

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043603**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.05

(51) Int. Cl. **C07K 14/54 (2006.01)**

(21) Номер заявки
202191280

(22) Дата подачи заявки
2019.11.07

(54) **КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ДЛЯ ТРАНСЦИТОЗА И СВЯЗАННЫЕ СПОСОБЫ**

(31) **62/756,889; PCT/US2019/021474;
62/888,238; 62/888,133;
PCT/US2019/050708**

(56) **WO-A2-2015171965
WO-A1-2019173787**

(32) **2018.11.07; 2019.03.08; 2019.08.16;
2019.08.16; 2019.09.11**

(33) **US**

(43) **2021.12.27**

(86) **PCT/US2019/060356**

(87) **WO 2020/097394 2020.05.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭППЛАЙД МОЛЕКЬЮЛАР
ТРАНСПОРТ ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Порат Амир, Сето Эльберт, Олсон
Чарльз, Мрсни Рэндалл Дж., Махмуд
Тахир, Фэн Вэйцзюнь, Постлетуэйт
Салли (US)**

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

(57) Изобретение относится к не встречающимся в природе слитым молекулам, содержащим группы терапевтической полезной нагрузки, такой как PL-22, с носителем. Изобретение также относится к способам и композициям для получения, очистки, рефолдинга, формуляции и введения слитых молекул. Также изобретение относится к способам и применению очищенных молекул для лечения и профилактики заболеваний или расстройств.

B1

043603

043603

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 62/756889, поданной 7 ноября 2018 г., предварительной заявки на патент США № 62/888133, поданной 16 августа 2019 г., и предварительной заявки на патент США № 62/888238, поданной 16 августа, 2019 г., международной заявки № PCT/US 2019/050708, поданной 11 сентября 2019 г., и международной заявки № PCT/US 2019/021474, поданной 8 марта 2019 г., данные заявки в полном объеме включены здесь посредством ссылки.

Уровень техники

Кишечный эпителий мешает пероральному введению крупных терапевтических молекул, таких как белки, поскольку белки не могут диффундировать через неповрежденный эпителиальный барьер или преодолевать барьер через плотные соединения. Будучи захваченным эпителиальной клеткой, терапевтический белок может поступить на деструктивный лизосомальный транспортный путь или может высвободиться обратно в просвет кишечника. Такая неспособность легко переноситься через эпителий кишечника может представлять собой ограничивающий фактор при разработке коммерчески перспективных пероральных композиций, особенно для терапевтических средств на основе полипептидов.

Парентеральное введение, такое как внутривенное или подкожное введение, может служить решением данной проблемы, но при этих путях введения часто могут возникнуть значительные побочные эффекты, снижение терапевтической эффективности и снижение удобства для пациента, что может отрицательно повлиять на соблюдение режима лечения. Существует потребность в улучшенных композициях и способах транспорта терапевтических средств через эпителий, например эпителий кишечника.

Кроме того, очистка и рефолдинг биологически активных полипептидов с целью получения правильно свернутых, биологически активных и стабильных полипептидов с высокими выходами и с низким уровнем эндотоксинов по-прежнему считается одним из наиболее сложных аспектов для экономичного и ресурсоэффективного производства биологических терапевтических средств (например, полипептидов). Таким образом, также существует потребность в усовершенствованных способах получения (ферментация, рефолдинг, очистка и формуляция) таких биологически активных молекул.

Сущность изобретения

В различных аспектах настоящее изобретение относится к конструкции для доставки, содержащей аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с ней.

В различных аспектах настоящее изобретение относится к конструкции для доставки, содержащей носитель, состоящий из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях носитель связан с гетерологичной полезной нагрузкой. В некоторых случаях гетерологичной полезной нагрузкой является человеческий IL-22. В некоторых случаях человеческий IL-22 состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 11. В некоторых случаях носитель ковалентно или нековалентно связан с IL-22. В некоторых случаях носитель ковалентно связан с IL-22 через спейсер. В некоторых случаях спейсер состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 13. В некоторых случаях конструкция для доставки состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17.

Настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества конструкции для доставки, описанной здесь (например, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17). В некоторых случаях воспалительное заболевание представляет собой гепатит, ожирение, жировую болезнь печени, воспаление печени или панкреатит, болезнь Крона, язвенный колит, поухит, проктит, рассеянный склероз, системную красную волчанку, синдром "трансплантат против хозяина», ревматоидный артрит или псориаз. В некоторых случаях заболевание представляет собой болезнь Крона или язвенный колит.

В данном документе, в некоторых вариантах осуществления, описаны способы получения очищенного, не встречающегося в природе слитого белка, где способ включает проведение анионообменной хроматографии на смеси, содержащей не встречающийся в природе слитый белок, с получением первой фракции, содержащей не встречающийся в природе слитый белок; где не встречающийся в природе слитый белок включает IL-22 и носитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения проведение анионообменной хроматографии включает связывание не встречающегося в природе слитого белка с анионообменной смолой и обеспечение возрастающего солевого градиента для последующего элюирования не встречающегося в природе слитого белка с получением первой фракции. В некоторых вариантах осуществления проведение анионообменной хроматографии включает контактирование смеси со смолой, содержащей гранулы полиметакрилата, функционализированного амином. В некоторых вариантах осуществления смола представляет собой смолу NH₂-750F.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает рефолдинг не встречающегося в природе слитого белка перед проведением анионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления рефолдинг не встречающегося в природе слитого белка включает контактирование белка, солиобилизованного хаотропным агентом из телец включения, с раствором для рефолдинга, где раствор для рефолдинга содержит: аргинин (от 0,75 М до 1,25 М); глицерин (от 2 до 20% об./об.); цисте-

ин (от 0,5 до 10 мМ); и цистамин (от 0,2 до 10 мМ); где раствор для рефолдинга имеет рН от 7,5 до 8,5. В некоторых вариантах осуществления аргинин присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 0,9 М до 1,1 М; глицерин присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 7% до 13% (мас./мас); цистеин присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 1,5 до 6 мМ; цистамин присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 0,6 до 3 мМ; и раствор для рефолдинга имеет рН от 7,8 до 8,2.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает подвержение образца, содержащего первую фракцию, обработке на гидроксиапатитовой смоле с получением второй фракции, содержащей не встречающийся в природе слитый белок. В некоторых вариантах осуществления гидроксиапатитовая смола представляет собой гидроксиапатитовую смолу CaPure. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение катионообменной хроматографии на образце, содержащем первую фракцию. В некоторых вариантах осуществления проведение катионообменной хроматографии включает контактирование образца, содержащего первую фракцию, со смолой, содержащей гранулы полиметакрилата, функционализированного сульфатными группами. В некоторых вариантах осуществления смола представляет собой смолу TOYOPEARL Sulfate-650F.

В некоторых вариантах осуществления изобретения при контакте с клеткой носитель способствует эндоцитозу или трансцитозу неприродного слитого белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения при контакте с клеткой носитель способствует трансцитозу неприродного слитого белка. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эпителиальную клетку кишечника. В некоторых вариантах осуществления эпителиальная клетка кишечника представляет собой поляризованную эпителиальную клетку кишечника. В некоторых вариантах осуществления носитель представляет собой усеченный вариант встречающегося в природе или не встречающегося в природе полипептида Cholix. В некоторых вариантах осуществления носитель имеет по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 22 или 23. В некоторых вариантах осуществления не встречающийся в природе слитый белок имеет по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 14-21. В некоторых вариантах осуществления IL-22 имеет по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 10, 11 или 12.

В некоторых вариантах осуществления носитель сам имеет первую изоэлектрическую точку (pI), и IL-22 сам имеет вторую изоэлектрическую точку, где первая изоэлектрическая точка по меньшей мере на 1 единицу рН, по меньшей мере на 1,5 единицы рН, по меньшей мере на 1,7 единицы рН или, по меньшей мере на 2 единицы рН ниже второй изоэлектрической точки. Например, в некоторых вариантах осуществления носитель имеет pI от 4,8 до 5,4, от 4,9 до 5,3, от 5,0 до 5,2, например pI около 5,1. В некоторых вариантах осуществления изобретения pI IL-22 составляет примерно от 6,8 до 7,4, например, примерно от 6,9 до 7,3, примерно от 7,0 до 7,2, например, примерно 7,1. В некоторых вариантах осуществления не встречающийся в природе слитый белок получают любым из способов, описанных здесь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения здесь описаны способы рефолдинга неприродного слитого белка, содержащего носитель и IL-22, где способ включает: (i) контактирование телец включения, содержащих неприродный слитый белок, с раствором для сольubilизации, содержащем хаотропный агент, с получением растворимого не встречающегося в природе слитого белка; (iii) контактирование неприродного слитого белка с раствором для рефолдинга, где раствор для рефолдинга содержит: аргинин (от 0,75 М до 1,25 М); глицерин (от 2 до 20% об./об.); цистеин (от 0,5 мМ до 10 мМ); и цистамин (от 0,2 мМ до 10 мМ); где раствор для рефолдинга имеет рН от 7,5 до 8,5.

В некоторых вариантах осуществления аргинин присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 0,9 М до 1,1 М; глицерин присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 7 до 13% (мас./мас); цистеин присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 1,5 до 6 мМ; цистамин присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 0,6 до 3 мМ и раствор для рефолдинга имеет рН от 7,8 до 8,2.

Включение ссылок

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые здесь, включены здесь посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

Краткое описание фигур

Новые признаки изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено при обращении к следующему подробному описанию, где излагаются иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы раскрытия, и прилагаемым фигурам, где:

На фиг. 1 схематически показано устройство, содержащее апикальную камеру над монослоем эпителиальных клеток и базальную камеру под монослоем таких эпителиальных клеток. Для апикальной и базолатеральной проницаемости тестируемые объекты (например, конструкции для доставки, полезные нагрузки и т. д.) наносили на апикальную (А) сторону, и количество проникающего (например, трансци-

тозированного) материала определяли на базолатеральной (В) стороне.

На фиг. 2 показано, что конструкция для доставки (SEQ ID NO: 15), которая включает носитель (SEQ ID NO: 7), связанный с IL-22 (SEQ ID NO: 11) через спейсер (SEQ ID NO: 13), транспортировала полезную нагрузку IL-22 через интактные монослои поляризованных эпителиальных клеток кишечника Caco-2 в зависимости от времени (количество белка на базолатеральной стороне измеряли через 15, 30 и 45 мин после того, как конструкцию для доставки наносили на базальную мембрану монослоя, как показано выше на фиг. 1). Данные также показывают, что когда конструкцию для доставки с носителем SEQ ID NO: 7 и IL-22 (SEQ ID NO: 11) наносили на эпителиальные клетки Caco-2, то примерно в 2-3 раза больше IL-22 пересекало монослой эпителиальных клеток Caco-2 по сравнению с тем, когда IL-22 (SEQ ID NO: 12) не был связан с носителем.

На фиг. 3 показано, что конструкция для доставки (SEQ ID NO: 15) приводила к транспорту IL-22 (SEQ ID NO: 11) через монослой интактных и поляризованных эпителиальных клеток кишечника SMI-100 в зависимости от времени (количество белка в базолатеральной камере измеряли через 15, 30 и 45 мин после нанесения конструкции для доставки на базальную мембрану монослоя). Данные также показывают, что когда конструкцию для доставки, включающую носитель с SEQ ID NO: 7, связанный с IL-22 (SEQ ID NO: 11), наносили на эпителиальные клетки SMI-100, то примерно в 2-3 раза больше IL-22 пересекало через монослой эпителиальных клеток SMI-100 по сравнению с тем, когда IL-22 (SEQ ID NO: 12) не был связан с носителем.

На фиг. 4 показано, что конструкция для доставки (SEQ ID NO: 15), включающая носитель (SEQ ID NO: 7), связанный с IL-22 (SEQ ID NO: 11) через спейсер (SEQ ID NO: 13), приводила к транспорту IL-22 в значительных количествах через интактный и поляризованный эпителий кишечника *in vivo*. Апикальная сторона эпителия кишечника выделена белой стрелкой № 1. Собственная пластинка сокращенно обозначается как 1.p. Наружная базальная мембрана поляризованного эпителия выделена белой стрелкой № 2. Локализация IL-22 показана белой стрелкой № 3).

На фиг. 5А показано фосфорилирование STAT3 в мышинных В-клетках FL83 как функция концентрации агониста (в пМ), где агонист представляет собой рекомбинантный человеческий IL-22 (rhIL-22, SEQ ID NO: 12) или рекомбинантный мышинный IL-22 (rmIL-22);

MAVLQKSMFSMLMGTAAASCLLLIALWAQE
ANALPVNTRCKLEVSNFQPPYIVNRTFMLAKEASLADNNTDVRLLIGEKLFRGVSAKDQ
CYLMKQVLNFTLEDVLLPQSDRFQPYMQEVVFFLTKLSNQLSSCHISGDDQNIQKNVRR
LKETVKKLGESGEIKAIGELDLLFMRLRNACV (SEQ ID NO: 30).

Данные показывают, что rhIL-22 и rmIL-22 индуцируют фосфорилирование STAT3 в зависимости от концентрации, демонстрируя, что человеческий белок IL-22 может связываться и индуцировать передачу сигнала через рецепторы мышинного IL-22 так же эффективно, как и мышинный IL-22.

На фиг. 5В показано, что rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) и rmIL-22 также индуцировали фосфорилирование STAT3 в мышинных клетках Hepa1-6.

На фиг. 6А показано, что rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) и rmIL-22 индуцируют фосфорилирование STAT5 в мышинных В-клетках FL83 дозозависимым образом, демонстрируя, что человеческий белок IL-22 может связываться и индуцировать передачу сигнала через рецепторы мышинного IL-22 так же эффективно, как и мышинный IL-22.

На фиг. 6В показано, что rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) и rmIL-22 также индуцировали фосфорилирование STAT5 в мышинных клетках Hepa1-6.

На фиг. 7А представлен дизайн и временной график исследования *in vivo* с целью сравнения перорального (п/о) введения конструкции для доставки с SEQ ID NO: 15 в двух дозах, 1 мг/кг и 30 мг/кг, один раз в сутки и при введении rhIL-22 внутривентриально (в/б) в дозе 4 мг/кг один раз в сутки. Исследование *in vivo* проводили на самках мышей C57BL/6 в возрасте 8-10 недель, получавших стандартный корм, с массой тела ~ 23 г. Колит индуцировали химически с использованием 2,5% натрия декстрана сульфата (DSS) в питьевой воде, которую предоставляли животным *ad libitum*. Конечные точки исследования включали процентное изменение массы тела, индекса активности заболевания, длины и массы толстого кишечника, и данные гистопатологии.

На фиг. 7В показаны характеристики экспериментальной и контрольной групп, использованных в исследовании, показанном на фиг. 7А.

На фиг. 8А показано изменение массы тела животных в процентах (%) на сутки 10 исследования относительно с сутками 0 в различных опытных и контрольных группах. Изменение массы тела относительно исходного периода (сутки 0 против суток 10) для rhIL-22 с SEQ ID NO: 12 или конструкции для доставки с SEQ ID NO: 15 в сравнении с носителем не было статистически значимым при оценке однофакторным дисперсионным анализом. Положительный модельный контроль (циклоспорин) CsA достоверно отличался от носителя при оценке однофакторным дисперсионным анализом.

На фиг. 8В показано изменение массы тела опытных и контрольных животных в течение первых 10 суток исследования. Средняя масса тела в группе с CsA за период исследования была достоверно выше по сравнению с контрольным носителем в период с суток 6 по сутки 10, при оценке двухфакторным дисперсионным анализом (*, **, ***). Масса тела с rhIL-22 (в/б) была достоверно выше относительно кон-

трольного носителя на сутки 10 при оценке двухфакторным дисперсионным анализом (*), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

На фиг. 9 приведены результаты анализа плазмы с использованием ELISA для определения уровней IL-22 в плазме. Результаты показывают, что концентрации rhIL-22 в плазме имеют тенденцию к повышению в плазме после перорального введения доз 1 и 30 мг/кг конструкции для доставки с SEQ ID NO: 15 в зависимости от дозы (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; среднее \pm SEM; $n=2$ наивные, 5 носитель, 5 CsA, 10 другие).

На фиг. 10А показан дизайн исследования с введением однократной дозы *in vivo*, разработанный для идентификации биомаркера(ов) взаимодействия с мишенью после однократного (острого введения) rhIL-22 у здоровых мышей CD-1.

На фиг. 10В показан дизайн исследования *in vivo* с введением многократных доз (субхроническое введение), разработанный для идентификации биомаркера(ов) взаимодействия с мишенью после введения однократной дозы и многократных доз rhIL-22 у здоровых мышей CD-1.

На фиг. 11А показано, что острое и субхроническое введение rhIL-22 приводило к последовательному повышению концентрации IL-22.

На фиг. 11В приведены некоторые фармакокинетические параметры, определенные в экспериментах с острым и субхроническим введением, описанных на фиг. 11А.

На фиг. 12А показана ответная индуцированная концентрация циркулирующего мышинового С-реактивного белка (mCRP) на сутки 1 после острого введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) и через 5 суток субхронического введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12). Результаты показывают зависимость от времени увеличения циркулирующего mCRP в обеих опытных группах.

На фиг. 12В показано кратное изменение концентрации mCRP в плазме на 1 сутки после острого введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 12С показано кратное изменение концентрации mCRP в плазме через 5 суток субхронического введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 13А показана ответная индуцированная концентрация циркулирующего белка амилоида А (mSAA) в мышинной сыворотке на 1 сутки после однократного введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) и через 5 суток субхронического введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12). Результаты показывают зависимость от времени повышение циркулирующего mSAA в обеих опытных группах с примерными максимальными концентрациями в плазме примерно через 8 ч после введения.

На фиг. 13В показано кратное изменение концентрации mSAA в плазме на 1 сутки после острого введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 13С показывает кратное изменение концентрации mSAA в плазме через 5 суток субхронического введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 14А показана ответная индуцированная концентрация циркулирующего регенерирующего белка из островков Лангерганса 3β (Reg 3β) на 1 сутки после острого введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) и через 5 суток субхронического введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 14В показано кратное изменение концентрации Reg 3β в плазме на 1 сутки после однократного введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 14С показано кратное изменение концентрации Reg 3β в плазме через 5 суток субхронического введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 15 приведена блок-схема, показывающая, как улучшенная технологичность может сделать возможным перевод в клинику.

На фиг. 16 показано, что SEQ ID NO: 15 представляет собой гетерологичный слитый белок, содержащий домен носителя (SEQ ID NO: 7), связанный через спейсер (SEQ ID NO: 13) с интерлейкином-22 (IL-22, SEQ ID NO: 11). Гетерологичные слитые белки могут быть выделены в тельцах включения (IB) E. coli и, таким образом, требуется рефолдинг и/или очистка.

На фиг. 17 приведена блок-схема, обобщающая рефолдинг, очистку и формуляцию гетерологичных слитых белков, описанных здесь, например, таких как SEQ ID NO: 14-21, и слитых белков, содержащих носитель с SEQ ID NO: 1-9, 22, или 23.

На фиг. 18 показана итеративная оптимизация с целью повышения эффективности рефолдинга конструкции SEQ ID NO: 15.

На фиг. 19 приведена хроматограмма, полученная эксклюзионной хроматографией (SEC), показывающая сигнал оптимизированного повторно свернутого белка (SEQ ID NO: 15) и белковых агрегатов, имеющих более высокие молекулярные массы и, следовательно, более низкие значения времени удерживания.

На фиг. 20 приведен типичный SDS-PAGE начального и оптимизированного повторно свернутого белка (SEQ ID NO: 15).

На фиг. 21А-21В приведена хроматограмма, полученная эксклюзионной хроматографией, после очистки SEQ ID NO: 15 на первой колонке с использованием анионообменной смолы NH₂-750F. На фиг. 21А приведена хроматограмма, полученная эксклюзионной хроматографией, после очистки SEQ ID NO:

15 на первой колонке с использованием анионообменной смолы NH₂-750F с объемом колонки 10 мл и высотой слоя 20 см. На фиг. 21B приведена хроматограмма, полученная эксклюзионной хроматографией, после очистки SEQ ID NO: 15 на первой колонке с использованием анионообменной смолы NH₂-750F с объемом колонки 4,6 л и высотой слоя 30 см.

На фиг. 21A-21B приведена хроматограмма, полученная эксклюзионной хроматографией, после очистки SEQ ID NO: 15 на первой колонке с использованием анионообменной смолы NH₂-750F. На фиг. 21A приведена хроматограмма, полученная эксклюзионной хроматографией, после очистки SEQ ID NO: 15 на первой колонке с использованием анионообменной смолы NH₂-750F с объемом колонки 10 мл и высотой слоя 20 см. На фиг. 21B приведена хроматограмма, полученная эксклюзионной хроматографией, после очистки SEQ ID NO: 15 на первой колонке с использованием анионообменной смолы NH₂-750F с объемом колонки 4,6 л и высотой слоя 30 см.

На фиг. 22A-22B приведена хроматограмма, полученная эксклюзионной хроматографией, после очистки SEQ ID NO: 15 на второй колонке с использованием гидроксиапатитовой смолы CaPure®. На фиг. 22A приведена хроматограмма, полученная эксклюзионной хроматографией, после очистки SEQ ID NO: 15 на второй колонке с использованием гидроксиапатитовой смолы Ca⁺⁺ Pure с объемом колонки 5 мл, высотой слоя 10 см и градиентом 0-25% B, 25C. На фиг. 22B приведена хроматограмма, полученная эксклюзионной хроматографией, после очистки SEQ ID NO: 15 на второй колонке с использованием гидроксиапатитовой смолы CaPure® с объемом колонки 800 мл, высотой слоя 21 см и градиентом 0-25% B, 25CV. Для каждой фигуры приведен соответствующий SDS-PAGE образцов из различных фракций, элюированных со смолы CaPure®.

На фиг. 23A-23B приведена хроматограмма, полученная жидкостной хроматографией-масс-спектрофотометрией (ЖХ-МС), после очистки гетерологичных слитых белков. На фиг. 23A приведена хроматограмма, полученная ЖХ-МС, SEQ ID NO: 17. Пик 1 соответствует правильно повторно свернутому белку SEQ ID NO: 17. На фиг. 23B приведена хроматограмма, полученная ЖХ-МС, белка SEQ ID NO: 15. Пик 1 соответствует скорректированному повторно свернутому белку SEQ ID NO: 15. Пик 2 соответствует белку SEQ ID NO: 15 с отщепленным концевым метионином (показано в SEQ ID NO: 20). Пик 3 соответствует SEQ ID NO: 15 с отщепленным концевым метионином (показано в SEQ ID NO: 20) и ацелированием полученной N-концевой аминокислоты.

На фиг. 24 приведен дизайн исследования, использованный в примере 16, для оценки транспорта конструкции для доставки, имеющей последовательность SEQ ID NO: 15, через эпителий кишечника и в кровоток после пероральной (сокращенно обозначается здесь как P.O.) доставки конструкции.

На фиг. 25A-25B приведены графики, показывающие концентрацию IL-22 в плазме как функцию времени после введения конструкции для доставки SEQ ID NO: 15. На фиг. 25A показана общая концентрация IL-22 в плазме как функцию времени после введения конструкции для доставки SEQ ID NO: 15. На фиг. 25B показана концентрация IL-22BP в плазме как функцию времени после введения конструкции для доставки SEQ ID NO: 15.

На фиг. 26A (носитель) и фиг. 26B (SEQ ID NO: 15) представляют собой графики, показывающие концентрацию IL-22 в плазме как функцию времени у отдельных мышей.

На фиг. 27A-27D показано, что длина спейсера и соединение полезной нагрузки с N- или C-концом носителя не оказывало существенного влияния на биологическую активность полезной нагрузки. На фиг. 27A показано, что длина различных аминокислотных спейсеров не влияло на индукцию димеризации рецептора IL-22. На фиг. 27B показано, что соединение полезной нагрузки IL-22 с N- или C-концом носителя не влияло на индукцию димеризации IL-22. На фиг. 27C показано, что длина различных аминокислотных спейсеров не влияло на индукцию активации pSTAT3. На фиг. 27D показано, что соединение полезной нагрузки IL-22 с N- или C-концом носителя не влияло на индукцию активации pSTAT3.

Подробное описание изобретения

В настоящем раскрытии описаны не встречающиеся в природе слитые белки (например, конструкции для доставки, способные транспортировать одну или более гетерологичных молекул полезной нагрузки) и способы рефолдинга и очистки не встречающихся в природе слитых белков. Например, не встречающийся в природе слитый белок может представлять собой конструкцию для доставки IL-22, описанную здесь.

Представленные ниже термины приведены для иллюстрации значений терминов, используемых в данном описании, в дополнение к пониманию этих терминов специалистами в данной области техники. Как здесь используется по тексту и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают в себя множественные ссылки, если контекст явно не диктует иное. Кроме того, следует отметить, что формула изобретения может быть составлена таким образом, чтобы исключить любой необязательный элемент. Таким образом, данное утверждение предназначено для использования в качестве предшествующей основы для использования такой исключительной терминологии, как "исключительно", "только" и т.п. в связи с перечислением элементов формулы изобретения или использованием "отрицательного" ограничения.

Некоторые диапазоны или числа представлены здесь с числовыми значениями, которым предшест-

вует термин "примерно". В рамках настоящего изобретения, термин "примерно" означает плюс или минус 1%, 2%, 3%, 4% или 5% от числа, к которому относится этот термин. В контексте настоящего описания термины "субъект" и "индивидуум" используются взаимозаменяемо и могут означать любое животное, включая млекопитающих (например, человека или животное, не являющееся человеком).

В рамках настоящего изобретения термины "лечить", "лечение" или "проводить лечение" и другие грамматические эквиваленты включают облегчение, снижение или ослабление одного или более симптомов заболевания или патологического состояния, ослабление, предупреждение или уменьшение проявления, тяжести или частоты одного или более дополнительных симптомов заболевания или патологического состояния, облегчение или предупреждение основных причин одного или более симптомов заболевания или патологического состояния, подавление заболевания или патологического состояния, например, такое как остановка развития заболевания или патологического состояния, облегчение заболевания или патологического состояния, обеспечение регресса заболевания или патологического состояния, облегчение состояния, вызванного заболеванием или патологическим состоянием, или подавление симптомов заболевания или патологического состояния профилактически и/или терапевтически.

В рамках настоящего изобретения, термин "процент (%)" идентичности последовательностей" и относящиеся к нему термины в контексте аминокислотных последовательностей представляют собой процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в выбранной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание для определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как Clustal Omega, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или программы Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для проведения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Термины "полипептид" и "белок" используются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Пептиды также включают по существу любую полиаминокислоту, включая, не ограничиваясь этим, пептидные миметики, где аминокислоты соединены простой эфирной связью, а не амидной связью.

Полезные нагрузки и конструкции для доставки

Настоящее изобретение относится к конструкциям для доставки, способным транспортировать одну или более гетерологичных молекул полезной нагрузки (например, одну или более терапевтических нагрузок) через эпителиальные клетки (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника) и в собственную пластинку оболочки кишечника посредством трансцитоза. Конструкции для доставки могут содержать носитель, связанный с гетерологичной полезной нагрузкой. Конструкция для доставки может представлять собой не встречающийся в природе слитый белок. Носитель может быть способен транспортировать гетерологичную полезную нагрузку через поляризованные эпителиальные клетки (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника) с использованием эндогенных путей переноса. Использование эндогенных путей переноса, в отличие от использования пассивной диффузии, может позволить носителю быстро и эффективно переносить гетерологичную полезную нагрузку через эпителиальные клетки без нарушения барьерной функции данных клеток или биологической активности гетерологичной полезной нагрузки. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам очистки и рефолдинга конструкций для доставки, описанных здесь.

Носитель здесь может происходить из полипептида, секретированного бактерией. Такой носитель может происходить из полипептида, секретированного *Vibrio Cholerae* или *Pseudomonas aeruginosa*. Полипептид, секретированный *Vibrio Cholerae*, может представлять собой полипептид Cholix. Носитель, полученный из полипептида Cholix, может представлять собой встречающийся в природе или не встречающийся в природе. Например, не встречающийся в природе полипептид Cholix может состоять из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1 (пример Cholix¹⁻⁶³⁴) (табл. 1). Носитель, полученный из полипептида Cholix, может представлять собой усеченный и/или мутированный вариант полипептида, полученного из Cholix. Например, носитель может содержать или состоять из аминокислотной последовательности с аминокислотными остатками 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 и 1-386 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 26. В некоторых случаях такие носители имеют аминокислотную последовательность с аминокислотными остатками 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 и 1-386 из SEQ ID NO: 4. Мутация(и) может включать одну или более замен, делеций и/или добавлений. Например, носитель здесь может содержать замену V1L. Иными словами, в некоторых вариантах осуществления связанный с Cholix носитель имеет аминокислоту лейцин в положении "1". (Положение 1 относится к первой аминокислоте вариантов, которые не имеют N-концевого метионина, или второму положению в вариантах, которые включают N-концевой метионин. Другими словами, при определении длины носителя N-концевой метионин, если он присутствует, не учитывается). В некоторых вариантах осуществления носители, содержащие замену V1L, проявляют пониженное отщепление N-концевой аминокислоты или его отсутствие.

В некоторых вариантах осуществления носители, содержащие замену V1L, проявляют пониженное ацетилирование N-концевой аминокислоты или его отсутствие. Носитель, обеспеченный здесь, может иметь сниженную (например, сниженную по меньшей мере на 50%) активность рибозилирования ADP (например, рибозилирование фактора элонгации 2) или его отсутствие по сравнению с природным вариантом Cholix. В некоторых вариантах осуществления носитель может содержать N-концевой метионин. В других вариантах осуществления N-концевой метионин отсутствует.

Усеченный носитель Cholix состоит, по существу состоит или содержит аминокислотные остатки 1-386 последовательности, показанной в SEQ ID NO: 26 (формула I). Усеченный носитель Cholix состоит, по существу состоит или содержит аминокислотные остатки 1-266 последовательности, показанной в SEQ ID NO: 26 (формула I). В таких случаях носитель состоит, по существу состоит или содержит аминокислотные остатки 1-266 последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1. Таким образом, в некоторых случаях носитель состоит из указанной аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2 (пример Cholix¹⁻³⁸⁶) или SEQ ID NO: 3 (пример Cholix¹⁻²⁶⁶). В некоторых случаях носитель имеет аминокислотную последовательность, показанную SEQ ID NO: 2, с заменой V1L. Таким образом, в некоторых случаях носитель состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 4 (пример V1L-Cholix¹⁻³⁸⁶) или SEQ ID NO: 5 (пример V1L Cholix¹⁻²⁶⁶). Любой из этих носителей может включать одну или более аминокислот на своем N-конце для экспрессии в различных микроорганизмах (например, бактериях), например, N-концевой метионин. Такой носитель может иметь аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 6-9.

Полипептид Cholix может представлять собой белок, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в любой из SEQ ID NO: 1-9 или SEQ ID NO: 22-23. Пример полипептида Cholix представлен здесь как SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 22. В настоящем документе также предусматриваются усеченные варианты полипептида Cholix, которые способны переносить полезную нагрузку через поляризованные эпителиальные клетки (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника). Такие полипептиды Cholix могут быть усечены в любом из аминокислотных положений от 206 до 633 по сравнению с референсной последовательностью, например SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 26, или аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности с ней.

В данном документе также рассматриваются конструкции для доставки, содержащие носители, имеющие высокую идентичность последовательности с последовательностями, приведенными выше. Такая высокая идентичность последовательностей может включать по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности. Таким образом, в некоторых случаях носитель имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 6-9.

Носитель, рассматриваемый здесь, может быть связан с полезной нагрузкой, такой как гетерологичная полезная нагрузка. Такая полезная нагрузка может представлять собой терапевтическую полезную нагрузку. Терапевтическая полезная нагрузка может быть цитокином, гормоном, фактором роста, терапевтическим антителом, антигеном, функциональным фрагментом любого из вышеперечисленного или любым другим белком, обладающим биологической, терапевтической активностью, или белком, в котором может быть дефицит у субъекта (например, генетический/наследственный дефицит определенного белка). Цитокины, рассматриваемые здесь, включают мономерные хемокины и интерлейкины (также сокращенно называемые здесь "IL"). Интерлейкин может представлять собой IL-22. Интерлейкин может быть от любого вида (например, человека или грызуна). Интерлейкин может представлять собой интерлейкин человека. Человеческий IL-22 может иметь аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 10 (IL-22¹⁻¹⁷⁹) или SEQ ID NO: 11 (IL-22³⁴⁻¹⁷⁹). Здесь IL-22 может дополнительно включать метионин на своем N-конце, например, когда такой белок IL-22 экспрессируется в бактериях. В одном случае IL-22 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 12 (M+IL-22³⁴⁻¹⁷⁹). Здесь IL-22 может дополнительно включать метионин на своем N-конце, например, когда такой белок IL-22 экспрессируется в бактериях. В одном случае IL-22 имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12 (M+IL-22³⁴⁻¹⁷⁹). IL-22 может содержать, состоять по существу или состоять из SEQ ID NO: 10 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности с ней, или его фрагмент. IL-22 содержит, по существу состоит или состоит из SEQ ID NO: 11 (IL-2234-179), которая является секретлируемой формой IL-22, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности с ней или ее фрагментом. IL-22 может включать метионин на своем N-конце, например, когда такой белок IL-22 экспрессируется бактериями. Такой IL-22 может состоять, по существу состоять или содержать аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 12 (M+IL-22³⁴⁻¹⁷⁹).

В некоторых случаях носитель, используемый в любой из конструкций для доставки, обеспеченных здесь, может представлять собой белок или другой тип молекулы, способной переносить терапевтиче-

скую нагрузку через эпителий (например, поляризованный эпителий кишечника субъекта). Такой транспорт может включать транцитоз. В рамках настоящего изобретения, "транцитоз" относится к перемещению слитой молекулы через поляризованную эпителиальную клетку. Такой трафик позволяет высвободить биологически активную нагрузку из базолатеральной мембраны поляризованной эпителиальной клетки. Процесс транцитоза может включать взаимодействие(я) носителя с одним или более рецепторами и/или белками на апикальной и/или базальной поверхности(ях), а также внутри клетки эпителия (например, поляризованной эпителиальной клетки кишечника). Носитель может быть способен транспортировать терапевтическую нагрузку через эпителий без нарушения эпителия, носителя и/или биологической и/или терапевтической функции полезной нагрузки.

Носитель может быть ковалентно или нековалентно и прямо или опосредованно связан с терапевтической полезной нагрузкой. Терапевтическая полезная нагрузка может быть напрямую связана с N-концом или C-концом носителя. В случаях, когда носитель ковалентно связан с полезной нагрузкой, то носитель может быть связан с такой полезной нагрузкой через спейсер (также называемый здесь линкером). Спейсер может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более аминокислотных остатков. Аминокислотные остатки спейсера могут представлять собой, например, глицин, серин и/или триптофан. Спейсер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Расщепляемый спейсер может расщепляться ферментом или pH-зависимым образом.

Примеры спейсеров, обеспеченных здесь, включают олигопептидные последовательности, такие как S, (GS)_x, (GGS)_x, (GGGS)_x (SEQ ID NO: 27), (GGGGS)_x (SEQ ID NO: 28) или (GGGGGS)_x (SEQ ID NO: 29), где x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15. В некоторых случаях, спейсер состоит, по существу состоит или содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 13 ((G₄S)₃). (GGGGSGGGSGGGGS). В некоторых случаях спейсер состоит, по существу состоит или содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 31 ((G₄S)₅). (GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS). В некоторых случаях конструкция для доставки включает терапевтическую нагрузку и носитель, которые связаны нековалентно (например, посредством ионных взаимодействий, ван-дер-ваальсовых взаимодействий, π-π-взаимодействий и т. д.). Носитель может дополнительно включать один или более признаков, элементов, аминокислот или модификаций на своем N-конце и/или C-конце. Например, некоторые варианты осуществления включают N-концевой метионин на N-конце носителя. Также могут присутствовать другие модификации (например, ацетилирование), включая модификации для экспрессии в гетерологической системе.

Конструкция для доставки по настоящему изобретению может иметь аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 15 или 17 (примеры M+Cholix¹⁻²⁶⁶-(G₄S)₃-IL-22³⁴⁻¹⁷⁹) (табл. 1). Другие конструкции для доставки могут иметь аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 24 или 25 (например, при экспрессии в клетке млекопитающего, такой как клетка CHO). Такие типичные конструкции для доставки транспортируют IL-22 через интактные поляризованные эпителиальные клетки кишечника и в собственную пластинку оболочки кишечника.

В различных вариантах осуществления не встречающийся в природе слитый белок имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 14-21, 24 или 25, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности с ними. Схема носителя, спейсера и полезной нагрузки неприродного слитого белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 15, приведена на фиг. 16.

В табл. 1 приведены примерные аминокислотные последовательности биологически активных молекул, используемых в комбинации со способами, раскрытыми здесь.

Таблица 1. Примерные аминокислотные последовательности

Группа	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
Cholix ¹⁻⁶³⁴	SEQ ID NO: 1	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVYNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDD LSCAYQAQNVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDQEPE VAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPADKSCVASNND QANINIESRSGRSLPENRAVITPQGVNTWYQELEA THQALREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGARYARIKEGTGEYG LPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE EHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIGWDMA IHAVAIPSTIPGNA YEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKE RKDELK
Cholix ¹⁻³⁸⁶	SEQ ID NO: 2	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVYNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDD LSCAYQAQNVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDQEPE VAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH HPGLTPEQTSAGAQA
Cholix ¹⁻²⁶⁶	SEQ ID NO: 3	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR

		HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKG
(VIL)-Cholix ¹⁻³⁸⁶	SEQ ID NO: 4	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDD LSCAYQAQNVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDQEPE VAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH HPGLTPEQTSAGAQA
(VIL)-Cholix ¹⁻²⁶⁶	SEQ ID NO: 5	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKG
M+Cholix ¹⁻³⁸⁶	SEQ ID NO: 6	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLD NQTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQ NCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLT DDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDQ EPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDY

		VTHHPGLTPEQTSAGAQA
M+Cholix ¹⁻²⁶⁶	SEQ ID NO: 7	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLD NQTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQ NCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSGK
M+(VIL)- Cholix ¹⁻³⁸⁶	SEQ ID NO: 8	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLD NQTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQ NCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSGKNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKRDLT DDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSLDVSFTLNLDEQ EPEVAERLSDLRRINENPMVTQVLTVARQIYNDY VTHHPGLTPEQTSAGAQA
M+(VIL)- Cholix ¹⁻²⁶⁶	SEQ ID NO: 9	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLD NQTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQ NCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSGK
IL-22 ¹⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 10	MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAPI SSHCRDLKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDV RLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSD RFQPYMQEVVPLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQ KLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 11	APISSHCRDLKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNT DVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLP

		QSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQR NVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
M+IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 12	MAPISSHCRDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNN TDVRLIGEKLFGVMSERCYLMKQVLNFTLEEVLP QSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQR NVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
(G ₄ S) ₃	SEQ ID NO: 13	GGGGSGGGSGGGGS
M+Cholix ¹⁻³⁸⁶ - (G ₄ S) ₃ -IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 14	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLD NQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQ NCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKRDLT DDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDEQ EPEVAERLSDLRINENNPMTQVLTVARQIYNDY VTHHPGLTPEQTSAGAQAGGGSGGGSGGGGSAPI SSHCRDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDV RLIGEKLFGVMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSD RFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQ KLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
M+Cholix ¹⁻²⁶⁶ - (G ₄ S) ₃ -IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 15	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLD NQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQ NCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGGGGSGGGSGGGGSAPISSHCRDKSNFQ QPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRIGEKLFGVMS MERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVP FLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGE SGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

M+(V1L)- Cholix ¹⁻³⁸⁶ - (G ₄ S) ₃ -IL-22 ³⁴ - 179	SEQ ID NO: 16	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLD NQTLQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQ NCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLT DDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSLDVSFTLNLDEQ EPEVAERLSDLRRINENNPMTQVLTVARQIYNDY VTHHPGLTPEQTSAGAAGGGGGGGGGGGGGGGSAPI SSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDV RLIGEKLFIGVMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSD RFQPYMQEVVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQ KLKDTVKKLGESEIKAIAGELDLFMSLRNACI
M+(V1L)- Cholix ¹⁻²⁶⁶ - (G ₄ S) ₃ -IL-22 ³⁴ - 179	SEQ ID NO: 17	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLD NQTLQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQ NCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGGGGGGGGGGGGGGGGSAPISSHCRLDKSNFQ QPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFIGVS MSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVV FLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGE SGEIKAIAGELDLFMSLRNACI
Cholix ¹⁻³⁸⁶ - (G ₄ S) ₃ -IL-22 ³⁴ - 179	SEQ ID NO: 18	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDD

		LSCAYQAQNVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDEQEPE VAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH HPGLTPEQTSAGAQAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SAPISSH CRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVR LIG EKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQ PVMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQ KLLK DTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
(VIL)-Cholix ¹⁻ ³⁸⁶⁻ (G ₄ S) ₃ -IL- ²² ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 19	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATV RATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGE FAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSID LDN QTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK AAQ KEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQ QN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE QRI HFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL TDD LSCAYQAQNVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDE QEPE VAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDY VTH HPGLTPEQTSAGAQAAGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGG SAPISSH CRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVR LIG EKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQ PVMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQ KLLK DTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
Cholix ¹⁻²⁶⁶⁻ (G ₄ S) ₃ -IL- ²² ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 20	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATV RATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGE FAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSID LDN QTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK AAQ KEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQ QN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE QRI HFSKGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SAPISSHCRLDKSNFQQ PYITNRTFMLAKEASLADNNTDVR LIG EKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQ PVMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQ KLLKDTVKKLGES GEIKAIGELDLLFMSLRNACI
(VIL)-Cholix ¹⁻	SEQ ID NO:	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDE

<p>²⁶⁶-(G₄S)₃-IL- 22³⁴⁻¹⁷⁹</p>	<p>21</p>	<p>GVLYYSMTINDEQNDIKDEKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKGGGGGGGGGGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQ PYITNRTFLAKEASLADNNTDVRLLIGEKLFHGVSMS ERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFL ARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLDKDTVKKLGES GEIKAIGELDLLFMSLRNACI</p>
<p>(VIL)-Cholix¹⁻⁶³⁴</p>	<p>SEQ ID NO: 22</p>	<p>LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDD LSCAYQAQNVSLFVATRILFSLDVSFTLNLDQEPE VAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNND QANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEA THQALTREGYVFGYHGHTNHVAAQTIVNRIAPVPRG NNTENEKKGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYG LPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE EHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIGWDMA IHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKE RKDELK</p>
<p>M+(VIL)- Cholix¹⁻⁶³⁴</p>	<p>SEQ ID NO: 23</p>	<p>MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE EGVLYYSMTINDEQNDIKDEKGESIITIGEFATVRAT RHVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPAGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLD NQLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQ</p>

		NCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLT DDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSLDSDVFTLNLDEQ EPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDY VTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQEL EATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVP RGNNTENEKWWGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGE YGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLEN AEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIGWD MAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPP YKERKDELK
Cholix ¹⁻²⁶⁶ - (G ₄ S) ₃ -IL-22 ³⁴ - 179	SSEQ ID NO: 24	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKGGGGGGGGGGGGGGGSAPISSHCRDLKSNFQQ PYITNRTFLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFGVSM ERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFL ARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGES GEIKAIGELDLLFMSLRNACI
(VIL)-Cholix ^{1- 266} -(G ₄ S) ₃ -IL- 22 ³⁴ -179	SSEQ ID NO: 25	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKGGGGGGGGGGGGGGGSAPISSHCRDLKSNFQQ PYITNRTFLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFGVSM ERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFL ARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGES

		GEIKAIGELDLLFMSLRNACI
M+Cholix ¹⁻²⁶⁶ - (G ₄ S) ₁ -IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 32	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLD NQTLQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQ NCTLGDNWFSGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFML AKEASLADNNTDVR LIGELKLFHGVMSERCYLMKQ VLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLST CHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELD LLFMSLRNACI
M+Cholix ¹⁻²⁶⁶ - (G ₄ S) ₅ -IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 33	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLD NQTLQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQ NCTLGDNWFSGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPI SHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVR LIGELKLFHGVMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDR FQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQK LKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
M+ IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹ -(G ₄ S) ₁ - Cholix ¹⁻²⁶⁶	SEQ ID NO: 34	MAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNN TDVRLIGELKLFHGVMSERCYLMKQVLNFTLEEVLP QSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQR NVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACIG GGGSVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATV RATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEG EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYS IDLDNQTLQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSY KAAQKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNY

		ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKP VEQRHFSKG
M+Cholix ¹⁻³⁸⁶ - (G ₄ S) ₁ -IL-22 ³⁴ - 179	SEQ ID NO: 35	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLD NQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRWAWHWTGLALCWLVPMDAIYNYITQQ NCTLGDNWFSGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLT DDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSLHDSVFTLNDEQ EPEVAERLSDLRRINENNGMVTQVLTVARQIYNDY VTHHPGLTPEQTSAGAQAAGGGGSAPISSHCRLDKSNF QQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRIGEKLFHGVS MSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVP FLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLDKDTVKKLGE SGEIKAIGELDLFMSLRNACI
Консенсусная последователь ность Cholix	SEQ ID NO: 26	X1-E-X3-X4-L-X6-I-F-D-E-C-R-S-P-C-X16-L-T-P-E- X21-G-K-X24-I-Q-S-K-L-X30-I-P-X33-D-V-V-L-D-E-G- V-L-Y-S-M-T-I-N-D-E-Q-N-D-I-X56-D-E-X59-K-G-E- S-I-I-T-X67-G-E-F-A-T-X73-R-A-T-R-H-Y-V-X81-Q-D- A-P-F-G-V-I-X90-L-D-I-T-T-E-N-G-T-K-X101-Y-S- X104-N-R-K-X108-X109-E-F-X112-I-X114-W-L-V- X118-X119-G-E-D-S-P-A-S-I-K-I-S-X131-D-E-X134-D- Q-X137-R-N-I-I-E-V-P-K-L-Y-S-I-D-L-D-N-Q-T-L-E-Q- W-X160-X161-Q-G-N-V-X166-F-X168-V-T-R-P-E-X174- X175-I-A-I-S-W-P-S-V-S-Y-X186-A-A-X189-K-X191-G- X193-R-H-K-R-W-A-X200-W-X202-T-X204-X205-X206- X207-X208-X209-L-X211-X212-X213-X214-X215-X216- X217-X218-X219-X220-X221-X222-X223-X224-C-T- X227-G-X229-X230-W-X232-G-G-X235-Y-X237-T-V-A- G-X242-P-X244-X245-I-X247-V-K-Q-G-X252-E-Q-K- X256-V-E-Q-R-I-H-F-S-X265-X266-N-A-X269-X270- X271-L-A-A-H-R-V-C-G-V-P-L-E-T-L-A-R-X288-R-K-P- R-X293-L-X295-D-D-L-X299-C-X301-Y-X303-A-Q-

	<p>X306-I-V-S-L-F-X312-A-T-R-X316-L-F-X319-H-X321-D-S-X324-F-T-L-N-L-X330-X331-Q-X333-P-X335-V-X337-E-R-L-X341-X342-X343-R-X345-I-N-E-X349-N-P-G-X353-V-X355-Q-V-L-T-X360-A-R-Q-I-Y-N-D-Y-V-T-X371-H-P-X374-L-X376-P-E-Q-T-S-A-X383-A-Q-A-A-D-I-L-S-L-X393-X394-P-D-X397-D-X399-X400-C-V-A-X404-X405-X406-D-Q-A-N-I-N-X413-E-S-R-S-G-R-S-Y-L-X423-E-N-R-A-V-I-T-X431-Q-G-V-T-N-W-T-Y-Q-E-L-X443-X444-X445-H-Q-X448-L-T-X451-E-X453-Y-V-F-V-G-Y-H-G-T-N-H-X465-A-A-Q-X469-I-V-N-R-I-X475-P-V-P-R-G-X481-X482-T-E-X485-E-X487-X488-W-G-G-X492-Y-V-X495-T-X497-A-X499-X500-X501-X502-X503-Y-X505-R-X507-X508-X509-G-T-X512-X513-X514-X515-X516-X517-T-X519-X520-X521-X522-X523-X524-R-G-V-M-L-X530-V-Y-X533-X534-X535-A-S-L-E-R-F-Y-R-X544-N-X546-X547-L-E-X550-X551-X552-X553-X554-X555-X556-X557-V-I-G-H-X562-L-P-L-R-N-F-A-F-T-G-X573-X574-X575-X576-X577-G-X579-X580-E-T-X583-I-G-W-D-X588-A-I-X591-X592-V-A-I-P-S-T-I-P-G-N-X603-Y-X605-X606-L-X608-X609-X610-E-E-A-X614-A-X616-E-Q-S-I-S-X622-K-P-P-Y-K-E-X629-X630-D-E-L-K; где X1 выбран из группы, состоящей из V и L; X3 выбран из группы, состоящей из E и D; X4 выбран из группы, состоящей из A и E; X6 выбран из группы, состоящей из N и K; X16 выбран из группы, состоящей из S и L; X21 выбран из группы, состоящей из P и L; X24 выбран из группы, состоящей из P и Q; X30 выбран из группы, состоящей из S и F; X33 выбран из группы, состоящей из S и G; X56 выбран из группы, состоящей из K и M; X59 выбран из группы, состоящей из D и G; X67 выбран из группы, состоящей из I и F; X73 выбран из группы, состоящей из V и I; X81 выбран из группы, состоящей из N и S; X90 выбран из группы, состоящей из H и N; X101 выбран из группы, состоящей из T и M; X104 выбран из группы, состоящей из Y и F; X108</p>
--	--

	<p>выбран из группы, состоящей из E и D; X109 выбран из группы, состоящей из G и S; X112 выбран из группы, состоящей из A и T; X114 выбран из группы, состоящей из N и H; X118 выбран из группы, состоящей из P и I; X119 выбран из группы, состоящей из I и P; X131 выбран из группы, состоящей из V и I; X134 выбран из группы, состоящей из L и I; X137 выбран из группы, состоящей из Q и K; X160 выбран из группы, состоящей из K и E; X161 выбран из группы, состоящей из T и N; X166 выбран из группы, состоящей из S и F; X168 выбран из группы, состоящей из S и A; X174 выбран из группы, состоящей из H и Q; X175 выбран из группы, состоящей из N, S, SIAKQS, и SIAKQSIAKQS; X186 выбран из группы, состоящей из K и N; X189 выбран из группы, состоящей из Q, E, и H; X191 выбран из группы, состоящей из E, N, и D; X193 выбран из группы, состоящей из S и A; X200 выбран из группы, состоящей из H и N; X202 выбран из группы, состоящей из H, L, F, и R; X204 выбран из группы, состоящей из G и T; X205 выбран из группы, состоящей из L и S; X206 выбран из группы, состоящей из A и P; X207 выбран из группы, состоящей из L, E, и K; X208 выбран из группы, состоящей из C и V; X209 выбран из группы, состоящей из W, V, и T; X211 выбран из группы, состоящей из V и без аминокислоты; X212 выбран из группы, состоящей из P и без аминокислоты; X213 выбран из группы, состоящей из M, I, L, и без аминокислоты; X214 выбран из группы, состоящей из D и без аминокислоты; X215 выбран из группы, состоящей из A и без аминокислоты; X216 выбран из группы, состоящей из I и без аминокислоты; X217 выбран из группы, состоящей из Y и C; X218 выбран из группы, состоящей из N и F; X219 выбран из группы, состоящей из Y и F; X220 выбран из группы, состоящей из I и E; X221 выбран из группы, состоящей из T и D; X222 выбран из группы, состоящей</p>
--	--

	<p>из Q и P; X223 выбран из группы, состоящей из Q, E, и A; X224 выбран из группы, состоящей из N, L, и Q; X227 выбран из группы, состоящей из L и Y; X229 выбран из группы, состоящей из D и E; X230 выбран из группы, состоящей из N и D; X232 выбран из группы, состоящей из F, H, и Y; X235 выбран из группы, состоящей из S и A; X237 выбран из группы, состоящей из E и K; X242 выбран из группы, состоящей из T и I; X244 выбран из группы, состоящей из K, E, и G; X245 выбран из группы, состоящей из V и A; X247 выбран из группы, состоящей из T и M; X252 выбран из группы, состоящей из I и M; X256 выбран из группы, состоящей из P, T, и A; X265 выбран из группы, состоящей из K, Q, и N; X266 выбран из группы, состоящей из G и K; X269 выбран из группы, состоящей из M и I; X270 выбран из группы, состоящей из S и E; X271 выбран из группы, состоящей из A и T; X288 выбран из группы, состоящей из S и G; X293 выбран из группы, состоящей из D и Y; X295 выбран из группы, состоящей из T, P, и Q; X299 выбран из группы, состоящей из S и Q; X301 выбран из группы, состоящей из A и V; X303 выбран из группы, состоящей из Q и N; X306 выбран из группы, состоящей из N и Q; X312 выбран из группы, состоящей из V и L; X316 выбран из группы, состоящей из I и M; X319 выбран из группы, состоящей из S и T; X321 выбран из группы, состоящей из L и I; X324 выбран из группы, состоящей из V и I; X330 выбран из группы, состоящей из D, E и H; X331 выбран из группы, состоящей из E и G; X333 выбран из группы, состоящей из E и A; X335 выбран из группы, состоящей из E и A; X337 выбран из группы, состоящей из A и T; X341 выбран из группы, состоящей из S, D и T; X342 выбран из группы, состоящей из D и A; X343 выбран из группы, состоящей из L и I; X345 выбран из группы, состоящей из R и Q; X349 выбран из группы, состоящей из N и D; X353 выбран из группы, состоящей</p>
--	--

	<p>из М и V; X355 выбран из группы, состоящей из Т и I; X360 выбран из группы, состоящей из V и I; X371 выбран из группы, состоящей из Н и E; X374 выбран из группы, состоящей из G и L; X376 выбран из группы, состоящей из Т и I; X383 выбран из группы, состоящей из G и S; X393 выбран из группы, состоящей из F и L; X394 выбран из группы, состоящей из С и Y; X397 выбран из группы, состоящей из А и Т; X399 выбран из группы, состоящей из К, E и G; X400 выбран из группы, состоящей из S, P и H; X404 выбран из группы, состоящей из S и L; X405 выбран из группы, состоящей из N и D; X406 выбран из группы, состоящей из N и S; X413 выбран из группы, состоящей из I и V; X423 выбран из группы, состоящей из P и L; X431 выбран из группы, состоящей из P и Q; X443 выбран из группы, состоящей из E и D; X444 выбран из группы, состоящей из А и Т; X445 выбран из группы, состоящей из Т и К; X448 выбран из группы, состоящей из А и Т; X451 выбран из группы, состоящей из R и Q; X453 выбран из группы, состоящей из G и D; X465 выбран из группы, состоящей из V и A; X469 выбран из группы, состоящей из Т, S, и N; X475 выбран из группы, состоящей из А, S, и Т; X481 выбран из группы, состоящей из N и S; X482 выбран из группы, состоящей из N и D; X485 выбран из группы, состоящей из N, S и K; X487 выбран из группы, состоящей из E, R и K; X488 выбран из группы, состоящей из K, A и E; X492 выбран из группы, состоящей из L и V; X495 выбран из группы, состоящей из А и S; X497 выбран из группы, состоящей из Н и D; X499 выбран из группы, состоящей из E и S; X500 выбран из группы, состоящей из V и L; X501 выбран из группы, состоящей из А и N; X502 выбран из группы, состоящей из Н и Y; X503 выбран из группы, состоящей из G и R; X505 выбран из группы, состоящей из А и Т; X507 выбран из группы, состоящей из I и L; X508 выбран</p>
--	--

	<p>из группы, состоящей из K и Q; X509 выбран из группы, состоящей из E и K; X512 выбран из группы, состоящей из G и A; X513 выбран из группы, состоящей из E, D и N; X514 выбран из группы, состоящей из Y, G, A и N; X515 выбран из группы, состоящей из G и E; X516 выбран из группы, состоящей из L и G; X517 выбран из группы, состоящей из P и L; X519 выбран из группы, состоящей из R, P и T; X520 выбран из группы, состоящей из A и E; X521 выбран из группы, состоящей из E и K; X522 выбран из группы, состоящей из R, Q и K; X523 выбран из группы, состоящей из D, K и E; X524 выбран из группы, состоящей из A, T и S; X530 выбран из группы, состоящей из R и K; X533 выбран из группы, состоящей из I и L; X534 выбран из группы, состоящей из P и H; X535 выбран из группы, состоящей из R и Q; X544 выбран из группы, состоящей из T и I; X546 выбран из группы, состоящей из T, A и I; X547 выбран из группы, состоящей из P и D; X550 выбран из группы, состоящей из N и K; X551 выбран из группы, состоящей из A и E; X552 выбран из группы, состоящей из E, R и D; X553 выбран из группы, состоящей из E, N и R; X554 выбран из группы, состоящей из H и L; X555 выбран из группы, состоящей из I и V; X556 выбран из группы, состоящей из T и E; X557 выбран из группы, состоящей из Q, R, H и D; X562 выбран из группы, состоящей из S и P; X573 выбран из группы, состоящей из P и T; X574 выбран из группы, состоящей из E и D; X575 выбран из группы, состоящей из S, A и R; X576 выбран из группы, состоящей из A, E, и V; X577 выбран из группы, состоящей из G, E, и D; X579 выбран из группы, состоящей из E и S; X580 выбран из группы, состоящей из D и N; X583 выбран из группы, состоящей из V и A; X588 выбран из группы, состоящей из M и I; X591 выбран из группы, состоящей из H и Y; X592 выбран из группы, состоящей из A и G; X603 выбран из группы,</p>
	<p>состоящей из A и S; X605 выбран из группы, состоящей из E и A; X606 выбран из группы, состоящей из E, A, Q, G, V и R; X608 выбран из группы, состоящей из A, P, и T; X609 выбран из группы, состоящей из I, T и P; X610 выбран из группы, состоящей из D и A; X614 выбран из группы, состоящей из V и VVKEAI; X616 выбран из группы, состоящей из K и E; X622 выбран из группы, состоящей из T, A, и P; и X629 выбран из группы, состоящей из R, Q, и H; и X630 выбран из группы, состоящей из K и без аминокислоты.</p>

В некоторых вариантах осуществления не встречающийся в природе слитый белок содержит или состоит из: носителя, выбранного из группы, состоящей из любой из последовательностей, показанных в SEQ ID NO: 1-9, 22-23 и 26, и полезной нагрузки, выбранной из группы, состоящей из любой из последовательностей, показанных в SEQ ID NO: 10-12, и где носитель и полезная нагрузка необязательно связаны спейсером, выбранным из группы, состоящей из любой из последовательностей, показанных в SEQ ID NO: 13 и 27-29.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим конструкцию для доставки и один или более фармацевтически приемлемых носителей. В некоторых случаях конструкция для доставки состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 15. В некоторых случаях конструкция для доставки состоит из аминокислотной последовательности,

показанной в SEQ ID NO: 17. Такие фармацевтические композиции могут быть сформулированы для введения субъекту. В некоторых случаях фармацевтическая композиция сформулирована для перорального введения субъекту.

Фармацевтическую композицию, содержащую конструкцию для доставки, можно вводить субъекту (например, человеку), нуждающемуся в этом, для лечения заболевания. Заболевания, которые можно лечить с использованием конструкций для доставки по настоящему изобретению, включают аутоиммунные заболевания и воспалительные заболевания. В некоторых случаях заболевание представляет собой повреждение эпителиальных клеток или повреждение мембран эпителиальных клеток (например, в желудочно-кишечном тракте). В некоторых случаях заболевание представляет собой гепатит, ожирение, жировую болезнь печени, воспаление печени или панкреатит, болезнь Крона (например, свищевую болезнь Крона), язвенный колит (например, легкой-средней степени или средней-тяжелой степени), пухит, проктит, рассеянный склероз, системную красную волчанку, синдром "трансплантат против хозяина", ревматоидный артрит или псориаз.

Способы очистки и композиции

Настоящее изобретение относится к способам получения очищенного не встречающегося в природе слитого белка. Не встречающийся в природе слитый белок может содержать IL-22 и носитель и, необязательно, спейсер, связывающий IL-22 с носителем. Не встречающийся в природе слитый белок может представлять собой белок, содержащий, по существу состоящий или состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 14-21, 24 или 25. Преимущества способов и композиций, описанных здесь, включают поддержание высокой чистоты и биологической активности очищенных полипептидов или белков.

Конкретные преимущества способов, раскрытых здесь, включают: а) высокую биологическую активность не встречающихся в природе слитых белков за счет правильного фолдинга с использованием специально разработанных буферов для фолдинга; б) высокую химическую чистоту очищенных не встречающихся в природе слитых белков в сочетании с низкой токсичностью; в) высокий выход материала, предназначенного для очистки; г) воспроизводимость результатов обеспечивает надежное получение и поставку; д) технологичность и масштабируемость до нескольких граммов и нескольких килограммов для клинических и коммерческих применений; е) стабильное использование материалов и ресурсов обеспечивает рентабельный и логистически эффективный способ очистки клинически значимых молекул. Кроме того, улучшенные способы получения могут увеличить скорость, с которой эти очищенные белки могут быть разработаны для терапевтического применения (фиг. 22).

Примерный процесс очистки не встречающихся в природе слитых белков, описанных здесь, показан на фиг. 17, которая дополнительно иллюстрирует примерные уровни чистоты и извлечения не встречающегося в природе слитого белка на каждой стадии процесса очистки.

В рамках настоящего изобретения, термин "чистота" указывает уровень желаемого белка (например, природного слитого белка) или желаемой формы белка (например, мономера природного слитого белка, скорректированного свернутого природного слитого белка или их комбинации) в композиции, которая также может содержать нежелательные белки или нежелательные формы белка (например, агрегат природного слитого белка, неправильно свернутого белка или их комбинации). Уровень может быть представлен процентным содержанием (%) желаемого белка или желаемой формы белка. Например, чистота может составлять более 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% или может составлять 100%. Термин "очищенный" можно использовать для обозначения композиции, чистота которой повысилась. Повышение чистоты может иметь место за счет процедур очистки, описанных здесь, таких как анионообменная хроматография, гидроксиапатитная хроматография, катионообменная хроматография или их комбинация.

В некоторых случаях способы и композиции по настоящему изобретению включают использование по меньшей мере двух хроматографических колонок, которые выполняются в тандеме, с последующей стадией концентрирования/буферного обмена (ультрафильтрация/диафильтрация (UF/DF) для концентрирования и буферного обмена раствора). Хроматографические колонки могут представлять собой системы для хроматографии низкого давления, такие как колонка АКТА Avant 150 или колонка АКТА Pilot от General Electric (GE). В некоторых случаях по меньшей мере одна колонка содержит анионообменную смолу (например, смолу NH₂-750F), и по меньшей мере одна колонка содержит гидроксиапатитную смолу (например, смолу CaPure®). В некоторых случаях по меньшей мере одна колонка, содержащая анионообменную смолу, используется на стадии захвата, тогда как по меньшей мере одна колонка, содержащая гидроксиапатитную смолу, используется на стадии очистки. В некоторых случаях вместо (или в дополнении к) гидроксиапатитной колонки можно использовать катионообменную колонку. Например, в некоторых вариантах осуществления катионообменная колонка с полиметакрилатной смолой, функционализированной сульфатными группами, такая как TOYOPEARL Sulfate-650F. Чистота солубилизованного белка может повыситься с 44%-47% после UF/DF до 93%-97% после анионообменной хроматографии до по меньшей мере 99% после хроматографии на гидроксиапатите. Извлечение солубилизиро-

ванного белка может увеличиваться с 70%-73% после анионообменной хроматографии по меньшей мере до 97% после хроматографии на гидроксипатите.

Выделение не встречающихся в природе слитых белков из телец включения

В некоторых вариантах осуществления не встречающиеся в природе слитые белки, подлежащие очистке, выделяют из телец включения (IB). IB, как здесь описано, могут представлять собой ядерные или цитоплазматические агрегаты стабильных веществ, таких как белки и полипептиды. В некоторых вариантах осуществления дважды промытые тельца включения (DWIB), содержащие неприродные слитые белки (например, SEQ ID NO: 14-21) из ферментации, ресуспендируют в конкретной буферной системе (см. пример 6).

В некоторых случаях концентрация DWIB составляет примерно от 0,5 г DWIB/100 мл буфера до примерно 5 г DWIB/10 мл буфера. В некоторых случаях концентрация DWIB составляет примерно от 2 г DWIB/50 мл буфера до примерно 5 г DWIB/50 мл буфера. В некоторых случаях концентрация DWIB составляет примерно от 1 г DWIB/20 мл буфера до примерно 1 г DWIB/10 мл буфера. В некоторых случаях концентрация DWIB составляет по меньшей мере 1 г DWIB/100 мл буфера. В некоторых случаях концентрация DWIB составляет по меньшей мере 1 г DWIB/10 мл буфера.

Буферная система для ресуспендирования может включать различные буферные агенты и ингредиенты. В некоторых случаях буферная система для ресуспендирования содержит гуанидин/HCl (Gu-HCl) в концентрации по меньшей мере 1 М по меньшей мере 2 М по меньшей мере 4 М по меньшей мере 6 М по меньшей мере 8 М. В некоторых случаях концентрация Gu-HCl составляет примерно от 4 М до примерно 8 М. В некоторых случаях буферная система для ресуспендирования включает Трис-буфер, где концентрация Трис составляет по меньшей мере 5 мМ по меньшей мере 10 мМ по меньшей мере 20 мМ по меньшей мере 50 мМ или по меньшей мере 100 мМ. В некоторых случаях Трис-буфер имеет концентрацию примерно от 40 мМ до примерно 60 мМ. Трис-буфер может представлять собой Трис-HCl. Трис-HCl может иметь pH от 8,0 до 8,5. Трис-HCl может иметь pH 8,2. В некоторых случаях буферная система для ресуспендирования включает дитиотреитол (DTT). DTT может иметь концентрацию по меньшей мере 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ или 70 мМ. DTT может иметь концентрацию от 7 до 11 мМ, от 8 до 10 мМ или от 9 до 10 мМ. В некоторых случаях буферная система для ресуспендирования включает этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). ЭДТА может иметь концентрацию по меньшей мере 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ или 2,5 мМ. ЭДТА может иметь концентрацию от 1 мМ до 2,5 мМ или от 1,9 до 2,1 мМ. В некоторых вариантах осуществления буферная система для ресуспендирования содержит, по существу состоит или состоит из Трис-буфера, Gu-HCl и DTT. Буферная система, используемая для ресуспендирования, может иметь pH примерно от 6 до примерно 10. В некоторых случаях буферная система имеет pH примерно от 7,5 до примерно 8,5. В некоторых случаях pH буферной системы составляет по меньшей мере 7. В некоторых случаях pH буферной системы составляет по меньшей мере 8. В некоторых случаях pH буферной системы составляет по меньшей мере 8,5.

Восстановление солибилизованных не встречающихся в природе слитых белков

К раствору для ресуспендирования может быть добавлен восстанавливающий агент. Восстанавливающим агентом может быть дитиотреитол (DTT). Количество используемого восстанавливающего агента может зависеть от объема раствора для ресуспендирования и слитого белка, присутствующего в этом растворе. В некоторых случаях количество используемого восстанавливающего агента составляет примерно от 0,025 мМ до примерно 50 мМ, от 0,5 до 30 мМ, от 1 до 10 мМ. В некоторых случаях количество используемого восстанавливающего агента составляет, по меньшей мере (или между) 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ или 10 мМ.

Раствор солибализованного неприродного слитого белка (например, SEQ ID NO: 14-21) можно инкубировать при различных температурах в диапазоне примерно от 2 до примерно 40°C. В некоторых случаях раствор белка можно инкубировать при комнатной температуре (rt). Инкубацию можно проводить при перемешивании раствора. Раствор можно перемешивать на магнитной мешалке, и затем центрифугировать. Центрифугирование можно проводить при скорости примерно от 1000× g до примерно 20000× g. В некоторых случаях центрифугирование выполняется при 15970× g в течение 90 мин при 4°C. Время инкубации может варьироваться от примерно 20 мин до примерно 180 мин, в зависимости от концентрации ингредиентов, концентрации слитого белка (например, SEQ ID NO: 14-21).

Определение концентрации белка в различных растворах во всех способах и процедурах, описанных здесь, можно выполнить с использованием анализа Брэдфорда. Концентрация солибализованного неприродного слитого белка может составлять примерно от 1 до примерно 50 мг/мл. В некоторых случаях конечная концентрация солибализованного неприродного слитого белка может составлять примерно от 3 до примерно 30 мг/мл. В некоторых случаях конечная концентрация солибализованного неприродного слитого белка может составлять примерно от 5 до примерно 20 мг/мл. В некоторых случаях конечная концентрация солибализованного неприродного слитого белка может составлять по меньшей мере 15 мг/мл.

Рефолдинг не встречающихся в природе слитых белков

Не встречающиеся в природе слитые белки по настоящему изобретению могут проявлять свою

биологическую активность за счет своей специфической трехмерной структуры или фолдинга. Следовательно, рефолдинг данных полипептидов может быть важным при разработке данных полипептидов для фармацевтического применения. Желателен рефолдинг слитого белка, содержащего по меньшей мере носитель и IL-22, может включать рефолдинг носителя или IL-22 в третичную структуру, аналогичную третичной структуре гомологичного встречающегося в природе носителя, или последовательности IL-22, или третичную структуру, которая приводит к поддержанию желаемой активности носителя (например, обеспечение транскрипции слитого белка) и IL-22. Способы, описанные здесь, могут включать рефолдинг солюбилизованного неприродного слитого белка для получения повторно свернутого неприродного слитого белка. Рефолдинг может иметь место до проведения анионообменной хроматографии.

Солюбилизованный белок (например, SEQ ID NO: 14-21) можно добавить к раствору для рефолдинга, также называемому буферным раствором для рефолдинга. Количество используемого солюбилизованного белка может составлять от 0,1 до 1 мг/кг, от 1 до 100 мг/кг, от 1 до 50 мг/кг, от 1 до 10 мг/кг от 5 до 20 мг/кг или примерно 15 мг/кг. Количество солюбилизованного белка может составлять по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг. Количество солюбилизованного белка может составлять не более 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг. Раствор для рефолдинга может иметь pH от 7,5 до 8,5 или примерно 7,0.

Буферный раствор для рефолдинга может содержать аминокислоту, полиол, соль, сахар, окислительно-восстановительный реагент, хаотропный агент или их комбинацию. Аминокислота может представлять собой пролин, глицин, аргинин или аланин. Полиол может быть глицерином. Соль может представлять собой хлорид натрия (NaCl), хлорид калия (KCl) или хлорид магния (MgCl₂). Сахар может быть глюкозой или сахарозой. Окислительно-восстановительным реагентом может быть цистеин, цистамин, глутатион, дитиотреитол (DTT) или сульфат меди (CuSO₄). В некоторых вариантах осуществления буфер для рефолдинга содержит Трис-основание, аргинин-HCl, мочевины, ЭДТА, глицерин, L-цистеин, цистамин-2HCl, DTT, Gu-HCl или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления буфер для рефолдинга содержит, по существу состоит или состоит из Трис pH 8,5, аргининглицерина, цистеина и цистамин. Концентрации Трис-буфера могут составлять примерно от 20 до примерно 200 мМ с pH примерно от 6 до примерно 9. Концентрации аргинин-HCl могут варьироваться примерно от 0,1 М до примерно 1,5 М, примерно от 0,75 до 1,25 М или примерно 1,0 М. Концентрации мочевины могут находиться в диапазоне примерно от 0,5 М до 1,5 М. Концентрации ЭДТА могут находиться в диапазоне от 1 мМ до 3 мМ. Концентрации глицерина могут находиться в диапазоне примерно от 2% об./об. до примерно 20% об./об., примерно от 8% об./об. до примерно 12% об./об. или примерно 10% об./об. Концентрации цистеина могут составлять от 1 мМ до 5 мМ, от 2 до 4 мМ или примерно 3 мМ. Цистеин может представлять собой L-цистеин. Концентрации цистамин могут находиться в диапазоне примерно от 0,5 мМ до примерно 5 мМ, примерно от 1 мМ до примерно 4 мМ или примерно 3 мМ. Цистамин может представлять собой цистамин-2HCl. Концентрации DTT могут варьироваться примерно от 0,1 мМ до примерно 1 мМ. Концентрации Gu-HCl могут находиться в диапазоне примерно от 50 мМ до примерно 500 мМ. Буфер для рефолдинга может содержать, по существу состоять или состоять из Трис, L-аргинина, мочевины, ЭДТА, цистеина и цистамин. Буфер для рефолдинга может содержать, по существу состоять или состоять из 100 мМ Трис pH 8,5, 1М аргинина, 10% (об./об.) глицерина, 3 мМ L-цистеина и 1 мМ цистамин-2HCl. Солюбилизованный неприродный слитый белок может быть добавлен в буфер для рефолдинга для получения смеси для рефолдинга. Концентрация неприродного слитого белка после добавления к смеси для рефолдинга может составлять примерно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл, от 0,5/мл до 1,5 мг/мл, от 0,75 мг/мл до 1,25 мг/мл или примерно 1 мг/мл. Концентрация не встречающегося в природе слитого белка в смеси для рефолдинга может составлять менее 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл или 1,0 мг/мл.

В различных вариантах осуществления используется объем примерно от 100 мл до примерно 10000 л буфера для рефолдинга. В некоторых случаях объем составляет примерно от 50 мл до примерно 1500 л. В некоторых случаях объем составляет примерно от 10 л до примерно 300 л. В некоторых случаях объем составляет по меньшей мере 200 л.

Раствор для рефолдинга может иметь определенную температуру. Например, раствор для рефолдинга можно предварительно охладить примерно до 2-12°C. В некоторых случаях раствор для рефолдинга предварительно охлаждают по меньшей мере примерно до 3°C. Данный процесс рефолдинга можно оптимизировать в зависимости от используемого белка и области применения (фиг. 18).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения смесь для рефолдинга инкубируют в течение определенного периода времени. В некоторых случаях процесс может занять примерно 1, 2, 4, 5 или 20 ч. В некоторых случаях процесс рефолдинга занимает от 15 до 25 ч. В некоторых случаях устанавливают перистальтический насос на определенную скорость потока в зависимости от состава раствора (например, концентрации или объема) для доставки солюбилизованного материала в раствор для рефолдинга. В некоторых случаях перистальтический насос устанавливают на скорость потока 60-80 мл/мин. В процессе оптимизации использовались дизайн эксперимента (DOE) с 15 различными матрицами, 12 переменными и 200 реакциями рефолдинга. Решения принимались методом исключения.

В различных вариантах осуществления можно провести количественный анализ для определения

количества или процента правильно свернутого белка в растворе, содержащем повторно свернутые неприродные слитые белки. В некоторых случаях проводят SEC-HPLC для определения количества правильно свернутого неприродного слитого белка, присутствующего в образцах рефолдинга.

Чистота повторно свернутого неприродного слитого белка может составлять от 45 до 65%, от 40 до 60% или от 45 до 55%. Чистота подвергнутого рефолдингу неприродного слитого белка может составлять по меньшей мере 40%, 45%, 50% или 55%.

Тангенциальная поточная фильтрация (TFF) солюбилизованных конструкций для доставки IL-22

В различных вариантах осуществления рефолдинг белка выполняется в комбинации с системами тангенциальной поточной фильтрации (TFF) (например, Millipore) и системами ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF) с определенными порогами отсека по молекулярной массе (MWCO) или до них.

Смесь для рефолдинга белков можно затем обработать TFF для концентрирования и буферным обменом раствора. В некоторых случаях процесс выполняется ультрафильтрацией/диафильтрацией (UF/DF). Во время ультрафильтрации раствор можно сконцентрировать в 8-12 или примерно в 10 раз. За ультрафильтрацией может следовать 5-кратный буферный обмен во время диафильтрации с буфером для диафильтрации. UF/DF может включать использование фильтров Millipore Ultracell Pellican3 с отсекаем по молекулярной массе 10-20 кДа с плоскими листовыми кассетами TFF 1-2 м². Конкретные параметры (например, TMP) могут варьироваться в зависимости от молекулярных характеристик белка. Буфер для диафильтрации может содержать от 10-25 мМ Трис-основания при pH примерно от 7 до примерно 8,5 и от 50-200 мМ NaCl. Конкретные параметры могут варьироваться в зависимости от молекулярных характеристик белка. Конечный объем в конце процесса UF/DF может составлять примерно от 5 до примерно 100 л. В некоторых случаях конечный объем колеблется примерно от 10 до примерно 50 л. В некоторых случаях конечный объем составляет примерно от 80 мл примерно до 10 л.

Последующую фильтрацию можно провести с использованием системы поточной фильтрации. В некоторых случаях система поточной фильтрации представляет собой систему фильтрации AkroPac, перистальтический насос и трубки Cole-Parmer. Можно провести анализ Брэдфорда для определения концентрации белка, выхода и стадии извлечения.

В различных вариантах осуществления может быть проведен количественный анализ для определения количества или процентного содержания правильно свернутого белка в растворах образцов. В некоторых случаях проводят SEC-HPLC для определения количества правильно свернутого неприродного слитого белка, присутствующего в образцах для рефолдинга и UF/DF.

Чистота раствора, содержащего повторно свернутый неприродный слитый белок после UF/DF, может составлять от 35 до 55%, от 40 до 50%, от 43 до 47% или примерно 45%. Чистота раствора, содержащего повторно свернутый неприродный слитый белок после UF/DF, может составлять по меньшей мере 35, 40 или 45%. Извлечение солюбилизованного, повторно свернутого не встречающегося в природе слитого белка после UF/DF может составлять от 87 до 97%, от 90 до 94%, от 92 до 93% или примерно 92,5%. (Также можно использовать другие системы концентрирования и буферного обмена).

Очистка и извлечение не встречающихся в природе слитых белков

Как описано ранее, использование двух методов хроматографии в тандеме, таких как анионообменная хроматография и хроматография на гидроксапатите (или, альтернативно, катионообменная хроматография), может привести к повышению чистоты и извлечения не встречающегося в природе слитого белка, такого как конструкции для доставки IL-22, описанные здесь, из раствора. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения характеристики хроматографии (например, тип колонки, смола, скорость потока, буферные системы, градиент и проводимость) определяются и оптимизируются в зависимости от различных параметров, например, белка, предназначенного для очистки. Для очистки белка, как здесь описано, можно использовать различные колонки для очистки.

Анионообменная хроматография

Способы, описанные здесь, могут включать проведение анионообменной хроматографии (AEX) на смеси, содержащей не встречающийся в природе слитый белок. Смесь может представлять собой раствор, содержащий повторно свернутый неприродный слитый белок. Проведение анионообменной хроматографии может дать первую фракцию, содержащую неприродный слитый белок.

Различные смолы могут использоваться в сочетании со способами и композициями по настоящему изобретению. В некоторых случаях смола содержит гранулы полиметилакрилата, функционализированного амином. В некоторых случаях для очистки белка используют анионообменную смолу NH₂-750F. Колонку с высотой слоя по меньшей мере 15, 20, 25 или 30 см можно заполнить смолой. Колонка с высотой слоя от 10 до 50 см может быть заполнена смолой таким образом, чтобы обеспечить объем колонки, который может способствовать соответствующей динамической связывающей способности (например, > 20 г/л), чтобы обеспечить получение желаемого количества белка. В некоторых случаях динамическая связывающая способность колонки составляет от 5 до 100 г/л, от 20 до примерно 50 г/л, от 15 до 30 г/л или от 20 до 25 г/л.

Буферные системы, используемые для элюирования (например, градиентного элюирования) в ани-

онообменной хроматографии, могут включать один, два, три или четыре различных буферных раствора (например, буферы от А до D). В некоторых вариантах осуществления в анионообменной хроматографии используются два буфера, которые здесь называются буфером А и буфером В. В некоторых случаях буферный раствор содержит Трис (например, 10-50 мМ, рН 7-9) и/или NaCl (например, 0,1-5 М). В некоторых случаях буферный раствор дополнительно содержит глицерин. В некоторых вариантах осуществления буферный раствор (растворы), используемый в анионообменной хроматографии, например, такой как буфер А или буфер В, содержит, по существу состоит или состоит из Трис рН 7,5 и NaCl и, необязательно, глицерина.

Буфер А может содержать от 10 до 30 мМ, от 15 до 25 мМ, от 19 до 21 мМ или примерно 20 мМ Трис, рН 7,5. Буфер А может содержать от 0,25 до 0,95 М, от 0,35 до 0,75 М, от 0,45 до 0,55 М, примерно 0,5 М, от 0,65 до 0,75 М или примерно 0,7 М NaCl. Буфер В может содержать от 10 до 30 мМ, от 15 до 25 мМ, от 19 до 21 мМ или примерно 20 мМ Трис, рН 7,5. Буфер В может содержать от 1 до 3 М, от 1,5 до 2,5 М, от 1,9 до 2,1 М или около 2 М NaCl. Буфер А может дополнительно содержать от 8% до 12%, от 9% до 11% или примерно 10% (об./об.) глицерина. Буфер В может дополнительно содержать от 8% до 12%, от 9% до 11% или примерно 10% (об./об.) глицерина.

Для анионообменной хроматографии SEQ ID NO: 15, буфер А может содержать 20 мМ Трис рН 7,5 и 0,5 М NaCl, и буфер В может содержать 20 мМ Трис рН 7,5 и 2,0 М NaCl (табл. 4). Для анионообменной хроматографии SEQ ID NO: 17, буфер А может содержать 20 мМ Трис рН 7,5 и 0,5 М NaCl, и буфер В может содержать 20 мМ Трис рН 7,5 и 2,0 М NaCl. Для анионообменной хроматографии SEQ ID NO: 14, буфер А может содержать 20 мМ Трис рН 7,5, 0,7 М NaCl и 10% (об./об.) глицерина, и буфер В может содержать 20 мМ Трис рН 7,5, 2,0 М NaCl, и 10% (об./об.) глицерина (табл. 5).

В некоторых вариантах осуществления к раствору белка добавляют определенный объем раствора соли. В некоторых случаях к раствору белка добавляют раствор NaCl с концентрацией примерно от 0,1 до примерно 5 М.

Белковые растворы загружают на колонку таким образом, чтобы можно было поддерживать определенную скорость потока и определенное время удерживания на колонке для гарантии соответствующего взаимодействия белка и твердой фазы (например, смолы). В некоторых случаях скорость потока регулируется таким образом, чтобы время удерживания на колонке составляло примерно от 30 с до примерно 6 мин или примерно 5 мин. Время удерживания на колонке может составлять по меньшей мере 30 с или 1, 2, 3, 4 или 5 мин. Время пребывания колонки может быть не более 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мин. Вытекающий поток можно собирать и анализировать, чтобы определить, есть ли несвязанный белок, что считается потерей. Для анализа и очистки белка определяют оптическую плотность при 280 нм для концентрации белка и SEC-HPLC для определения чистоты белка.

В некоторых вариантах осуществления процентное содержание (например, 0-100%) или скорость потока (например, 1-10 мл/мин) первого буфера комбинируется со вторым буфером для достижения конкретной конечной скорости потока (например, 1-10 мл/мин) колоночной системы очистки. Например, для очистки белка используется линейный градиент 20 объемов колонки (CV) от 0,0-62,5% В (100-37,5% А) с последующим ступенчатым градиентом до 100% В (0% А) для дополнительных 5 CV. В некоторых случаях градиент 0-75% В (100-25% А) 40 CV, стадия 100% В, 10 CV может быть выполнен как градиент элюирования, указывающий на чистоту белка 91-93% и выход > 90%.

Чистота неприродного слитого белка в первой фракции может составлять от 90 до 99% или от 91 до 95%. Чистота солиобилизованного неприродного слитого белка в первой фракции может составлять по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95%. Извлечение солиобилизованного неприродного слитого белка в первой фракции может составлять от 61 до 81%, от 66 до 76% или от 71 до 72%.

Катионообменная хроматография или хроматография на гидроксипатите

Способы, описанные здесь, могут дополнительно включать подвергание первой фракции полученной после анионообменной хроматографии, обработке на катионообменной смоле, с получением второй фракции, содержащей не встречающийся в природе слитый белок. Катионообменная смола может представлять собой метакрилатную смолу, функционализированную сульфатными группами. Катионообменная смола может быть смолой TOYOPEARL® Sulfate-650F.

Способы, описанные здесь, могут дополнительно или альтернативно включать подвергание первой фракции, полученной после анионообменной хроматографии, обработке гидроксипатитовой смолой с получением второй фракции, содержащей неприродный слитый белок. Гидроксипатитовая смола может быть катионообменной смолой, дополнительно включающей средство к кальцию. Гидроксипатитовая смола может содержать фосфат кальция. Смола на основе гидроксипатита может иметь химическую формулу: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Гидроксипатитовая смола может иметь размер частиц от 30 до 50 мкм, от 35 до 45 мкм или примерно 39 мкм. Гидроксипатитовая смола может представлять собой смолу CaPure®.

Преимущества смолы CaPure® могут включать следующее: а) солеустойчивость, позволяющую адсорбировать белок с высокой проводимостью в водных растворах; б) не требуется подготовка белков (например, слитых белков, таких как SEQ ID NO: 14-21) перед загрузкой; в) приводит к высокому извлечению (> 90%); д) высокая связывающая способность (> 20 мг/мл смолы); е) повышает чистоту за счет

удаления низкомолекулярных примесей (LMW); и f) обеспечивает клиренс эндотоксинов (<1,0 МЕ/мг).

Катионообменную смолу или гидроксиапатитовую смолу можно использовать для упаковки хроматографической колонки. Колонка может иметь высоту слоя от 10 до 50 см или примерно 20 см. Колонка может иметь высоту слоя по меньшей мере 10, 15, 20, 25 или 30 см. Колонка может иметь высоту слоя не более 20, 30, 40 или 50 см. В некоторых случаях гидроксиапатитовая смола CaPure® смешанного типа используется для заполнения колонки с высотой слоя 10-50 см, обеспечивая объем колонки, обеспечивающий динамическую связывающую способность максимум 10-100 г/л для обеспечения получения желаемого количества белка.

Буферные системы, используемые для элюирования (например, градиентного элюирования) в хроматографии на гидроксиапатите, могут включать один, два, три или четыре различных буферных раствора (например, буферы от А до D). В некоторых вариантах осуществления в хроматографии на гидроксиапатите используются два буфера, которые называются здесь буфером А и буфером В. В некоторых случаях буферный раствор содержит Трис (например, 10-50 мМ, рН 7-9) и/или NaCl (например, 0,1-5 М). В некоторых случаях буферный раствор дополнительно содержит глицерин. В некоторых вариантах осуществления первый буферный раствор, используемый в хроматографии на гидроксиапатите, например, такой как буфер А, содержит, по существу состоит или состоит из Трис рН 7,5, NaCl и CaCl₂. В некоторых вариантах осуществления второй буферный раствор, используемый в хроматографии на гидроксиапатите, такой как, например, буфер В, содержит, по существу состоит или состоит из фосфата натрия с рН 7,0, NaCl и CaCl₂.

Буфер А может содержать от 10 до 30 мМ, от 15 до 25 мМ, от 19 до 21 мМ или примерно 20 мМ Трис, рН 7,5. Буфер А может содержать от 80 до 120 мМ, от 90 до 110 мМ или примерно 100 мМ NaCl. Буфер А может содержать от 0,5 до 1,5 мМ, от 0,75 до 1,25 мМ, от 0,9 до 1,1 мМ или примерно 1 мМ CaCl₂. Буфер В может содержать от 150 до 250 мМ, от 175 до 225 мМ, от 190 до 210 мМ или примерно 200 мМ фосфата натрия, рН 7,0. Буфер В может содержать от 50 до 150 мМ, от 75 до 125 мМ, от 90 до 110 мМ или примерно 100 мМ NaCl. Буфер В может содержать от 0,5 до 1,5 мМ, от 0,75 до 1,25 мМ, от 0,9 до 1,1 мМ или примерно 1 мМ CaCl₂.

Для гидроксиапатитной хроматографии SEQ ID NO: 15, буфер А может содержать 20 мМ Трис, рН 7,5, 100 мМ NaCl и 1 мМ CaCl₂, и буфер В может содержать 200 мМ фосфата натрия, рН 7,0, 100 мМ NaCl и 1 мМ CaCl₂ (табл. 6). Для гидроксиапатитной хроматографии SEQ ID NO: 17, буфер А может содержать 20 мМ Трис, рН 7,5, 100 мМ NaCl и 1 мМ CaCl₂, и буфер В может содержать 200 мМ фосфата натрия, рН 7,0, 100 мМ NaCl и 1 мМ CaCl₂. Для гидроксиапатитной хроматографии SEQ ID NO: 14, буфер А может содержать 20 мМ Трис, рН 7,5, 100 мМ NaCl и 1 мМ CaCl₂, и буфер В может содержать 200 мМ фосфата натрия, рН 7,0, 100 мМ NaCl и 1 мМ CaCl₂ (табл. 7).

Чистота солюбилизованного белка после использования катионообменной смолы или гидроксиапатитовой смолы может составлять от 99 до 100%. Чистота солюбилизованного белка после использования гидроксиапатитовой смолы может составлять по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Извлечение солюбилизованного белка после использования гидроксиапатитовой смолы может составлять от 85 до 100%, от 96 до 99% или от 97 до 98%. Гидроксиапатитовая смола может представлять собой CaPure®.

Фракции, собранные во время колоночной хроматографии, которые содержат очищенное соединение (например, слитый белок), можно сконцентрировать и формулировать для введения с использованием буферного обмена или диафильтрации. Например, фракции, собранные во время CaPure®, можно сконцентрировать и формулировать с использованием системы TFF (например, Pall Corporation) для концентрирования белка. Белок можно сконцентрировать до конечной концентрации 20 мг/мл с последующим 5-кратным буферным обменом. Процесс фильтрации можно выполнить с использованием ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF) и фильтров Millipore Pellican3 с отсечением по молекулярной массе 10 кДа с плоскими листовыми кассетами TFF 0,114 м². MWCO системы фильтрации может варьироваться в зависимости от очищаемого белка (например, молекулярной массы). Буфер для диафильтрации может состоять из 10-20 мМ фосфата натрия при рН примерно 7,0, 50-100 мМ NaCl. Формулированные SEQ ID NO: 14-21 затем можно отфильтровать с использованием системы поточной фильтрации, в которой используется фильтр AkroPac 0,8/ 0,2 мкм и перистальтический насос Cole-Parmer и трубки. Очищенный и приготовленный белок можно хранить в аликвотах при -80°C до дальнейшего использования.

В конкретных вариантах осуществления белки, анализированные с помощью SEC-HPLC, могут иметь чистоту выше 97% (обычно > 98%) с использованием колонки TSKgel GW3000SWXL, 5 мкм, 7,8 мм ID × 30,0 см L (Tosoh Bioscience, 8541).

Анализ белков

Образцы из различных фракций можно анализировать с помощью SDS-PAGE с использованием системы визуализации Bio-Rad ChemiDoc® MP, и фракции, собранные во время колоночной хроматографии, можно анализировать на содержание белка с помощью Thermo Fisher Nanodrop One®. Общие методы детектирования или анализа белков включают гель-электрофорез, флуоресцентную микроскопию, капиллярный электрофорез, масс-спектрометрию, анализ сдвига электрофоретической подвижности или

ядерный магнитный резонанс.

Способы лечения

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции, содержащие слитые молекулы по настоящему изобретению, предназначены для применения в лечении и/или профилактике воспалительных заболеваний. Эти фармацевтические композиции можно формулировать для пероральной доставки. "Воспалительные заболевания" могут включать все заболевания, связанные с острым или хроническим воспалением. Острое воспаление представляет собой первоначальную реакцию организма на неблагоприятные стимулы, возникающую в результате повышенного притока плазмы и лейкоцитов (например, гранулоцитов) из крови в поврежденные ткани. Ряд биохимических событий способствует развитию воспалительного ответа, вовлекая местную сосудистую систему, иммунную систему и различные клетки в поврежденную ткань. Длительное воспаление называется хроническим воспалением, которое приводит к прогрессивному изменению типа клеток, присутствующих в очаге воспаления, и характеризуется одновременным разрушением и заживлением ткани от воспалительного процесса. Воспалительные заболевания могут быть вызваны, например, ожогами, химическими раздражителями, обморожением, токсинами, инфекциями, вызванными патогенами, физическими травмами, иммунными реакциями в результате гиперчувствительности, ионизирующим излучением или инородными телами, например, такими как занозы, грязь и дебрис. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание представляет собой повреждение эпителиальных клеток, гепатит, ожирение, жировую болезнь печени, воспаление печени, панкреатит, болезнь Крона, фистулизирующую форму болезни Крона, язвенный колит, язвенный колит легкой-средней степени, язвенный колит средней-тяжелой степени, поухит, проктит, рассеянный склероз, системную красную волчанку, синдром "трансплантат против хозяина", ревматоидный артрит или псориаз.

Кроме того, здесь описаны способы лечения заболевания или состояния у субъекта, включающие введение субъекту не встречающегося в природе слитого белка. В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой повреждение эпителиальных клеток, гепатит, ожирение, жировую болезнь печени, воспаление печени, панкреатит, болезнь Крона, фистулизирующую форму болезни Крона, язвенный колит, язвенный колит легкой-средней степени, язвенный колит средней-тяжелой степени, колит, поухит, проктит, рассеянный склероз, системная красная волчанка, синдром "трансплантат против хозяина", ревматоидный артрит или псориаз. Не встречающийся в природе слитый белок можно вводить субъекту перорально. Субъект может представлять собой человека.

Примеры

Данные примеры приведены только для иллюстративных целей, и не для ограничения объема формулы изобретения, представленной здесь.

Пример 1. Экспрессия конструкции для доставки

В данном примере, в общем, описано приготовление конструкции для доставки в виде одной аминокислотной последовательности, содержащей последовательность носителя, полученную из Cholix, спейсерную последовательность и терапевтическую полезную нагрузку.

Сначала последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую конструкцию для доставки SEQ ID NO: 15, амплифицировали с использованием ПЦР, включая пары рестрикционных ферментов NdeI и EcoRI, PstI и PstI, AgeI и EcoRI или сайты PstI и EcoRI на двух концах продуктов ПЦР. После расщепления рестрикционным ферментом продукты ПЦР клонировали в подходящую плазмиду для клеточной экспрессии, которую расщепляли соответствующими парами рестрикционных ферментов. Плазида кодировала конструкцию для доставки, содержащую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 15.

Конструкцию для доставки экспрессировали следующим образом: компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen, Madison, Wis.) трансформировали с использованием стандартного метода теплового шока в присутствии соответствующей плазмиды для генерации клеток, экспрессирующих конструкцию для доставки, селектировали на среде, содержащей ампициллин, и выделяли и культивировали в бульоне Лурия-Бертани (Difco; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) с антибиотиком, затем индуцировали для экспрессии белка добавлением 1 mM изопропил-D-тиогактопиранозид (IPTG) при OD 0,6. Через 2 ч после индукции IPTG клетки собирали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин. Тельца включения выделяли после лизиса клеток и дважды промывали водой в соотношении 1 г/10 мл. Осадок после лизиса клеток ресуспендировали в воде с последующим центрифугированием в течение 1 ч при 10000 об/мин при 4°C. Затем данную промывку повторяли еще один раз. Дважды промытые IB (DWIB) солибилизировали в буфере, содержащем 50 mM трис-HCl (pH 8,2), 6 M гуанидина HCl и 10 mM дитиотреитола (DTT). Затем солибализованный материал разбавляли буфером для рефолдинга, содержащим 0,1 M Трис (pH=8,5 при 4°C), 1,0 M L-аргинина, 10% глицерина, 3 mM L-цистеина, 1 mM цистамина-2HCl. Белок с SEQ ID NO: 15 очищали анионообменной хроматографией (ионообменная хроматография на Q-сефарозе) и гель-фильтрационной хроматографией Superdex 200 (Amersham Biosciences, Inc., Швеция). Чистоту белка определяли с помощью SDS-PAGE и аналитической ВЭЖХ (Agilent, Inc., Palo Alto, Calif.).

Конструкцию для доставки анализировали для подтверждения правильной укладки в соответствии

с предполагаемым размером молекулы. После индукции экспрессированный белок собирали из телец включения. Используя тельца включения, степень экспрессии конструкции для доставки анализировали с помощью гель-электрофореза, и кажущуюся молекулярную массу сравнивали с расчетной массой.

Результаты показали стабильное и эффективное получение функциональной конструкции для доставки с высоким выходом и чистотой.

Пример 2. Модель *in vitro* для оценки транспорта полезной нагрузки через монослой эпителиальных клеток

В данном примере показана модель *in vitro*, разработанная для оценки транспортных свойств полезных нагрузок или конструкций для доставки, описанных здесь.

На фиг. 1 схематически показано устройство, содержащее апикальную камеру над монослоем эпителиальных клеток и базальную камеру под таким монослоем эпителиальных клеток.

Для определения проникновения от апикальной стороны к базолатеральной стороне, испытываемые образцы (например, конструкция для доставки, полезная нагрузка и т.д.) наносили на апикальную (А) сторону, и степень проникновения определяли на базолатеральной (В) стороне. Для определения проникновения от базолатеральной стороны к апикальной стороне, испытываемые образцы добавляли на базолатеральную (В) сторону и определяли степень проникновения на апикальной (А) стороне.

Данные можно выразить в виде проникновения (P_{app}) в соответствии со следующим уравнением: $P_{app} = (dQ/dt)/(C_0 \cdot A)$. Q/dt представляет собой скорость проникновения, C_0 представляет собой начальную концентрацию испытываемого вещества, A представляет собой площадь монослоя. Коэффициент переноса потока (Re) можно рассчитать по следующему уравнению: $(Re) = P_{app} (B-A)/P_{app} (A-B)$. $Re > 2$ может указывать на потенциальный субстрат для P-гр или других активных переносчиков оттока.

Клетки SMI-100 или Caco-2 можно использовать для оценки функции трансцитоза носителя или конструкции для доставки *in vitro*.

Для клеток Caco-2 проводили анализ ELISA для оценки способности носителя или конструкции для доставки перемещаться через монослой клеток Caco-2 посредством трансцитоза. Клетки Caco-2 (ATCC HTB-37™) поддерживали в 5% CO₂ при 37°C в полной среде: среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко F12 (DMEM F12) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2,5 мМ глутамин, 100 Е пенициллина/мл и 100 мкг стрептомицина/мл (Gibco BRL, Grand Island, N.Y.). Клетки подпитывали данной средой (обозначенной как полная среда) каждые 2-3 дня и пассировали каждые 5-7 суток. Для проведения анализов клетки высевали в 24- или 96-луночные планшеты и культивировали до слияния.

Клетки Caco-2 культивировали в виде конфлюэнтных монослоев на покрытых коллагеном вкладышах Transwell из поликарбонатной мембраны с размером пор 0,4 мкм (Corning-Costar, Cambridge, MA) и использовали через 18-25 суток после достижения трансэпителиального электрического сопротивления (TER) $> 250 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ при измерении с помощью вольтметра Millicell-ERS® (Millipore). Апикально-базолатеральный (А→В) транспорт носителя или конструкции для доставки через этот монослой определяли измерением количества транспортированного белка на определенные временные точки (например, 15, 30 и 45 мин) после нанесения на апикальную сторону 4,7 нМ, 23,6 нМ и 236 нМ при 37°C. Измерения TER и степень флуоресцентного декстрана 10 кДа (измеренная с использованием протокола эксклюзивной ВЭЖХ) использовали для оценки барьерных свойств монослоя в ходе исследования. Степень транспорта конструкции для доставки (например, SEQ ID NO: 15) определяли титрованием собранной среды в клеточном анализе цитотоксичности. Транспортированную конструкцию для доставки определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием антител (например, против носителя или против полезной нагрузки, таких как анти-IL-22 антитело) для захвата и детектирования.

Конфлюэнтным монослоем тканей тонкого кишечника человека (SMI-100, MatTek Corporation; Ashland, MA, USA), созданным на вкладышах для культивирования клеток, перед использованием давали стабилизироваться в течение 24 ч при 37°C. Только вкладыши, имеющие трансэпителиальное электрическое сопротивление (TEER) $> 400 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$, считались имеющими достаточную целостность монослоя для использования в исследованиях. Вторичную проверку целостности монослоя проводили оценкой подавления транспорта декстрана 70 кДа. Камеры один раз промывали буфером для транспорта (PBS). Испытуемые молекулы, приготовленные в концентрации 20 мкг/мл, наносили на апикальную поверхность вкладышей в объеме 100 мкл. Базолатеральные объемы 500 мкл PBS отбирали на каждую временную точку для исследований транспорта. Каждое экспериментальное условие выполняли в трех повторностях.

Пример 3. Опосредованный носителем транспорт IL-22 через поляризованные эпителиальные клетки кишечника

В данном примере показано, что носитель (SEQ ID NO: 7) может транспортировать полезную нагрузку IL-22 (SEQ ID NO: 11) через поляризованные эпителиальные клетки кишечника *in vitro*. Данный пример дополнительно демонстрирует, что носитель с SEQ ID NO: 7 может транспортировать биологически активную полезную нагрузку IL-22 через поляризованные эпителиальные клетки кишечника и в собственную пластинку оболочки кишечника *in vivo*.

Транспорт конструкции для доставки (SEQ ID NO: 15) через монослой клеток Caco-2 и эпителиаль-

ную ткань тонкого кишечника (также называемую здесь SMI-100) тестировали посредством нанесения конструкции для доставки на апикальную мембрану эпителиальных клеток, согласно примеру 2 и как показано на фиг. 1 для апикального (А) к базальному (В) транспорту. Эксперименты проводили в двух повторностях, и образцы из базолатеральной камеры собирали через 15, 30 и 45 мин после нанесения в апикальную камеру для определения количества транспортированного белка. Количество транцитозированного белка измеряли с помощью анализов ELISA, как описано в примере 2.

Данные на фиг. 2 и 3 показывают, что носитель (SEQ ID NO: 7) при связывании с IL-22 (SEQ ID NO: 11) приводил к транспорту полезной нагрузки IL-22 как через монослой Caco-2 (фиг. 2), так и через SMI-100 (фиг. 3) в зависимости от времени, и что конструкция для доставки приводила к примерно в 2-3 раза большему количеству IL-22, перенесенному через эпителиальные клетки, по сравнению с IL-22 (SEQ ID NO: 12, M+IL-2234-179), который не был связан с носителем.

Для экспериментов *in vivo* транцитоз тестировали на самцах крыс Wistar. При включении в исследование самцов крыс Wistar содержали по 3-5 особей в клетке с циклом свет/темнота 12/12 ч, и их масса тела составляла примерно 225-275 г (возраст примерно 6-8 недель). Эксперименты проводили во время световой фазы с использованием протокола без восстановления животных, в котором используется непрерывная анестезия изофлураном. Проводили разрез брюшной полости по средней линии длиной 4-5 см, обнажающий среднюю часть тощей кишки. Стоковые растворы с концентрацией $3,86 \times 10^{-5}$ М конструкции для доставки (SEQ ID NO: 15) готовили в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), где 50 мкл (на крысу массой 250 г) вводили внутрипросветной инъекцией (ILI) с использованием иглы 29 номера. Затем место инъекции отмечали перманентным маркером. По окончании исследования область размером 3-5 мм, которая захватывала отмеченный сегмент кишечника, выделяли и обрабатывали для микроскопического анализа.

Результаты транцитозной активности конструкции для доставки (SEQ ID NO: 15) показаны на фиг. 4, демонстрируя, что значительные количества полезной нагрузки IL-22 (SEQ ID NO: 11) пересекали интактный и поляризованный эпителий кишечника *in vivo*, когда она представляла собой часть конструкции для доставки, которая включает связанный носитель, полученный из Cholix (SEQ ID NO: 7), с IL-22. Данное микроскопическое изображение показывает транспорт полезной нагрузки IL-22 (SEQ ID NO: 11) от апикального участка эпителия кишечника (выделено белыми стрелками № 1) к базальному участку эпителиальных клеток (выделено белой стрелкой № 2) и в собственную пластинку (сокращенно "l.p.") после введения конструкции для доставки SEQ ID NO: 15 в просвет тонкого кишечника крыс Wistar. Изображение также показывает, что IL-22 взаимодействует и связывается в значительной степени с рецепторами IL-22, расположенными на клетках внутри собственной пластинки и на внешней базальной мембране поляризованного эпителия (выделено белыми стрелками № 3). Локализация IL-22 обозначена белыми стрелками № 2 и № 3.

Пример 4. Рекомбинантный человеческий IL-22 связывается с рецепторами мышинового IL-22

В данном примере показано, что рекомбинантный человеческий IL-22 (rhIL-22, SEQ ID NO: 12) связывается с рецепторами мышинового IL-22 дозозависимым образом, сравнимым с рекомбинантным мышинным IL-22 (gmIL-22).

На фиг. 5А показано фосфорилирование STAT3 в мышинных В-клетках FL83 как функция концентрации агониста (в пМ), где агонист представляет собой rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) или gmIL-22. Данные показывают, что rhIL-22 и gmIL-22 индуцируют фосфорилирование STAT3 в зависимости от концентрации, демонстрируя, что человеческий белок IL-22 может связываться и индуцировать передачу сигнала через рецепторы мышинового IL-22 так же эффективно, как и мышинный IL-22.

На фиг. 5В показано, что rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) и gmIL-22 также индуцировали фосфорилирование STAT3 в мышинных клетках Hepa1-6.

На фиг. 6А показано, что rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) и gmIL-22 индуцируют фосфорилирование STAT5 в мышинных В-клетках FL83 дозозависимым образом, демонстрируя, что человеческий белок IL-22 может связываться и индуцировать передачу сигнала через рецепторы мышинового IL-22 с эффективностью, сравнимой с мышинным IL-22.

На фиг. 6В показано, что rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) и gmIL-22 также индуцируют фосфорилирование STAT5 в мышинных клетках Hepa1-6, но в последующих экспериментах необходимо будет определить дополнительный диапазон доз.

Полученные данные являются убедительным доказательством того, что rhIL-22 (например, используемый в конструкциях для доставки с SEQ ID NO: 10 или 11) способен активировать STAT3 и STAT5 в мышинных клетках, что дает основание для применения таких конструкций для доставки на мышинных моделях для оценки активности и функции IL-22.

Пример 5. Эффективность конструкции для доставки с SEQ ID NO: 15 *in vivo* на модели колита

В данном примере *in vivo* показана эффективность конструкции для доставки с SEQ ID NO: 15, содержащей производный Cholix носитель SEQ ID NO: 7, связанный с IL-22 с SEQ ID NO: 11 через линкер с SEQ ID NO: 13, по сравнению с одним IL-22 (SEQ ID NO: 12) на мышинной модели колита, индуцированного декстрансульфатом натрия (DSS).

На фиг. 7А представлен дизайн и временной график исследования *in vivo* с целью сравнения перо-

рального (п/о) введения конструкции для доставки с SEQ ID NO: 15 в двух дозах, 1 мг/кг и 30 мг/кг, один раз в сутки и при введении rhIL-22 внутрибрюшинно (в/б) в дозе 4 мг/кг один раз в сутки. Исследование *in vivo* проводили на самках мышей C57BL/6 в возрасте 8-10 недель, получавших стандартный корм, с массой тела примерно 23 г. Колит индуцировали химически введением 2,5% натрия декстрана сульфата (DSS) в питьевой воде *ad libitum*. Конечные точки исследования включали процентное изменение массы тела, индекса активности заболевания, длины и массы толстого кишечника, и также результаты гистопатологии.

На фиг. 7B показаны характеристики опытной и контрольной групп, использованных в исследовании, представленном на фиг. 7A.

На фиг. 8A показано изменение массы тела животных в процентах (%) на сутки 10 исследования относительно с сутками 0 в различных опытных и контрольных группах. Изменение массы тела относительно исходного периода (сутки 0 против суток 10) для rhIL-22 с SEQ ID NO: 12 или конструкции для доставки с SEQ ID NO: 15 в сравнении с носителем не было статистически значимым при оценке однофакторным дисперсионным анализом. Положительный модельный контроль (циклоспорин) CsA достоверно отличался от носителя при оценке однофакторным дисперсионным анализом.

На фиг. 8B показано изменение массы тела опытных и контрольных животных в течение первых 10 суток исследования. Средняя масса тела в группе CsA за период исследования была достоверно выше по сравнению с контрольным носителем в период с суток 6 по сутки 10, при оценке двухфакторным дисперсионным анализом (*, **, ***). Масса тела у мышей, получавших rhIL-22 (в/б), была достоверно выше относительно контрольного носителя на сутки 10 при оценке двухфакторным дисперсионным анализом (*), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

На фиг. 9 приведены результаты анализа плазмы с использованием ELISA для определения уровней IL-22 в плазме. Результаты показывают, что концентрации rhIL-22 в плазме имели тенденцию к повышению уровней в плазме после перорального введения доз 1 и 30 мг/кг конструкции для доставки с SEQ ID NO: 15 дозозависимым образом (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; среднее значение \pm SEM; $n=2$ наивные, 5 носитель, 5 CsA, 10 другие).

Полученные данные показывают, что конструкция для доставки с SEQ ID NO: 15 индуцировала дозозависимую тенденцию к увеличению массы тела после введения через желудочный зонд. Повышенные уровни IL-22 в плазме имели место после перорального введения конструкции для доставки с SEQ ID NO: 15 в дозах 1 и 30 мг/кг в зависимости от дозы. На основе этих данных можно предположить, что введенная перорально конструкция для доставки с SEQ ID NO: 15 способна ослаблять симптомы колита на мышинной модели с DSS, сравнимой с внутрибрюшинным введением rhIL-22.

Кроме того, оценивали биомаркеры конструкции для пероральной доставки с SEQ ID NO: 15 введением rhIL-22 мышам CD-1, как описано ниже.

На фиг. 10A показан дизайн исследования с введением однократной дозы *in vivo*, разработанный для идентификации биомаркера(ов) взаимодействия с мишенью после однократного (острого введения) rhIL-22 у здоровых мышей CD-1.

На фиг. 10B показан дизайн исследования *in vivo* с введением многократных доз (субхроническое введение), разработанный для идентификации биомаркера(ов) взаимодействия с мишенью после однократного или многократного введения rhIL-22 у здоровых мышей CD-1.

На фиг. 11A показано, что острое и субхроническое введение rhIL-22 приводило к последовательному повышению концентрации IL-22.

На фиг. 11B приведены некоторые фармакокинетические параметры, определенные во время экспериментов с острым и субхроническим введением, описанных на фиг. 11A.

На фиг. 12A показана ответная индуцированная концентрация циркулирующего мышинового С-реактивного белка (mCRP) на сутки 1 после острого введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) и через 5 суток субхронического введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12). Результаты показывают зависимое от времени увеличение циркулирующего mCRP в обеих опытных группах.

На фиг. 12B показано кратное изменение концентрации mCRP в плазме на 1 сутки после острого введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 12C показано кратное изменение концентрации mCRP в плазме через 5 суток субхронического введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 13A показана ответная индуцированная концентрация циркулирующего белка амилоида А (mSAA) в мышинной сыворотке на 1 сутки после острого введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) и через 5 суток субхронического введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 13B показано кратное изменение концентрации mSAA в плазме на 1 сутки после острого введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 13C показано кратное изменение концентрации mSAA в плазме через 5 суток субхронического введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 14A показана ответная индуцированная концентрация циркулирующего регенерирующего белка из островков Лангерганса 3β (Reg 3β) на 1 сутки после острого введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) и

через 5 суток субхронического введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 14B показано кратное изменение концентрации Reg3 β в плазме на 1 сутки после острого введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 14C показано кратное изменение концентрации Reg3 β в плазме через 5 суток субхронического введения rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

Полученные результаты показывают, что три потенциальных биомаркера PD IL-22 взаимодействия с мишенью: С-реактивный белок (CRP), сывороточный белок амилоид А (SAA) и регенерирующий белок из островков Лангерганса 3 β (Reg3 β), можно использовать в исследованиях для оценки фармакодинамики (PD) конструкций для доставки, таких как конструкции с SEQ ID NO: 15 или 17.

Пример 6. Солюбилизация белков

627 г дважды промытых теляц включения (DWIB) из ферментации SEQ ID NO: 15 ресуспендировали в 4500 мл 8М гуанидина/НСl (Gu-HCl) и 50 мМ Трис рН при 8,0. Затем добавляли 50 мМ Трис рН 8,5 для доведения объема до 6,0 л. Раствор осторожно перемешивали на пластине смесителя и добавляли 9,225 г восстанавливающего агента дитиотреитола (DTT). Конечный раствор 6 л солюбилизованного белка (SEQ ID NO: 15) состоял из 6 М Gu-HCl, 50 мМ Трис рН 8,0, 10 мМ DTT и 1 г DWIB/10 мл буфера. Раствор солюбилизованного белка (SEQ ID NO: 15) инкубировали при комнатной температуре (rt) при перемешивании на магнитной мешалке, и затем центрифугировали при 15970 \times g в течение 90 мин при 4 $^{\circ}$ C. Супернатант, содержащий солюбилизованный белок, осторожно переносили в новый сосуд общим объемом 5520 мл. Определение концентрации белка выполняли методом Брэдфорда и составляли 15 мг/мл.

Данные демонстрируют, что солюбилизацию белка можно проводить с использованием вышеописанной процедуры.

Пример 7. Рефолдинг белка

В данном примере показан рефолдинг белка как часть процесса очистки, как представлено на блок-схеме на фиг. 17.

Раствор для рефолдинга был тщательно исследован, разработан и оптимизирован (фиг. 18). В процессе оптимизации использовали дизайн экспериментов (DOE) с 15 различными матрицами, 12 переменными и 200 реакциями рефолдинга. Решения принимались методом исключения. Начальная смесь для рефолдинга (содержащая исходный раствор для рефолдинга и повторно свернутый солюбилизованный белок (SEQ ID NO: 15)) представлены в табл. 2. Оптимизированная смесь для рефолдинга (содержащая оптимизированный раствор для рефолдинга и повторно свернутый солюбилизованный белок (SEQ ID NO: 15)) представлены в табл. 3.

Таблица 2. Начальная смесь для рефолдинга

100 мМ Трис рН 8,5 (4 $^{\circ}$ C)
0,5 М аргинин
1 М мочевины
2 мМ ЭДТА
0,3 мМ GSH
1 мМ GSSG
концентрация 0,2 мг/мл при рефолдинге

Таблица 3. Оптимизированная смесь для рефолдинга

100 мМ Трис рН 8,5 (4 $^{\circ}$ C)
1,0 М аргинин
10% глицерина
3 мМ L-цистеина
1 мМ цистамина-2HCL
концентрация >0,1 мг/мл при рефолдинге

Раствор для рефолдинга объемом 105 л инкубировали при 4 $^{\circ}$ C в течение 16 ч, и затем фильтровали через поточный фильтр (AcroPac от Pall corporation или Sartopore 2XLG от Sartorius) с использованием мембраны 0,8/0,2 мкм и перистальтического насоса Cole-Parmer и трубок.

Солюбилизованный белок (SEQ ID NO: 15) (105 г) из примера 6 добавляли к 100 л оптимизированного раствора для рефолдинга, предварительно охлажденного до 4 $^{\circ}$ C.

Этот процесс был запрограммирован на один час с использованием перистальтического насоса Cole-Parmer, установленного на 73 мл/мин. Данный процесс проводили в холодном помещении при 4 $^{\circ}$ C.

Оптимизированный буферный раствор для рефолдинга дает большее количество SEQ ID NO: 15 по сравнению с агрегатами SEQ ID NO: 15 (фиг. 19-20). Использование начального повторно свернутого раствора дает примерно 10-15% правильно свернутого белка с SEQ ID NO: 15. Использование оптимизированного раствора для рефолдинга дает примерно 45-55% правильно свернутого белка с SEQ ID NO: 15.

Пример 8. Концентрирование белка и буферный обмен с использованием TFF UF/DF

В данном примере показано концентрирование белка и буферный обмен с использованием тангенциальной поточной фильтрации (TFF), основанной на принципах ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF).

Повторно свернутый белок (например, SEQ ID NO: 15) был обработан системой TFF (Millipore) для его 10-кратного концентрирования и 5-кратного буферного обмена. Процесс выполняли ультрафильтра-

цией/диафильтрацией (UF/DF) с использованием четырех кассет с плоскими листами MWCO Millipore Ultracell Pellican3 с порогом отсека 10 кДа, 1,14 м² TFF. Буфер для диафильтрации состоял из 20 мМ Трис-основания pH 7,5 и 100 мМ NaCl. Конечный объем в конце процесса UF/DF составлял 10 л. Затем данный материал фильтровали с использованием системы поточной фильтрации с использованием фильтра AkroPac 0,8/0,2 мкм от Pall Corporation и перистальтического насоса и трубок Cole-Parmer. Для определения концентрации белка, выхода и на стадии извлечения проводили анализ Брэдфорда. На данной стадии проводили количественную SEC-HPLC для определения количества правильно свернутого белка с последовательностью SEQ ID NO: 15, присутствующего в образцах рефолдинга и UF/DF. Коммерчески доступный BSA известной концентрации использовали в качестве референсного стандарта, на основе которого строили стандартную кривую для анализа Брэдфорда. Использовали систему ВЭЖХ Agilent 1100 и колонку TSKgel SuperSW3000, 4 мкм, ID 4,6 мм×30,0 см L (Tosoh Bioscience, 18675). На основе этого количественного анализа определяли эффективность рефолдинга.

Данные показывают, что рефолдинг можно выполнить с использованием буферного обмена и TFF UF/DF.

Пример 9. Хроматография белков с использованием смолы Capture Step NH₂-750F®

В данном примере показаны стадии захвата белка в анионообменной хроматографии с использованием смолы NH₂-750F®.

Для хроматографии белков использовали системы АКТА Avant 150 или АКТА Pilot FPLC от General Electric (GE). Анионообменную смолу Tosoh NH₂-750F® использовали для упаковки колонки с минимальной высотой слоя по меньшей мере 20 см и объемом колонки, который обеспечивал бы динамическую связывающую способность 20-25 г/л. Для заполнения колонки использовали буфер из 20 мМ ацетата натрия, pH 4,5 или 20 мМ цитрата натрия, pH 4,5. Использовали следующие буферы: буфер А: 20 мМ Трис, pH 7,5, 0,5 М NaCl; буфер В: 20 мМ Трис, pH 7,5, 2,0 М NaCl. Затем колонку с NH₂-750F промывали 0,5 М раствором NaOH, время контакта составляло 30 мин, и затем уравнивали буфером А не менее 3 объемов колонки (CV) или до тех пор, пока pH и проводимость не достигали стабильных значений при ожидаемых значениях (pH 7,5-pH 7,7, примерно 49 мСм/см ± 1 мСм/см).

Перед загрузкой на колонку в раствор белка UF/DF (SEQ ID NO: 15) добавляли 0,4 М NaCl внесением 5 М стокового раствора и измеряли проводимость для обеспечения проводимости 49 мСм/см ± 2 мСм/см. Раствор белка (SEQ ID NO: 15) загружали на колонку со скоростью потока, чтобы время удерживания на колонке составляло минимум 5 мин, и собирали остаток. Колонку промывали 3 CV буфера А или до тех пор, пока оптическая плотность при 280 нм не восстанавливалась и не стала стабильной на исходном уровне, примерно 0,0 мАЕ при 280 нм. В данный момент проводили линейный градиент 20 CV от 0,0-62,5% В с последующим ступенчатым градиентом до 100% В для дополнительных 5 CV. Собирали вытекающие фракции, и их объемы не превышали 0,5 объема колонки. Образцы из различных фракций анализировали с помощью SDS-PAGE с использованием системы визуализации Bio-Rad ChemiDoc® MP, и фракции, содержащие более 90% SEQ ID NO: 15, объединяли и обозначали как NH₂-750F-пул. Концентрацию белка во фракции NH₂-750F-пул измеряли с помощью Thermo Fisher Nanodrop One®, считывая оптическую плотность при 280 нм (A280) с учетом коэффициента экстинкции 1,22 для SEQ ID NO: 15 и отношения 260/280 нм < 0,6. Фракция NH₂-750F-пул содержит примерно 1,0 М NaCl.

Примерная хроматограмма после очистки с помощью NH₂-750F SEQ ID NO: 15 приведена на фиг. 21А с высотой слоя 20 см и объемом колонки 10 мл, и фиг. 21В с высотой слоя 30 см и объемом колонки 4,6 л.

Обобщенные результаты очистки на NH₂-750F приведен в табл. 4 для SEQ ID NO: 15 и в табл. 5 для SEQ ID NO: 14, которые обычно получали, подвергали рефолдингу и очищали способом, аналогичным SEQ ID NO: 15.

Таблица 4. Обобщенные результаты очистки SEQ ID NO: 15 NH₂-750F

SEQ ID NO: 15	
Буфер А	20 мМ Трис pH 7,5, 0,5М NaCl
Буфер В	20 мМ Трис pH 7,5, 2,0М NaCl
Высота слоя	минимум 20 см
Время удерживания	5,0 мин
Градиент	0,0-62,5%В, 20 CV
Связывающая способность	20-25 г/л (протекание при 40 г/л)
Чистота	93-96%
Извлечение	71-76%
Эндотоксины	< 1,0 МЕ/мг

Таблица 5. Обобщенные результаты очистки SEQ ID NO: 14 NH₂-750F

SEQ ID NO: 14	
Буфер А	20 мМ Трис рН 7,5, 0,7М NaCl. 10% глицерина
Буфер В	20 мМ Трис рН 7,5, 2,0М NaCl, 10% глицерина
Высота слоя	минимум 20 см
Время удерживания	5,0 мин
Градиент	0,0-62,5%B, 20 CV
Связывающая способность	20-25 г/л
Чистота	≥ 93-96%
Извлечение	80-93%
Эндотоксины	< 1,0 МЕ/мг

Пример 10. Хроматография белков с использованием процедуры CaPure®

В данном примере показана стадия очистки в хроматографии белков с использованием процедуры CaPure®.

Системы АКТА Avant 150 или АКТА Pilot FPLC от General Electric (GE) использовали для хроматографии белков с SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 14. Гидроксипатитную смолу смешанного типа Tosoh CaPure® использовали для упаковки колонки для каждого белка с SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 14 с минимальной высотой слоя по меньшей мере 10 см и объемом колонки, который будет обеспечивать динамическую связывающую способность максимум 20 г/л. Используемые буферы для SEQ ID NO: 15 были следующими: буфер А: 20 мМ Трис рН 7,5, 100 мМ NaCl и 1 мМ CaCl₂; буфер В: 200 мМ фосфат натрия, рН 7,0, 100 мМ NaCl и 1 мМ CaCl₂. Используемые буферы для SEQ ID NO: 14 были следующими: буфер А: 20 мМ Трис рН 7,5, 100 мМ NaCl и 1 мМ CaCl₂; буфер В: 200 мМ фосфат натрия, рН 7,0, 100 мМ NaCl и 1 мМ CaCl₂. Затем каждую колонку CaPure® очищали 0,5 М NaOH со временем контакта 30 мин или более, и затем уравнивали буфером А как минимум с 3 объемами колонки (CV) или до тех пор, пока рН и проводимость не достигали стабильных линий при ожидаемых значениях (рН 7,5-рН 7,7, ~11 мСм/см ± 1 мСм/см). Необходимость в обработке NH₂-750F-пул перед его загрузкой на колонку отсутствовала. Это значительно снизило потерю белка, время и ресурсы. NH₂-750F-пул загружали на колонку со скоростью потока не менее 5 мин, время удерживания на колонке составляло минимум 5 мин, и собирали вытекающий поток. Колонку промывали 3 CV буфера А или до тех пор, пока оптическая плотность при 280 нм не восстанавливалась и не становилась стабильной на исходном уровне, примерно 0,0 мА. На данной стадии проводили линейный градиент 25 CV от 0-25% В с последующим ступенчатым градиентом до 100% В для дополнительных 5 CV. Собирали вытекающие фракции, и их объемы составляли от 0,36 до 1,43 объема колонки, в зависимости от профиля элюирования. Образцы из различных фракций анализировали с помощью SDS-PAGE с использованием системы визуализации ChemiDoc® MP, и фракции, содержащие более 95% SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 14, объединяли и обозначали как CaPure-пул. Концентрацию белка в CaPure-пул измеряли с помощью Thermo Fisher Nanodrop One®, считывая оптическую плотность при 280 нм (A280) с учетом коэффициента экстинкции 1,22 для SEQ ID NO: 15 и отношения 260/280 нм < 0,6.

Типичная хроматограмма после очистки CaPure® SEQ ID NO: 15 приведена на фиг. 22А с высотой слоя 10 см и объемом колонки 5 мл, и на фиг. 22В с высотой слоя 21 см и объемом колонки 800 мл.

Обобщенные результаты очистки CaPure® представлены в табл. 6 для SEQ ID NO: 15 и в табл. 7 для SEQ ID NO: 14.

Таблица 6. Обобщенные результаты очистки SEQ ID NO: 15 CaPure®

SEQ ID NO: 15	
Буфер А	20 мМ Трис рН 7,5, 100 мМ NaCl, 1 мМ CaCl ₂
Буфер В	200 мМ фосфата натрия рН 7,0, 100 мМ NaCl, 1 мМ CaCl ₂
Высота слоя	20 см
Время удерживания	5,0 мин
Градиент	0,0-25%B, 25 CV
Связывающая способность	20 г/л
Чистота	>98%
Извлечение	>92%
Эндотоксины	< 1,0 МЕ/мг

Таблица 7. Обобщенные результаты очистки SEQ ID NO: 14 CaPure®

SEQ ID NO: 14	
Буфер А	20 mM Трис pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂
Буфер В	200 mM фосфата натрия pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂
Высота слоя	20 см
Время удерживания	5,0 мин
Градиент	0,0-25% В, 25 CV
Связывающая способность	20 г/л
Чистота	>98%
Извлечение	>92%
Эндотоксины	< 1,0 МЕ/мг

Пример 11. Концентрирование белка с использованием TFF UF/DF

В данном примере показана формуляция белка с помощью процедур TFF UF/DF.

CaPure®-пул концентрировали с помощью системы TFF (Pall Corporation) до конечной концентрации 20 мг/мл с последующим 5-кратным буферным обменом. Процесс выполняли ультрафильтрацией/диафильтрацией (UF/DF) с использованием трех кассет с плоскими листами MWCO Millipore Pellican3 с порогом отсечения 10 кДа, 0,114 м² TFF. Буфер для диафильтрации состоял из 10 mM фосфата натрия, pH 7,0, 100 mM NaCl. Формулированный белок с SEQ ID NO: 15 затем фильтровали с использованием системы поточной фильтрации с использованием фильтра AkroPac 0,8/0,2 мкм от Pall Corporation и перистальтического насоса и трубки Cole-Parmer. Формулированный белок с SEQ ID NO: 15 затем хранили в аликвотах при -80°C, и проводили следующие анализы, чтобы гарантировать его биофизическое качество: (1) концентрацию белка (например, SEQ ID NO: 15) при 20 мг/мл измеряли по поглощению при 280 нм при соотношении 260/280 < 0,6 с использованием Thermo Fisher Nanodrop One™ и с учетом коэффициента экстинкции белка 1,22; (2) уровни эндотоксинов по данным LAL-теста были ниже 1,0 МЕ/мг, измеренные на оборудовании Charles River Laboratories; (3) чистота по данным SEC-HPLC была выше 97% (обычно > 98%) с использованием TSKgel GW3000SWXL, 5 мкм, 7,8 мм ID × 30,0 см л колонки (Tosoh Bioscience, 8541) (4) SDS-PAGE анализ с использованием аппарата Bio-Rad gel и связанной с ним системы визуализации ChemiDoc® MP.

Пример 12. Оценка активности очищенных гибридных молекул *in vivo*

В данном примере показаны методы подтверждения правильного фолдинга слитых молекул в отношении их способности переносить биологически активный груз через интактный эпителий.

Слитый белок с SEQ ID NO: 15 экспрессировали в *E.coli*, собирали из телец включения и подвергали фолдингу с использованием буферной обменной системы, как описано в примере 8 выше. Полученный материал очищали в соответствии с методами, описанными в примере 9 и примере 10, и как обобщено, например, в табл. 4-7, в зависимости от молекулярных характеристик слитой молекулы. Препарат имеет чистоту белка ≥98% на основе данных SDS-PAGE. Эпителиальные клетки обрабатывали слитой молекулой, имеющей SEQ ID NO: 15, в концентрациях 25 нМ и 250 нМ. По сравнению с необработанными аналогичными клетками, обработанные SEQ ID NO: 15 клетки вызывают дозозависимое уменьшение количества клеток, что оценивали с помощью проточной цитометрии живых/мертвых клеток). Значения представляют n=4 ± стандартное отклонение.

Пример 13. Масштабирование очистки слитых белков

В данном примере показано масштабирование метода очистки с использованием слитого белка SEQ ID NO: 15 (фиг. 7А и 7В).

Слитый белок с SEQ ID NO: 15 очищали в двух разных масштабах.

Первую очистку проводили с использованием хроматографической колонки объемом 10 мл, упакованной смолой NH₂-750F®, и следующих параметров: высота слоя: 20 см, время удерживания: 5 мин (скорость потока: 2 мл/мин), буфер А: 20 mM Трис pH 7,5, 0,5 M NaCl, буфер В: 20 mM Трис pH 7,5, 2 M NaCl и с использованием следующего градиента: 0,0-62,5% В для 20 объемов колонки (CV). Слитый белок с SEQ ID NO: 15 получали с чистотой 93-96%, степенью извлечения > 71% и уровнями эндотоксинов <1,0 МЕ/мг.

Вторую очистку проводили с использованием хроматографической колонки объемом 4,6 л, упакованной смолой NH₂-750F®, и следующих параметров: высота слоя: 30 см, время удерживания: 11,55 мин (скорость потока: 400 мл/мин), буфер А: 20 mM Трис pH 7,5, 0,5 M NaCl, буфер В: 20 mM Трис pH 7,5, 2 M NaCl и с использованием следующего градиента: 0,0-62,5% В для 20 объемов колонки (CV). Слитый белок с SEQ ID NO: 15 получали с чистотой 93-96%, степенью извлечения > 71% и уровням эндотоксинов <1,0 МЕ/мг.

Пример 14. Воспроизводимость между процессами стадий извлечения

Процесс очистки проводили для очистки слитого белка с SEQ ID NO: 15 четыре раза (партии 1-4), и

извлечение данного слитого белка оценивали после каждой стадии процесса очистки (табл. 8). Между этими повторами наблюдали высокую степень воспроизводимости в извлечении слитого белка.

Таблица 8. Извлечение слитого белка SEQ ID NO: 15 в 4-х повторных процессах очистки

Стадия процесса	Описание процесса	Партия 1	Партия 2	Партия 3	Партия 4	Среднее (%)
2	Рефолдинг UF/DF	98,60%	94%	92,40%	85%	92
3	NH ₂ -750F	68,60%	66,30%	76%	74,50%	71,35%
4	CaPure	99%	96,40%	100%	94,80%	97,55
5	Формуляция UF/DF	97,80%	100%	98,75%	100%	99,14

Полученные данные демонстрируют, что способы и композиции по настоящему изобретению позволяют производить и очищать терапевтический слитый белок в большом масштабе, и что способы и композиции, раскрытые здесь, обеспечивают высокую воспроизводимость во время масштабирования.

Все способы, раскрытые и заявленные в данном документе, можно осуществить и выполнить без излишнего экспериментирования в свете настоящего раскрытия. Несмотря на то, что композиции и способы по данному раскрытию были описаны в терминах предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет очевидно, что к способам и стадиям или в последовательности стадий описанного способа могут быть применены вариации в данном документе без отклонения от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что определенные агенты, которые являются как химически, так и физиологически близкими, могут заменить агенты, описанные здесь, и при этом могут быть достигнуты такие же или подобные результаты. Все такие аналогичные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, считаются находящимися в пределах сущности, объема и концепции раскрытия, как определено прилагаемой формулой изобретения.

Пример 15. Сравнение SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17

Жидкостную хроматографию-масс-спектрофотометрию (ЖХ-МС) проводили на очищенных композициях, представляющих SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17, и результаты представлены на фиг. 23В и 23А соответственно. Композицию SEQ ID NO: 17 получали, подвергали фолдингу и очищали способом, аналогичным описанному выше для композиции SEQ ID NO: 15.

Пример 16. Оценка конструкций для доставки in vivo

В данном примере описана оценка in vivo конструкции для доставки, имеющей последовательность SEQ ID NO: 15, по сравнению с носителем.

На фиг. 24 показан дизайн исследования (с однократной дозой) для оценки транспорта конструкции для доставки, имеющей последовательность SEQ ID NO: 15, через эпителий кишечника и в кровоток после пероральной (сокращенно обозначенной здесь как Р.О.) доставки конструкции. Животные, использованные в этих экспериментах, представляли собой самцов мышей CD-1 без выдерживания голодными. Первичной конечной точкой исследования была общая экспозиция IL-22 в плазме, и вторичной конечной точкой были биомаркеры плазмы, включая белок, связывающий IL-22 (например, IL-22BP).

В табл. 9 представлены детали экспериментальной схемы, включая информацию о жидкой (неформулированной) конструкции для доставки и носителя.

Таблица 9. Экспериментальная схема исследования in vivo

Группа	Исследуемый объект	Носитель	Формуляция	Доза (мг/кг)	Путь введения	n (4/два TP)	Временные точки (ч)
1	Носитель	PBS, pH 7	Водный болюс	n/a	перорально	4	1
2	SEQ ID NO: 15 (жидкость)	PBS, pH 7	Водный болюс	90	перорально	8 (4*2)	1, 2, 4, 6

Таблица 10. Свойства конструкции для доставки в жидкой форме

Группы	Группы	С _{max} (нг/мл)	T _{max} (ч)	AUC (0-6ч)
SEQ ID NO: 15-жидкость	n/a	24488	2	58126

Общую экспозицию IL-22 в плазме определяли на соответствующие временные точки, показанные в табл. 9. На фиг. 25А показана общая системная экспозиция IL-22 (в пг/мл), и на фиг. 25В показана экспозиция IL-22BP (в пг/мл) на разные временные точки, когда были отобраны образцы крови и проведены измерения. На фиг. 26А-26В приведены результаты индивидуальных измерений и точки данных для каждой группы, тестируемой в данном исследовании.

Было отмечено, что введенная перорально конструкция для доставки, имеющая последовательность, показанную в SEQ ID NO: 15, обеспечивала IL-22 в плазме.

Пример 17. Длина спейсера и связывание полезной нагрузки с N- или C-концом носителя не оказывает существенного влияния на биологическую активность полезной нагрузки

В данном примере показано, что аминокислотные линкеры различной длины и связывание гетерологичной полезной нагрузки с N-концом носителя не оказывают существенного влияния на способность полезной нагрузки связываться со своей мишенью при включении в конструкцию для доставки. Исследованными аминокислотными линкерами были SEQ ID NO: 13 (GGGSGGGSGGGSGGGGS), SEQ ID NO: 28 (GGGGS) и SEQ ID NO: 31 (GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS).

Анализ димеризации рецептора IL-22 проводили посевом клеток DiscoverX HEK293 и инкубацией клеток в течение 16 ч (5000 клеток на лунку) с использованием указанных концентраций агониста (конструкция для доставки, содержащая полезную нагрузку IL-22). Люминесценцию в качестве конечной точки считывали на планшет-ридере с использованием анализа димеризации PathHunter® eXpress IL22RA1/IL10RB.

На фиг. 27A показано, что длина аминокислотных спейсеров с SEQ ID NO: 13, 28 и 31 не влияет на способность IL-22 (SEQ ID NO: 11) при включении в конструкции для доставки с SEQ ID NO: 15, 32 и 33 в индукции димеризации рецептора IL-22. Индукция димеризации рецептора контрольного рекомбинантного человеческого IL-22 (rhIL-22, SEQ ID NO: 12) показана черной кривой.

На фиг. 27B показано, что связывание полезной нагрузки IL-22 (SEQ ID NO: 11) с N- или C-концом носителя, содержащего аминокислотные остатки 1-266 SEQ ID NO: 1, через спейсер с SEQ ID NO: 28, существенно не изменило способность конструкций для доставки с SEQ ID NO: 32, 34 и 35 индуцировать димеризацию рецептора IL-22. Индукция димеризации рецептора контрольного рекомбинантного человеческого IL-22 (rhIL-22) показана черной кривой.

Анализ активации pSTAT3 проводили с использованием клеток Colo205, инкубированных с 10 мкл агониста (соответствующей конструкции для доставки или контрольного IL-22), имеющего различные концентрации, в течение 15 мин. Затем степень активации pSTAT3 определяли с использованием планшетов MSD STAT3 (номер по каталогу N450SMA-1).

На фиг. 27C показано, что длина аминокислотных спейсеров с SEQ ID NO: 13, 28 и 31 не влияет на способность IL-22 (SEQ ID NO: 11) при включении в конструкции для доставки с SEQ ID NO: 15, 32 и 33, индуцировать активацию pSTAT3. Активация pSTAT3 контрольного рекомбинантного человеческого IL-22 (rhIL-22, SEQ ID NO: 12) показана черной кривой.

На фиг. 27D показано, что связывание полезной нагрузки IL-22 (SEQ ID NO: 11) с N- или C-концом носителя, содержащего аминокислотные остатки 1-266 SEQ ID NO: 1, через спейсер с SEQ ID NO: 28 существенно не изменило способность конструкций для доставки с SEQ ID NO: 32, 34 и 35 индуцировать активацию pSTAT3. Активация pSTAT3 контрольного рекомбинантного человеческого IL-22 (rhIL-22) показана черной кривой.

043603

Список последовательностей

<110> ЭППЛАЙД МОЛЕКЮЛАР ТРАНСПОРТ ИНК.

<120> КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ДЛЯ ТРАНСЦИТОЗА И СВЯЗАННЫЕ СПОСОБЫ

<130> 40566-716.601

<140> PCT/US2019/060356

<141> 2019-11-07

<150> PCT/US2019/050708

<151> 2019-09-11

<150> 62/888,238

<151> 2019-08-16

<150> 62/888,133

<151> 2019-08-16

<150> PCT/US2019/021474

<151> 2019-03-08

<150> 62/756,889

<151> 2018-11-07

<160> 41

<170> PATENTIN VERSION 3.5

<210> 1

<211> 634

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД

<400> 1

VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS SER
1 5 10 15

LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE PRO
20 25 30

SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
35 40 45

ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER ILE
50 55 60

ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
65 70 75 80

ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR GLU
85 90 95

ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE ALA
100 105 110

ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
115 120 125

043603

ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
 130 135 140
 LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP LYS
 145 150 155 160
 THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN ILE
 165 170 175
 ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU GLY
 180 185 190
 SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU CYS
 195 200 205
 TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN ASN
 210 215 220
 CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL ALA
 225 230 235 240
 GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS PRO
 245 250 255
 VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY ASN ALA MET SER ALA LEU
 260 265 270
 ALA ALA HIS ARG VAL CYS GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG SER
 275 280 285
 ARG LYS PRO ARG ASP LEU THR ASP ASP LEU SER CYS ALA TYR GLN ALA
 290 295 300
 GLN ASN ILE VAL SER LEU PHE VAL ALA THR ARG ILE LEU PHE SER HIS
 305 310 315 320
 LEU ASP SER VAL PHE THR LEU ASN LEU ASP GLU GLN GLU PRO GLU VAL
 325 330 335
 ALA GLU ARG LEU SER ASP LEU ARG ARG ILE ASN GLU ASN ASN PRO GLY
 340 345 350
 MET VAL THR GLN VAL LEU THR VAL ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP TYR
 355 360 365
 VAL THR HIS HIS PRO GLY LEU THR PRO GLU GLN THR SER ALA GLY ALA
 370 375 380
 GLN ALA ALA ASP ILE LEU SER LEU PHE CYS PRO ASP ALA ASP LYS SER
 385 390 395 400
 CYS VAL ALA SER ASN ASN ASP GLN ALA ASN ILE ASN ILE GLU SER ARG
 405 410 415
 SER GLY ARG SER TYR LEU PRO GLU ASN ARG ALA VAL ILE THR PRO GLN
 420 425 430
 GLY VAL THR ASN TRP THR TYR GLN GLU LEU GLU ALA THR HIS GLN ALA
 435 440 445
 LEU THR ARG GLU GLY TYR VAL PHE VAL GLY TYR HIS GLY THR ASN HIS
 450 455 460

043603

VAL ALA ALA GLN THR ILE VAL ASN ARG ILE ALA PRO VAL PRO ARG GLY
465 470 475 480

ASN ASN THR GLU ASN GLU GLU LYS TRP GLY GLY LEU TYR VAL ALA THR
485 490 495

HIS ALA GLU VAL ALA HIS GLY TYR ALA ARG ILE LYS GLU GLY THR GLY
500 505 510

GLU TYR GLY LEU PRO THR ARG ALA GLU ARG ASP ALA ARG GLY VAL MET
515 520 525

LEU ARG VAL TYR ILE PRO ARG ALA SER LEU GLU ARG PHE TYR ARG THR
530 535 540

ASN THR PRO LEU GLU ASN ALA GLU GLU HIS ILE THR GLN VAL ILE GLY
545 550 555 560

HIS SER LEU PRO LEU ARG ASN GLU ALA PHE THR GLY PRO GLU SER ALA
565 570 575

GLY GLY GLU ASP GLU THR VAL ILE GLY TRP ASP MET ALA ILE HIS ALA
580 585 590

VAL ALA ILE PRO SER THR ILE PRO GLY ASN ALA TYR GLU GLU LEU ALA
595 600 605

ILE ASP GLU GLU ALA VAL ALA LYS GLU GLN SER ILE SER THR LYS PRO
610 615 620

PRO TYR LYS GLU ARG LYS ASP GLU LEU LYS
625 630

<210> 2

<211> 386

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 2

VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS SER
1 5 10 15

LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE PRO
20 25 30

SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
35 40 45

ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER ILE
50 55 60

ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
65 70 75 80

ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR GLU
85 90 95

ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE ALA

043603

100 105 110
 ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
 115 120 125
 ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
 130 135 140
 LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP LYS
 145 150 155 160
 THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN ILE
 165 170 175
 ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU GLY
 180 185 190
 SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU CYS
 195 200 205
 TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN ASN
 210 215 220
 CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL ALA
 225 230 235 240
 GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS PRO
 245 250 255
 VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY ASN ALA MET SER ALA LEU
 260 265 270
 ALA ALA HIS ARG VAL CYS GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG SER
 275 280 285
 ARG LYS PRO ARG ASP LEU THR ASP ASP LEU SER CYS ALA TYR GLN ALA
 290 295 300
 GLN ASN ILE VAL SER LEU PHE VAL ALA THR ARG ILE LEU PHE SER HIS
 305 310 315 320
 LEU ASP SER VAL PHE THR LEU ASN LEU ASP GLU GLN GLU PRO GLU VAL
 325 330 335
 ALA GLU ARG LEU SER ASP LEU ARG ARG ILE ASN GLU ASN ASN PRO GLY
 340 345 350
 MET VAL THR GLN VAL LEU THR VAL ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP TYR
 355 360 365
 VAL THR HIS HIS PRO GLY LEU THR PRO GLU GLN THR SER ALA GLY ALA
 370 375 380
 GLN ALA
 385

<210> 3

<211> 266

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

043603

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД

<400> 3

VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS SER
1 5 10 15
LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE PRO
20 25 30
SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
35 40 45
ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER ILE
50 55 60
ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
65 70 75 80
ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR GLU
85 90 95
ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE ALA
100 105 110
ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
115 120 125
ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
130 135 140
LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP LYS
145 150 155 160
THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN ILE
165 170 175
ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU GLY
180 185 190
SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU CYS
195 200 205
TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN ASN
210 215 220
CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL ALA
225 230 235 240
GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS PRO
245 250 255
VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY
260 265

<210> 4

<211> 386

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ

043603

ПОЛИПЕПТИД

<400> 4

LEU GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS SER
1 5 10 15

LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE PRO
20 25 30

SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
35 40 45

ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER ILE
50 55 60

ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
65 70 75 80

ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR GLU
85 90 95

ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE ALA
100 105 110

ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
115 120 125

ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
130 135 140

LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP LYS
145 150 155 160

THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN ILE
165 170 175

ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU GLY
180 185 190

SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU CYS
195 200 205

TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN ASN
210 215 220

CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL ALA
225 230 235 240

GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS PRO
245 250 255

VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY ASN ALA MET SER ALA LEU
260 265 270

ALA ALA HIS ARG VAL CYS GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG SER
275 280 285

ARG LYS PRO ARG ASP LEU THR ASP ASP LEU SER CYS ALA TYR GLN ALA
290 295 300

GLN ASN ILE VAL SER LEU PHE VAL ALA THR ARG ILE LEU PHE SER HIS
305 310 315 320

043603

LEU ASP SER VAL PHE THR LEU ASN LEU ASP GLU GLN GLU PRO GLU VAL
325 330 335

ALA GLU ARG LEU SER ASP LEU ARG ARG ILE ASN GLU ASN ASN PRO GLY
340 345 350

MET VAL THR GLN VAL LEU THR VAL ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP TYR
355 360 365

VAL THR HIS HIS PRO GLY LEU THR PRO GLU GLN THR SER ALA GLY ALA
370 375 380

GLN ALA
385

<210> 5

<211> 266

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 5

LEU GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS SER
1 5 10 15

LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE PRO
20 25 30

SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
35 40 45

ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER ILE
50 55 60

ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
65 70 75 80

ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR GLU
85 90 95

ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE ALA
100 105 110

ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
115 120 125

ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
130 135 140

LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP LYS
145 150 155 160

THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN ILE
165 170 175

ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU GLY
180 185 190

SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU CYS

043603

195 200 205
TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN ASN
210 215 220
CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL ALA
225 230 235 240
GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS PRO
245 250 255
VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY
260 265
<210> 6
<211> 387
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
<220>
<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД
<400> 6
MET VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS
1 5 10 15
SER LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE
20 25 30
PRO SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR
35 40 45
ILE ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER
50 55 60
ILE ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR
65 70 75 80
VAL ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR
85 90 95
GLU ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE
100 105 110
ALA ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE
115 120 125
LYS ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL
130 135 140
PRO LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP
145 150 155 160
LYS THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN
165 170 175
ILE ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU
180 185 190
GLY SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU
195 200 205

043603

CYS TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN
210 215 220

ASN CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL
225 230 235 240

ALA GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS
245 250 255

PRO VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY ASN ALA MET SER ALA
260 265 270

LEU ALA ALA HIS ARG VAL CYS GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG
275 280 285

SER ARG LYS PRO ARG ASP LEU THR ASP ASP LEU SER CYS ALA TYR GLN
290 295 300

ALA GLN ASN ILE VAL SER LEU PHE VAL ALA THR ARG ILE LEU PHE SER
305 310 315 320

HIS LEU ASP SER VAL PHE THR LEU ASN LEU ASP GLU GLN GLU PRO GLU
325 330 335

VAL ALA GLU ARG LEU SER ASP LEU ARG ARG ILE ASN GLU ASN ASN PRO
340 345 350

GLY MET VAL THR GLN VAL LEU THR VAL ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP
355 360 365

TYR VAL THR HIS HIS PRO GLY LEU THR PRO GLU GLN THR SER ALA GLY
370 375 380

ALA GLN ALA
385

<210> 7

<211> 267

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 7

MET VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS
1 5 10 15

SER LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE
20 25 30

PRO SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR
35 40 45

ILE ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER
50 55 60

ILE ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR
65 70 75 80

043603

VAL ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR
85 90 95

GLU ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE
100 105 110

ALA ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE
115 120 125

LYS ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL
130 135 140

PRO LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP
145 150 155 160

LYS THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN
165 170 175

ILE ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU
180 185 190

GLY SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU
195 200 205

CYS TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN
210 215 220

ASN CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL
225 230 235 240

ALA GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS
245 250 255

PRO VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY
260 265

<210> 8

<211> 387

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 8

MET LEU GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS
1 5 10 15

SER LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE
20 25 30

PRO SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR
35 40 45

ILE ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER
50 55 60

ILE ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR
65 70 75 80

043603

VAL ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR
85 90 95

GLU ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE
100 105 110

ALA ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE
115 120 125

LYS ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL
130 135 140

PRO LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP
145 150 155 160

LYS THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN
165 170 175

ILE ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU
180 185 190

GLY SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU
195 200 205

CYS TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN
210 215 220

ASN CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL
225 230 235 240

ALA GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS
245 250 255

PRO VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY ASN ALA MET SER ALA
260 265 270

LEU ALA ALA HIS ARG VAL CYS GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG
275 280 285

SER ARG LYS PRO ARG ASP LEU THR ASP ASP LEU SER CYS ALA TYR GLN
290 295 300

ALA GLN ASN ILE VAL SER LEU PHE VAL ALA THR ARG ILE LEU PHE SER
305 310 315 320

HIS LEU ASP SER VAL PHE THR LEU ASN LEU ASP GLU GLN GLU PRO GLU
325 330 335

VAL ALA GLU ARG LEU SER ASP LEU ARG ARG ILE ASN GLU ASN ASN PRO
340 345 350

GLY MET VAL THR GLN VAL LEU THR VAL ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP
355 360 365

TYR VAL THR HIS HIS PRO GLY LEU THR PRO GLU GLN THR SER ALA GLY
370 375 380

ALA GLN ALA
385

<210> 9

043603

<211> 267

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД

<400> 9

MET LEU GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS
1 5 10 15

SER LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE
20 25 30

PRO SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR
35 40 45

ILE ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER
50 55 60

ILE ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR
65 70 75 80

VAL ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR
85 90 95

GLU ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE
100 105 110

ALA ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE
115 120 125

LYS ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL
130 135 140

PRO LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP
145 150 155 160

LYS THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN
165 170 175

ILE ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU
180 185 190

GLY SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU
195 200 205

CYS TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN
210 215 220

ASN CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL
225 230 235 240

ALA GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS
245 250 255

PRO VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY
260 265

<210> 10

<211> 179

043603

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД

<400> 10

MET ALA ALA LEU GLN LYS SER VAL SER SER PHE LEU MET GLY THR LEU
1 5 10 15

ALA THR SER CYS LEU LEU LEU LEU ALA LEU LEU VAL GLN GLY GLY ALA
20 25 30

ALA ALA PRO ILE SER SER HIS CYS ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN
35 40 45

GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER
50 55 60

LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE
65 70 75 80

HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU
85 90 95

ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN
100 105 110

PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG
115 120 125

LEU SER THR CYS HIS ILE GLU GLY ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN
130 135 140

VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU
145 150 155 160

ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN
165 170 175

ALA CYS ILE

<210> 11

<211> 146

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД

<400> 11

ALA PRO ILE SER SER HIS CYS ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN GLN
1 5 10 15

PRO TYR ILE THR ASN ARG THR PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER LEU
20 25 30

ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE HIS
35 40 45

043603

GLY VAL SER MET SER GLU ARG CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU ASN
50 55 60

PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN PRO
65 70 75 80

TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG LEU
85 90 95

SER THR CYS HIS ILE GLU GLY ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN VAL
100 105 110

GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU ILE
115 120 125

LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN ALA
130 135 140

CYS ILE
145

<210> 12

<211> 147

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 12

MET ALA PRO ILE SER SER HIS CYS ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN
1 5 10 15

GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER
20 25 30

LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE
35 40 45

HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU
50 55 60

ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN
65 70 75 80

PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG
85 90 95

LEU SER THR CYS HIS ILE GLU GLY ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN
100 105 110

VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU
115 120 125

ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN
130 135 140

ALA CYS ILE
145

043603

<210> 13

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПЕПТИД

<400> 13

GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER
1 5 10 15

<210> 14

<211> 548

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД

<400> 14

MET LEU GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS
1 5 10 15

SER LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE
20 25 30

PRO SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR
35 40 45

ILE ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER
50 55 60

ILE ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR
65 70 75 80

VAL ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR
85 90 95

GLU ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE
100 105 110

ALA ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE
115 120 125

LYS ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL
130 135 140

PRO LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP
145 150 155 160

LYS THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN
165 170 175

ILE ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU
180 185 190

GLY SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU
195 200 205

CYS TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN
 210 215 220
 ASN CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL
 225 230 235 240
 ALA GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS
 245 250 255
 PRO VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY ASN ALA MET SER ALA
 260 265 270
 LEU ALA ALA HIS ARG VAL CYS GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG
 275 280 285
 SER ARG LYS PRO ARG ASP LEU THR ASP ASP LEU SER CYS ALA TYR GLN
 290 295 300
 ALA GLN ASN ILE VAL SER LEU PHE VAL ALA THR ARG ILE LEU PHE SER
 305 310 315 320
 HIS LEU ASP SER VAL PHE THR LEU ASN LEU ASP GLU GLN GLU PRO GLU
 325 330 335
 VAL ALA GLU ARG LEU SER ASP LEU ARG ARG ILE ASN GLU ASN ASN PRO
 340 345 350
 GLY MET VAL THR GLN VAL LEU THR VAL ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP
 355 360 365
 TYR VAL THR HIS HIS PRO GLY LEU THR PRO GLU GLN THR SER ALA GLY
 370 375 380
 ALA GLN ALA GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY
 385 390 395 400
 GLY SER ALA PRO ILE SER SER HIS CYS ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE
 405 410 415
 GLN GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA
 420 425 430
 SER LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU
 435 440 445
 PHE HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL
 450 455 460
 LEU ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE
 465 470 475 480
 GLN PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN
 485 490 495
 ARG LEU SER THR CYS HIS ILE GLU GLY ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG
 500 505 510
 ASN VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY
 515 520 525

043603

GLU ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP LEU LEU PHE MET SER LEU ARG
530 535 540

ASN ALA CYS ILE
545

<210> 15

<211> 428

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 15

MET VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS
1 5 10 15

SER LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE
20 25 30

PRO SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR
35 40 45

ILE ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER
50 55 60

ILE ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR
65 70 75 80

VAL ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR
85 90 95

GLU ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE
100 105 110

ALA ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE
115 120 125

LYS ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL
130 135 140

PRO LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP
145 150 155 160

LYS THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN
165 170 175

ILE ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU
180 185 190

GLY SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU
195 200 205

CYS TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN
210 215 220

ASN CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL
225 230 235 240

043603

ALA GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS
245 250 255

PRO VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY GLY GLY GLY SER
260 265 270

GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER ALA PRO ILE SER SER HIS
275 280 285

CYS ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG
290 295 300

THR PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP
305 310 315 320

VAL ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE HIS GLY VAL SER MET SER GLU
325 330 335

ARG CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL
340 345 350

LEU PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL
355 360 365

PRO PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG LEU SER THR CYS HIS ILE GLU
370 375 380

GLY ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR
385 390 395 400

VAL LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU
405 410 415

ASP LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN ALA CYS ILE
420 425

<210> 16
<211> 548
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 16

MET VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS
1 5 10 15

SER LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE
20 25 30

PRO SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR
35 40 45

ILE ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER
50 55 60

ILE ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR
65 70 75 80

043603

VAL ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR
 85 90 95
 GLU ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE
 100 105 110
 ALA ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE
 115 120 125
 LYS ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL
 130 135 140
 PRO LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP
 145 150 155 160
 LYS THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN
 165 170 175
 ILE ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU
 180 185 190
 GLY SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU
 195 200 205
 CYS TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN
 210 215 220
 ASN CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL
 225 230 235 240
 ALA GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS
 245 250 255
 PRO VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY ASN ALA MET SER ALA
 260 265 270
 LEU ALA ALA HIS ARG VAL CYS GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG
 275 280 285
 SER ARG LYS PRO ARG ASP LEU THR ASP ASP LEU SER CYS ALA TYR GLN
 290 295 300
 ALA GLN ASN ILE VAL SER LEU PHE VAL ALA THR ARG ILE LEU PHE SER
 305 310 315 320
 HIS LEU ASP SER VAL PHE THR LEU ASN LEU ASP GLU GLN GLU PRO GLU
 325 330 335
 VAL ALA GLU ARG LEU SER ASP LEU ARG ARG ILE ASN GLU ASN ASN PRO
 340 345 350
 GLY MET VAL THR GLN VAL LEU THR VAL ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP
 355 360 365
 TYR VAL THR HIS HIS PRO GLY LEU THR PRO GLU GLN THR SER ALA GLY
 370 375 380
 ALA GLN ALA GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY
 385 390 395 400

043603

GLY SER ALA PRO ILE SER SER HIS CYS ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE
405 410 415
GLN GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA
420 425 430
SER LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU
435 440 445
PHE HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL
450 455 460
LEU ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE
465 470 475 480
GLN PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN
485 490 495
ARG LEU SER THR CYS HIS ILE GLU GLY ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG
500 505 510
ASN VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY
515 520 525
GLU ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP LEU LEU PHE MET SER LEU ARG
530 535 540

ASN ALA CYS ILE
545

<210> 17

<211> 428

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 17

MET LEU GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS
1 5 10 15
SER LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE
20 25 30
PRO SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR
35 40 45
ILE ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER
50 55 60
ILE ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR
65 70 75 80
VAL ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR
85 90 95
GLU ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE
100 105 110
ALA ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE
115 120 125

LYS ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL
 130 135 140
 PRO LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP
 145 150 155 160
 LYS THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN
 165 170 175
 ILE ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU
 180 185 190
 GLY SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU
 195 200 205
 CYS TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN
 210 215 220
 ASN CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL
 225 230 235 240
 ALA GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS
 245 250 255
 PRO VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY GLY GLY GLY GLY SER
 260 265 270
 GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER ALA PRO ILE SER SER HIS
 275 280 285
 CYS ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG
 290 295 300
 THR PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP
 305 310 315 320
 VAL ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE HIS GLY VAL SER MET SER GLU
 325 330 335
 ARG CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL
 340 345 350
 LEU PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL
 355 360 365
 PRO PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG LEU SER THR CYS HIS ILE GLU
 370 375 380
 GLY ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR
 385 390 395 400
 VAL LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU
 405 410 415
 ASP LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN ALA CYS ILE
 420 425

<210> 18

<211> 547

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
 ПОЛИПЕПТИД

<400> 18

VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS SER
 1 5 10 15

LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE PRO
 20 25 30

SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
 35 40 45

ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER ILE
 50 55 60

ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
 65 70 75 80

ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR GLU
 85 90 95

ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE ALA
 100 105 110

ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
 115 120 125

ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
 130 135 140

LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP LYS
 145 150 155 160

THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN ILE
 165 170 175

ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU GLY
 180 185 190

SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU CYS
 195 200 205

TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN ASN
 210 215 220

CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL ALA
 225 230 235 240

GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS PRO
 245 250 255

VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY ASN ALA MET SER ALA LEU
 260 265 270

ALA ALA HIS ARG VAL CYS GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG SER
 275 280 285

ARG LYS PRO ARG ASP LEU THR ASP ASP LEU SER CYS ALA TYR GLN ALA
 290 295 300

043603

GLN ASN ILE VAL SER LEU PHE VAL ALA THR ARG ILE LEU PHE SER HIS
305 310 315 320

LEU ASP SER VAL PHE THR LEU ASN LEU ASP GLU GLN GLU PRO GLU VAL
325 330 335

ALA GLU ARG LEU SER ASP LEU ARG ARG ILE ASN GLU ASN ASN PRO GLY
340 345 350

MET VAL THR GLN VAL LEU THR VAL ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP TYR
355 360 365

VAL THR HIS HIS PRO GLY LEU THR PRO GLU GLN THR SER ALA GLY ALA
370 375 380

GLN ALA GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY
385 390 395 400

SER ALA PRO ILE SER SER HIS CYS ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN
405 410 415

GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER
420 425 430

LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE
435 440 445

HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU
450 455 460

ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN
465 470 475 480

PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG
485 490 495

LEU SER THR CYS HIS ILE GLU GLY ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN
500 505 510

VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU
515 520 525

ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN
530 535 540

ALA CYS ILE

545

<210> 19

<211> 547

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 19

LEU GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS SER
1 5 10 15

LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE PRO
20 25 30

043603

SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
 35 40 45
 ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER ILE
 50 55 60
 ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
 65 70 75 80
 ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR GLU
 85 90 95
 ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE ALA
 100 105 110
 ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
 115 120 125
 ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
 130 135 140
 LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP LYS
 145 150 155 160
 THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN ILE
 165 170 175
 ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU GLY
 180 185 190
 SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU CYS
 195 200 205
 TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN ASN
 210 215 220
 CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL ALA
 225 230 235 240
 GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS PRO
 245 250 255
 VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY ASN ALA MET SER ALA LEU
 260 265 270
 ALA ALA HIS ARG VAL CYS GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG SER
 275 280 285
 ARG LYS PRO ARG ASP LEU THR ASP ASP LEU SER CYS ALA TYR GLN ALA
 290 295 300
 GLN ASN ILE VAL SER LEU PHE VAL ALA THR ARG ILE LEU PHE SER HIS
 305 310 315 320
 LEU ASP SER VAL PHE THR LEU ASN LEU ASP GLU GLN GLU PRO GLU VAL
 325 330 335
 ALA GLU ARG LEU SER ASP LEU ARG ARG ILE ASN GLU ASN ASN PRO GLY
 340 345 350
 MET VAL THR GLN VAL LEU THR VAL ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP TYR

043603

355 360 365
VAL THR HIS HIS PRO GLY LEU THR PRO GLU GLN THR SER ALA GLY ALA
370 375 380
GLN ALA GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY
385 390 395 400
SER ALA PRO ILE SER SER HIS CYS ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN
405 410 415
GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER
420 425 430
LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE
435 440 445
HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU
450 455 460
ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN
465 470 475 480
PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG
485 490 495
LEU SER THR CYS HIS ILE GLU GLY ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN
500 505 510
VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU
515 520 525
ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN
530 535 540
ALA CYS ILE
545
<210> 20
<211> 427
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
<220>
<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД
<400> 20
VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS SER
1 5 10 15
LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE PRO
20 25 30
SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
35 40 45
ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER ILE
50 55 60
ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
65 70 75 80

ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR GLU
 85 90 95

ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE ALA
 100 105 110

ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
 115 120 125

ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
 130 135 140

LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP LYS
 145 150 155 160

THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN ILE
 165 170 175

ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU GLY
 180 185 190

SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU CYS
 195 200 205

TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN ASN
 210 215 220

CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL ALA
 225 230 235 240

GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS PRO
 245 250 255

VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY GLY GLY GLY SER GLY
 260 265 270

GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER ALA PRO ILE SER SER HIS CYS
 275 280 285

ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR
 290 295 300

PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL
 305 310 315 320

ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG
 325 330 335

CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU
 340 345 350

PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO
 355 360 365

PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG LEU SER THR CYS HIS ILE GLU GLY
 370 375 380

ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL
 385 390 395 400

LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP

043603

405 410 415

LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN ALA CYS ILE
420 425

<210> 21

<211> 427

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 21

LEU GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS SER
1 5 10 15

LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE PRO
20 25 30

SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
35 40 45

ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER ILE
50 55 60

ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
65 70 75 80

ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR GLU
85 90 95

ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE ALA
100 105 110

ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
115 120 125

ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
130 135 140

LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP LYS
145 150 155 160

THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN ILE
165 170 175

ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU GLY
180 185 190

SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU CYS
195 200 205

TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN ASN
210 215 220

CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL ALA
225 230 235 240

GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS PRO
245 250 255

VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY GLY GLY GLY GLY SER GLY
 260 265 270

GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER ALA PRO ILE SER SER HIS CYS
 275 280 285

ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR
 290 295 300

PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL
 305 310 315 320

ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG
 325 330 335

CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU
 340 345 350

PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO
 355 360 365

PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG LEU SER THR CYS HIS ILE GLU GLY
 370 375 380

ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL
 385 390 395 400

LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP
 405 410 415

LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN ALA CYS ILE
 420 425

<210> 22

<211> 634

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
 ПОЛИПЕПТИД

<400> 22

LEU GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS SER
 1 5 10 15

LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE PRO
 20 25 30

SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
 35 40 45

ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER ILE
 50 55 60

ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
 65 70 75 80

ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR GLU
 85 90 95

043603

ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE ALA
 100 105 110
 ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
 115 120 125
 ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
 130 135 140
 LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP LYS
 145 150 155 160
 THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN ILE
 165 170 175
 ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU GLY
 180 185 190
 SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU CYS
 195 200 205
 TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN ASN
 210 215 220
 CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL ALA
 225 230 235 240
 GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS PRO
 245 250 255
 VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY ASN ALA MET SER ALA LEU
 260 265 270
 ALA ALA HIS ARG VAL CYS GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG SER
 275 280 285
 ARG LYS PRO ARG ASP LEU THR ASP ASP LEU SER CYS ALA TYR GLN ALA
 290 295 300
 GLN ASN ILE VAL SER LEU PHE VAL ALA THR ARG ILE LEU PHE SER HIS
 305 310 315 320
 LEU ASP SER VAL PHE THR LEU ASN LEU ASP GLU GLN GLU PRO GLU VAL
 325 330 335
 ALA GLU ARG LEU SER ASP LEU ARG ARG ILE ASN GLU ASN ASN PRO GLY
 340 345 350
 MET VAL THR GLN VAL LEU THR VAL ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP TYR
 355 360 365
 VAL THR HIS HIS PRO GLY LEU THR PRO GLU GLN THR SER ALA GLY ALA
 370 375 380
 GLN ALA ALA ASP ILE LEU SER LEU PHE CYS PRO ASP ALA ASP LYS SER
 385 390 395 400
 CYS VAL ALA SER ASN ASN ASP GLN ALA ASN ILE ASN ILE GLU SER ARG
 405 410 415
 SER GLY ARG SER TYR LEU PRO GLU ASN ARG ALA VAL ILE THR PRO GLN
 420 425 430

GLY VAL THR ASN TRP THR TYR GLN GLU LEU GLU ALA THR HIS GLN ALA
435 440 445

LEU THR ARG GLU GLY TYR VAL PHE VAL GLY TYR HIS GLY THR ASN HIS
450 455 460

VAL ALA ALA GLN THR ILE VAL ASN ARG ILE ALA PRO VAL PRO ARG GLY
465 470 475 480

ASN ASN THR GLU ASN GLU GLU LYS TRP GLY GLY LEU TYR VAL ALA THR
485 490 495

HIS ALA GLU VAL ALA HIS GLY TYR ALA ARG ILE LYS GLU GLY THR GLY
500 505 510

GLU TYR GLY LEU PRO THR ARG ALA GLU ARG ASP ALA ARG GLY VAL MET
515 520 525

LEU ARG VAL TYR ILE PRO ARG ALA SER LEU GLU ARG PHE TYR ARG THR
530 535 540

ASN THR PRO LEU GLU ASN ALA GLU GLU HIS ILE THR GLN VAL ILE GLY
545 550 555 560

HIS SER LEU PRO LEU ARG ASN GLU ALA PHE THR GLY PRO GLU SER ALA
565 570 575

GLY GLY GLU ASP GLU THR VAL ILE GLY TRP ASP MET ALA ILE HIS ALA
580 585 590

VAL ALA ILE PRO SER THR ILE PRO GLY ASN ALA TYR GLU GLU LEU ALA
595 600 605

ILE ASP GLU GLU ALA VAL ALA LYS GLU GLN SER ILE SER THR LYS PRO
610 615 620

PRO TYR LYS GLU ARG LYS ASP GLU LEU LYS
625 630

<210> 23

<211> 635

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 23

MET LEU GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS
1 5 10 15

SER LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE
20 25 30

PRO SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR
35 40 45

ILE ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER
50 55 60

043603

ILE ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR
 65 70 75 80
 VAL ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR
 85 90 95
 GLU ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE
 100 105 110
 ALA ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE
 115 120 125
 LYS ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL
 130 135 140
 PRO LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP
 145 150 155 160
 LYS THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN
 165 170 175
 ILE ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU
 180 185 190
 GLY SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU
 195 200 205
 CYS TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN
 210 215 220
 ASN CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL
 225 230 235 240
 ALA GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS
 245 250 255
 PRO VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY ASN ALA MET SER ALA
 260 265 270
 LEU ALA ALA HIS ARG VAL CYS GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG
 275 280 285
 SER ARG LYS PRO ARG ASP LEU THR ASP ASP LEU SER CYS ALA TYR GLN
 290 295 300
 ALA GLN ASN ILE VAL SER LEU PHE VAL ALA THR ARG ILE LEU PHE SER
 305 310 315 320
 HIS LEU ASP SER VAL PHE THR LEU ASN LEU ASP GLU GLN GLU PRO GLU
 325 330 335
 VAL ALA GLU ARG LEU SER ASP LEU ARG ARG ILE ASN GLU ASN ASN PRO
 340 345 350
 GLY MET VAL THR GLN VAL LEU THR VAL ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP
 355 360 365
 TYR VAL THR HIS HIS PRO GLY LEU THR PRO GLU GLN THR SER ALA GLY
 370 375 380
 ALA GLN ALA ALA ASP ILE LEU SER LEU PHE CYS PRO ASP ALA ASP LYS
 385 390 395 400

043603

SER CYS VAL ALA SER ASN ASN ASP GLN ALA ASN ILE ASN ILE GLU SER
405 410 415

ARG SER GLY ARG SER TYR LEU PRO GLU ASN ARG ALA VAL ILE THR PRO
420 425 430

GLN GLY VAL THR ASN TRP THR TYR GLN GLU LEU GLU ALA THR HIS GLN
435 440 445

ALA LEU THR ARG GLU GLY TYR VAL PHE VAL GLY TYR HIS GLY THR ASN
450 455 460

HIS VAL ALA ALA GLN THR ILE VAL ASN ARG ILE ALA PRO VAL PRO ARG
465 470 475 480

GLY ASN ASN THR GLU ASN GLU GLU LYS TRP GLY GLY LEU TYR VAL ALA
485 490 495

THR HIS ALA GLU VAL ALA HIS GLY TYR ALA ARG ILE LYS GLU GLY THR
500 505 510

GLY GLU TYR GLY LEU PRO THR ARG ALA GLU ARG ASP ALA ARG GLY VAL
515 520 525

MET LEU ARG VAL TYR ILE PRO ARG ALA SER LEU GLU ARG PHE TYR ARG
530 535 540

THR ASN THR PRO LEU GLU ASN ALA GLU GLU HIS ILE THR GLN VAL ILE
545 550 555 560

GLY HIS SER LEU PRO LEU ARG ASN GLU ALA PHE THR GLY PRO GLU SER
565 570 575

ALA GLY GLY GLU ASP GLU THR VAL ILE GLY TRP ASP MET ALA ILE HIS
580 585 590

ALA VAL ALA ILE PRO SER THR ILE PRO GLY ASN ALA TYR GLU GLU LEU
595 600 605

ALA ILE ASP GLU GLU ALA VAL ALA LYS GLU GLN SER ILE SER THR LYS
610 615 620

PRO PRO TYR LYS GLU ARG LYS ASP GLU LEU LYS
625 630 635

<210> 24

<211> 427

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 24

VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS SER
1 5 10 15

LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE PRO
20 25 30

043603

SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
 35 40 45
 ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER ILE
 50 55 60
 ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
 65 70 75 80
 ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR GLU
 85 90 95
 ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE ALA
 100 105 110
 ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
 115 120 125
 ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
 130 135 140
 LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP LYS
 145 150 155 160
 THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN ILE
 165 170 175
 ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU GLY
 180 185 190
 SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU CYS
 195 200 205
 TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN ASN
 210 215 220
 CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL ALA
 225 230 235 240
 GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS PRO
 245 250 255
 VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY GLY GLY GLY GLY SER GLY
 260 265 270
 GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER ALA PRO ILE SER SER HIS CYS
 275 280 285
 ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR
 290 295 300
 PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL
 305 310 315 320
 ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG
 325 330 335
 CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU
 340 345 350
 PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO
 355 360 365

043603

PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG LEU SER THR CYS HIS ILE GLU GLY
370 375 380

ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL
385 390 395 400

LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP
405 410 415

LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN ALA CYS ILE
420 425

<210> 25

<211> 427

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 25

LEU GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS SER
1 5 10 15

LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE PRO
20 25 30

SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
35 40 45

ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER ILE
50 55 60

ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
65 70 75 80

ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR GLU
85 90 95

ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE ALA
100 105 110

ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
115 120 125

ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
130 135 140

LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP LYS
145 150 155 160

THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN ILE
165 170 175

ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU GLY
180 185 190

SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU CYS
195 200 205

043603

TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN ASN
210 215 220

CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL ALA
225 230 235 240

GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS PRO
245 250 255

VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY GLY GLY GLY SER GLY
260 265 270

GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER ALA PRO ILE SER SER HIS CYS
275 280 285

ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR
290 295 300

PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL
305 310 315 320

ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG
325 330 335

CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU
340 345 350

PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO
355 360 365

PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG LEU SER THR CYS HIS ILE GLU GLY
370 375 380

ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL
385 390 395 400

LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP
405 410 415

LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN ALA CYS ILE
420 425

<210> 26

<211> 649

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> V ИЛИ L

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> E ИЛИ D

<220>

<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> А ИЛИ Е

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Н ИЛИ К

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> S ИЛИ L

<220>
<221> MOD_RES
<222> (21)..(21)
<223> Р ИЛИ L

<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> Р ИЛИ Q

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30)..(30)
<223> S ИЛИ F

<220>
<221> MOD_RES
<222> (33)..(33)
<223> S ИЛИ G

<220>
<221> MOD_RES
<222> (56)..(56)
<223> К ИЛИ M

<220>
<221> MOD_RES
<222> (59)..(59)
<223> D ИЛИ G

<220>
<221> MOD_RES
<222> (67)..(67)
<223> I ИЛИ F

<220>
<221> MOD_RES
<222> (73)..(73)
<223> V ИЛИ I

<220>
<221> MOD_RES
<222> (81)..(81)
<223> N ИЛИ S

<220>
<221> MOD_RES
<222> (90)..(90)

043603

<223> Н ИЛИ N

<220>

<221> MOD_RES

<222> (101)..(101)

<223> Т ИЛИ M

<220>

<221> MOD_RES

<222> (104)..(104)

<223> Y ИЛИ F

<220>

<221> MOD_RES

<222> (108)..(108)

<223> E ИЛИ D

<220>

<221> MOD_RES

<222> (109)..(109)

<223> G ИЛИ S

<220>

<221> MOD_RES

<222> (112)..(112)

<223> A ИЛИ T

<220>

<221> MOD_RES

<222> (114)..(114)

<223> N ИЛИ H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (118)..(118)

<223> P ИЛИ I

<220>

<221> MOD_RES

<222> (119)..(119)

<223> I ИЛИ P

<220>

<221> MOD_RES

<222> (131)..(131)

<223> V ИЛИ I

<220>

<221> MOD_RES

<222> (134)..(134)

<223> L ИЛИ I

<220>

<221> MOD_RES

<222> (137)..(137)

<223> Q ИЛИ K

<220>

<221> MOD_RES

<222> (160)..(160)

<223> K ИЛИ E

043603

<220>

<221> MOD_RES

<222> (161)..(161)

<223> Т ИЛИ N

<220>

<221> MOD_RES

<222> (166)..(166)

<223> S ИЛИ F

<220>

<221> MOD_RES

<222> (168)..(168)

<223> S ИЛИ A

<220>

<221> MOD_RES

<222> (174)..(174)

<223> H ИЛИ Q

<220>

<221> MOD_RES

<222> (175)..(185)

<223> ЭТА ОБЛАСТЬ МОЖЕТ ОХВАТЫВАТЬ ОДНУ ИЗ СЛЕДУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-
СТЕЙ:

"N", "S", "SIKQS" ИЛИ "SIKQSIKQS"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (196)..(196)

<223> K ИЛИ N

<220>

<221> MOD_RES

<222> (199)..(199)

<223> Q, E ИЛИ H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (201)..(201)

<223> E, N ИЛИ D

<220>

<221> MOD_RES

<222> (203)..(203)

<223> S ИЛИ A

<220>

<221> MOD_RES

<222> (210)..(210)

<223> H ИЛИ N

<220>

<221> MOD_RES

<222> (212)..(212)

<223> H, L, F ИЛИ R

<220>

<221> MOD_RES

<222> (214)..(214)

<223> G ИЛИ T

<220>

<221> MOD_RES

<222> (215)..(215)

<223> L ИЛИ S

<220>

<221> MOD_RES

<222> (216)..(216)

<223> A ИЛИ P

<220>

<221> MOD_RES

<222> (217)..(217)

<223> L, E ИЛИ K

<220>

<221> MOD_RES

<222> (218)..(218)

<223> C ИЛИ V

<220>

<221> MOD_RES

<222> (219)..(219)

<223> W, V ИЛИ T

<220>

<221> MOD_RES

<222> (221)..(221)

<223> V ИЛИ ОТСУТСТВУЕТ

<220>

<221> MOD_RES

<222> (222)..(222)

<223> P ИЛИ ОТСУТСТВУЕТ

<220>

<221> MOD_RES

<222> (223)..(223)

<223> M, I, L ИЛИ ОТСУТСТВУЕТ

<220>

<221> MOD_RES

<222> (224)..(224)

<223> D ИЛИ ОТСУТСТВУЕТ

<220>

<221> MOD_RES

<222> (225)..(225)

<223> A ИЛИ ОТСУТСТВУЕТ

<220>

<221> MOD_RES

<222> (226)..(226)

<223> I ИЛИ ОТСУТСТВУЕТ

<220>

<221> MOD_RES

<222> (227)..(227)

<223> Y ИЛИ C

<220>

<221> MOD_RES

043603

<222> (228)..(228)
<223> N ИЛИ F

<220>
<221> MOD_RES
<222> (229)..(229)
<223> Y ИЛИ F

<220>
<221> MOD_RES
<222> (230)..(230)
<223> I ИЛИ E

<220>
<221> MOD_RES
<222> (231)..(231)
<223> T ИЛИ D

<220>
<221> MOD_RES
<222> (232)..(232)
<223> Q ИЛИ P

<220>
<221> MOD_RES
<222> (233)..(233)
<223> Q, E ИЛИ A

<220>
<221> MOD_RES
<222> (234)..(234)
<223> N, L ИЛИ Q

<220>
<221> MOD_RES
<222> (237)..(237)
<223> L ИЛИ Y

<220>
<221> MOD_RES
<222> (239)..(239)
<223> D ИЛИ E

<220>
<221> MOD_RES
<222> (240)..(240)
<223> N ИЛИ D

<220>
<221> MOD_RES
<222> (242)..(242)
<223> F, H ИЛИ Y

<220>
<221> MOD_RES
<222> (245)..(245)
<223> S ИЛИ A

<220>
<221> MOD_RES
<222> (247)..(247)
<223> E ИЛИ K

<220>
<221> MOD_RES
<222> (252)..(252)
<223> Т ИЛИ І

<220>
<221> MOD_RES
<222> (254)..(254)
<223> К, Е ИЛИ G

<220>
<221> MOD_RES
<222> (255)..(255)
<223> V ИЛИ А

<220>
<221> MOD_RES
<222> (257)..(257)
<223> Т ИЛИ М

<220>
<221> MOD_RES
<222> (262)..(262)
<223> І ИЛИ М

<220>
<221> MOD_RES
<222> (266)..(266)
<223> Р, Т ИЛИ А

<220>
<221> MOD_RES
<222> (275)..(275)
<223> К, Q ИЛИ N

<220>
<221> MOD_RES
<222> (276)..(276)
<223> G ИЛИ К

<220>
<221> MOD_RES
<222> (279)..(279)
<223> М ИЛИ І

<220>
<221> MOD_RES
<222> (280)..(280)
<223> S ИЛИ E

<220>
<221> MOD_RES
<222> (281)..(281)
<223> А ИЛИ Т

<220>
<221> MOD_RES
<222> (298)..(298)
<223> S ИЛИ G

<220>

<221> MOD_RES
<222> (303)..(303)
<223> D ИЛИ Y

<220>
<221> MOD_RES
<222> (305)..(305)
<223> T, P ИЛИ Q

<220>
<221> MOD_RES
<222> (309)..(309)
<223> S ИЛИ Q

<220>
<221> MOD_RES
<222> (311)..(311)
<223> A ИЛИ V

<220>
<221> MOD_RES
<222> (313)..(313)
<223> Q ИЛИ N

<220>
<221> MOD_RES
<222> (316)..(316)
<223> N ИЛИ Q

<220>
<221> MOD_RES
<222> (322)..(322)
<223> V ИЛИ L

<220>
<221> MOD_RES
<222> (326)..(326)
<223> I ИЛИ M

<220>
<221> MOD_RES
<222> (329)..(329)
<223> S ИЛИ T

<220>
<221> MOD_RES
<222> (331)..(331)
<223> L ИЛИ I

<220>
<221> MOD_RES
<222> (334)..(334)
<223> V ИЛИ I

<220>
<221> MOD_RES
<222> (340)..(340)
<223> D, E ИЛИ H

<220>
<221> MOD_RES
<222> (341)..(341)

<223> Е ИЛИ G

<220>

<221> MOD_RES

<222> (343)..(343)

<223> Е ИЛИ А

<220>

<221> MOD_RES

<222> (345)..(345)

<223> Е ИЛИ А

<220>

<221> MOD_RES

<222> (347)..(347)

<223> А ИЛИ Т

<220>

<221> MOD_RES

<222> (351)..(351)

<223> S, D ИЛИ Т

<220>

<221> MOD_RES

<222> (352)..(352)

<223> D ИЛИ А

<220>

<221> MOD_RES

<222> (353)..(353)

<223> L ИЛИ I

<220>

<221> MOD_RES

<222> (355)..(355)

<223> R ИЛИ Q

<220>

<221> MOD_RES

<222> (359)..(359)

<223> N ИЛИ D

<220>

<221> MOD_RES

<222> (363)..(363)

<223> M ИЛИ V

<220>

<221> MOD_RES

<222> (365)..(365)

<223> T ИЛИ I

<220>

<221> MOD_RES

<222> (370)..(370)

<223> V ИЛИ I

<220>

<221> MOD_RES

<222> (381)..(381)

<223> H ИЛИ E

043603

<220>

<221> MOD_RES
<222> (384)..(384)
<223> G ИЛИ L

<220>

<221> MOD_RES
<222> (386)..(386)
<223> T ИЛИ I

<220>

<221> MOD_RES
<222> (393)..(393)
<223> G ИЛИ S

<220>

<221> MOD_RES
<222> (403)..(403)
<223> F ИЛИ L

<220>

<221> MOD_RES
<222> (404)..(404)
<223> C ИЛИ Y

<220>

<221> MOD_RES
<222> (407)..(407)
<223> A ИЛИ T

<220>

<221> MOD_RES
<222> (409)..(409)
<223> K, E ИЛИ G

<220>

<221> MOD_RES
<222> (410)..(410)
<223> S, P ИЛИ H

<220>

<221> MOD_RES
<222> (414)..(414)
<223> S ИЛИ L

<220>

<221> MOD_RES
<222> (415)..(415)
<223> N ИЛИ D

<220>

<221> MOD_RES
<222> (416)..(416)
<223> N ИЛИ S

<220>

<221> MOD_RES
<222> (423)..(423)
<223> I ИЛИ V

<220>

<221> MOD_RES

043603

<222> (433)..(433)
<223> Р ИЛИ L

<220>
<221> MOD_RES
<222> (441)..(441)
<223> Р ИЛИ Q

<220>
<221> MOD_RES
<222> (453)..(453)
<223> E ИЛИ D

<220>
<221> MOD_RES
<222> (454)..(454)
<223> A ИЛИ T

<220>
<221> MOD_RES
<222> (455)..(455)
<223> T ИЛИ K

<220>
<221> MOD_RES
<222> (458)..(458)
<223> A ИЛИ T

<220>
<221> MOD_RES
<222> (461)..(461)
<223> R ИЛИ Q

<220>
<221> MOD_RES
<222> (463)..(463)
<223> G ИЛИ D

<220>
<221> MOD_RES
<222> (475)..(475)
<223> V ИЛИ A

<220>
<221> MOD_RES
<222> (479)..(479)
<223> T, S ИЛИ N

<220>
<221> MOD_RES
<222> (485)..(485)
<223> A, S ИЛИ T

<220>
<221> MOD_RES
<222> (491)..(491)
<223> N ИЛИ S

<220>
<221> MOD_RES
<222> (492)..(492)
<223> N ИЛИ D

<220>
<221> MOD_RES
<222> (495)..(495)
<223> N, S ИЛИ K

<220>
<221> MOD_RES
<222> (497)..(497)
<223> E, R ИЛИ K

<220>
<221> MOD_RES
<222> (498)..(498)
<223> K, A ИЛИ E

<220>
<221> MOD_RES
<222> (502)..(502)
<223> L ИЛИ V

<220>
<221> MOD_RES
<222> (505)..(505)
<223> A ИЛИ S

<220>
<221> MOD_RES
<222> (507)..(507)
<223> H ИЛИ D

<220>
<221> MOD_RES
<222> (509)..(509)
<223> E ИЛИ S

<220>
<221> MOD_RES
<222> (510)..(510)
<223> V ИЛИ L

<220>
<221> MOD_RES
<222> (511)..(511)
<223> A ИЛИ N

<220>
<221> MOD_RES
<222> (512)..(512)
<223> H ИЛИ Y

<220>
<221> MOD_RES
<222> (513)..(513)
<223> G ИЛИ R

<220>
<221> MOD_RES
<222> (515)..(515)
<223> A ИЛИ T

<220>

<221> MOD_RES
<222> (517)..(517)
<223> I ИЛИ L

<220>
<221> MOD_RES
<222> (518)..(518)
<223> K ИЛИ Q

<220>
<221> MOD_RES
<222> (519)..(519)
<223> E ИЛИ K

<220>
<221> MOD_RES
<222> (522)..(522)
<223> G ИЛИ A

<220>
<221> MOD_RES
<222> (523)..(523)
<223> E, D ИЛИ N

<220>
<221> MOD_RES
<222> (524)..(524)
<223> Y, G, A ИЛИ N

<220>
<221> MOD_RES
<222> (525)..(525)
<223> G ИЛИ E

<220>
<221> MOD_RES
<222> (526)..(526)
<223> L ИЛИ G

<220>
<221> MOD_RES
<222> (527)..(527)
<223> P ИЛИ L

<220>
<221> MOD_RES
<222> (529)..(529)
<223> R, P ИЛИ T

<220>
<221> MOD_RES
<222> (530)..(530)
<223> A ИЛИ E

<220>
<221> MOD_RES
<222> (531)..(531)
<223> E ИЛИ K

<220>
<221> MOD_RES
<222> (532)..(532)

<223> R, Q ИЛИ K

<220>

<221> MOD_RES

<222> (533)..(533)

<223> D, K ИЛИ E

<220>

<221> MOD_RES

<222> (534)..(534)

<223> A, T ИЛИ S

<220>

<221> MOD_RES

<222> (540)..(540)

<223> R ИЛИ K

<220>

<221> MOD_RES

<222> (543)..(543)

<223> I ИЛИ L

<220>

<221> MOD_RES

<222> (544)..(544)

<223> P ИЛИ H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (545)..(545)

<223> R ИЛИ Q

<220>

<221> MOD_RES

<222> (554)..(554)

<223> T ИЛИ I

<220>

<221> MOD_RES

<222> (556)..(556)

<223> T, A ИЛИ I

<220>

<221> MOD_RES

<222> (557)..(557)

<223> P ИЛИ D

<220>

<221> MOD_RES

<222> (560)..(560)

<223> N ИЛИ K

<220>

<221> MOD_RES

<222> (561)..(561)

<223> A ИЛИ E

<220>

<221> MOD_RES

<222> (562)..(562)

<223> E, R ИЛИ D

043603

<220>

<221> MOD_RES

<222> (563)..(563)

<223> E, N ИЛИ R

<220>

<221> MOD_RES

<222> (564)..(564)

<223> H ИЛИ L

<220>

<221> MOD_RES

<222> (565)..(565)

<223> I ИЛИ V

<220>

<221> MOD_RES

<222> (566)..(566)

<223> T ИЛИ E

<220>

<221> MOD_RES

<222> (567)..(567)

<223> Q, R, H ИЛИ D

<220>

<221> MOD_RES

<222> (572)..(572)

<223> S ИЛИ P

<220>

<221> MOD_RES

<222> (583)..(583)

<223> P ИЛИ T

<220>

<221> MOD_RES

<222> (584)..(584)

<223> E ИЛИ D

<220>

<221> MOD_RES

<222> (585)..(585)

<223> S, A ИЛИ R

<220>

<221> MOD_RES

<222> (586)..(586)

<223> A, E ИЛИ V

<220>

<221> MOD_RES

<222> (587)..(587)

<223> G, E ИЛИ D

<220>

<221> MOD_RES

<222> (589)..(589)

<223> E ИЛИ S

<220>

<221> MOD_RES

043603

<222> (590)..(590)
<223> D ИЛИ N

<220>
<221> MOD_RES
<222> (593)..(593)
<223> V ИЛИ A

<220>
<221> MOD_RES
<222> (598)..(598)
<223> M ИЛИ I

<220>
<221> MOD_RES
<222> (601)..(601)
<223> H ИЛИ Y

<220>
<221> MOD_RES
<222> (602)..(602)
<223> A ИЛИ G

<220>
<221> MOD_RES
<222> (613)..(613)
<223> A ИЛИ S

<220>
<221> MOD_RES
<222> (615)..(615)
<223> E ИЛИ A

<220>
<221> MOD_RES
<222> (616)..(616)
<223> E, A, Q, G, V ИЛИ R

<220>
<221> MOD_RES
<222> (618)..(618)
<223> A, P ИЛИ T

<220>
<221> MOD_RES
<222> (619)..(619)
<223> I, T ИЛИ P

<220>
<221> MOD_RES
<222> (620)..(620)
<223> D ИЛИ A

<220>
<221> MOD_RES
<222> (624)..(629)
<223> ЭТА ОБЛАСТЬ МОЖЕТ ОХВАТЫВАТЬ ОДНУ ИЗ СЛЕДУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-
СТЕЙ:
"V" ИЛИ "VVKEAI"

<220>
<221> MOD_RES

043603

<222> (631)..(631)

<223> К ИЛИ Е

<220>

<221> MOD_RES

<222> (637)..(637)

<223> Т, А ИЛИ Р

<220>

<221> MOD_RES

<222> (644)..(644)

<223> R, Q ИЛИ Н

<220>

<221> MOD_RES

<222> (645)..(645)

<223> К ИЛИ ОТСУТСТВУЕТ

<220>

<223> СМ. ОПИСАНИЕ, КАК ОНО ПОДАНО, ДЛЯ ПОДРОБНОГО ОПИСАНИЯ ЗАМЕН И ПРЕД-
ПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

<400> 26

XAA GLU XAA XAA LEU XAA ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS XAA
1 5 10 15

LEU THR PRO GLU XAA GLY LYS XAA ILE GLN SER LYS LEU XAA ILE PRO
20 25 30

XAA ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR ILE
35 40 45

ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE XAA ASP GLU XAA LYS GLY GLU SER ILE
50 55 60

ILE THR XAA GLY GLU PHE ALA THR XAA ARG ALA THR ARG HIS TYR VAL
65 70 75 80

XAA GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE XAA LEU ASP ILE THR THR GLU
85 90 95

ASN GLY THR LYS XAA TYR SER XAA ASN ARG LYS XAA XAA GLU PHE XAA
100 105 110

ILE XAA TRP LEU VAL XAA XAA GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE LYS
115 120 125

ILE SER XAA ASP GLU XAA ASP GLN XAA ARG ASN ILE ILE GLU VAL PRO
130 135 140

LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP XAA
145 150 155 160

XAA GLN GLY ASN VAL XAA PHE XAA VAL THR ARG PRO GLU XAA XAA XAA
165 170 175

XAA XAA XAA XAA XAA XAA XAA XAA XAA ILE ALA ILE SER TRP PRO SER
180 185 190

VAL SER TYR XAA ALA ALA XAA LYS XAA GLY XAA ARG HIS LYS ARG TRP
195 200 205

043603

ALA XAA TRP XAA THR XAA XAA XAA XAA XAA XAA LEU XAA XAA XAA XAA
210 215 220

XAA CYS THR XAA GLY XAA XAA
225 230 235 240

TRP XAA GLY GLY XAA TYR XAA THR VAL ALA GLY XAA PRO XAA XAA ILE
245 250 255

XAA VAL LYS GLN GLY XAA GLU GLN LYS XAA VAL GLU GLN ARG ILE HIS
260 265 270

PHE SER XAA XAA ASN ALA XAA XAA XAA LEU ALA ALA HIS ARG VAL CYS
275 280 285

GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG XAA ARG LYS PRO ARG XAA LEU
290 295 300

XAA ASP ASP LEU XAA CYS XAA TYR XAA ALA GLN XAA ILE VAL SER LEU
305 310 315 320

PHE XAA ALA THR ARG XAA LEU PHE XAA HIS XAA ASP SER XAA PHE THR
325 330 335

LEU ASN LEU XAA XAA GLN XAA PRO XAA VAL XAA GLU ARG LEU XAA XAA
340 345 350

XAA ARG XAA ILE ASN GLU XAA ASN PRO GLY XAA VAL XAA GLN VAL LEU
355 360 365

THR XAA ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP TYR VAL THR XAA HIS PRO XAA
370 375 380

LEU XAA PRO GLU GLN THR SER ALA XAA ALA GLN ALA ALA ASP ILE LEU
385 390 395 400

SER LEU XAA XAA PRO ASP XAA ASP XAA XAA CYS VAL ALA XAA XAA XAA
405 410 415

ASP GLN ALA ASN ILE ASN XAA GLU SER ARG SER GLY ARG SER TYR LEU
420 425 430

XAA GLU ASN ARG ALA VAL ILE THR XAA GLN GLY VAL THR ASN TRP THR
435 440 445

TYR GLN GLU LEU XAA XAA XAA HIS GLN XAA LEU THR XAA GLU XAA TYR
450 455 460

VAL PHE VAL GLY TYR HIS GLY THR ASN HIS XAA ALA ALA GLN XAA ILE
465 470 475 480

VAL ASN ARG ILE XAA PRO VAL PRO ARG GLY XAA XAA THR GLU XAA GLU
485 490 495

XAA XAA TRP GLY GLY XAA TYR VAL XAA THR XAA ALA XAA XAA XAA XAA
500 505 510

XAA TYR XAA ARG XAA XAA XAA GLY THR XAA XAA XAA XAA XAA XAA THR
515 520 525

XAA XAA XAA XAA XAA XAA ARG GLY VAL MET LEU XAA VAL TYR XAA XAA
530 535 540

043603

XAA ALA SER LEU GLU ARG PHE TYR ARG XAA ASN XAA XAA LEU GLU XAA
545 550 555 560

XAA XAA XAA XAA XAA XAA XAA VAL ILE GLY HIS XAA LEU PRO LEU ARG
565 570 575

ASN GLU ALA PHE THR GLY XAA XAA XAA XAA XAA GLY XAA XAA GLU THR
580 585 590

XAA ILE GLY TRP ASP XAA ALA ILE XAA XAA VAL ALA ILE PRO SER THR
595 600 605

ILE PRO GLY ASN XAA TYR XAA XAA LEU XAA XAA XAA GLU GLU ALA XAA
610 615 620

XAA XAA XAA XAA XAA ALA XAA GLU GLN SER ILE SER XAA LYS PRO PRO
625 630 635 640

TYR LYS GLU XAA XAA ASP GLU LEU LYS
645

<210> 27

<211> 60

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(60)

<223> ЭТА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МОЖЕТ ОХВАТЫВАТЬЖ.Э/
1-15 "GLY GLY GLY SER"
ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ЕДИНИЦ

<400> 27

GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER
1 5 10 15

GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER
20 25 30

GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER
35 40 45

GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER
50 55 60

<210> 28

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПЕПТИД

<400> 28

043603

GLY GLY GLY GLY SER

1 5

<210> 29

<211> 90

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(90)

<223> ЭТА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МОЖЕТ ОХВАТЫВАТЬ 1-15 "GLY GLY GLY GLY GLY SER" ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ЕДИНИЦ

<400> 29

GLY GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY

1 5 10 15

GLY SER GLY GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY

20 25 30

GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY GLY SER

35 40 45

GLY GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY

50 55 60

GLY SER GLY GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY

65 70 75 80

GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY GLY SER

85 90

<210> 30

<211> 179

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД

<400> 30

MET ALA VAL LEU GLN LYS SER MET SER PHE SER LEU MET GLY THR LEU

1 5 10 15

ALA ALA SER CYS LEU LEU LEU ILE ALA LEU TRP ALA GLN GLU ALA ASN

20 25 30

ALA LEU PRO VAL ASN THR ARG CYS LYS LEU GLU VAL SER ASN PHE GLN

35 40 45

GLN PRO TYR ILE VAL ASN ARG THR PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER

50 55 60

LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE

65 70 75 80

043603

ARG GLY VAL SER ALA LYS ASP GLN CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU
85 90 95

ASN PHE THR LEU GLU ASP VAL LEU LEU PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN
100 105 110

PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO PHE LEU THR LYS LEU SER ASN GLN
115 120 125

LEU SER SER CYS HIS ILE SER GLY ASP ASP GLN ASN ILE GLN LYS ASN
130 135 140

VAL ARG ARG LEU LYS GLU THR VAL LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU
145 150 155 160

ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN
165 170 175

ALA CYS VAL

<210> 31

<211> 25

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПЕПТИД

<400> 31

GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY
1 5 10 15

GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER
20 25

<210> 32

<211> 418

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 32

MET VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS
1 5 10 15

SER LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE
20 25 30

PRO SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR
35 40 45

ILE ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER
50 55 60

ILE ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR
65 70 75 80

043603

VAL ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR
 85 90 95
 GLU ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE
 100 105 110
 ALA ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE
 115 120 125
 LYS ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL
 130 135 140
 PRO LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP
 145 150 155 160
 LYS THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN
 165 170 175
 ILE ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU
 180 185 190
 GLY SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU
 195 200 205
 CYS TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN
 210 215 220
 ASN CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL
 225 230 235 240
 ALA GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS
 245 250 255
 PRO VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY GLY GLY GLY SER
 260 265 270
 ALA PRO ILE SER SER HIS CYS ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN GLN
 275 280 285
 PRO TYR ILE THR ASN ARG THR PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER LEU
 290 295 300
 ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE HIS
 305 310 315 320
 GLY VAL SER MET SER GLU ARG CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU ASN
 325 330 335
 PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN PRO
 340 345 350
 TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO PHE LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG LEU
 355 360 365
 SER THR CYS HIS ILE GLU GLY ASP ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN VAL
 370 375 380
 GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL LYS LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU ILE
 385 390 395 400
 LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP LEU LEU PHE MET SER LEU ARG ASN ALA
 405 410 415

043603

CYS ILE

<210> 33

<211> 438

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД

<400> 33

MET VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS
1 5 10 15

SER LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE
20 25 30

PRO SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR
35 40 45

ILE ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER
50 55 60

ILE ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR
65 70 75 80

VAL ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR
85 90 95

GLU ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE
100 105 110

ALA ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE
115 120 125

LYS ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL
130 135 140

PRO LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP
145 150 155 160

LYS THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN
165 170 175

ILE ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU
180 185 190

GLY SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU
195 200 205

CYS TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN
210 215 220

ASN CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL
225 230 235 240

ALA GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS
245 250 255

043603

PRO VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY GLY GLY GLY GLY SER
260 265 270

GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY
275 280 285

GLY GLY GLY SER ALA PRO ILE SER SER HIS CYS ARG LEU ASP LYS SER
290 295 300

ASN PHE GLN GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR PHE MET LEU ALA LYS
305 310 315 320

GLU ALA SER LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL ARG LEU ILE GLY GLU
325 330 335

LYS LEU PHE HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG CYS TYR LEU MET LYS
340 345 350

GLN VAL LEU ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU PHE PRO GLN SER ASP
355 360 365

ARG PHE GLN PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO PHE LEU ALA ARG LEU
370 375 380

SER ASN ARG LEU SER THR CYS HIS ILE GLU GLY ASP ASP LEU HIS ILE
385 390 395 400

GLN ARG ASN VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL LYS LYS LEU GLY GLU
405 410 415

SER GLY GLU ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP LEU LEU PHE MET SER
420 425 430

LEU ARG ASN ALA CYS ILE
435

<210> 34

<211> 418

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 34

MET ALA PRO ILE SER SER HIS CYS ARG LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN
1 5 10 15

GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR PHE MET LEU ALA LYS GLU ALA SER
20 25 30

LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL ARG LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE
35 40 45

HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG CYS TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU
50 55 60

ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU PHE PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN
65 70 75 80

043603

O VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER
405 410 415

LYS GLY

<210> 35

<211> 538

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<400> 35

MET VAL GLU GLU ALA LEU ASN ILE PHE ASP GLU CYS ARG SER PRO CYS
1 5 10 15

SER LEU THR PRO GLU PRO GLY LYS PRO ILE GLN SER LYS LEU SER ILE
20 25 30

PRO SER ASP VAL VAL LEU ASP GLU GLY VAL LEU TYR TYR SER MET THR
35 40 45

ILE ASN ASP GLU GLN ASN ASP ILE LYS ASP GLU ASP LYS GLY GLU SER
50 55 60

ILE ILE THR ILE GLY GLU PHE ALA THR VAL ARG ALA THR ARG HIS TYR
65 70 75 80

VAL ASN GLN ASP ALA PRO PHE GLY VAL ILE HIS LEU ASP ILE THR THR
85 90 95

GLU ASN GLY THR LYS THR TYR SER TYR ASN ARG LYS GLU GLY GLU PHE
100 105 110

ALA ILE ASN TRP LEU VAL PRO ILE GLY GLU ASP SER PRO ALA SER ILE
115 120 125

LYS ILE SER VAL ASP GLU LEU ASP GLN GLN ARG ASN ILE ILE GLU VAL
130 135 140

PRO LYS LEU TYR SER ILE ASP LEU ASP ASN GLN THR LEU GLU GLN TRP
145 150 155 160

LYS THR GLN GLY ASN VAL SER PHE SER VAL THR ARG PRO GLU HIS ASN
165 170 175

ILE ALA ILE SER TRP PRO SER VAL SER TYR LYS ALA ALA GLN LYS GLU
180 185 190

GLY SER ARG HIS LYS ARG TRP ALA HIS TRP HIS THR GLY LEU ALA LEU
195 200 205

CYS TRP LEU VAL PRO MET ASP ALA ILE TYR ASN TYR ILE THR GLN GLN
210 215 220

ASN CYS THR LEU GLY ASP ASN TRP PHE GLY GLY SER TYR GLU THR VAL
225 230 235 240

043603

ALA GLY THR PRO LYS VAL ILE THR VAL LYS GLN GLY ILE GLU GLN LYS
245 250 255

PRO VAL GLU GLN ARG ILE HIS PHE SER LYS GLY ASN ALA MET SER ALA
260 265 270

LEU ALA ALA HIS ARG VAL CYS GLY VAL PRO LEU GLU THR LEU ALA ARG
275 280 285

SER ARG LYS PRO ARG ASP LEU THR ASP ASP LEU SER CYS ALA TYR GLN
290 295 300

ALA GLN ASN ILE VAL SER LEU PHE VAL ALA THR ARG ILE LEU PHE SER
305 310 315 320

HIS LEU ASP SER VAL PHE THR LEU ASN LEU ASP GLU GLN GLU PRO GLU
325 330 335

VAL ALA GLU ARG LEU SER ASP LEU ARG ARG ILE ASN GLU ASN ASN PRO
340 345 350

GLY MET VAL THR GLN VAL LEU THR VAL ALA ARG GLN ILE TYR ASN ASP
355 360 365

TYR VAL THR HIS HIS PRO GLY LEU THR PRO GLU GLN THR SER ALA GLY
370 375 380

ALA GLN ALA GLY GLY GLY GLY SER ALA PRO ILE SER SER HIS CYS ARG
385 390 395 400

LEU ASP LYS SER ASN PHE GLN GLN PRO TYR ILE THR ASN ARG THR PHE
405 410 415

MET LEU ALA LYS GLU ALA SER LEU ALA ASP ASN ASN THR ASP VAL ARG
420 425 430

LEU ILE GLY GLU LYS LEU PHE HIS GLY VAL SER MET SER GLU ARG CYS
435 440 445

TYR LEU MET LYS GLN VAL LEU ASN PHE THR LEU GLU GLU VAL LEU PHE
450 455 460

PRO GLN SER ASP ARG PHE GLN PRO TYR MET GLN GLU VAL VAL PRO PHE
465 470 475 480

LEU ALA ARG LEU SER ASN ARG LEU SER THR CYS HIS ILE GLU GLY ASP
485 490 495

ASP LEU HIS ILE GLN ARG ASN VAL GLN LYS LEU LYS ASP THR VAL LYS
500 505 510

LYS LEU GLY GLU SER GLY GLU ILE LYS ALA ILE GLY GLU LEU ASP LEU
515 520 525

LEU PHE MET SER LEU ARG ASN ALA CYS ILE
530 535

<210> 36

<211> 75

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(75)

<223> ЭТА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МОЖЕТ ОХВАТЫВАТЬ 1-15 "GLY GLY GLY GLY SER"
ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ЕДИНИЦ

<400> 36

GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY
1 5 10 15

GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY
20 25 30

GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY
35 40 45

GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY
50 55 60

SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER
65 70 75

<210> 37

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПЕПТИД

<400> 37

SER ILE ALA LYS GLN SER

1 5

<210> 38

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПЕПТИД

<400> 38

SER ILE ALA LYS GLN SER ILE ALA LYS GLN SER

1 5 10

<210> 39

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПЕПТИД

043603

<400> 39
VAL VAL LYS GLU ALA ILE
1 5

<210> 40
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(30)
<223> ЭТА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МОЖЕТ ОХВАТЫВАТЬ 1-15 "GLY SER"
ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ЕДИНИЦ

<400> 40
GLY SER
1 5 10 15
GLY SER
20 25 30

<210> 41
<211> 45
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
<223> ОПИСАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: СИНТЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИПЕПТИД

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(45)
<223> ЭТА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МОЖЕТ ОХВАТЫВАТЬ 1-15 "GLY GLY SER"
ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ЕДИНИЦ

<400> 41
GLY GLY SER GLY
1 5 10 15
GLY SER GLY GLY
20 25 30
SER GLY GLY SER GLY GLY SER GLY GLY SER GLY GLY SER
35 40 45

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция для доставки, содержащая носитель, соединенный с IL-22 человека, где носитель состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9.
2. Конструкция для доставки по п.1, где IL-22 человека состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 11.
3. Конструкция для доставки по любому из пп.1, 2, где носитель ковалентно или нековалентно связан с IL-22 человека.
4. Конструкция для доставки по п.3, где носитель ковалентно связан с IL-22 человека через спейсер.
5. Конструкция для доставки по п.4, где спейсер состоит из аминокислотной последовательности,

показанной в SEQ ID NO: 13.

6. Конструкция для доставки по любому из пп.1-5, где конструкция для доставки состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17.

7. Конструкция для доставки по п.6, где конструкция для доставки состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 15.

8. Конструкция для доставки по п.6, где конструкция для доставки состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 17.

9. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества конструкции для доставки по любому из пп.1-8.

10. Способ по п.9, где воспалительное заболевание представляет собой гепатит, ожирение, жировую болезнь печени, воспаление печени или панкреатит, болезнь Крона, язвенный колит, поухит, проктит, рассеянный склероз, системную красную волчанку, синдром "трансплантат против хозяина", ревматоидный артрит или псориаз.

11. Способ по п.10, где заболевание представляет собой болезнь Крона или язвенный колит.

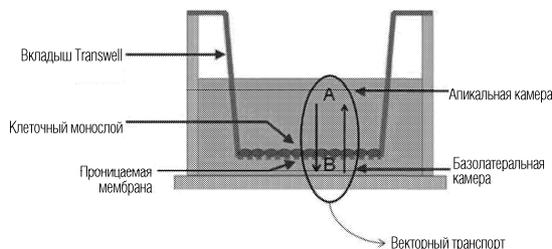
12. Способ по п.11, где заболевание представляет собой болезнь Крона.

13. Способ по п.11, где заболевание представляет собой язвенный колит.

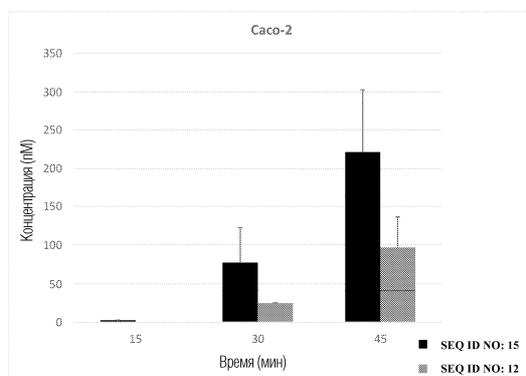
14. Способ по п.10, где заболевание представляет собой ревматоидный артрит.

15. Конструкция для доставки, содержащая аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17.

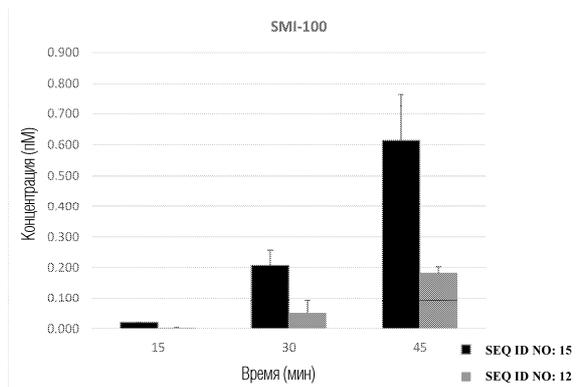
16. Конструкция для доставки по п.15, где аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17.



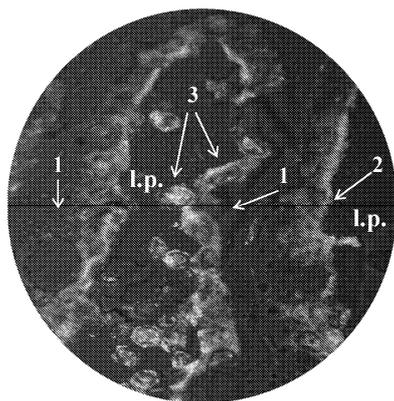
Фиг. 1



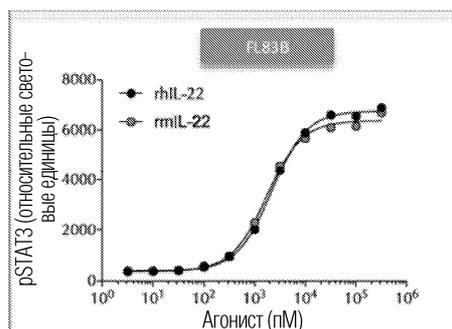
Фиг. 2



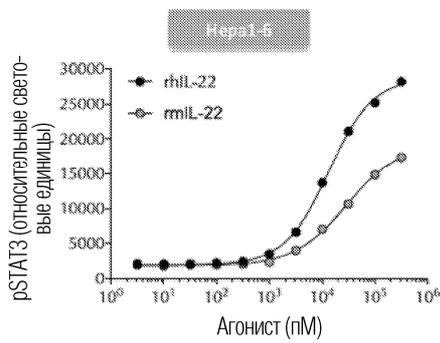
Фиг. 3



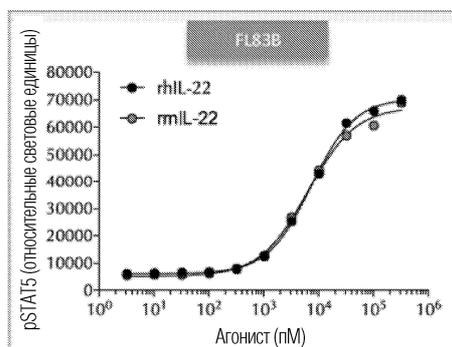
Фиг. 4



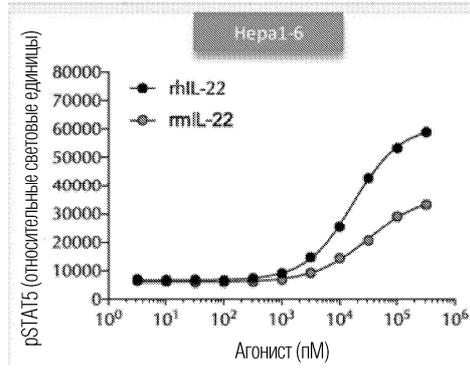
Фиг. 5А



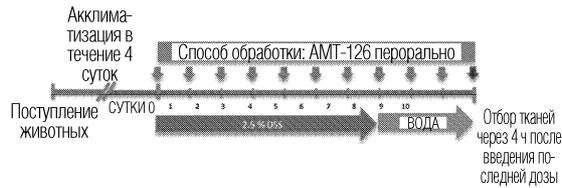
Фиг. 5В



Фиг. 6А



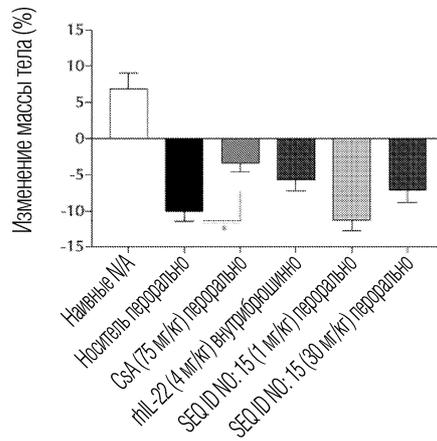
Фиг. 6В



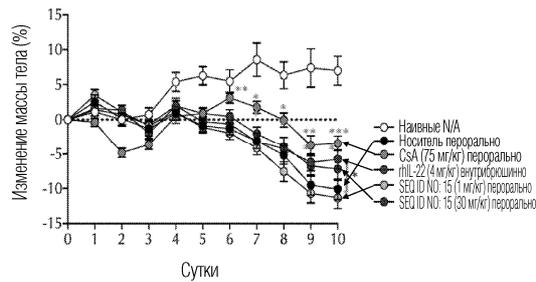
Фиг. 7А

ГРУППА	ПУТЬ, КРАТНОСТЬ	ДОЗА
НАИВНЫЕ	ПЕРОРАЛЬНО, РАЗ В СУТКИ	NA
НОСИТЕЛЬ	ПЕРОРАЛЬНО, РАЗ В СУТКИ	10 мг/мл SBT в бикарбонате
ЦИКЛОСПОРИН А (ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ)	ПЕРОРАЛЬНО, РАЗ В СУТКИ	75 мг/кг
rhIL-22	ВНУТРИБРЮШИННО, РАЗ В СУТКИ	4 мг/кг
SEQ ID NO: 15	ПЕРОРАЛЬНО, РАЗ В СУТКИ	1 мг/кг
SEQ ID NO: 15	ПЕРОРАЛЬНО, РАЗ В СУТКИ	30 мг/кг

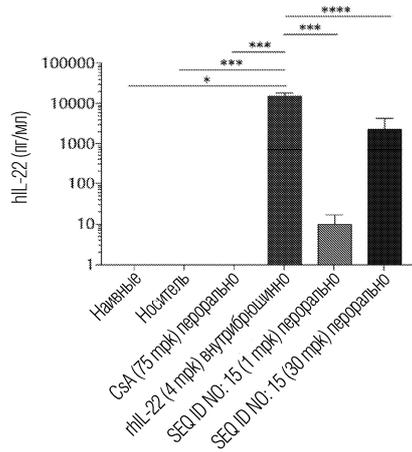
Фиг. 7В



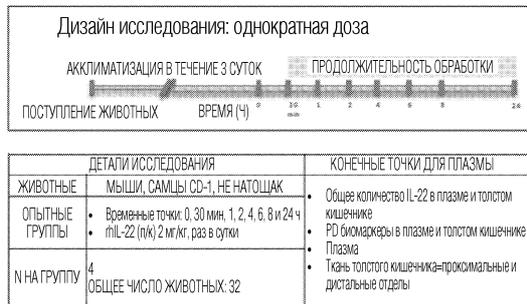
Фиг. 8А



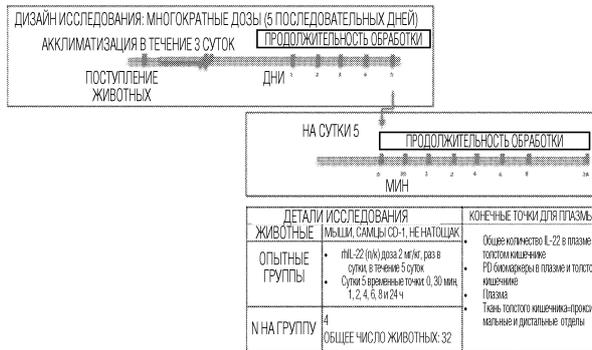
Фиг. 8В



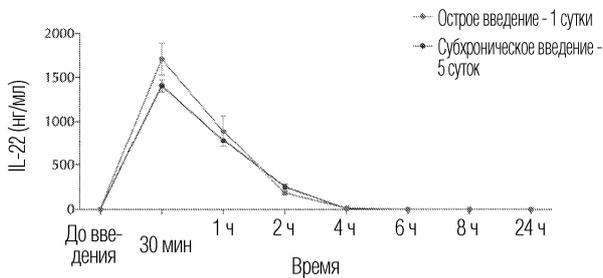
Фиг. 9



Фиг. 10А



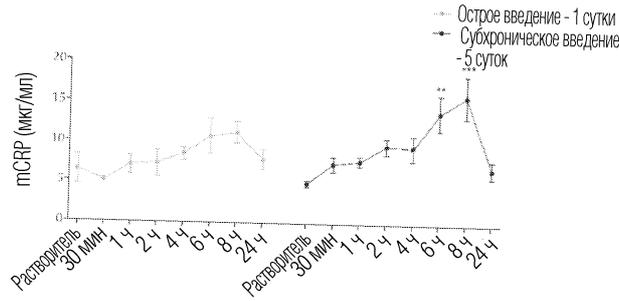
Фиг. 10В



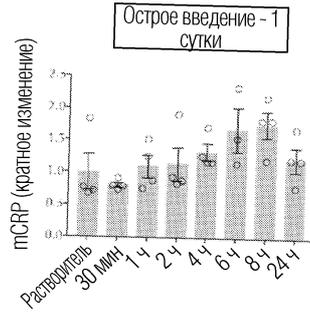
Фиг. 11А

Параметр	Острое введение	Субхроническое введение
C _{max}	1711 нг/мл	1409 нг/мл
T _{max}	30 мин	30 мин
AUC ₀₋₂₄	2796 (нг/мл) × ч	2454 (нг/мл) × ч

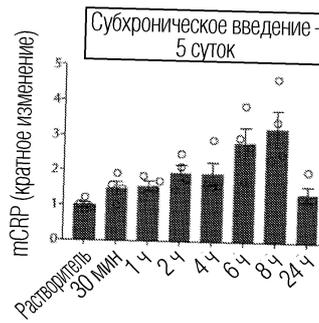
Фиг. 11В



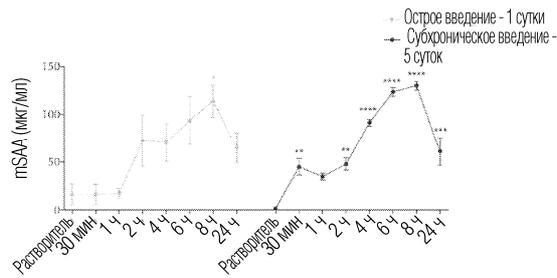
Фиг. 12А



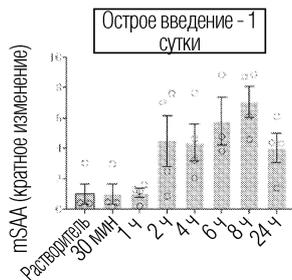
Фиг. 12В



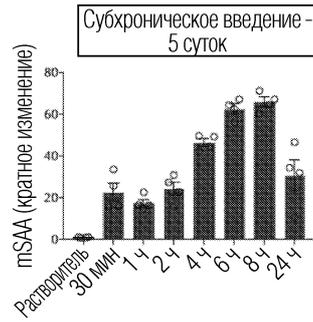
Фиг. 12С



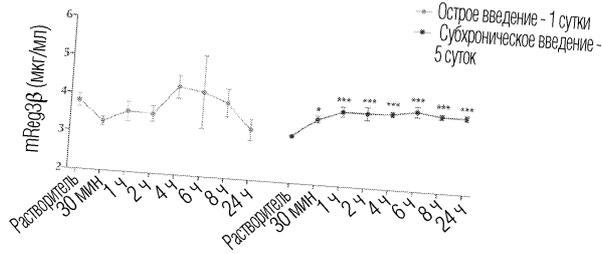
Фиг. 13А



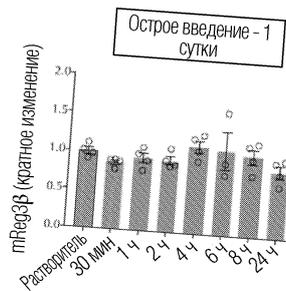
Фиг. 13В



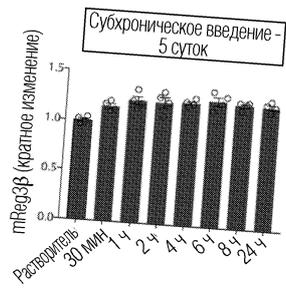
Фиг. 13С



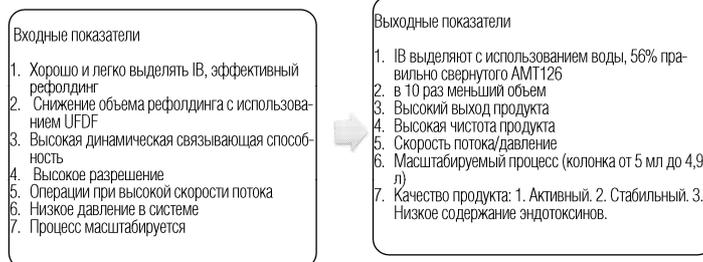
Фиг. 14А



Фиг. 14В

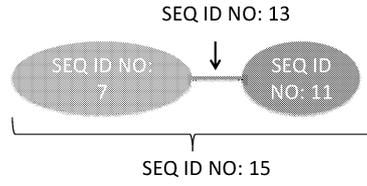


Фиг. 14С



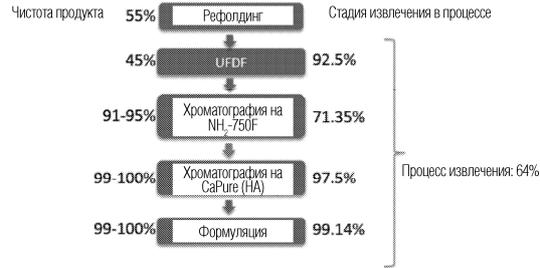
Фиг. 15

043603



Молекулярная масса: 48 кДа
Теоретическая рI: 5,5
Дисульфидные связи: 4

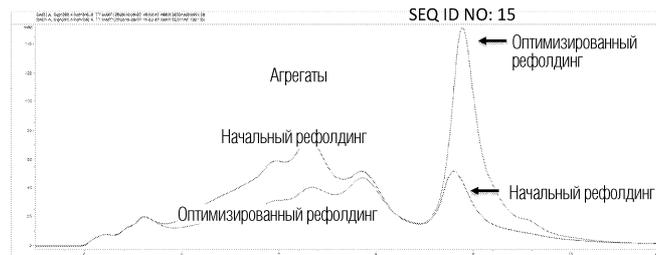
Фиг. 16



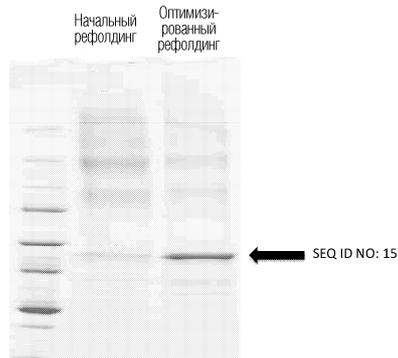
Фиг. 17



Фиг. 18

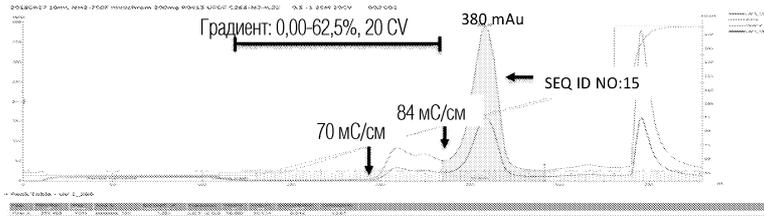


Фиг. 19

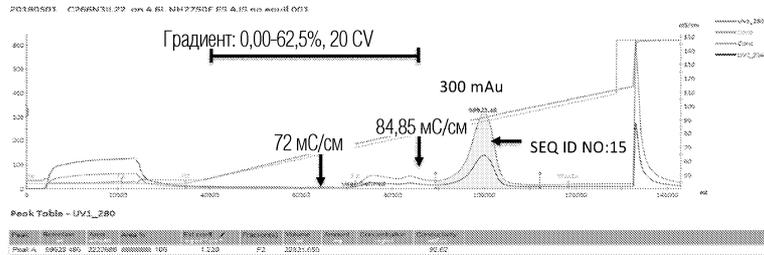


Фиг. 20

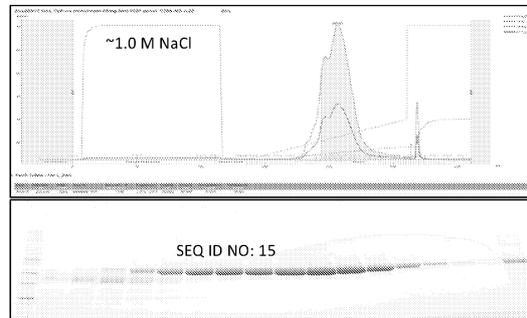
043603



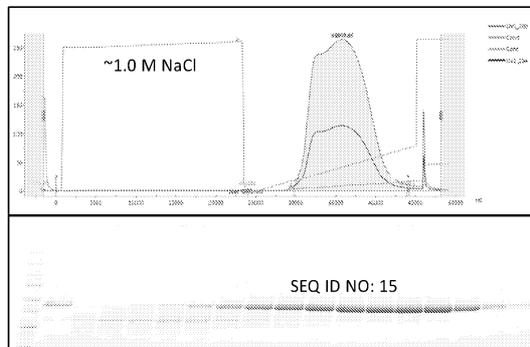
Фиг. 21А



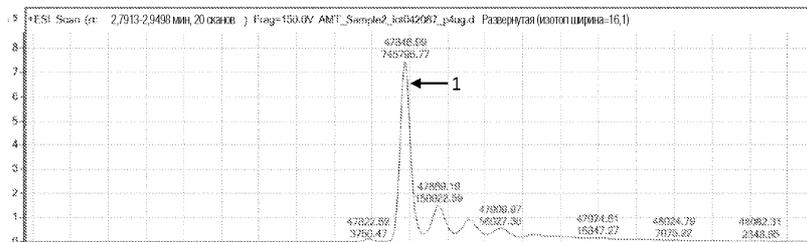
Фиг. 21В



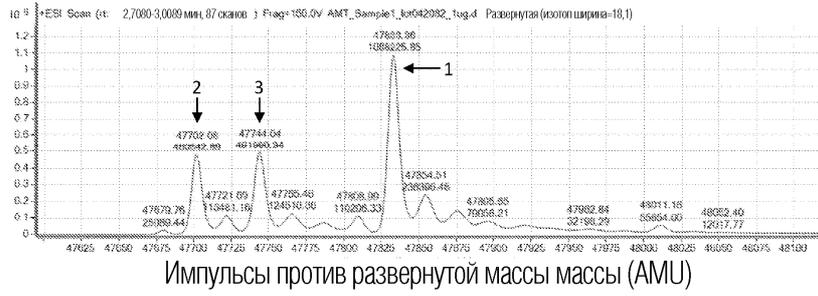
Фиг. 22А



Фиг. 22В



Фиг. 23А

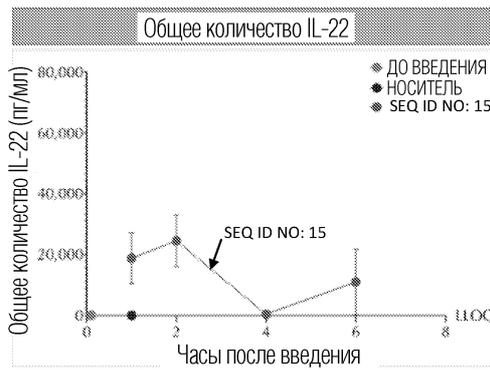


Импульсы против развернутой массы массы (AMU)

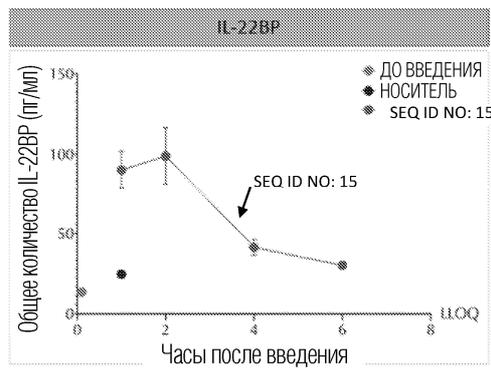
Фиг. 23В



Фиг. 24

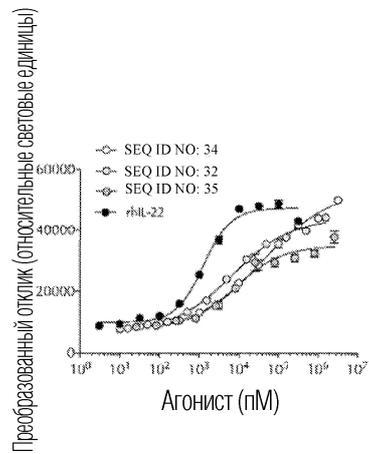
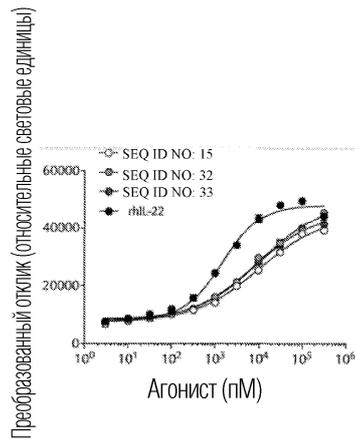
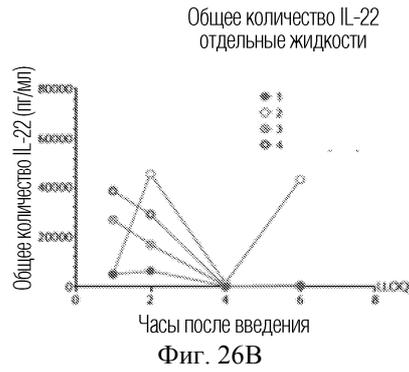
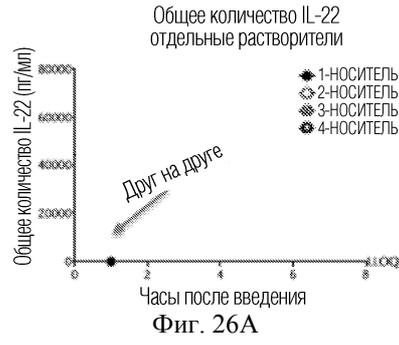


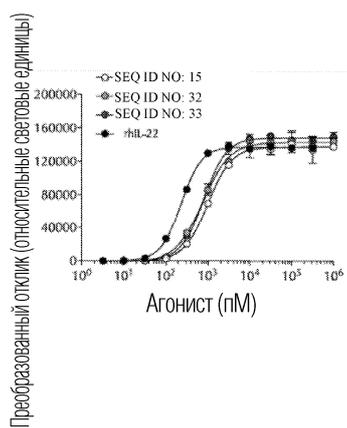
Фиг. 25А



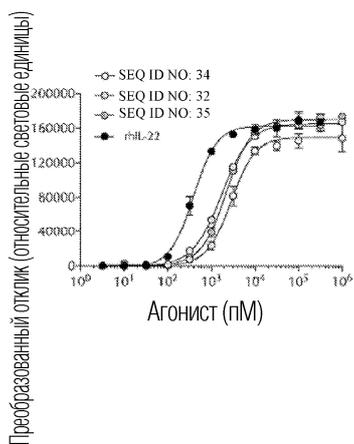
Фиг. 25В

043603





Фиг. 27С



Фиг. 27D

