в *Deutscher, Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) и *Scopes, Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, N.Y. (1994).

Как описано выше, слитый белок согласно данному изобретению в некоторых вариантах реализации получают в виде димера. В таком димере Fc-участки IgG человека слитых белков связаны друг с другом посредством нековалентных взаимодействий и дисульфидных связей. Схематическое изображение такого димера представлено на диаграмме (C) на Фиг. 2. Когда аминокислотные последовательности двух слитых белков, которые составляют такой димер, например, слитый белок А и слитый белок В в димере, изображенном на диаграмме (C) на Фиг. 2, являются одинаковыми, димер упоминается в данном документе как «гомодимер». Как отмечено выше, экспрессия слитых белков согласно данному изобретению в клетках млекопитающих является предпочтительной, и экспрессия в таких клетках приводит к гомодимерам. Слитые белки в таких гомодимерах связаны посредством нековалентных взаимодействий и межмолекулярных дисульфидных связей в Fc-части. Например, белок, продуцируемый геном, который кодирует слитый белок SEQ ID NO 12 был бы гомодимером, ковалентно связанным через межцепочечные дисульфидные связи, а именно C80 с C80 и C83 с C83.

Когда аминокислотные последовательности двух слитых белков, которые составляют димер, например, слитый белок А и слитый белок В на диаграмме (C) на Фиг. 2, различны, димер упоминается в данном документе как «гетеродимер». Такой гетеродимер может быть получен способами, известными в данной области техники. См., например, Lewis SM, et al. *NAT. BIOTECHNOL.* 32(2):191-8 (2014); Carter, J. *IMMUNOL. METHODS*, 248(1-2):7-15 (2001); Ridgway, J. B. et al. *PROTEIN ENG.* 9(7):617-2 (1996).

Ссылки в данном документе на фармацевтические композиции, содержащие слитый белок, включают фармацевтические композиции, которые содержат гомодимер этого слитого белка и/или которые содержат гетеродимер, где один член гетеродимера представляет собой слитый белок. Аналогично, ссылки на способы, включающие введение слитого белка, включают способы, включающие введение гомодимера этого

слитого белка и/или введение гетеродимера, где один член гетеродимера представляет собой слитый белок. Аналогично, ссылки на слитый белок для применения в терапии и/или слитый белок для применения при изготовлении лекарственного средства включают гомодимер этого слитого белка и/или гетеродимер, где один член гетеродимера представляет собой слитый белок для применения в терапии и/или при изготовлении лекарственного средства.

Термин «лечение» или «лечить», используемые в данном документе, относится к управлению и уходу за пациентом, больным диабетом или гипергликемией, или к другому состоянию, для которого указано введение инсулина для борьбы или облегчения симптомов и осложнений этих состояний. Лечение включает введение слитых белков согласно данному изобретению для предотвращения или замедления появления симптомов или осложнений, облегчения симптомов или осложнений или устранения заболевания, состояния или расстройства. Пациент, подлежащий лечению, представляет собой млекопитающее и, предпочтительно, человека.

Используемый в данном документе термин «предотвращение» или «предотвращать» относится к уменьшению риска или заболеваемости или устранению или замедлению прогрессирования одного или более состояний, симптомов, осложнений или расстройств.

Слитые белки согласно данному изобретению могут быть применены для лечения субъектов с широким спектром заболеваний и состояний. Включаются пациенты с гипергликемией, инсулинозависимым диабетом, а также субъекты с неинсулинозависимым диабетом, включая наименее подверженных лечению субъектов, а также субъекты, получающие пероральные препараты, такие как сульфонилмочевина, метформин, тиазолидиндион, такие как пиоглитазон,  $\alpha$ -глюкозидаза ингибитор, такой как акарбоза и/или неинсулиновые инъекции, включая терапию на основе инкретина, такую как ингибиторы DPP-4 и агонисты GLP-1R. Слитые белки согласно данному изобретению могут быть применены для регулирования уровня глюкозы в крови у таких пациентов и могут лечить состояния или осложнения, которые являются результатом недостаточного контроля уровня глюкозы в крови, такого как ретинопатия, невропатия или заболевание почек.

В некоторых вариантах реализации изобретения слитый белок согласно данному изобретению вводят каждые сутки, через сутки, два раза в неделю, три раза в неделю, раз в неделю, два раза в месяц или один раз в месяц. В предпочтительных вариантах

реализации изобретения продолжительность действия достаточно увеличена, чтобы обеспечить дозировку раз в неделю. Однако даже для таких молекул с длительным действием специалистам в данной области техники будет понятно, что эффективный контроль глюкозы может также обеспечиваться путем постепенной дозы, накапливающей лекарство с длинным фармакокинетическим профилем с использованием более частых режимов лечения, таких как ежедневные. См., например, Heise T and Meneghini LF, 20 ENDOCR. PRACT. p75-83 (2014).

В некоторых вариантах реализации изобретения слитый белок согласно данному изобретению вводят в комбинации с дополнительным активным ингредиентом, таким как инсулин или аналог инсулина, терапия на основе инкретина или пероральным препаратом для лечения диабета, таким как сульфонилмочевина, метформин, тиазолидиндион, такой как пиоглитазон или ингибитор  $\alpha$ -глюкозидазы, такой как акарбоза.

Термин «терапия на основе инкретина» включает любое лечение, которое включает введение или стимулирует, позволяет, усиливает и/или имитирует действие группы метаболических гормонов, известных как инкретины, в эту группу входят GLP-1 и ингибиторный пептид желудка (GIP). В данное время в терапии на основе инкретина входят ингибиторы DPP-4 и агонисты GLP-1R.

«Ингибитор DPP-4» представляет собой соединение, которое блокирует фермент DPP-4, который ответственен за деградацию инкретинов. В данное время доступными ингибиторами DPP-4 являются ситаглиптин (Januvia®) и линаглиптин (Tradjenta®).

Агонист «GLP-1R» определяется как соединение, содержащее аминокислотную последовательность нативного GLP-1 человека (SEQ ID NO 25), аналога GLP-1, производного GLP-1 или слитого белка GLP-1, который поддерживает активность в рецепторе GLP-1. Активность GLP-1R может быть измерена способами, известными в данной области техники, в том числе с применением экспериментов *in vivo* и анализов *in vitro*, которые измеряют активность связывания рецептора GLP-1 или активацию рецептора, например, анализы с применением островковых клеток поджелудочной железы или клеток инсулиномы, как описано в EP 619322 и патенте США № 5120712, соответственно. Аналог GLP-1 представляет собой молекулу, имеющую модификацию, включающую одну или более аминокислотных замен, делеций, инверсий или добавок по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного GLP-1 человека (SEQ ID NO 25). Производное GLP-1 представляет собой молекулу, имеющую аминокислотную последовательность нативного GLP-1 человека (SEQ ID NO 25) или аналога GLP-1, но



дополнительно имеющую по меньшей мере одну химическую модификацию одной или более ее аминокислот боковые группы,  $\alpha$ -углеродные атомы, концевую аминогруппу или концевую группу карбоновой кислоты. Слитый белок GLP-1 представляет собой гетерологичный белок, содержащий GLP-1, аналог GLP-1 или часть производного GLP-1 и второй полипептид. В данное время агонисты GLP-1R включают экзенатид (Byetta® и Bydureon®), лираглутид (Victoza®), альбиглутид (Tanzeum®) и дулаглутид (Trulicity®), структуры которых известны в данной области техники. См., например, патент США № 5424286 (экзенатид); патент США № 6268343 (лираглутид); заявку на патент США № 2014044717 (албиглутид); и патент США № 7452966 (дулаглутид).

В вариантах реализации изобретения, где слитый белок согласно данному изобретению предоставляется в комбинации с дополнительным активным ингредиентом, слитый белок и дополнительный активный ингредиент могут вводиться одновременно, последовательно или в виде одного комбинированного состава.

Слитые белки согласно данному изобретению являются эффективными при лечении таких заболеваний и состояний путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества слитого белка согласно данному изобретению. Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к такому количеству слитого белка согласно данному изобретению, достаточному для регулирования уровня глюкозы в крови у пациента без возникновения неприемлемых побочных эффектов. Терапевтически эффективное количество слитого белка, вводимого субъекту, будет зависеть от типа и тяжести заболевания и от характеристик субъекта, таких как общее состояние здоровья, возраст, пол, масса тела и невосприимчивость к лекарственным средствам. Специалист в данной области техники сможет определить соответствующие дозы в зависимости от этих и других факторов. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтически эффективное количество слитого белка согласно данному изобретению при введении один раз в неделю составляет от около 0,01 нмоль/кг до около 100 нмоль/кг. Более предпочтительно, терапевтически эффективное количество слитого белка согласно данному изобретению при введении один раз в неделю составляет от около 1 нмоль/кг до около 50 нмоль/кг. Более предпочтительно, терапевтически эффективное количество слитого белка согласно данному изобретению при введении один раз в неделю составляет от около 16 нмоль/кг до около 25 нмоль/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтически эффективное количество слитого белка согласно данному изобретению при введении один

раз в неделю составляет от около 1 мг до около 200 мг. Более предпочтительно, терапевтически эффективное количество слитого белка согласно данному изобретению при введении один раз в неделю составляет от около 25 мг до около 175 мг. Более предпочтительно, терапевтически эффективное количество слитого белка согласно данному изобретению при введении один раз в неделю составляет от около 100 мг до около 160 мг.

Специалисты в данной области техники поймут, что, когда слитый белок согласно данному изобретению вводят в комбинации с другим активным ингредиентом, таким как агонист GLP-1R, дозу можно регулировать так, чтобы активность двух комбинированных препаратов была достаточной для регулирования уровня глюкозы в крови у пациента. Таким образом, количество слитого белка, которое необходимо вводить для регулирования уровней глюкозы в крови в таких комбинациях, может быть меньше, чем требовалось бы, если бы слитый белок вводили в виде монотерапии. Например, когда слитый белок согласно данному изобретению предоставляется в сочетании с агонистом GLP-1R, количество слитого белка, которое должно быть предоставлено в разовой еженедельной дозе, может быть уменьшено на 50% по сравнению с количеством того же слитого белка для применения в качестве монотерапии, такой как дозы, описанные в предыдущем абзаце.

Предпочтительно, введение терапевтически эффективного количества слитого белка согласно данному изобретению в некоторых вариантах реализации изобретения обеспечит эффективный контроль глюкозы, одновременно уменьшая риск гипогликемии и/или увеличения веса по сравнению с существующими способами лечения. Частота гипогликемии, вызванная терапией диабетом, которая агонизирует рецептор инсулина, может быть сведена к минимуму, избегая быстрого всплеска в концентрации терапевтического агента после введения. Слитые белки согласно данному изобретению имеют расширенный профиль действия во времени без быстрого всплеска концентрации после введения.

Кроме того, в вариантах реализации изобретения, в которых слитые белки согласно данному изобретению предоставляются в комбинации с другим активным ингредиентом, в частности с агонистом GLP-1R, гепатопреференционная активность слитых белков согласно данному изобретению также может снизить риск гипогликемии при контроле уровня глюкозы. Поскольку слитый белок согласно данному изобретению может легко получить доступ к печени через фенестрованный синусоидный эндотелий, молекула

может контролировать выработку глюкозы в печени, при небольшой активности, если таковая имеется, на периферии, тогда как агонист GLP-1R способствует глюкозозависимой секреции эндогенного инсулина из поджелудочной железы, который легко способен проникать на периферию, чтобы контролировать поглощение глюкозы в мышцах и жире.

Слитые белки согласно данному изобретению вводят парентерально, путем назального введения или легочной ингаляции. Парентеральное введение является предпочтительным и может включать, например, системное введение, такое как внутримышечное, внутривенное, подкожное или внутривентральное введение.

Слитые белки могут вводиться субъекту в фармацевтической композиции, которая содержит слитый белок согласно данному изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент. Такие фармацевтические композиции обычно, хотя и не обязательно, парентеральны по своей природе и могут быть получены любым из множества способов с применением обычных эксципиентов для парентеральных продуктов, которые хорошо известны в данной области техники. См., например, Remington: the Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21<sup>st</sup> Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). Как описано выше, слитый белок согласно данному изобретению является гомодимером при экспрессии в клетках млекопитающих. Таким образом, при использовании в данном документе, термин «композиция, содержащая слитый белок» включает композицию, которая содержит гомодимер слитого белка. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция согласно данному изобретению включает композицию со слитым белком согласно данному изобретению, содержащуюся в концентрации, равной по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 20 мг/мл, по меньшей мере 25 мг/мл, по меньшей мере 30 мг/мл, по меньшей мере 35 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 55 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 65 мг/мл, по меньшей мере 75 мг/мл, по меньшей мере 100 мг/мл или более. В предпочтительных вариантах реализации изобретения слитый белок присутствует в концентрации, равной 10-100 мг/мл. В более предпочтительных вариантах реализации изобретения слитый белок присутствует в концентрации, равной 15-75 мг/мл, а в большинстве предпочтительных вариантов реализации изобретения слитый белок присутствует в концентрации, равной 20-65 мг/мл.

Термин «эксципиент» означает любое вещество, добавленное к композиции, отличное от слитого белка или любого другого дополнительного активного ингредиента(ов). Примеры таких эксципиентов, которые могут быть применены в композициях согласно данному изобретению, включают буферные агенты, поверхностно-активные вещества, агенты изотоничности и консерванты.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция согласно данному изобретению включает один или более буферных агентов для контроля pH композиции. «Буферный агент» представляет собой вещество, которое сопротивляется изменениям pH под действием его компонентов на основе кислотно-основного конъюгата. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция согласно данному изобретению имеет pH от около 5,5 до около 8,0, предпочтительно от около 6,0 до около 7,4, более предпочтительно от около 6,0 до 6,75. Буферные агенты, пригодные для регулирования pH композиций согласно данному изобретению в требуемом диапазоне, включают, но не ограничиваются ими, такие агенты, как фосфат, ацетат, цитрат или их кислоты, аргинин, TRIS и гистидиновые буферы, а также их комбинации. «TRIS» относится к 2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиолу и к любой его фармакологически приемлемой соли. Свободное основание и гидрохлорид (т.е. TRIS-HCl) являются двумя распространенными формами TRIS. TRIS также известен в данной области как триметилолминометан, трометамин и трис(гидроксиметил)аминометан. Предпочтительными буферными агентами в композиции согласно данному изобретению являются цитрат или лимонная кислота и фосфат.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции согласно данному изобретению содержат один или более агентов изотоничности для сведения к минимуму боли при инъекции из-за набухания клеток или разрыва клеток. «Агент изотоничности» представляет собой соединение, которое физиологически переносится и придает подходящую тоничность составу для предотвращения собственно потока воды через клеточные мембраны, которые находятся в контакте с введенной фармацевтической композицией. Известные агенты изотоничности включают глицерин, соли, такие как хлорид натрия и моносахариды, включая, но не ограничиваясь ими, маннит, декстрозу и лактозу. Предпочтительным агентом (агентами) изотоничности являются маннит и хлорид натрия.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции согласно данному изобретению содержат поверхностно-активное вещество. «Поверхностно-активное

вещество» представляет собой вещество, которое снижает поверхностное натяжение жидкости. Примеры поверхностно-активных веществ, используемых в фармацевтических композициях и которые могут быть применены в некоторых композициях согласно данному изобретению, включают полисорбат 20, полисорбат 80, полиэтиленгликоли (например, PEG 400, PEG 3000, TRITON X-100), алкиловые эфиры полиэтиленгликоли (например, BRIJ), полипропиленгликоли, блок-сополимеры (например, полуксамер, PLURONIC F68, полуксамер 407, PLURONIC F127, TETRONICS), сложные эфиры сорбитана (например, SPAN), полиэтиоксилированное касторовое масло (например, KOLLIPHOR, CREMOPHOR) и трегалозу.

Фармацевтические композиции согласно данному изобретению могут также содержать консервант. Термин «консервант» относится к соединению, добавленному в фармацевтический состав, чтобы действовать как антимикробный агент в многофазовых и/или титруемых композициях. Среди консервантов, известных в данной области техники как эффективные и приемлемые в парентеральных составах, являются бензалконийхлорид, бензетоний, хлоргексидин, фенол, м-крезол, бензиловый спирт, метил- или пропилпарабен, хлорбутанол, о-крезол, п-крезол, хлоркрезол, фенолмеркурический нитрат, тимеросал, бензойную кислоту и различные их смеси. Фенольный консервант включает фенольные соединения, м-крезол, о-крезол, п-крезол, хлоркрезол, метилпарабен и их смеси. Если необходим консервант, то консервант, используемый в композициях согласно данному изобретению, предпочтительно представляет собой фенольный консервант, предпочтительно либо м-крезол, либо фенол.

Известно, что некоторые фенольные консерванты, такие как фенол и м-крезол, связываются с инсулином и гексамерами инсулина и тем самым стабилизируют конформационное изменение, которое увеличивает либо физическую, либо химическую стабильность, или и то, и другое. Однако в композициях, содержащих другие белки, такие консерванты могут способствовать образованию белковых агрегатов или высокомолекулярных полимеров (HMWP). См., например, Maa YF and Hsu CC, *Int J Pharm* 140: 155–168 (1996); Fransson J, et al., *Pharm. Res.*, 14: 606–612 (1997); Lam XM, et al., *Pharm. Res.*, 14: 725–729 (1997); Remmele RL Jr, et al., *Pharm Res* 15: 200–208. (1998); Thirumangalathu R, et al., *J Pharm Sci* 95: 1480–1497 (2006). Такие белковые агрегаты в терапевтических составах нежелательны из-за их тенденции индуцировать иммунный ответ.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность слитого белка согласно данному изобретению оптимизирована для повышения физической стабильности слитого белка в композициях, которые также содержат фенольный консервант. Например, авторы данного изобретения неожиданно обнаружили, что присутствие мутации аминокислоты в положении 10 в аналоге А-цепи инсулина (переменная X<sub>1</sub> в аналоге А-цепи инсулина, приведенной в SEQ ID NO 2), уменьшает накопление агрегатов слитого белка в присутствии фенольных консервантов, как показано в исследованиях стабильности ниже.

Изобретение далее иллюстрируется следующими примерами, которые не должны рассматриваться как ограничивающие.

### **Экспрессия и очистка слитых белков**

Слитые белки согласно данному изобретению продуцируются в экспрессионной системе млекопитающих с использованием клеточной линии CHO (GSKO) с нокаутной глутаминсинтетазой (GS). Нокаут гена GS обеспечивает жесткую строгость отбора путем устранения эндогенной фоновой активности GS, которая может позволить выживание низко- или непроизводительных клеток в условиях отбора. Гены, кодирующие слитые белки, субклонированы в экспрессионную плазмиду, содержащую глутаминсинтетазу (GS). Последовательность кДНК, кодирующая слитые белки, слита в рамке считывания с кодирующей последовательностью сигнального пептида, которая усиливает секрецию слитого белка в клеточную культуральную среду. Экспрессия управляется промотором цитомегаловируса (CMV). Клетки CHO GSKO стабильно трансфицируют с использованием электропорации и соответствующего количества рекомбинантной экспрессионной плазмиды.

Трансфицированные клетки подвергаются массовому отбору в безглутаминовых средах. Трансфицированные пулы засевали с низкой плотностью, чтобы обеспечить близкий к клональному рост устойчивых экспрессирующих клеток. Маточные планшеты скринируют на экспрессию слитого белка и масштабируют в суспензионных бессывороточных культурах, которые будут использоваться для производства.

Слитые белки, секретлируемые в среду, могут быть очищены с помощью аффинной хроматографии на белках с последующей эксклюзионной хроматографией по размеру после стандартных хроматографических методов. Вкратце, слитые белки из осветленных сред захватывают Mab Select Protein A (GE), который забуферен фосфатным буферным раствором с pH 7,4. После стадии промывки фосфатным буферным раствором с pH 7,4,

связанные слитые белки элюируют 10 мМ лимонной кислотой, рН 3,0. Фракции, содержащие слитый белок, объединяют и нейтрализуют добавлением 1/10 объема 1М Tris рН 8,0. Растворимые агрегаты и мультимеры могут быть эффективно удалены по общепринятым методикам, включая исключение размера, гидрофобное взаимодействие или ионообменную хроматографию. Фракции, содержащие мономерный слитый белок (ковалентно связанный гомодимер), как определено методом эксклюзионной хроматографии, объединяют, стерильно фильтруют и сохраняют.

Ниже приведены аминокислотные последовательности иллюстративных слитых белков согласно данному изобретению:

**Пример 1:**

```

      10          20          30          40          50          60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG
      70          80          90         100         110         120
GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
      130         140         150         160         170         180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDNLNGKEYKCKVSNKG
      190         200         210         220         230         240
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
      250         260         270         280         290
ENNYKTTTPMLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

(SEQ ID NO:12)

**Пример 2:**

```

      10          20          30          40          50          60
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCTSICSLYQLENYCGGGG
      70          80          90         100         110         120
GSGGGGSGGGGSESKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
      130         140         150         160         170         180
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQQDNLNGKEYKCKVSNK
      190         200         210         220         230         240
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
      250         260         270         280         290
PENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

```

(SEQ ID NO:16)

**Пример 3:**

```

      10          20          30          40          50          60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG
      70          80          90         100         110         120
GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
      130         140         150         160         170         180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQQDNLNGKEYKCKVS
      190         200         210         220         230         240
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

```

250 260 270 280 290 300  
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL  
 LG

(SEQ ID NO:17)

**Пример 4:**

10 20 30 40 50 60  
 FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGGG  
 70 80 90 100 110 120  
 GEGGGGEGGGGEGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE  
 130 140 150 160 170 180  
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP  
 190 200 210 220 230 240  
 APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
 250 260 270 280 290  
 NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO:18)

**Пример 5:**

10 20 30 40 50 60  
 FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG  
 70 80 90 100 110 120  
 GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
 130 140 150 160 170 180  
 DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS  
 190 200 210 220 230 240  
 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
 250 260 270 280 290 300  
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL  
 LG

(SEQ ID NO:19)

**Пример 6:**

10 20 30 40 50 60  
 FVGQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG  
 70 80 90 100 110 120  
 GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
 130 140 150 160 170 180  
 DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS  
 190 200 210 220 230 240  
 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
 250 260 270 280 290 300  
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL  
 LG



(SEQ ID NO:20)

**Пример 7:**

10	20	30	40	50	60
AGGQHL	CGSHL	VEALEL	VCGERG	FHYGGGG	GGGGGIVE
70	80	90	100	110	120
QGGGGQ	GGGGQ	GGGGGEC	PPCPAPP	VAGPSV	FLFPPKPK
130	140	150	160	170	180
DPEVQ	FNWY	VDGVEV	HNAKTK	PREEQ	FNSTFRV
190	200	210	220	230	240
APIEKT	ISKTKG	QPREPQ	VYTLPP	SREEMTK	NQVSLT
250	260	270	280	290	
NYKTT	PPMLD	SDGS	FFLY	SKLTV	DKSRWQ

(SEQ ID NO 21)

**Пример 8**

10	20	30	40	50	60
FVNQHL	CGSHL	VEALEL	VCGERG	FHYTPKT	GGSGGGG
70	80	90	100	110	120
GGQGGG	QGGGGQ	GGGGGEC	PPCPAPP	VAGPSV	FLFPPKPK
130	140	150	160	170	180
HEDPEV	QFNWY	VDGVEV	HNAKTK	PREEQ	FNSTFRV
190	200	210	220	230	240
LPAPIE	KTISKTKG	QPREPQ	VYTLPP	SREEMTK	NQVSLT
250	260	270	280	290	
ENNYKT	TPMLD	SDGS	FFLY	SKLTV	DKSRWQ

(SEQ ID NO 22)

**Пример 9**

10	20	30	40	50	60
FVNQHL	CGSHL	VEALEL	VCGERG	FFYTEET	GGGGGGG
70	80	90	100	110	120
GSGGGG	SGGGG	SGGGGSEC	PPCPAPP	VAGPSV	FLFPPKPK
130	140	150	160	170	180
EDPEV	QFNWY	VDGVEV	HNAKTK	PREEQ	FNSTFRV
190	200	210	220	230	240
PAPIE	KTISKTKG	QPREPQ	VYTLPP	SREEMTK	NQVSLT
250	260	270	280	290	
NNYKT	TPMLD	SDGS	FFLY	SKLTV	DKSRWQ

(SEQ ID NO 23)

**Пример 10**

10	20	30	40	50	60
FVGQHL	CGSHL	VEALEL	VCGERG	FHYGGGG	GGGGGIVE
70	80	90	100	110	120
GGQGGG	QGGGGQ	GGGGGEC	PPCPAPP	VAGPSV	FLFPPKPK
130	140	150	160	170	180
HEDPEV	QFNWY	VDGVEV	HNAKTK	PREEQ	FNSTFRV

190 200 210 220 230 240  
 LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
 250 260 270 280 290  
 ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
 (SEQ ID NO 24)

### **Активность *in vitro***

Испытуемые партии примеров 1-3, 5 и 9 получают в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS, pH 7,4) или 10 mM цитратном буфере (pH 6,5) и хранят при 4 °C. Биосинтетический человеческий инсулин (Eli Lilly and Company) готовят в 0,01 N HCl и хранят в виде замороженных аликвот или готовят в приготовленной смеси, содержащей m-крезол, цинк, хлорид натрия и буфер TRIS (pH 7,3) при 100 единиц/мл и хранят при 4 °C.

Аффинности слитых белков определяют в анализах связывания с рецепторами, выполненных на мембранах P1, полученных из стабильно трансфицированных клеток 293EBNA (293НЕК человеческих эмбриональных клеток почки, экспрессирующих EBNA-1), надэкспрессирующих или изоформу А рецептора инсулина человека (hIR-A) или изоформу В рецептора инсулина человека (hIR-B), содержащую метку эпитопа С9 на С-конце. Аффинности связывания определяют по конкурентному анализу связывания радиолиганда, проводимому в стационарном режиме с использованием рекомбинантного инсулина (3-[<sup>125</sup>I]-йодтирозил-А<sup>14</sup>) человека. Значения для тестовых образцов рассчитываются как процент по отношению к активности немеченого инсулина человека. Значения IC<sub>50</sub> определяются из 4-параметрического логистического нелинейного регрессионного анализа (XLFit версии 4.0, IDBS). При необходимости параметры верхней или нижней кривых устанавливаются на 100 или 0 соответственно.

Константа средства (K<sub>i</sub>) вычисляется по значению IC<sub>50</sub>, основанному на уравнении  $K_i = IC_{50}/(1+D/K_d)$ , где D равно концентрации радиолиганда, используемого в эксперименте, и K<sub>d</sub> равно равновесной константе аффинности связывания радиолиганд для его родственного рецептора, определенный из анализа связывания насыщения (hIR-A = 0,205 нМ, hIR-B = 0,251 нМ). Представленные значения для K<sub>i</sub> показаны как геометрическое среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM), с количеством повторных определений, обозначенных «n» (таблица 1).

Иллюстративные слитые белки имеют средство как с hIR-A, так и с hIR-B. По сравнению с инсулином человека, приведенные в качестве примера слитые белки демонстрируют снижение аффинности связывания с hIR-A и hIR-B (Таблица 1).

Таблица 1:

Образец	Аффинность связывание рецептора, $K_i$ , нМ (SEM, n)	
	hIR-A	hIR-B
Пример 1	24,9 (4,3, n=10)	26,2 (4,3, n=10)
Пример 2	1,61 (0,06, n=3)	4,60 (0,86, n=3)
Пример 3	10,1 (1,5, n=4)	14,5 (2,3, n=4)
Пример 5	35,6 (10,4, n=4)	24,6 (3,4, n=4)
Пример 9	3,74 (1,20, n=2)	4,71 (1,78, n=2)
Инсулин человека	0,166 (0,008, n=10)	0,202 (0,007, n=10)

Значения  $K_i$  являются средними геометрическими. SEM представляет собой стандартную ошибку среднего значения. n представляет собой количество наблюдений.

### Исследования *in vivo*

#### **Исследования в крысиной модели с диабетом, леченным стрептозотоцином (STZ)**

Эффекты слитых белков исследуются в крысиной модели с STZ-леченым диабетом. Самцы крыс Спрэг-Дули, 400-425 грамм массы тела, обезболиваются изофлураном и получают единственную инъекцию Zanosar<sup>®</sup> (STZ № 89256, парентеральные лекарственные средства Teva, 40 мг/кг IV). Крыс используют в исследованиях через 3 суток после инъекции Zanosar<sup>®</sup>; в этих исследованиях используются только животные с уровнем глюкозы в крови натощак между 400-550 мг/дл.

Крыс распределяют по группам, чтобы обеспечить сопоставимую дисперсию глюкозы в крови и массы тела, а затем рандомизируют. Уровень глюкозы в крови измеряется с помощью глюкометра Accucheck Aviva (Roche). STZ-леченым крысам давали одну подкожную (SC) инъекционную дозу 30 нмоль/кг.

Образцы крови для измерений уровня глюкозы собирают путем надреза хвоста. У животных есть свободный доступ к еде и воде на протяжении всего эксперимента. Данные о глюкозе в крови представлены на Фиг. 1. Данные, представленные на Фиг. 1, являются средним  $\pm$  SEM (n = 6 для примеров 1 и 8, n = 3 для остальных примеров). Данные о глюкозе крови для временных точек в течение начального периода кормления (от 0 до 24 часов) собраны, но не показаны на Фиг. 1 для удобства визуального представления. Как показано на Фиг. 1, примеры 1-10 каждый обеспечивают снижение уровня глюкозы в течение длительного периода времени.

Фармакокинетические свойства примеров 1, 3-6 и 9-10 также характеризуются после подкожной (СК) дозировкой у STZ-леченых крыс, как описано выше. Данные

генерируются с использованием анализа ИФА рецептора инсулина, который требует наличия инсулина, который способен связывать рецептор инсулина. ИФА рецептора инсулина использует человеческий рецептор инсулина (R&D Systems № 1544-IR/CF aa28-944) в качестве захвата. Рецептор инсулина человека прикрепляют к пластинке Immulon 4 НВХ при помощи анти-6x HisTag антитела мыши (Novagen 70796). Стандартная кривая слитого белка и образцы разбавлялись в 100% -ной крысиной КЗ ЭДТА плазме и детектировались при помощи мышиного анти-человеческого Fc IgG с пероксидазой хрена (SouthernBiotech 9040-05). Концентрации примеров 3-6 и 9-10 в момент времени 336 часов составляют от 22,1 до 9,8 мг/мл и  $1498 \pm 690$  мг/мл. В Таблице 3 показаны концентрации примера 1 с течением времени, а в таблице 4 показаны фармакокинетические параметры после нечастичного анализа данных для примера 1. Данные поддерживают длительную продолжительность биодоступности для слитых белков согласно данному изобретению.

Таблица 3

Время (часы)	Концентрация (мг/мл)
1	$335 \pm 104$
6	$3559 \pm 447$
12	$5991 \pm 1578$
24	$10614 \pm 1334$
48	$12629 \pm 1811$
96	$8766 \pm 2028$
168	$5017 \pm 253$
240	$3682 \pm 509$
336	$2014 \pm 134$

Данные представляют среднее и стандартное отклонение  $n = 3$ .

Таблица 4

Параметр РК	Результат
$AUC_{0-\infty}$ (мкг*ч/мл)	$1066 \pm 363$
$C_{max}$ (мкг/мл)	$6,81 \pm 1,62$
$T_{max}$ (ч)	$40 \pm 14$
CL или CL/F (мл/ч/кг)	$2,15 \pm 0,91$
$t_{1/2}$ (ч)	$82 \pm 12$
%F	147

Данные представляют среднее и стандартное отклонение  $n = 3$ . Сокращения:  $AUC_{0-\infty}$  – область под кривой от 0 до бесконечности,  $C_{max}$  – максимальная концентрация,  $T_{max}$  –

время при максимальной концентрации, CL – клиренс, F – биодоступность,  $t_{1/2}$  – полувыведение.

### **Эугликемический клэмп-метод исследования у нормальных крыс**

Исследование с помощью эугликемического клэмп-метода у самцов крыс Спрэг-Доули проводится для понимания общей активности *in vivo* примера 1 при утилизации глюкозы и определения активности примера 1 в печени и периферических тканях. Болюсная/непрерывная инфузия  $3\text{-}^3\text{H}$ -глюкозы инициируется у хронически катетеризированных крыс, голодающих ночью, для определения эндогенной продукции глюкозы (EGP) в базальных условиях. Болюсная/непрерывная внутривенная инфузия испытуемого изделия  $-7\text{ нм/кг}$  [болюсная] и  $1\text{ нмоль/кг/ч}$  [непрерывная скорость] - или компаратор инсулина лизпро - [не болюсная] и  $0,75\text{ мЕд/кг/мин}$  [непрерывная скорость] - тогда вводится переменная внутривенная инфузия 20% глюкозы и периодически корректируется для поддержания концентрации глюкозы в крови на уровне 100-110 мг/дл. Скорость болюсной инъекции/инфузии выбирают для достижения сравнимых скоростей инфузии глюкозы (GIR) и сравнимого подавления EGP в условиях эугликемического клэмпа в каждой группе. Соматостатин вводят для ингибирования эндогенной секреции инсулина. Во время эксперимента получены образцы артериальной крови для мониторинга гематокрита, плазменного инсулина и свободных жирных кислот, С-пептида и базального и клэмпового EGP. В конце эксперимента вводят 2-  $[1\text{-}^{14}\text{C}]$  -дезоксиглюкозу для измерения поглощения глюкозы в ткани в условиях равновесных концентраций глюкозы. В этих равновесных условиях периферическая активность испытуемого изделия и компараторов анализируется как поглощение глюкозы в камбаловидной мышце и подавление свободных жирных кислот (FFA). Все данные анализируются с использованием одностороннего анализа дисперсии с *post-hoc* критерием Даннета, использующего группу инсулина лизпро в качестве контрольного компаратора.

Болюсные и инфузионные дозы из примера 1 приводят к устойчивой концентрации в плазме  $274 \pm 57\text{ нМ}$  в течение клэмп-эксперимента. Как показано в таблице 5, обе группы животных достигают сопоставимого GIR во время клэмп-фазы эксперимента. Средний уровень глюкозы в крови в группе примера 1 несколько выше, чем у группы инсулина лизпро. Обе группы имеют сходные базовые и фиксированные уровни EGP (таблица 5). Кроме того, процентное изменение от основного EGP в группе примера 1 сравнимо с контрольной группой лизпро инсулина (таблица 5). Для оценки периферической активности при эквивалентных клэмп-условиях измеряют подавление

FFA плазмы и поглощение глюкозы мышцы. В то время как инсулин лизпро приводил к снижению уровней FFA в плазме в ходе клэмп-эксперимента, в примере 1 этого не произошло. (Таблица 5). Кроме того, инфузия примера 1 приводит к 33% -ному снижению поглощения глюкозы в камбаловидной мышце по сравнению с инсулином лизпро. (Таблица 5). В совокупности эти данные показывают, что в примере 1 показана уменьшенная периферическая активность по сравнению с инсулином лизпро.

**Таблица 5:**

	<b>Инсулин лизпро</b>	<b>Пример 1</b>
Глюкоза в крови (мг/дл)	106,3 ± 2,2	111,8 ± 1,2 *
GIR (мг/кг/мин)	4,71 ± 0,46	4,72 ± 0,13
Скорость EGP (мг/кг/мин)	Базальный	5,062 ± 0,141
	Клэмп	3,607 ± 0,241
% Изменения от базового EGP	-29,3 ± 3,5	-30,1 ± 2,5
% Подавление FFA в плазме от базального	-14,5 ± 4,1	9,9 ± 2,4 *
Rg (мкмоль/100 мг/мин)	11,34 ± 1,73	7,66 ± 1,38

Значения показаны как среднее ± SEM 13 животных для инсулина лизпро и 17 животных для примера 1. Rg = индекс метаболизма глюкозы. Статистический анализ был завершён однофакторным ANOVA (дисперсионным анализом) с последующим post-hoc тестом Даннета. \* = Значительно отличается от инсулина лизпро (p < 0,05).

### **Эффективность *in vivo* у яванских макаков**

Параметры фармакокинетики (PK) из примера 1 оценивают после однократной внутривенной дозы 1,5 нмоль/кг и одной подкожной дозы 3 нмоль/кг у яванских макаков. Образцы плазмы для анализа PK собирали от трех животных на группу/способ введения в течение 3 недель. Для исследования PK используются два анализа: ИФА инсулинового рецептора и общий ИФА Fc IgG. ИФА рецептора инсулина использует человеческий рецептор инсулина (R&D Systems1544-IR/CF) в качестве захвата. Рецептор инсулина человека прикрепляют к пластинке Immunlon 4 HBX при помощи анти-HisTag антитела мыши (Novagen 70796). Стандартная кривая примера 1 и образцы разбавлялись в 100% плазме яванского макака (антикоагулянт был К3 ЭДТА) и детектировались при помощи мышиного анти-человеческого Fc IgG с пероксидазой хрена (SouthernBiotech 9040-05). В общем ИФА IgG в качестве реагента для захвата использовали анти-человеческий IgG<sub>2</sub> (Abcam ab1933). Пример 1 разводили в 100% плазме яванского макака, а антитело для

детекции было таким же, как и в ИФА рецептора инсулина. Результаты обоих анализов представлены в таблице 6, а соответствующие параметры РК представлены в таблице 7. Пример 1 демонстрирует полную биодоступность у обезьян, а активный анализ на инсулин и общий анализ Fc дают аналогичные результаты.

**Таблица 6. РК примера 1 у нормальных яванских макаков.**

Время (часы)	Концентрация ± SD (нг/мл)			
	ИФА рецептора инсулина		ИФА общего Fc	
	в/в	SC	в/в	SC
	1,5 нмоль/кг	3,0 нмоль/кг	1,5 нмоль/кг	3,0 нмоль/кг
0,083	1213 ± 212	НП	2190 ± 1369	НП
1	1172 ± 182	<43,75 ± НР	1708 ± 1219	<43,75 ± НР
3	863 ± 114	87 ± 25	798 ± НР	92 ± 22
6	726 ± 119	272 ± 31	688 ± 96	209 ± 116
12	576 ± 88	579 ± 78	457 ± 178	409 ± 145
24	422 ± 67	788 ± 69	332 ± 95	685 ± 359
48	299 ± 39	805 ± 55	260 ± 19	802 ± 64
72	219 ± 42	651 ± 83	199 ± 34	770 ± 83
96	173 ± 26	544 ± 89	159 ± 25	703 ± 390
120	146 ± 28	452 ± 55	152 ± 27	574 ± 160
168	83 ± 13	289 ± 54	126 ± НР	395 ± 70
216	48 ± НР	183 ± 44	99 ± НР	208 ± 123
240	<43,75 ± НР	145 ± 25	80 ± НР	242 ± НР
336	<43,75 ± НР	63 ± НР	47 ± НР	НР
504	<43,75 ± НР	<43,75 ± НР	<43,75 ± НР	<43,75 ± НР

Данные представляют среднее и стандартное отклонение от n = 3. Сокращения: в/в = внутривенное; SD = стандартное отклонение; НР = не рассчитано

**Таблица 7. Параметры РК, полученные из нечастичного анализа данных в таблице 6.**

	ИФА рецептора инсулина		ИФА общего Fc	
	в/в	SC	в/в	SC
Доза (нмоль/кг)	1,5	3,0	1,5	3,0
AUC <sub>0-∞</sub> (мкг*ч/мл)	51,1 ± 6,4	127 ± 7	62,7 ± 5,8	171 ± 17
C <sub>max</sub> (мкг/мл)	1,22 ± 0,22	0,82 ± 0,06	2,24 ± 1,38	0,90 ± 0,21
T <sub>max</sub> (ч)	0	48 ± 24	0	64 ± 28
CL или CL/F (мл/ч/кг)	1,99 ± 0,24	1,59 ± 0,09	1,61 ± 0,15	1,19 ± 0,11
T <sub>1/2</sub> (ч)	61 ± 9	70 ± 2	127 ± 18	148 ± 53
V <sub>ss</sub> (мл/кг)	164 ± 31	НР	256 ± 47	НР
%F	НР	125	НР	136

Данные представляют среднее и стандартное отклонение от n = 3. Сокращения: AUC<sub>0-inf</sub> – область под кривой от 0 до бесконечности, C<sub>max</sub> – максимальная концентрация (для в/в

введения  $C_{\max}$  представляет собой экстраполированную концентрацию во время 0),  $T_{\max}$  – время при максимальной концентрации, CL – клиренс, F – биодоступность,  $t_{1/2}$  – полувыведение,  $V_{ss}$  – установившийся объем распределения, НП – непригодный.

### **Стабильность**

#### **Неконсервированный состав «65 мг/мл» примера 1**

Пример 1 готовили в форме «65 мг/мл» в 10 мМ цитрате, 46,4 мг/мл маннита, 0,02% полисорбата 80, pH 6,5 и хранили при 30 °С. Образцы анализировали на процент высокомолекулярных агрегатов при помощи эксклюзионной хроматографии (SEC) на 0, 2 и 4 недели путем введения 1 мкл образца «65 мг/мл». Аналитическую SEC выполняли на системе Agilent 1100, оборудованной колонкой TSKgel SuperSW3000 (Tosoh Bioscience) и 50 мМ фосфатом натрия, 300 мМ NaCl, pH 7,0 подвижной фазой, протекающей со скоростью 0,4 мл/мин в течение 15 минут. Пики обнаруживали при поглощении 280 нм и хроматограммы анализировали с использованием программного обеспечения ChemStation. Процент высокомолекулярных агрегатов в нулевой момент времени равен 1,13%, в то время как на вторую неделю составляет 1,68%, а на четвертую неделю - 1,74%. Эти результаты подтверждают стабильность примера 1 при концентрации 65 мг/мл при минимальном росте растворимого агрегата через 4 недели при 30 °С.

#### **Консервированные и неконсервированные составы «1 мг/мл» примеров 1 и 3**

Примеры 1 и 3 готовили в форме 1 мг/мл в 10 мМ цитрате, pH 6,5, в присутствии или в отсутствие 30 мМ м-крезола, и хранили при 30 °С. Образцы анализируют на процент высокомолекулярных агрегатов при помощи эксклюзионной хроматографии (SEC) в нулевой момент времени и на 2 неделю путем инъекции 10 мкл образца «1 мг/мл». Аналитическую SEC выполняли на системе Agilent 1100, оборудованной колонкой TSKgel G3000SWxl (Tosoh Bioscience) и PBS + 350 мМ NaCl, подвижной фазой pH 7,4, протекающей со скоростью 0,5 мл/мин в течение 35 минут или 45 минут для образцов в отсутствие или в присутствии м-крезола, соответственно. Пики обнаруживали при поглощении 214 нм и хроматограммы анализировали с использованием программного обеспечения ChemStation. Для примера 3 без и с м-крезолом процент высокомолекулярных агрегатов в нулевой момент времени равен 0,2% и 3,06% соответственно. Процент высокомолекулярных агрегатов через 2 недели без и с м-крезолом составлял 0,2% и 1,73% соответственно. Эти результаты показывают немедленное увеличение растворимого агрегата после добавления м-крезола для примера 3 в нулевой момент времени. Для примера 1 в отсутствие и присутствии м-крезола



процент высокомолекулярных агрегатов в нулевой момент времени составлял 0,16% и 0,15% соответственно. Процент высокомолекулярных агрегатов через 2 недели в отсутствие и присутствии м-крезола составлял 0,18% и 0,31% соответственно. Эти результаты демонстрируют стабильность примера 1 в присутствии консерванта, который включает модификацию аминокислоты в положении 10 в аналоге А-цепи инсулина (переменная X<sub>1</sub> в SEQ ID NO 2 – Z<sub>3</sub> в первом слитом белке описанном выше) до остатка Т относительно примера 3, который содержит остаток нативного I в этом положении, но который в остальном содержит такую же аминокислотную последовательность агониста рецептора инсулина, как в примере 1.

**Последовательности****SEQ ID NO 1 – Аналог В-цепи инсулина**

X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>QHLCGSHLVEALX<sub>4</sub>LVCGERGFX<sub>5</sub>YX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>

где X<sub>1</sub> представляет собой F, Q или A; X<sub>2</sub> представляет собой V или G; X<sub>3</sub> представляет собой N, K, D, G, Q, A или E; X<sub>4</sub> представляет собой E, Y, Q, или H; X<sub>5</sub> представляет собой H или F; X<sub>6</sub> представляет собой G, T, S, H, V или отсутствует; X<sub>7</sub> представляет собой G, E, P, K, D, S, H или отсутствует; X<sub>8</sub> представляет собой G, E, K, P, Q, D, H или отсутствует; X<sub>9</sub> представляет собой G, T, S, E, K, A или отсутствует, при условии, что аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub>

**SEQ ID NO 2 – Аналог А-цепи инсулина**

GIVEQCCTSX<sub>1</sub>CSLX<sub>2</sub>QLENYCX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>

X<sub>1</sub> представляет собой T или I; X<sub>2</sub> представляет собой D, Y, Q или E; X<sub>3</sub> представляет собой G, N, S или A; и X<sub>4</sub> предлагает собой любую встречающуюся в природе аминокислоту или отсутствует, при условии, что если X<sub>3</sub> представляет собой N, когда X<sub>4</sub> должен представлять собой аминокислоту, отличную от G или N

**SEQ ID NO 3 - Первый пептидный линкер**

X<sub>1</sub>GX<sub>2</sub>GGGG, где X<sub>1</sub> представляет собой G или отсутствует; и X<sub>2</sub> представляет собой G, S или отсутствует

**SEQ ID NO 4 - Агонист рецептора инсулина**

X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>QHLCGSHLVEALX<sub>4</sub>LVCGERGFX<sub>5</sub>YX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>GX<sub>11</sub>GGGGGIVEQCCTSX<sub>12</sub>CSLX<sub>13</sub>QLENYCX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>

где X<sub>1</sub> представляет собой F, Q или A; X<sub>2</sub> представляет собой V или G; X<sub>3</sub> представляет собой N, K, D, G, Q, A или E; X<sub>4</sub> представляет собой E, Y, Q или H; X<sub>5</sub> представляет собой H или F; X<sub>6</sub> представляет собой G, T, S, H, V или отсутствует; X<sub>7</sub> представляет собой G, E, P, K, D, S, H или отсутствует; X<sub>8</sub> представляет собой G, E, K, P, Q, D, H или отсутствует; X<sub>9</sub> представляет собой G, T, S, E, K, A или отсутствует; X<sub>10</sub> представляет собой G или отсутствует; X<sub>11</sub> представляет собой G, S или отсутствует; X<sub>12</sub> представляет собой T или I; X<sub>13</sub> представляет собой D, Y, Q или E; X<sub>14</sub> представляет собой G, N, S или A; и X<sub>15</sub>

представляет собой любую встречающуюся в природе аминокислоту, или отсутствует, при условии, что по меньшей мере один из X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub> или X<sub>9</sub> должен представлять собой другую аминокислоту, чем обнаруженная, соответственно, в положении В<sub>16</sub>, В<sub>25</sub>, В<sub>27</sub>, В<sub>28</sub>, В<sub>29</sub> или В<sub>30</sub> В-цепи молекулы инсулина человека и, кроме того, при условии, что если X<sub>14</sub> представляет собой N, тогда X<sub>15</sub> должен представлять собой аминокислоту, отличную от G или N

**SEQ ID NO 5 - Агонист рецептора инсулина**

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFGHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCG

**SEQ ID NO 6 - Второй пептидный линкер**

GGGGX<sub>1</sub>GGGGX<sub>2</sub>GGGGX<sub>3</sub>GGGGX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>

где X<sub>1</sub> представляет собой Q или E; X<sub>2</sub> представляет собой Q или E; X<sub>3</sub> представляет собой Q или E; X<sub>4</sub> представляет собой G, E, Q или отсутствует; X<sub>5</sub> представляет собой G или отсутствует; и X<sub>6</sub> представляет собой G или отсутствует

**SEQ ID NO 7 - Второй пептидный линкер**

GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG

**SEQ ID NO 8 – Fc-участок IgG человека**

CPPCPAPELLGGPSVX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>PPKPKDTLMISRTPEVTCX<sub>3</sub>VX<sub>4</sub>DVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYX<sub>5</sub>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX<sub>6</sub>

где X<sub>1</sub> представляет собой F, Q или E; X<sub>2</sub> представляет собой F, Q или E; X<sub>3</sub> представляет собой V или T; X<sub>4</sub> представляет собой V или T; X<sub>5</sub> представляет собой N, D или Q; и X<sub>6</sub> представляет собой K или отсутствует

**SEQ ID NO 9 – Fc-участок IgG человека**

PCPPCPAPEAAGGPSVX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>PPKPKDTLMISRTPEVTCX<sub>3</sub>VX<sub>4</sub>DVSQEDPEVQFNWYVDG  
VEVHNAKTKPREEQFX<sub>5</sub>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA  
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
DSDGSFFLYSX<sub>6</sub>LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLXLGX<sub>7</sub>

где X<sub>1</sub> представляет собой F, Q или E; X<sub>2</sub> представляет собой F, Q или E; X<sub>3</sub> представляет собой V или T; X<sub>4</sub> представляет собой V или T; X<sub>5</sub> представляет собой N, D или Q; X<sub>6</sub> представляет собой R или K; X<sub>7</sub> представляет собой K или отсутствует

**SEQ ID NO 10 – Fc-участок IgG человека**

ECPPCPAPPVAGPSVX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>PPKPKDTLMISRTPEVTCX<sub>3</sub>VX<sub>4</sub>DVSHEDPEVQFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQFX<sub>5</sub>STFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK  
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX<sub>6</sub>

где X<sub>1</sub> представляет собой F, Q или E; X<sub>2</sub> представляет собой F, Q или E; X<sub>3</sub> представляет собой V или T; X<sub>4</sub> представляет собой V или T; X<sub>5</sub> представляет собой N, D или Q; и X<sub>6</sub> представляет собой K или отсутствует

**SEQ ID NO 11 - Слитый белок**

X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>QHLCGSHLVEALX<sub>4</sub>LVCGERGFX<sub>5</sub>YX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>GX<sub>11</sub>GGGGGIVEQCCTSX<sub>12</sub>CSLX<sub>13</sub>QL  
ENYCX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GGGGX<sub>16</sub>GGGGX<sub>17</sub>GGGGX<sub>18</sub>GGGGX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>CPPCPAPX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>AGX<sub>25</sub>PSVFLFP  
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVX<sub>26</sub>EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTX<sub>27</sub>RVVSVL  
TVX<sub>28</sub>HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>IEKTIISKX<sub>31</sub>KGQPREPQVYTLPPSX<sub>32</sub>EEMTKNQVS  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX<sub>33</sub>LDS DGSFFLYSX<sub>34</sub>LTVDKSRWQX<sub>35</sub>GNVFS  
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSX<sub>36</sub>G

где X<sub>1</sub> представляет собой F, Q или A; X<sub>2</sub> представляет собой V или G; X<sub>3</sub> представляет собой N, K, D, G, Q, A или E; X<sub>4</sub> представляет собой E, Y, Q, или H; X<sub>5</sub> представляет собой H или F; X<sub>6</sub> представляет собой G, T, S, H, V или отсутствует; X<sub>7</sub> представляет собой G, E, P, K, D, S, H или отсутствует; X<sub>8</sub> представляет собой G, E, K, P, Q, D, H или отсутствует; X<sub>9</sub> представляет собой G, T, S, E, K, A или отсутствует, при условии, что по меньшей мере один из X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, или X<sub>9</sub> представляет собой аминокислоту, отличную от той, которая присутствует, соответственно, в положении B<sub>16</sub>, B<sub>25</sub>, B<sub>27</sub>, B<sub>28</sub>, B<sub>29</sub> или B<sub>30</sub> В-цепи инсулина человека; X<sub>10</sub> представляет собой G или отсутствует; X<sub>11</sub> представляет собой G, S или отсутствует; X<sub>12</sub> представляет собой T или I; X<sub>13</sub> представляет собой D, Y, Q или E; X<sub>14</sub> представляет собой G, N, S или A; X<sub>15</sub> представляет собой любую встречающуюся в природе аминокислоту, или отсутствует, при условии, что если X<sub>14</sub> представляет собой N, тогда X<sub>15</sub> должен представлять собой аминокислоту, отличную от G или N; X<sub>16</sub> представляет собой Q или E; X<sub>17</sub> представляет собой Q или E;

X<sub>18</sub> представляет собой Q или E; X<sub>19</sub> представляет собой G, E, Q или отсутствует; X<sub>20</sub> представляет собой G или отсутствует; X<sub>21</sub> представляет собой G или отсутствует; X<sub>22</sub> представляет собой E или P; X<sub>23</sub> представляет собой E или P; X<sub>24</sub> представляет собой A или V; X<sub>25</sub> представляет собой G или отсутствует; X<sub>26</sub> представляет собой Q или H; X<sub>27</sub> представляет собой Y или F; X<sub>28</sub> представляет собой L или V; X<sub>29</sub> представляет собой S или A; X<sub>30</sub> представляет собой S или P; X<sub>31</sub> представляет собой A или T; X<sub>32</sub> представляет собой Q или R; X<sub>33</sub> представляет собой V или M; X<sub>34</sub> представляет собой R или K; X<sub>35</sub> представляет собой E или Q и X<sub>36</sub> представляет собой L или P

**SEQ ID NO 12 - Слитый белок**

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS					
130	140	150	160	170	180
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG					
190	200	210	220	230	240
LPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP					
250	260	270	280	290	
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG					

**SEQ ID NO 13 - А-цепь инсулина человека**

GIVEQCCTSICSLYQLENYCN

**SEQ ID NO 14 - В-цепь инсулина человека**

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT

**SEQ ID NO 15 - Первый пептидный линкер**

GGSGGGG

**SEQ ID NO 16 - Слитый белок**

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEETGGGGGGGIVEQCCTSICSLYQLENYCGGGG					
70	80	90	100	110	120
GSGGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV					
130	140	150	160	170	180
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK					
190	200	210	220	230	240
GLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ					
250	260	270	280	290	
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG					

**SEQ ID NO 17 - Слитый белок**

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV					
130	140	150	160	170	180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS					
190	200	210	220	230	240
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN					
250	260	270	280	290	300
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS					

LG

**SEQ ID NO 18 - Слитый белок**

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGGG					
70	80	90	100	110	120
GEGGGGEGGGGEGGGGEGCPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE					
130	140	150	160	170	180
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP					
190	200	210	220	230	240
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN					
250	260	270	280	290	
NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG					

**SEQ ID NO 19 - Слитый белок**

10	20	30	40	50	60
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV					
130	140	150	160	170	180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS					
190	200	210	220	230	240
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN					
250	260	270	280	290	300
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS					

LG

**SEQ ID NO 20 - Слитый белок**

10	20	30	40	50	60
FVGQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGG					
70	80	90	100	110	120
GGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV					
130	140	150	160	170	180
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS					
190	200	210	220	230	240
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN					

250 260 270 280 290 300  
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSL  
 LG

**SEQ ID NO 21 - Слитый белок**

10 20 30 40 50 60  
 AGGQHLGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGIVEQCCTSICSLDQLENYCGGGG  
 70 80 90 100 110 120  
 GQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH  
 130 140 150 160 170 180  
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP  
 190 200 210 220 230 240  
 APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
 250 260 270 280 290  
 NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

**SEQ ID NO 22 - Слитый белок**

10 20 30 40 50 60  
 FVNQHLGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTTGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG  
 70 80 90 100 110 120  
 GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH  
 130 140 150 160 170 180  
 HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL  
 190 200 210 220 230 240  
 LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
 250 260 270 280 290  
 ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

**SEQ ID NO 23 - Слитый белок**

10 20 30 40 50 60  
 FVNQHLGSHLVEALELVCGERGFFYTEETGGGGGGGGGIVEQCCTSICSLYQLENYCGGGG  
 70 80 90 100 110 120  
 GSGGGGSGGGGGSGGGGSECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH  
 130 140 150 160 170 180  
 EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL  
 190 200 210 220 230 240  
 PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
 250 260 270 280 290  
 NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

**SEQ ID NO 24 - Слитый белок**

10 20 30 40 50 60  
 FVGQHLGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENYCGGG  
 70 80 90 100 110 120  
 GGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH  
 130 140 150 160 170 180  
 HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL

190 200 210 220 230 240  
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
250 260 270 280 290  
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG

**SEQ ID NO 25 – GLP-1**

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG



## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Эли Лилли энд Компани

<120> СЛИТЫЕ БЕЛКИ

<130> X20356

<150> 62/158079

<151> 2015-05-07

<160> 25

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Хаа в позиции 1 представляет собой Phe, Gln или Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Хаа в позиции 2 представляет собой Val или Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Хаа в позиции 3 представляет собой Asn, Lys, Asp, Gly, Gln, Ala или Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Хаа в позиции 16 представляет собой Glu, Tyr, Gln или His

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> Хаа в позиции 25 представляет собой His или Phe

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Хаа в позиции 27 представляет собой Gly, Thr, Ser, His, Val, или отсутствует

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Хаа в позиции 28 представляет собой Gly, Glu, Pro, Lys, Asp, Ser, His, или отсутствует

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa в позиции 29 представляет собой Gly, Glu, Lys, Pro, Gln, Asp, His, или отсутствует

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa в позиции 30 представляет собой Gly, Thr, Ser, Glu, Lys, Ala, или отсутствует

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa  
20 25 30

<210> 2

<211> 22

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa в позиции 10 представляет собой Thr или Ile

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa в позиции 14 представляет собой Asp, Tyr, Gln или Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa в позиции 21 представляет собой Gly, Asn, Ser, или Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa в позиции 22 представляет собой любую встречающуюся в природе аминокислоту или отсутствует

<400> 2

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Xaa Cys Ser Leu Xaa Gln Leu  
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Xaa Xaa  
20

<210> 3

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Хаа в позиции 1 представляет собой Gly или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Хаа в позиции 3 представляет собой Gly, Ser, или отсутствует

<400> 3

Хаа Gly Хаа Gly Gly Gly Gly  
1 5

<210> 4  
<211> 59  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Хаа в позиции 1 представляет собой Phe, Gln, или Ala

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Хаа в позиции 2 представляет собой Val или Gly

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Хаа в позиции 3 представляет собой Asn, Lys, Asp, Gly, Gln, Ala, или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(16)  
<223> Хаа в позиции 16 представляет собой Glu, Tyr, Gln, или His

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (25)..(25)  
<223> Хаа в позиции 25 представляет собой His или Phe

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (27)..(27)  
<223> Хаа в позиции 27 представляет собой Gly, Thr, Ser, His, Val, или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (28)..(28)

<223> Хаа в позиции 28 представляет собой Gly, Glu, Pro, Lys, Asp, Ser, His, или отсутствует

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Хаа в позиции 29 представляет собой Gly, Glu, Lys, Pro, Gln, Asp, His, или отсутствует

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Хаа в позиции 30 представляет собой Gly, Thr, Ser, Glu, Lys, Ala, или отсутствует

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Хаа в позиции 31 представляет собой Gly или отсутствует

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> Хаа в позиции 33 представляет собой Gly, Ser, или отсутствует

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (47)..(47)

<223> Хаа в позиции 47 представляет собой Thr или Ile

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (51)..(51)

<223> Хаа в позиции 51 представляет собой Asp, Tyr, Gln, или Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (58)..(58)

<223> Хаа в позиции 58 представляет собой Gly, Asn, Ser, или Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (59)..(59)

<223> Хаа в позиции 59 представляет собой любую встречающуюся в природе аминокислоту или отсутствует

<400> 4

Xaa Xaa Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Gly  
20 25 30

Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Xaa Cys  
35 40 45

Ser Leu Xaa Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Xaa Xaa  
50 55

<210> 5  
<211> 58  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 5

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys  
35 40 45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly  
50 55

<210> 6  
<211> 22  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Хаа в позиции 5 представляет собой Gln или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
<223> Хаа в позиции 10 представляет собой Gln или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (15)..(15)  
<223> Хаа в позиции 15 представляет собой Gln или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (20)..(20)  
<223> Хаа в позиции 20 представляет собой Gly, Glu, Gln, или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (21)..(21)  
<223> Хаа в позиции 21 представляет собой Gly или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (22)..(22)  
<223> Хаа в позиции 21 представляет собой Gly или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (22)..(22)  
<223> Хаа в позиции 22 представляет собой Gly или отсутствует

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Хаа Gly Gly Gly Gly Хаа Gly Gly Gly Gly Хаа Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Хаа Хаа Хаа  
20

<210> 7  
<211> 20  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly  
20

<210> 8  
<211> 222  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(16)  
<223> Хаа в позиции 16 представляет собой Phe, Gln или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (18)..(18)  
<223> Хаа в позиции 18 представляет собой Phe, Gln или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (37)..(37)  
<223> Хаа в позиции 37 представляет собой Val или Thr

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (39)..(39)  
<223> Хаа в позиции 39 представляет собой Val или Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (72)..(72)  
 <223> Xaa в позиции 72 представляет собой Asn, Asp или Gln  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (222)..(222)  
 <223> Xaa в позиции 222 представляет собой Lys или отсутствует  
  
 <400> 8  
  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Xaa  
 1 5 10 15  
  
 Leu Xaa Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 20 25 30  
  
 Glu Val Thr Cys Xaa Val Xaa Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 35 40 45  
  
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 50 55 60  
  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Xaa Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 65 70 75 80  
  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 85 90 95  
  
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 100 105 110  
  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 115 120 125  
  
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 130 135 140  
  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 145 150 155 160  
  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 165 170 175  
  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 180 185 190  
  
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 195 200 205  
  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa

210

215

220

<210> 9  
 <211> 223  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая конструкция

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Хаа в позиции 17 представляет собой Phe, Gln или Glu

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Хаа в позиции 19 представляет собой Phe, Gln или Glu

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (38)..(38)  
 <223> Хаа в позиции 38 представляет собой Val или Thr

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Хаа в позиции 40 представляет собой Val или Thr

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (73)..(73)  
 <223> Хаа в позиции 73 представляет собой Asn, Asp или Gln

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (185)..(185)  
 <223> Хаа в позиции 185 представляет собой Arg или Lys

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (223)..(223)  
 <223> Хаа в позиции 223 представляет собой Lys или отсутствует

<400> 9

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
 1 5 10 15

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

Pro Glu Val Thr Cys Xaa Val Xaa Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
 35 40 45

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10  
<211> 222  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(16)  
<223> Xaa в позиции 16 представляет собой Phe, Gln, или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (18)..(18)  
<223> Xaa в позиции 18 представляет собой Phe, Gln, или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (37)..(37)  
<223> Xaa в позиции 37 представляет собой Val или Thr

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 <223> Xaa в позиции 39 представляет собой Val или Thr

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (72)..(72)  
 <223> Xaa в позиции 72 представляет собой Asn, Asp, или Gln

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (222)..(222)  
 <223> Xaa в позиции 222 представляет собой Lys или отсутствует

<400> 10

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Xaa  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11  
<211> 303  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa в позиции 1 представляет собой Phe, Gln, или Ala

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa в позиции 2 представляет собой Val или Gly

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa в позиции 3 представляет собой Asn, Lys, Asp, Gly, Gln, Ala, или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(16)  
<223> Xaa в позиции 16 представляет собой Glu, Tyr, Gln, или His

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (25)..(25)  
<223> Xaa в позиции 25 представляет собой His или Phe

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (27)..(27)  
<223> Xaa в позиции 27 представляет собой Gly, Thr, Ser, His, Val, или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (28)..(28)  
<223> Xaa в позиции 28 представляет собой Gly, Glu, Pro, Lys, Asp, Ser, His, или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (29)..(29)  
<223> Xaa в позиции 29 представляет собой Gly, Glu, Lys, Pro, Gln, Asp, His, или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE

<222> (30)..(30)  
<223> Хаа в позиции 30 представляет собой Gly, Thr, Ser, Glu, Lys, Ala, или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (31)..(31)  
<223> Хаа в позиции 31 представляет собой Gly, или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (33)..(33)  
<223> Хаа в позиции 33 представляет собой Gly, Ser, или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (47)..(47)  
<223> Хаа в позиции 47 представляет собой Thr или Ile

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (51)..(51)  
<223> Хаа в позиции 51 представляет собой Asp, Tyr, Gln, или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (58)..(58)  
<223> Хаа в позиции 58 представляет собой Gly, Asn, Ser или Ala

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (59)..(59)  
<223> Хаа в позиции 59 представляет собой любую встречающуюся в природе аминокислоту или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (64)..(64)  
<223> Хаа в позиции 64 представляет собой Gln или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (69)..(69)  
<223> Хаа в позиции 69 представляет собой Gln или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (74)..(74)  
<223> Хаа в позиции 74 представляет собой Gln или Glu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (79)..(79)  
<223> Хаа в позиции 79 представляет собой Gly, Glu, Gln, или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (80)..(80)  
<223> Хаа в позиции 80 представляет собой Gly или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (81)..(81)  
<223> Хаа в позиции 81 представляет собой Gly или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (82)..(82)  
<223> Хаа в позиции 82 представляет собой Glu или Pro

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (90)..(90)  
<223> Хаа в позиции 90 представляет собой Glu или Pro

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (91)..(91)  
<223> Хаа в позиции 91 представляет собой Ala and Val

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (94)..(94)  
<223> Хаа в позиции 94 представляет собой Gly или отсутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (125)..(125)  
<223> Хаа в позиции 125 представляет собой Gln или His

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (157)..(157)  
<223> Хаа в позиции 157 представляет собой Tyr или Phe

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (166)..(166)  
<223> Хаа в позиции 166 представляет собой Leu или Val

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (187)..(187)  
<223> Хаа в позиции 187 представляет собой Ser или Ala

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (188)..(188)  
<223> Хаа в позиции 188 представляет собой Ser или Pro

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (196)..(196)  
<223> Хаа в позиции 196 представляет собой Ala или Thr

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (212)..(212)  
<223> Хаа в позиции 212 представляет собой Gln или Arg

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (254)..(254)  
<223> Хаа в позиции 254 представляет собой Val или Met

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (266)..(266)

<223> Xaa в позиции 266 представляет собой Arg или Lys

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (276)..(276)

<223> Xaa в позиции 276 представляет собой Glu или Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (302)..(302)

<223> Xaa в позиции 302 представляет собой Leu или Pro

<400> 11

Xaa Xaa Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly  
20 25 30

Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Xaa Cys  
35 40 45

Ser Leu Xaa Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Xaa Xaa Gly Gly Gly Gly Xaa  
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Gly Xaa Xaa  
65 70 75 80

Xaa Xaa Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Xaa Xaa Ala Gly Xaa Pro Ser  
85 90 95

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
100 105 110

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Xaa Glu Asp Pro  
115 120 125

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
130 135 140

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Xaa Arg Val Val  
145 150 155 160

Ser Val Leu Thr Val Xaa His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
165 170 175

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Xaa Xaa Ile Glu Lys Thr  
180 185 190

Ile Ser Lys Xaa Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
195 200 205

Pro Pro Ser Xaa Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
210 215 220

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
225 230 235 240

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Xaa Leu Asp  
245 250 255

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Xaa Leu Thr Val Asp Lys Ser  
260 265 270

Arg Trp Gln Xaa Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
275 280 285

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Xaa Gly  
290 295 300

<210> 12

<211> 299

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 12

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys  
35 40 45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly  
50 55 60

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gly Glu Cys  
65 70 75 80

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
85 90 95

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
115 120 125

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
130 135 140

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
145 150 155 160

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
165 170 175

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr  
180 185 190

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

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
210 215 220

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
225 230 235 240

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
245 250 255

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
260 265 270

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
275 280 285

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
290 295

<210> 13

<211> 21

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn  
20

<210> 14



<211> 30  
<212> БЕЛОК  
<213> Homo sapiens

<400> 14

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr  
20 25 30

<210> 15  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
1 5

<210> 16  
<211> 300  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 16

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Glu Glu Thr Gly Gly  
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser  
35 40 45

Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys  
65 70 75 80

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
85 90 95

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
100 105 110

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
115 120 125

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
130 135 140

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
145 150 155 160

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
165 170 175

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
180 185 190

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
195 200 205

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
210 215 220

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
225 230 235 240

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
260 265 270

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
275 280 285

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
290 295 300

<210> 17

<211> 302

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 17

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
 20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys  
 35 40 45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly  
 50 55 60

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly  
 65 70 75 80

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
 85 90 95

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 100 105 110

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
 115 120 125

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 130 135 140

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 145 150 155 160

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 165 170 175

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 180 185 190

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 195 200 205

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 210 215 220

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 225 230 235 240

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 245 250 255

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 260 265 270

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
275 280 285

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
290 295 300

<210> 18

<211> 297

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 18

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser  
35 40 45

Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Glu Gly Gly  
50 55 60

Gly Gly Glu Gly Gly Gly Gly Glu Gly Gly Gly Gly Glu Cys Pro Pro  
65 70 75 80

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp  
115 120 125

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

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val  
145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
165 170 175

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly  
180 185 190

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
225 230 235 240

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

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
290 295

<210> 19

<211> 302

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 19

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys  
35 40 45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly  
50 55 60

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly  
65 70 75 80

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
85 90 95

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
100 105 110

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
115 120 125

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
130 135 140

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
145 150 155 160

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
165 170 175

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
180 185 190

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
195 200 205

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
210 215 220

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
225 230 235 240

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
245 250 255

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
260 265 270

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
275 280 285

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
290 295 300

<210> 20

<211> 302

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 20

Phe Val Gly Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
 20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys  
 35 40 45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly  
 50 55 60

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly  
 65 70 75 80

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
 85 90 95

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 100 105 110

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
 115 120 125

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 130 135 140

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 145 150 155 160

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 165 170 175

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 180 185 190

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 195 200 205

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 210 215 220

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 225 230 235 240

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 245 250 255

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 260 265 270

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
275 280 285

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
290 295 300

<210> 21

<211> 297

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 21

Ala Gly Gly Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser  
35 40 45

Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly  
50 55 60

Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Glu Cys Pro Pro  
65 70 75 80

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp  
115 120 125

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

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val  
145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
165 170 175



Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly  
180 185 190

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
225 230 235 240

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

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
290 295

<210> 22

<211> 299

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 22

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys Thr Gly Gly  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys  
35 40 45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly  
50 55 60

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gly Glu Cys  
65 70 75 80

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
85 90 95

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
115 120 125

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
130 135 140

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
145 150 155 160

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
165 170 175

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr  
180 185 190

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

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
210 215 220

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
225 230 235 240

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
245 250 255

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
260 265 270

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
275 280 285

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
290 295

<210> 23  
<211> 298  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 23

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
275 280 285

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
290 295

<210> 24

<211> 299

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 24

Phe Val Gly Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Thr Cys  
35 40 45

Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gln Gly  
50 55 60

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gly Glu Cys  
65 70 75 80

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
85 90 95

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
115 120 125

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
130 135 140

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
145 150 155 160

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
165 170 175

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr  
180 185 190

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

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
210 215 220

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
225 230 235 240

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
245 250 255

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
260 265 270

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
275 280 285

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
290 295

<210> 25  
<211> 31  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<400> 25

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

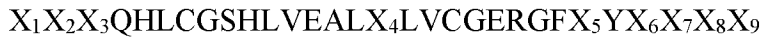
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
20 25 30

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий:

a) агонист рецептора инсулина, имеющий общую формулу  $Z_1$ - $Z_2$ - $Z_3$ , где

i)  $Z_1$  представляет собой аналог В-цепи инсулина, содержащий аминокислотную последовательность:



где  $X_1$  представляет собой F, Q или A;  $X_2$  представляет собой V или G;  $X_3$  представляет собой N, K, D, G, Q, A или E;  $X_4$  представляет собой E, Y, Q, или H;  $X_5$  представляет собой H или F;  $X_6$  представляет собой G, T, S, H, V или отсутствует;  $X_7$  представляет собой G, E, P, K, D, S, H или отсутствует;  $X_8$  представляет собой G, E, K, P, Q, D, H или отсутствует;  $X_9$  представляет собой G, T, S, E, K, A или отсутствует, при условии, что аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи молекулы инсулина человека в  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_6$ ,  $X_7$ ,  $X_8$  или  $X_9$  (SEQ ID NO: 1);

ii)  $Z_2$  представляет собой первый пептидный линкер, содержащий от 5 до 10 аминокислот, причем по меньшей мере 5 из указанных аминокислот представляют собой остатки G; и

iii)  $Z_3$  представляет собой аналог А-цепи инсулина, содержащий аминокислотную последовательность:



где  $X_1$  представляет собой T или I;  $X_2$  представляет собой D, Y, Q или E;  $X_3$  представляет собой G, N, S или A; и  $X_4$  представляет собой любую встречающуюся в природе аминокислоту или отсутствует, при условии, что если  $X_3$  представляет собой N, то  $X_4$  должен представлять собой аминокислоту, отличную от G или N (SEQ ID NO: 2);

b) второй пептидный линкер; и

c) Fc-участок IgG человека;

где С-концевой остаток агониста рецептора инсулина непосредственно слит с N-концевым остатком второго пептидного линкера, а С-концевой остаток второго

пептидного линкера непосредственно слит с N-концевым остатком Fc-участка IgG человека.

2. Слитый белок по п. 1, отличающийся тем что:

аналог В-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности В-цепи инсулина человека в положении X<sub>4</sub> или X<sub>5</sub> последовательности SEQ ID NO: 1; и

аналог А-цепи инсулина содержит по меньшей мере одну модификацию из аминокислотной последовательности А-цепи инсулина человека в положении X<sub>1</sub> или X<sub>2</sub> последовательности SEQ ID NO: 2.

3. Слитый белок по пп. 1 или 2, отличающийся тем что:

аналог В-цепи инсулина содержит последовательность SEQ ID NO: 1, где: X<sub>1</sub> представляет собой F; X<sub>2</sub> представляет собой V; X<sub>3</sub> представляет собой N или D; X<sub>4</sub> представляет собой E; X<sub>5</sub> представляет собой H; и

аналог А-цепи инсулина содержит последовательность SEQ ID NO: 2, где: X<sub>1</sub> представляет собой I или T; X<sub>2</sub> представляет собой D; X<sub>3</sub> представляет собой G; и X<sub>4</sub> отсутствует.

4. Слитый белок по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что аналог В-цепи инсулина содержит последовательность SEQ ID NO: 1, где X<sub>6</sub>-X<sub>9</sub> каждый представляет собой G.

5. Слитый белок по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что первый пептидный линкер содержит следующую аминокислотную последовательность:

X<sub>1</sub>GX<sub>2</sub>GGGG

где X<sub>1</sub> представляет собой G или отсутствует; и X<sub>2</sub> представляет собой G, S или отсутствует (SEQ ID NO: 3).

6. Слитый белок по п. 5, отличающийся тем, что X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> последовательности SEQ ID NO: 3 представляют собой G и S, соответственно.

7. Слитый белок по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что агонист рецептора инсулина имеет следующую аминокислотную последовательность:

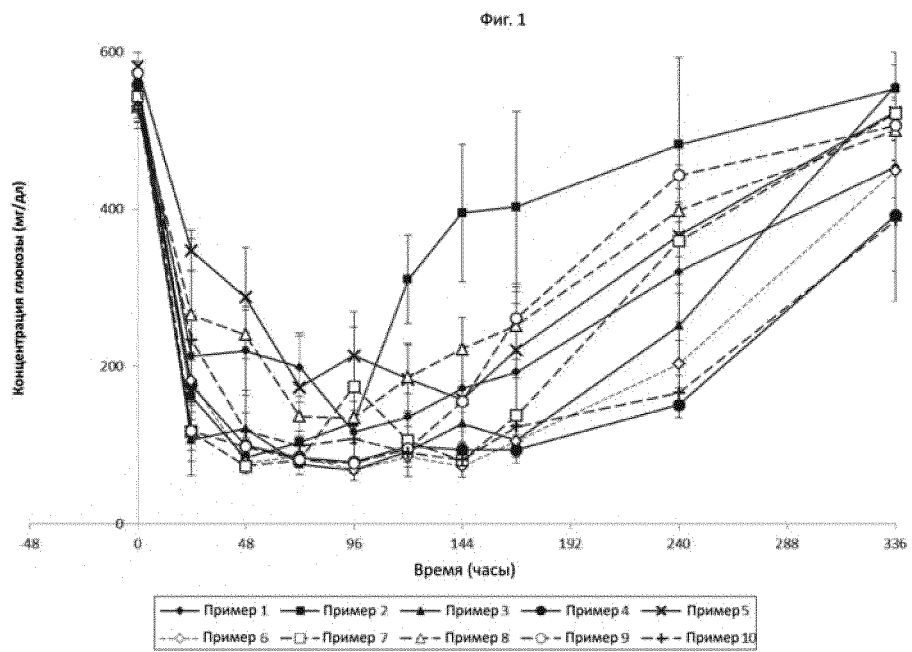
FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQLENY  
CG (SEQ ID NO: 5).

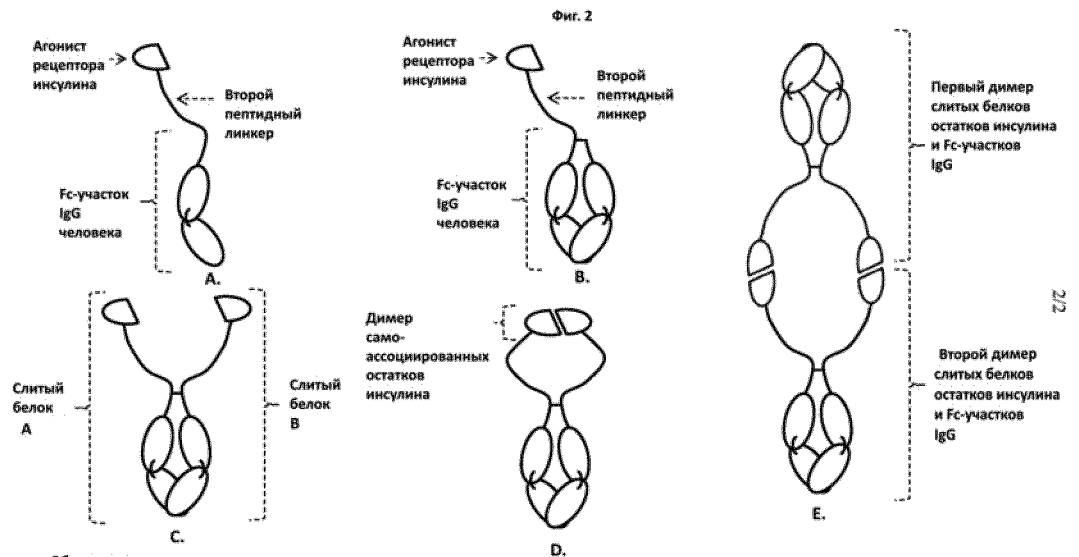
8. Слитый белок по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что второй пептидный линкер представляет собой пептид, содержащий от 10 до 25 аминокислот, причем по меньшей мере 50% указанных аминокислот представляют собой остатки G.
9. Слитый белок по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что второй пептидный линкер содержит пептид, имеющий последовательность [GGGGX]<sub>n</sub>  
где X представляет собой Q, E или S; и где n равен 2-5.
10. Слитый белок по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что второй пептидный линкер содержит следующую аминокислотную последовательность:  
GGGGX<sub>1</sub>GGGGX<sub>2</sub>GGGGX<sub>3</sub>GGGGX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>  
X<sub>1</sub> представляет собой Q или E  
X<sub>2</sub> представляет собой Q или E  
X<sub>3</sub> представляет собой Q или E  
X<sub>4</sub> представляет собой G, E, Q или отсутствует  
X<sub>5</sub> представляет собой G или отсутствует; и  
X<sub>6</sub> представляет собой G или отсутствует  
(SEQ ID NO: 6).
11. Слитый белок по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что второй пептидный линкер имеет следующую аминокислотную последовательность:  
GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG (SEQ ID NO: 7).
12. Слитый белок по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что Fc-участок IgG человека представляет собой Fc-участок из IgG1, IgG2 или IgG4.
13. Слитый белок по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что Fc-участок IgG человека содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.
14. Слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
15. Гомодимер двух слитых белков по любому из пп. 1-14.



16. Фармацевтическая композиция, содержащая или слитый белок по любому из пп. 1-14, или гомодимер по п. 15 и по меньшей мере один эксципиент.
17. Фармацевтическая композиция по п. 16, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит один или более буферных агентов, одно или более поверхностно-активных веществ и один или более агентов изотоничности.
18. Фармацевтическая композиция по п. 16, дополнительно содержащая цитрат, лимонную кислоту, полисорбат 80 и маннит.
19. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-18, отличающаяся тем, что рН составляет от около 5,5 до около 8,0.
20. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-19, отличающаяся тем, что рН составляет от около 6,0 до около 6,75.
21. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-20, дополнительно содержащая дополнительный активный ингредиент.
22. Фармацевтическая композиция по п. 21, отличающаяся тем, что дополнительный активный ингредиент представляет собой препарат на основе инкретина.
23. Фармацевтическая композиция по п. 23, отличающаяся тем, что препарат на основе инкретина представляет собой агонист GLP-1R.
24. Фармацевтическая композиция по п. 23, отличающаяся тем, что агонист GLP-1R представляет собой дулаглутид.
25. Фармацевтическая композиция, содержащая гомодимер по п. 15 и дулаглутид.
26. Способ лечения пациента, больного сахарным диабетом включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп. 1-14.
27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что слитый белок по любому из пп. 1-14 вводят в комбинации с дополнительным активным ингредиентом.
28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что дополнительный активный ингредиент представляет собой препарат на основе инкретина.
29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что препарат на основе инкретина представляет собой агонист GLP-1R.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что агонист GLP-1R представляет собой дулаглутид.
31. Способ лечения пациента, больного сахарным диабетом включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, гомодимера по п. 15 в комбинации с дулаглутидом.
32. Слитый белок по любому из пп. 1-14 для применения в терапии.
33. Слитый белок по любому из пп. 1-14 для применения при лечении сахарного диабета.
34. Слитый белок по любому из пп. 1-14 для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с дополнительным активным ингредиентом.
35. Слитый белок по любому из пп. 1-14 для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с дулаглутидом.
36. Гомодимер по п. 15 для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с дулаглутидом.
37. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп. 1-14.





**Обозначения:**

- A. Слитый белок, в котором Fc-участок IgG человека содержит Fc-участок из одной тяжелой цепи.
- B. Слитый белок, в котором Fc-участок IgG человека содержит Fc-участок из двух тяжелых цепей.
- C. Димер двух слитых белков.
- D. Димер двух слитых белков, в котором два остатка инсулина являются самоассоциированными или димеризованными.
- E. Димер двух димеров слитых белков, в котором два остатка инсулина димера первого слитого белка являются самоассоциированными или димеризованными с двумя остатками инсулина второго димера.