



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ, А61P 9/00 (2006.01)
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006102497/13, 29.06.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.06.2004(30) Конвенционный приоритет:
30.06.2003 US 10/609,775

(43) Дата публикации заявки: 10.06.2006

(45) Опубликовано: 20.12.2009 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WULFF C. et al. Prevention of thecal
angiogenesis, antral follicular growth, and
ovulation in the primate by treatment with
vascular endothelial growth factor Trap R1R2,
Endocrinology, 2002, v.143, n.7, p.2797-2807. WO
0075319, 14.12.2000. RU 2177950 C2, 10.01.2002.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 30.01.2006(86) Заявка РСТ:
US 2004/021059 (29.06.2004)(87) Публикация РСТ:
WO 2005/000895 (06.01.2005)

Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

ДЕЙЛИ Томас Дж. (US),
ФЭНДЛ Джеймс П. (US),
ПАПАДОПУЛОС Николас Дж. (US)

(73) Патентообладатель(и):

РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(54) ИЗОЛИРОВАННАЯ МОЛЕКУЛА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩАЯ
СЛИТЫЙ ПОЛИПЕПТИД, СПОСОБНЫЙ СВЯЗЫВАТЬ ФАКТОР РОСТА
ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК СОСУДОВ (VEGF), СЛИТЫЙ ПОЛИПЕПТИД,
РЕПЛИЦИРУЕМЫЙ ЭКСПРЕССИОННЫЙ ВЕКТОР, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СЛИТОГО
ПОЛИПЕПТИДА, ЛОВУШКА VEGF, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СПОСОБ
ЛЕЧЕНИЯ И НАБОР ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ VEGF-ОПОСРЕДОВАННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ ИЛИ
СОСТОЯНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии, конкретно к нуклеиновым
кислотам и мультимерным белкам, способным
связывать фактор роста эндотелиальных

клеток сосудов (VEGF), и может быть
использовано в медицине. Рекомбинантным
путем получают полипептид, состоящий из
компонента (R1R2)_x и, необязательно,
мультимеризующего компонента (MC),

который представляет собой аминокислотную последовательность длиной от 1 до 200 аминокислот, имеющую по меньшей мере один остаток цистеина, где $X \geq 1$, R1 означает иммуноглобулин-подобный (Ig) домен 2 рецептора VEGF Flt-1, а R2 означает Ig-домен 3 рецептора VEGF Flk-1. Полученный слитый полипептид не содержит мультимеризующего компонента в случае, когда $X=2$, а в случае, когда $X=1$, мультимеризующий компонент представляет собой аминокислотную

последовательность длиной от 1 до 15 аминокислот. Полученный полипептид используют в составе фармацевтической композиции для VEGF-опосредованного заболевания или состояния. Изобретение позволяет получить высокоэффективную ловушку VEGF, специальная конструкция которой подходит для локального введения в конкретные органы, ткани и/или клетки. 9 н. и 7 з.п. ф-лы, 3 табл.

RU 2 3 7 6 3 7 3 C 2

RU 2 3 7 6 3 7 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)*C07K 14/71* (2006.01)*C12N 15/62* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*C12N 15/86* (2006.01)*C12P 21/02* (2006.01)*A61K 38/17* (2006.01)*A61P 9/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006102497/13, 29.06.2004**(24) Effective date for property rights:
29.06.2004(30) Priority:
30.06.2003 US 10/609,775(43) Application published: **10.06.2006**(45) Date of publication: **20.12.2009 Bull. 35**(85) Commencement of national phase: **30.01.2006**(86) PCT application:
US 2004/021059 (29.06.2004)(87) PCT publication:
WO 2005/000895 (06.01.2005)

Mail address:

129010, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517

(72) Inventor(s):

**DEJLI Tomas Dzh. (US),
FEhNDL Dzhejms P. (US),
PAPADOPULOS Nikolas Dzh. (US)**

(73) Proprietor(s):

**RIDZhENERON FARMAS'JuTIKALZ, INK.
(US)**

(54) ISOLATED MOLECULE OF NUCLEIC ACID, WHICH CODES FUSED POLYPEPTIDE THAT IS ABLE TO BIND VESSEL ENDOTHELIOCYTES GROWTH FACTOR (VEGF), FUSED POLYPEPTIDE, COPIED EXPRESSIVE VECTOR, METHOD FOR PRODUCTION OF FUSED POLYPEPTIDE, TRAP OF VEGF, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, METHOD FOR TREATMENT AND SET FOR TREATMENT OF VEGF-MEDIATED DISEASE OR CONDITION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention is related to nucleic acids and multidomain proteins, which are able to bind vessel endotheliocyte growth factor (VEGF), and may be used in medicine. Recombinant method is used to produce polypeptide, which consists of component (R1R2)_X and, unnecessarily, multidomain component (MC)_X, which represents aminoacid sequence with length from 1 to 200 of amino acids, having at least one remainder of cysteine, where X≥1, R1 means antibody-like (Ig) domain 2 of VEGF

receptor Llt-1, and R2 means Ig-domain 3 of VEGF receptor Flk-1. Produced fused polypeptide does not contain multidomain component in case, when X=2, and in case when X=1, multidomain component represents aminoacid sequence with length from 1 to 15 amino acids. Produced polypeptide is used in composition of pharmaceutical compound for VEGF-mediated disease or condition.

EFFECT: invention makes it possible to produce highly efficient trap of VEGF, special structure of which is suitable for local introduction into specific organs, tissues or cells.

16 cl, 3 tbl, 7 ex

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к слитым полипептидам, способным связывать фактор роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF), представителей семейства VEGF и варианты сплайсинга с конкретными требуемыми характеристиками, а также к терапевтическим способам применения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте отличительным признаком изобретения является молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый полипептид, содержащий компоненты рецепторов $(R1R2)_X$ и/или $(R1R3)_Y$, где R1 означает компонент рецептора фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF) в виде Ig-домена 2 Flt-1 (Flt1D2), R2 означает компонент рецептора VEGF в виде Ig-домена 3 Flk-1 (Flk1D3) и R3 означает компонент рецептора VEGF в виде Ig-домена 3 Flt-4 (Flt1D3 или R3) и где $X \geq 1$ и $Y \geq 1$.

В связанном втором аспекте отличительным признаком изобретения является мономерная ловушка VEGF или слитый полипептид, содержащий компоненты рецептора VEGF $(R1R2)_X$ и/или $(R1R3)_Y$, где $X \geq 1$, $Y \geq 1$ и R1, R2 и R3 имеют значения, определенные выше. Компоненты рецептора VEGF R1, R2 и R3 могут быть непосредственно связаны друг с другом или связаны посредством одной или нескольких спейсерных последовательностей. В одном конкретном варианте мономерная ловушка VEGF представляет собой $(R1R2)_X$, где $X=2$. В более конкретном варианте мономерной ловушкой VEGF является SEQ ID NO: 24 или ее функционально эквивалентный аминокислотный вариант. Изобретение относится к мономерной ловушке VEGF, главным образом состоящей из компонентов рецептора VEGF $(R1R2)_X$ и/или $(R1R3)_Y$ и их функционально эквивалентных аминокислотных вариантов.

В третьем аспекте отличительным признаком изобретения является изолированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый полипептид, содержащий компоненты рецептора VEGF $(R1R2)_X$ и/или $(R1R3)_Y$ и компонент, являющийся партнером в слиянии (FP), выбранный из группы, состоящей из мультимеризующего компонента (MC), сывороточного белка или молекулы, способной связывать сывороточный белок. В предпочтительном варианте FP является мультимеризующим компонентом (MC), способным взаимодействовать с мультимеризующим компонентом в другом слитом полипептиде с образованием мультимерной структуры, например димера или тримера. Наиболее предпочтительно MC выбран из группы, состоящей из (i) мультимеризующего компонента, содержащего расщепляемую область (С-область), (ii) укороченного мультимеризующего компонента, (iii) аминокислотной последовательности длиной от 1 до примерно 200 аминокислот, имеющей по меньшей мере один остаток цистеина, (iv) лейциновой молнии, (v) мотива спиральной петли, (vi) coil-coil мотива и (vii) домена иммуноглобулина. Кроме того, предлагаются слитые полипептиды, по существу состоящие из $(R1R2)_X$ и/или $(R1R3)_Y$ и FP. В предпочтительном варианте слитый полипептид по существу состоит из $(R1R2)_X$ и MC.

В четвертом аспекте отличительным признаком изобретения является слитый полипептид, содержащий компоненты рецептора VEGF $(R1R2)_X$ и/или $(R1R3)_Y$ и FP, которые описаны выше. Компоненты рецептора могут быть расположены в разном порядке, например $(R1R2)_X$ -FP; $(R1R2)_X$ -FP- $(R1R2)_X$; FP- $(R2R1)_X$ и т.д. Компоненты слитого полипептида могут быть непосредственно связаны друг с другом или связаны

посредством спейсерной последовательности.

В пятом аспекте отличительным признаком изобретения является ловушка VEGF, содержащая мультимер из двух или более слитых полипептидов, состоящих из компонентов рецептора VEGF $(R1R2)_X$ и/или $(R1R3)_Y$ и FP, где компонент FP является мультимеризующим компонентом (MC), содержащим С-область. С-область может быть природного происхождения или искусственной и может находиться в любой точке в мультимеризующем компоненте и функционирует, обеспечивая расщепление исходного MC до укороченного MC. Ловушка VEGF, состоящая из двух или более слитых полипептидов, имеющих по меньшей мере один укороченный MC, называется «укороченной миниловушкой».

С-область может быть создана в MC посредством инсерции, делеции или мутации так, чтобы был создан ферментативно или химически расщепляемый сайт. С-область может быть создана в любом MC и в любом положении в MC; предпочтительно С-область создают в полноразмерном домене Fc или его фрагменте или домене CH3. С-область может быть сайтом, расщепляемым ферментом, таким как тромбин, фицин, пепсин, матрилизин или пролидаза, или расщепляемым химически, например, муравьиной кислотой или $CuCl_2$.

В шестом связанном аспекте отличительным признаком изобретения является укороченная миниловушка VEGF, которая является мультимерным белком, содержащим два или более слитых полипептида, состоящих из $(R1R2)_X$ и/или $(R1R3)_Y$ и мультимеризующего компонента, который укорочен расщеплением исходного MC, содержащего С-область (tMC).

В седьмом аспекте отличительным признаком изобретения является слитый полипептид, состоящий из компонентов рецептора VEGF $(R1R2)_X$ и/или $(R1R3)_Y$ и MC, где MC представляет собой аминокислотную последовательность длиной от 1 до примерно 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина, где по меньшей мере один остаток цистеина способен образовывать дисульфидную связь с остатком цистеина, присутствующим в MC другого слитого полипептида (сMC). В предпочтительном варианте сMC представляет собой аминокислотную последовательность длиной 1-50 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В более предпочтительном варианте сMC является аминокислотной последовательностью длиной 1-15 аминокислот, содержащей по меньшей мере один остаток цистеина. В еще более предпочтительном варианте сMC представляет собой аминокислотную последовательность длиной 1-10 аминокислот, содержащую 1-2 остатка цистеина. Иллюстрация данного варианта изобретения показана в SEQ ID NO: 27, имеющей сигнальную последовательность (1-26), за которой следуют компоненты R1 (27-129) и R2 (130-231), и далее следует последовательность из девяти аминокислот, заканчивающаяся остатком цистеина. В другом варианте, показанном в SEQ ID NO:28, за сигнальной последовательностью (1-26) следуют компоненты R1 (27-129) и R2 (130-231), за которыми следует последовательность из шести аминокислот, заканчивающаяся остатком цистеина.

В восьмом аспекте отличительным признаком изобретения является миниловушка VEGF, содержащая мультимер из двух или более слитых полипептидов, состоящих из $(R1R2)_X$ и/или $(R1R3)_Y$ и сMC. В более конкретном варианте миниловушка является димером. Иллюстрацией данного варианта миниловушки согласно изобретению является димер слитого полипептида, показанного в SEQ ID NO: 2, в котором каждый слитый полипептид ($R1R2$ -сMC) имеет молекулярную массу 23,0

кДа и pI 9,22.

В другом варианте сМС имеет 4 аминокислоты в длину и включает два остатка цистеина, например XCXC (SEQ ID NO: 3). В одном иллюстративном примере данного варианта изобретения миниловушка состоит из компонентов рецептора VEGF
5 согласно изобретению и сМС состоит из ACGC (SEQ ID NO: 4). Одним иллюстративным примером данного варианта миниловушки согласно изобретению является димер слитого полипептида, показанного в SEQ ID NO: 5, в котором каждый мономер имеет молекулярную массу 23,2 кДа и pI 9,22. Другой иллюстративный
10 пример данного варианта изобретения показан в SEQ ID NO: 26, имеющей сигнальную последовательность (1-26), за которой следуют компоненты R1 (27-129) и R2 (130-231) с последующей последовательностью из девяти аминокислот, заканчивающейся CPPC.

Во всех вариантах ловушки VEGF согласно изобретению (включая укороченную миниловушку VEGF, миниловушки VEGF и мономерные миниловушки VEGF)
15 сигнальная последовательность (S) может быть включена в начале (или на N-конце) слитого полипептида согласно изобретению. Сигнальная последовательность может быть нативной для клетки, рекомбинантной или синтетической. Если сигнальная последовательность связана с N-концом первого рецепторного компонента, то слитый
20 полипептид может быть обозначен, например, как S-(R1R2)_x.

Компоненты слитого полипептида могут быть непосредственно связаны друг с другом или могут быть связаны посредством спейсеров. В конкретных вариантах один или несколько рецепторных компонентов и/или компонентов, являющихся
25 партнерами в слиянии, в слитом полипептиде непосредственно связаны друг с другом без спейсеров. В других вариантах один или несколько рецепторных компонентов и/или компонентов, являющихся партнерами в слиянии, связаны посредством спейсеров.

Изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты
30 согласно изобретению, включая экспрессирующие векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, функционально связанную с последовательностью регуляции экспрессии. Изобретение, кроме того, относится к системам хозяин-вектор для получения слитого полипептида, которые содержат экспрессирующий вектор в
35 подходящей клетке-хозяине; к системам хозяин-вектор, в которых подходящей клеткой-хозяином является бактериальная, дрожжевая клетка, клетка насекомых, клетка млекопитающих; клетка E. coli или клетка COS или CHO. Кроме того, предлагаются ловушки VEGF согласно изобретению, модифицированные ацетилированием или пэгилированием. Способы ацетилирования или пэгилирования
40 белка хорошо известны в данной области.

В связанном девятом аспекте отличительным признаком изобретения является способ получения ловушки VEGF согласно изобретению, включающий
культивирование клетки-хозяина, трансфицированной вектором, содержащим
45 последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению, в условиях, подходящих для экспрессии белка клеткой-хозяином, и извлечение полученного таким образом слитого полипептида.

Ловушки VEGF согласно изобретению терапевтически применимы для лечения
любого заболевания или состояния, которое улучшается, становится ослабленным или
50 подавленным при удалении, ингибировании или уменьшении количества VEGF. Неполный список конкретных состояний, улучшаемых при ингибировании или уменьшении количества VEGF, включает например нежелательное просачивание плазмы или проницаемость сосудов, нежелательный рост кровеносных сосудов,

например, такой как в опухоли, отек, связанный с воспалительными заболеваниями, такими как псориаз или артрит, включая ревматоидный артрит; астму; генерализованный отек, связанный с ожогами; асцит и плевральный выпот, связанный с опухолями, воспалением или травмой; хроническое воспаление дыхательных путей; астму; синдром капиллярной утечки; сепсис; болезнь почек, связанную с повышенным просачиванием белка; аденокарциному протоков поджелудочной железы (PDAC) и глазные заболевания, такие как связанная с возрастом дегенерация желтого пятна и диабетическая ретинопатия. Миниловушка VEGF, в частности, применима для лечения заболеваний глаз и как вспомогательное средство при операциях на глазах, включая операцию по поводу глаукомы; и лечения внутриглазных опухолей, например, таких как увеальная меланома, ретинобластома, посредством доставки в стекловидное тело.

Соответственно в десятом аспекте отличительным признаком изобретения является терапевтический способ лечения связанного с VEGF заболевания или состояния, включающий введение ловушки VEGF согласно изобретению субъекту, страдающему от связанного с VEGF заболевания или состояния. Хотя любое млекопитающее можно лечить терапевтическими способами согласно изобретению, субъектом предпочтительно является больной человек, страдающий или подверженный риску развития состояния или заболевания, которое может быть улучшено, ослаблено, ингибировано или подвергнуто лечению ловушкой VEGF.

В одиннадцатом аспекте отличительным признаком изобретения являются способы диагностики и прогнозирования, а также наборы для выявления, количественного анализа и/или слежения за VEGF с использованием миниловушек согласно изобретению.

В двенадцатом аспекте отличительным признаком изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие ловушку VEGF согласно изобретению с фармацевтически приемлемым носителем. Такие фармацевтические композиции могут содержать ловушку из димерного слитого полипептида или нуклеиновые кислоты, кодирующие слитый полипептид. Миниловушки согласно изобретению находят конкретные применения при состояниях, при которых требуется ловушка VEGF с пониженным временем полужизни в сыворотке (например, более быстрый клиренс) и/или повышенным проникновением в ткани вследствие меньшего размера.

Конкретные применения миниловушки VEGF включают, например, заболевания, при которых желательно локальное введение в конкретную ткань или клетку. Примерами такого состояния являются офтальмологические болезни глаза.

Другие объекты и преимущества станут очевидными при ознакомлении со следующим подробным описанием.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Перед тем как ознакомиться с описанием предлагаемых способов, следует понимать, что данное изобретение не ограничено описанными конкретными способами и экспериментальными условиями, как таковые способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном описании терминология применяется только с целью описания конкретных вариантов и не предназначена для ограничения, так как объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

В используемом в данном описании и прилагаемой формуле изобретения смысле формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст четко не диктует обратное. Таким образом, например, ссылка на «способ» включает один или несколько способов и/или стадий указанного в данном описании типа и/или

тех, которые станут очевидными специалистам в данной области при чтении данного описания и т.д.

Если не оговорено особо, все технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой данное изобретение относится. Хотя на практике или при проверке настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и вещества, сходные или эквивалентные веществам, указанным в данном описании, описаны предпочтительные способы и вещества. Все публикации, упоминаемые в данном описании, включены в него в виде ссылки, чтобы описать способы и/или вещества, в связи с которыми цитированы публикации.

Общее описание

Изобретение относится к ловушке VEGF, способной связывать и ингибировать активность VEGF, которая является мономером или мультимером одного или нескольких слитых полипептидов. Молекулы согласно изобретению связывают и ингибируют биологическую активность VEGF и/или физиологическую реакцию или ответ. Описание основанных на рецепторе VEGF антагонистических ловушек VEGF Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) (SEQ ID NO: 7-8) и VEGFR1R2-FcΔC1(a) (SEQ ID NO: 9-10) смотри в PCT WO/0075319, содержание которой включено в данное описание в виде ссылки в полном объеме.

Миниловушка согласно изобретению меньше, чем полноразмерная ловушка, примерно 50-60 кДа по сравнению с 120 кДа исходной ловушки, и включает мономерные ловушки, состоящие главным образом из доменов рецепторов VEGF (R1R2)_X, (R1R3)_Y или их комбинаций, ловушки, образованные отщеплением части исходной мультимерной ловушки, имеющей компонент, являющийся партнером в слиянии, который представляет собой мультимеризующий компонент (MC), содержащий область расщепления (С-область); или связыванием остатка цистеина или аминокислотной последовательности, содержащей один или несколько остатков цистеина, с доменами рецепторного компонента или между доменами рецепторного компонента. В конкретных вариантах миниловушка согласно изобретению имеет молекулярную массу меньше 60 кДа, как измерено посредством SDS-ПААГ-анализа; более предпочтительно примерно 50 кДа; еще более предпочтительно примерно 20-30 кДа или примерно 25 кДа и способна связывать VEGF с аффинностью, сравнимой с полноразмерной исходной ловушкой, описанной в PCT/US00/14142.

Конструкции нуклеиновой кислоты и экспрессия

Настоящее изобретение относится к конструкции молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих отдельный слитый полипептид, способный связывать VEGF, или мультимерные ловушки VEGF. Молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут кодировать компоненты рецепторов дикого типа R1, R2 и/или R3 или их функционально эквивалентные варианты. Варианты аминокислотной последовательности рецепторных компонентов R1, R2 и/или R3 ловушек согласно изобретению также могут быть получены в результате создания мутаций в кодирующих молекулах нуклеиновых кислот. Такие варианты включают, например, делеции, или инсерции, или замены аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности R1, R2 и/или R3. Может быть осуществлена любая комбинация делеции, инсерции и замены, чтобы получить конечную конструкцию, при условии, что конечная конструкция обладает способностью связывать и ингибировать VEGF.

Указанные молекулы нуклеиновых кислот встраивают в вектор, который способен экспрессировать слитый полипептид при введении в подходящую клетку-хозяина.

Подходящие клетки-хозяева включают, но не ограничены указанным, клетки бактерий, дрожжей, насекомых и млекопитающих. Можно применять любые способы, известные специалисту в данной области, для встраивания фрагментов ДНК в вектор, чтобы сконструировать экспрессирующие векторы, кодирующие слитый полипептид согласно изобретению, под контролем сигналов регуляции транскрипции/трансляции.

Экспрессия молекул нуклеиновой кислоты согласно изобретению может регулироваться второй последовательностью нуклеиновой кислоты так, чтобы молекулы экспрессировались в хозяине, трансформированном молекулой рекомбинантной ДНК. Например, экспрессия может регулироваться любым промоторным/энхансерным элементом, известным в данной области. Промоторы, которые можно использовать для регуляции экспрессии химерных полипептидных молекул, включают без ограничения длинный концевой повтор (Squinto et al. (1991) Cell 65: 1-20); область раннего промотора SV40, промотор CMV, M-MuLV, промотор тимидинкиназы, регуляторные последовательности гена металлотенина; прокариотические экспрессирующие векторы, такие как промотор b-лактамазы или промотор tac (смотри также Scientific American (1980) 242: 74-94); промоторные элементы дрожжей или других грибов, такие как промотор Gal 4, ADH, PGK, промотор щелочной фосфатазы и области регуляции тканеспецифичной транскрипции, полученные из таких генов, как эластаза I.

Экспрессирующие векторы, способные реплицироваться в бактериальном или эукариотическом хозяине, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению, используют для трансфекции хозяина и таким образом для управления экспрессией таких нуклеиновых кислот, чтобы получить слитый полипептид согласно изобретению, который образует ловушки, способные связываться с VEGF. Трансфицированные клетки могут временно или предпочтительно конститутивно и постоянно экспрессировать ловушки VEGF согласно изобретению.

Ловушки согласно изобретению могут быть очищены любым способом, который обеспечивает последующее образование стабильной биологически активной ловушки. Например, но не с целью ограничения, факторы могут быть извлечены из клеток либо в виде растворимых белков, либо в виде тел включения, из которых их можно экстрагировать количественно 8M гидрохлоридом гуанидиния и диализом (смотри, например, патент США No. 5663304). Чтобы дополнительно очистить факторы, можно использовать обычную ионообменную хроматографию, хроматографию на основе гидрофобного взаимодействия, хроматографию с обращенной фазой или гель-фильтрацию.

Компоненты рецептора VEGF

Компоненты рецептора VEGF в миниловушках VEGF состоят из Ig-домена 2 Flt-1 (Flt1D2) (R1), Ig-домена 3 Flk-1 (Flk1D3) (R2) (вместе, R1R2), и/или R1 и Ig-домена 3 Flt-4 (Flt1D3) (R3) (вместе R1R3). Подразумевается, что термин «Ig-домен» Flt-1, Flt-4 или Flk-1 охватывает не только полный домен дикого типа, но также его варианты с инсерциями, делециями и/или заменами, которые по существу сохраняют функциональные свойства интактного домена. Специалисту в данной области без труда будет понятно, что могут быть получены многочисленные варианты указанных выше Ig-доменов, которые будут сохранять по существу такие же функциональные свойства, как и домен дикого типа.

Подразумевается, что термин «функциональные эквиваленты» при использовании со ссылкой на R1, R2 или R3, охватывает домен R1, R2 или R3 по меньшей мере с одним изменением, например делецией, присоединением и/или заменой, который

сохраняет по существу такие же функциональные свойства, как и домен R1, R2 или R3 дикого типа, то есть по существу эквивалентное связывание с VEGF. Будет понятно, что могут быть сделаны различные аминокислотные замены в R1, R2 или R3, не отходя от сути изобретения в отношении способности указанных рецепторных компонентов связывать и инактивировать VEGF. Функциональные свойства ловушек согласно изобретению можно определить любым подходящим скрининговым анализом, известным в данной области для измерения требуемой характеристики. Примеры таких анализов описаны в экспериментальном разделе ниже, которые позволяют определять связывающие свойства ловушек для VEGF (Kd), а также время их полужизни в случае диссоциации комплекса ловушка-лиганд ($T_{1/2}$). Другие анализы, например изменение способности специфично связываться с VEGF, можно измерить в анализе связывания VEGF конкурентного типа. Модификации свойств белка, таких как термостабильность, гидрофобность, чувствительность к протеолитической деградации или тенденция к агрегации, могут быть измерены способами, известными специалистам в данной области.

Компоненты слитого полипептида могут быть непосредственно связаны друг с другом или могут быть связаны посредством спейсеров. В общем, термин «спейсер» (или линкер) означает одну или несколько молекул, например нуклеиновых кислот, или аминокислот, или непептидных остатков, таких как полиэтиленгликоль, которые могут быть встроены между одним или несколькими составляющими доменами. Например, спейсерные последовательности могут быть использованы для обеспечения требуемого представляющего интерес сайта между компонентами для облегчения обработки. Спейсер также может быть введен, чтобы усилить экспрессию слитого полипептида клеткой-хозяином, чтобы уменьшить стерические помехи, так чтобы компонент мог принимать свою оптимальную третичную структуру и/или соответствующим образом взаимодействовать со своей молекулой-мишенью. Спейсеры и способы идентификации требуемых спейсеров смотри, например, в работе George et al. (2003) Protein Engineering 15: 871-879, включенной в данное описание в виде ссылки. Последовательность спейсера может содержать одну или несколько аминокислот, связанных в природе с рецепторным компонентом, или может представлять собой добавленную последовательность, используемую для усиления экспрессии слитого полипептида, обеспечения специальных требуемых представляющих интерес сайтов, обеспечения возможности для образования составляющими доменами оптимальных третичных структур и/или для усиления взаимодействия компонента с его молекулой-мишенью. В одном варианте спейсер содержит одну или несколько пептидных последовательностей между одним или несколькими компонентами, которые содержат 1-100 аминокислот, предпочтительно 1-25.

В более конкретных вариантах R1 представляет собой аминокислоты 27-126 SEQ ID NO: 8 или 1-126 SEQ ID NO: 8 (включая сигнальную последовательность 1-26); или аминокислоты 27-129 SEQ ID NO: 10 или 1-129 SEQ ID NO: 10 (включая сигнальную последовательность в положении 1-26). В более конкретных вариантах R2 представляет собой аминокислоты 127-228 SEQ ID NO: 8, или аминокислоты 130-231 SEQ ID NO: 10. В более конкретных вариантах R3 представляет собой аминокислоты 127-225 SEQ ID NO: 13 (без сигнальной последовательности). В том случае, когда, например, R2 помещают на N-конце слитого полипептида, может быть желательно, чтобы сигнальная последовательность предшествовала рецепторному компоненту. Рецепторный компонент(ы), связанный с мультимеризующим

компонентом, кроме того, может содержать спейсерный компонент, например последовательность GPG из аминокислот 229-231 SEQ ID NO: 7.

Компоненты, являющиеся партнерами в слиянии, и мультимеризующие компоненты

Партнером в слиянии является любой компонент, который усиливает функции слитого полипептида. Таким образом, например, партнер в слиянии может усиливать биологическую активность слитого полипептида, помогать его продуцированию и/или извлечению или усиливать фармакологическое свойство или фармакокинетический профиль слитого полипептида, например, посредством увеличения его времени полужизни в сыворотке, проницаемости в ткани, обеспечения отсутствия иммуногенности или обеспечения стабильности. В предпочтительных вариантах партнер в слиянии выбран из группы, состоящей из мультимеризующего компонента, сывороточного белка или молекулы, способной связывать сывороточный белок.

В том случае, когда партнер в слиянии является сывороточным белком или его фрагментом, он выбран из группы, состоящей из α -1-микроглобулина, AGP-1, орозомукоида, α -1-кислого гликопротеина, связывающего витамин D белка (DBP), гемопексина, сывороточного альбумина человека (hSA), трансферрина, ферритина, афамина, гаптоглобина, α -фетопропротеина тироглобулина, α -2-HS-гликопротеина, β -2-гликопротеина, гиалуронан связывающего белка, синтаксина, C1R, цепи C1q, связывающего галектин 3-Mac2 белка, фибриногена, полимерного рецептора Ig (PIGR), α -2-макроглобулина, белка, транспортирующего мочевины, гаптоглобина, IGFBP, фагоцитарных рецепторов макрофагов, фибронектина, гиантина, Fc, α -1-антихимотрипсина, α -1-антитрипсина, антитромбина III, аполипопротеина A-1, аполипопротеина B, β -2-микроглобулина, церулоплазмينا, компонента комплемента C3 или C4, ингибитора эстеразы CI, C-реактивного белка, цистатина C и белка C. В более конкретном варианте партнер в слиянии выбран из группы, состоящей из α -1-микроглобулина, AGP-1, орозомукоида, α -1-кислого гликопротеина, связывающего витамин D белка (DBP), гемопексина, сывороточного альбумина человека (hSA), афамина и гаптоглобина. Включение компонента, являющегося партнером в слиянии, может при желании продлевать время полужизни слитого полипептида согласно изобретению в сыворотке. Смотри, например, патенты США No. 6423512, 5876969, 6593295 и 6548653, специально включенные в данное описание в виде ссылки в полном объеме, в отношении примеров полипептида, слитого с сывороточным альбумином. hSA широко распределен в организме, особенно в кишечнике и компонентах крови, и играет важную роль в поддержании осмолярности и объема плазмы. Он медленно выводится из печени и у людей обычно имеет время полужизни in vivo 14-20 дней (Waldmann et al. (1977) Albumin, Structure Function and Uses; Pergamon Press; pp. 255-275).

В том случае, когда партнером в слиянии является молекула, способная связывать сывороточный белок, молекула может быть синтетической малой молекулой, липидом или липосомой, нуклеиновой кислотой, включая синтетическую нуклеиновую кислоту, такую как аптомер, пептидом или олигосахаридом. Кроме того, молекула может быть таким белком, как, например, Fc γ R1, Fc γ R2, Fc γ R3, полимерный рецептор Ig (PIGR), ScFv и другие фрагменты антител, специфичные по отношению к сывороточному белку.

В том случае, когда партнером в слиянии является мультимеризующий компонент (MC), он представляет собой любую природную или синтетическую последовательность, способную взаимодействовать с другим MC с образованием структуры более высокого порядка, например димера, тримера и т.д. Подходящие MC

могут включать лейциновую молнию, включая домены лейциновой молнии, полученные из c-jun или c-fos; последовательности, полученные из константных областей легких цепей каппа или лямбда; синтетические последовательности, такие как мотивы спираль-петля-спираль (Muller et al. (1998) FEBS Lett. 432: 45-49), coil-coil мотивы и т.д., или другие общепринятые мультимеризующие домены, известные в данной области. В некоторых вариантах слитый компонент содержит домен, полученный из иммуноглобулина, например из IgG, IgM или IgA человека. В конкретных вариантах полученный из иммуноглобулина домен может быть выбран из группы, состоящей из Fc-домена IgG, тяжелой цепи IgG и легкой цепи IgG. Fc-домен IgG может быть выбран из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа в каждой группе изотипов. В одном примере ловушки VEGF согласно изобретению мультимеризующим компонентом является Fc-домен IgG4 (SEQ ID NO: 29).

Создание укороченных миниловушек VEGF

В одном варианте ловушки согласно изобретению укороченную миниловушку VEGF, содержащую два или более слитых полипептида согласно изобретению, создают, подвергая исходную ловушку, имеющую MC, содержащие C-область, воздействию условий, при которых отщепляются один или несколько MC, содержащих C-область. Полученная в результате укороченная миниловушка может быть продуктом полного и частичного расщепления исходной ловушки.

MC, содержащий C-область, может представлять собой любой MC, способный взаимодействовать с другим MC с образованием структуры более высокого порядка, например димера или тримера. C-область может быть создана в MC в любом требуемом положении. В свете инструкций, представленных в примерах ниже, специалист в данной области сможет выбрать требуемый сайт для создания C-области на основе требуемых свойств получаемых в результате укороченных ловушек, например молекулярной массы, мономерной или димерной структуры и т.д.

В конкретном варианте C-область представляет собой сайт расщепления тромбином (LVPRGS) (SEQ ID NO: 6), встроенный в домен Fc Δ C1 после N-концевой последовательности CPPC (SEQ ID NO: 1). В данном варианте конструкция полноразмерной исходной ловушки VEGF экспрессируется в клетке в виде Fc-меченого белка, обеспечивая таким образом улавливание и очистку, например, с использованием колонки с белком А. После образования димера и ковалентного связывания по одному или обоими остатками цистеина последовательности CPPC (SEQ ID NO: 1) димер подвергают воздействию тромбином в условиях, при которых отщепляются один или оба домена Fc Δ C1, так что образуются укороченные димерные миниловушки, имеющие молекулярную массу примерно 50-90 кДа и обладающие аффинностью по отношению к VEGF, сравнимой с аффинностью исходной ловушки. Специалист в данной области может регулировать условия расщепления, чтобы предпочтительно образовывать продукт частичного расщепления или продукт полного расщепления, при этом вариант условий расщепления выбирают на основе потребности в конкретном продукте, обладающем конкретными свойствами, такими как молекулярная масса.

В конкретном варианте C-область является сайтом расщепления тромбином (LVPRGS) (SEQ ID NO: 6), встроенным в домен Fc Δ C1 на N-конце по отношению к последовательности CPPC (SEQ ID NO: 1). После образования димера и ковалентного связывания по одному или обоим остаткам цистеина последовательности CPPC (SEQ ID NO: 1) димер подвергают воздействию тромбина в

условиях, при которых возникают один или оба домена FcΔC1 и образуются укороченные мономерные миниловушки. Мономерная укороченная миниловушка, образованная таким образом, содержит рецепторный компонент, небольшой фрагмент Fc и имеет размер примерно 25 кДа и проявляет пониженную аффинность по отношению к VEGF по сравнению с укороченной димерной ловушкой и полноразмерной исходной ловушкой. Показано, что подобная мономерная ловушка, полученная в виде рекомбинантного белка, имеет K_D примерно 1 нМ.

Создание миниловушек VEGF

В одном варианте изобретение относится к миниловушкам VEGF, имеющим один или несколько доменов рецепторных компонентов $(R1R2)_X$ и/или $(R1R3)_Y$, где $X \geq 1$, $Y \geq 1$ и R1, R2 и R3 имеют значения, определенные выше, и необязательно партнер в слиянии, который предпочтительно является доменом MC, который представляет собой аминокислотную последовательность длиной от 1 до примерно 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина, где по меньшей мере один остаток цистеина способен образовывать дисульфидную связь с остатком цистеина, присутствующим в MC другого слитого полипептида (сMC). сMC может находиться на N-конце или C-конце слитого полипептида или между двумя доменами рецепторных компонентов. В одном конкретном варианте цистеин добавляют к C-концу компонента рецептора VEGF, например $R1R2_C$, который позволяет слитому полипептиду образовывать ковалентные димеры посредством образования ковалентной дисульфидной связи между остатком цистеина на C-конце одного слитого полипептида и остатком цистеина на C-конце другого слитого полипептида. В данном иллюстративном примере миниловушка является димером слитого полипептида, показанного в SEQ ID NO: 2, где каждый слитый полипептид ($R1R2$ -сMC или $R1R2_C$) имеет молекулярную массу примерно 23,0 кДа.

В другом варианте сMC является последовательностью 4 аминокислот (XXXX) (SEQ ID NO: 11), где X означает любую аминокислоту и последовательность содержит, по меньшей мере, один остаток цистеина. В конкретном варианте сMC добавляют к C-концу домена рецепторного компонента. В более конкретном варианте последовательность из 4 аминокислот представляет собой ACGC (SEQ ID NO: 4) и сMC образует две дисульфидные связи с остатками цистеина, присутствующими во втором слитом полипептиде. Как показано ниже (таблица 2), обе приведенные в качестве примера миниловушки проявляют аффинность по отношению к VEGF, сравнимую с аффинностью исходной ловушки.

Терапевтические применения

Миниловушки VEGF согласно изобретению терапевтически применимы для лечения любого заболевания или состояния, которое улучшается, ослабляется, подавляется или предотвращается при удалении, ингибировании или уменьшении количества VEGF. Неограничивающий список конкретных состояний, улучшаемых ингибированием или уменьшением количества VEGF, включает клинические состояния, которые характеризуются избыточной пролиферацией эндотелиальных клеток сосудов, проницаемостью сосудов, отеком или воспалением, такие как отек головного мозга, связанный с повреждением, инсультом или опухолью; отек, связанный с воспалительными заболеваниями, такими как псориаз или артрит, включая ревматоидный артрит; астму; генерализованный отек, связанный с ожогами; асцит и плевральный выпот, связанный с опухолями, воспалением или травмой; хроническое воспаление дыхательных путей; синдром капиллярной утечки; сепсис; болезнь почек, связанную с повышенным просачиванием белка; и глазные заболевания, такие как

связанная с возрастом дегенерация желтого пятна и диабетическая ретинопатия.

Композиции согласно изобретению терапевтически применимы для лечения широкого множества заболеваний, связанных с повышенными уровнями VEGF.

Например, воспаление с аномальным повышением Th2 и ремоделирование дыхательных путей характерны для патогенеза астмы (смотри, например, Elias et al. (1999) J. Clin. Invest. 104: 1001-6). Повышенные уровни VEGF обнаружены в тканях и биологических образцах пациентов с астмой, которые прямо коррелируют с активностью заболевания (Lee et al. (2001) J. Allergy Clin. Immunol. 107: 1106-1108) и обратно коррелируют с диаметром дыхательных путей и чувствительностью дыхательных путей. Кроме того, предполагалось, что VEGF вносит вклад в отек ткани при астме.

Другим заболеванием, связанным с повышенным уровнем VEGF, является аденокарцинома протоков поджелудочной железы (PDAC). Указанная злокачественная опухоль часто имеет очаг усиленной пролиферации эндотелиальных клеток и часто сверхэкспрессирует VEGF (Ferrara (1999) J. Mol. Med. 77: 527-543). PDAC является причиной более 20% смертельных исходов вследствие злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта, что делает данное заболевание четвертым из наиболее распространенных причин связанной со злокачественными опухолями смертности в США и других промышленно развитых стран. Экспериментальные данные свидетельствуют о важной роли VEGF в развитии злокачественной опухоли поджелудочной железы, таким образом, ингибитор VEGF является многообещающим в качестве терапевтического средства для ослабления роста опухоли внутри поджелудочной железы и региональных и дистальных метастазов.

Меньшая по размеру негликозилированная миноловушка, экспрессированная в E. coli (пример 4), гликозилированная миноловушка, экспрессированная в клетках CHO (пример 5), или основанная на рецепторе мономерная ловушка (пример 6) имеет оптимизированные характеристики для локальной/интравитреальной доставки, т.е. более короткое время полужизни в сыворотке для более быстрого клиренса и минимизации нежелательного системного воздействия. Кроме того, вследствие своего меньшего размера миноловушка обладает способностью проникать через внутреннюю ограничивающую мембрану (ILM) в глаз и диффундировать через стекловидное тело к сетчатке/пигментному эпителиальному слою сетчатки (RPE), что поможет лечить болезнь сетчатки. Кроме того, миноловушку можно использовать для локального введения при лечении такой глазной болезни, как неоваскуляризация сосудистой оболочки глаза, диабетический макулярный отек, пролиферативная диабетическая ретинопатия, неоваскуляризация роговицы/отторжение трансплантата. Кроме того, миноловушку можно применять в любой ситуации, когда требуется временное (кратковременное) блокирование VEGF, например, чтобы избежать хронического воздействия блокады VEGF, например, при лечении псориаза.

Серьезной проблемой, приводящей к неблагоприятному исходу после операции по поводу глаукомы, является раннее воспаление и ангиогенез, а также слишком быстрое заживление раны. Соответственно ловушки VEGF согласно изобретению могут быть эффективно использованы в качестве адъюванта при оперировании глаукомы, чтобы предотвратить ранний гем- и лимфангиогенез и рекрутирование макрофагов к фильтрационной подушке после операции по поводу глаукомы и улучшить исход операции.

Комбинированная терапия

В многочисленных вариантах ловушка VEGF может быть введена в комбинации с

одним или несколькими дополнительными соединениями или терапевтическими средствами, включая вторую молекулу ловушки VEGF, хемотерапевтическое средство, хирургию, катетерные устройства и облучение. Комбинированная терапия включает в себя введение одного фармацевтического дозированного препарата, который
 5 содержит ловушку VEGF, и одного или нескольких дополнительных средств; а также введение ловушки VEGF и одного или нескольких дополнительных средства в своих отдельных фармацевтических дозированных препаратах. Например, ловушка VEGF и цитотоксическое средство, хемотерапевтическое средство или ингибирующее рост
 10 средство могут быть введены пациенту вместе в одном дозированном препарате, таким как комбинированный препарат, или каждое средство может быть введено в виде отдельного дозированного препарата. В том случае, когда используют отдельные дозированные препараты, VEGF-специфичный слитый полипептид согласно изобретению и одно или несколько дополнительных средств могут быть
 15 введены одновременно или в отдельные периоды времени со сдвигом, например последовательно.

Термин «цитотоксическое средство» в используемом в данном описании смысле относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функционирование
 20 клеток и/или вызывает разрушение клеток. Подразумевается, что термин включает радиоактивные изотопы (например, I^{131} , I^{125} , Y^{90} и Re^{186}), хемотерапевтические средства и токсины, такие как ферментативно активные токсины из бактерий, грибов, растений или животных или их фрагменты.

«Хемотерапевтическим средством» является химическое соединение, применимое
 25 для лечения злокачественной опухоли. Примеры хемотерапевтических средств включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (Cytosan®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и
 30 метилмеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида, триэтилентифосфорамида и триметилмеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлоретамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевин, такие как
 35 кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицин, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин,
 40 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как
 45 деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тигуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон,
 50 пропионат дромостанолон, эпителиостанол, мепитиостан, тестостерон; антиадренальные средства, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; пополнитель фолиевой кислоты, такой как фолиевая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрин;

эдатраксат; дефофамин; демекольцин; диазиковон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; 5 спирогерманий; тенуазоновую кислота; триазиковон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксаны, например паклитаксел (Taxol®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.) и 10 доцетаксел (Taxotere®, Aventis Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; 15 диформетилорнитин (DMFO); ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше средств. Также в данное определение включены антигормональные средства, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли, такие 20 как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Fareston); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гoserelin; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше средств.

25 «Ингибирующее рост средство» при использовании в данном описании относится к соединению или композиции, которая ингибирует рост клетки, особенно клетки злокачественной опухоли, либо *in vitro*, либо *in vivo*. Примеры ингибирующих рост средств включают средства, которые блокируют прохождение клеточного цикла (в 30 другой фазе, отличной от S-фазы), такие как средства, которые индуцируют задержку в G1 и задержку в M-фазе. Классические блокаторы фазы M включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), Taxol® и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубицин, эпирубицин, даунорубицин, этопозид и блеомицин. Указанные средства, которые задерживают G1, также распространяются на задержку S-фазы, 35 например ДНК-алкилирующие агенты, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлорэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C.

Способы введения

Изобретение относится к способам лечения, включающим в себя введение субъекту 40 эффективного количества ловушки VEGF согласно изобретению. В предпочтительном аспекте ловушка в значительной степени очищена (например, по существу не содержит веществ, которые ограничивают ее действие или дают нежелательные побочные эффекты). Субъектом предпочтительно является млекопитающее и наиболее предпочтительно человек.

45 Известны различные системы доставки, которые могут быть использованы для введения средства согласно изобретению, например инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать соединение, опосредованный рецепторами эндоцитоз (смотри, например, Wu and 50 Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432), конструирование нуклеиновой кислоты в виде части ретровирусного или другого вектора и т.д. Способы введения могут быть энтеральными или парентеральными и включают без ограничения интрадермальный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный,

внутриглазной и пероральный способы. Соединения могут быть введены любым удобным способом, например посредством инфузии или болюсной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые выстилающие (например, слизистую оболочку ротовой полости, слизистую оболочку прямой кишки и
 5 кишечника и т.д.), и могут быть введены вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным. Введение может быть срочным или хроническим (например, ежедневно, еженедельно, ежемесячно и т.д.) или в комбинации с другими средствами. Также может быть применено легочное введение,
 10 например, с использованием ингалятора или распылителя и препарат с агентом для аэрозоля.

В другом варианте активный агент может быть доставлен в везикулах, в частности липосомах, в системе контролируемого высвобождения или в насосе. В другом варианте, когда активным агентом согласно изобретению является нуклеиновая
 15 кислота, кодирующая белок, нуклеиновая кислота может быть введена *in vivo*, чтобы поддерживать экспрессию кодируемого ею белка, посредством конструирования ее в виде части соответствующего вектора для экспрессии нуклеиновой кислоты и введения его таким образом, чтобы он стал внутриклеточным, например, используя
 20 ретровирусный вектор (смотри, например, патент США No. 4980286), прямой инъекцией или используя бомбардировку микрочастицами, или покрытие липидами, или посредством рецепторов клеточной поверхности или трансфицирующих агентов, или путем введения его в связи с пептидом, подобным гомеобоксу, который, как
 25 известно, проникает в ядро (смотри, например, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868) и т.д. Альтернативно нуклеиновая кислота может быть введена внутрь клетки и включена в ДНК клетки-хозяина для экспрессии посредством гомологичной рекомбинации.

В конкретном варианте может быть желательным введение фармацевтических композиций согласно изобретению локально в необходимую для лечения область;
 30 указанное можно осуществить, например, без ограничения посредством локальной инфузии во время операции, местным применением, например, посредством инъекции, с помощью катетера или с помощью имплантата, при этом имплантат является пористым, непористым или гелеобразным материалом, включая мембраны, такие как
 35 силиконовые мембраны, волокна или промышленные заменители кожи.

Композиция, применяемая при практическом осуществлении способов согласно изобретению, может быть жидкостью, содержащей агент согласно изобретению в растворе, в суспензии или и в том и в другом. Термин «раствор/суспензия» относится к
 40 жидкой композиции, в которой первая часть активного агента присутствует в растворе, а вторая часть активного агента присутствует в форме частиц в суспензии в жидком матриксе. Жидкая композиция также включает гель. Жидкая композиция может быть водной или в форме мази. Кроме того, композиция может принимать форму твердой частицы, которая может быть введена в глаз, например между глазом
 45 и веком или в конъюнктивальный мешок, где высвобождается ловушка VEGF. Высвобождение из такой частицы обычно происходит к роговой оболочке либо через слезную жидкость, либо непосредственно к самой роговице, с которой твердая частица обычно находится в прямом контакте. Твердые частицы, подходящие для
 50 имплантации в глаз, обычно главным образом состоят из биоразрушаемых или небiorазрушаемых полимеров. Водный раствор и/или суспензия могут быть в форме глазных капель. Требуемая доза активного агента может быть измерена введением известного количества капель в глаз. Например, в случае объема капли 25 мкл

введение 1-6 капель будет доставлять 25-150 мкл композиции.

Водная суспензия или раствор/суспензия, применимые при практическом осуществлении способов согласно изобретению, могут содержать один или несколько полимеров в качестве суспендирующих агентов. Применимые полимеры включают водорастворимые полимеры, такие как полимеры целлюлозы, и водонерастворимые полимеры, такие как перекрестно сшитые карбоксилсодержащие полимеры. Водная суспензия или раствор/суспензия согласно настоящему изобретению предпочтительно являются вязкими или мукоадгезивными или еще более предпочтительно как вязкими, так и мукоадгезивными.

В другом варианте композиция, применяемая при практическом осуществлении способов согласно изобретению, является желатинизируемой *in situ* водной композицией. Такая композиция содержит желатинизирующий агент в концентрации, эффективной для стимулирования гелеобразования при контакте с глазом или с слезной жидкостью. Подходящие желатинизирующие агенты включают, но не ограничены указанным, термоотверждающиеся полимеры. Термин «желатинизируемый *in situ*» в используемом в данном описании смысле включает не только жидкости с низкой вязкостью, которые образуют гели при контакте с глазом или слезной жидкостью, но также включает более вязкие жидкости, такие как полутекучие и тиксотропные гели, которые имеют в значительной степени повышенную вязкость или плотность геля при введении в глаз.

Способы диагностики и скрининга

Ловушки VEGF согласно изобретению можно использовать диагностически и/или в способах скрининга. Например, ловушка может быть использована для наблюдения за уровнями VEGF во время клинического исследования, чтобы оценить эффективность лечения. В другом варианте способы и композиции согласно настоящему изобретению используют для отбора индивидуумов для введения в клиническое исследование, чтобы идентифицировать людей, имеющих, например, слишком высокий или слишком низкий уровень VEGF. Ловушки можно использовать в способах, известных в данной области, связанных с локализацией и активностью VEGF, например, при визуализации, измерении его уровней в соответствующих физиологических образцах, в диагностических способах и т.д.

Ловушки согласно изобретению можно использовать в скрининговом анализе *in vivo* и *in vitro*, чтобы оценить количество присутствующего несвязанного VEGF, например, в скрининговом способе для идентификации тестируемых агентов, способных снижать экспрессию VEGF. Более широко ловушки согласно изобретению можно использовать в любом анализе или способе, в котором требуется количественное измерение и/или выделение VEGF.

Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим миниловушку VEGF согласно изобретению. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество одной или нескольких миниловушек и фармацевтически приемлемый носитель. Термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим ведомством федерального правительства или правительства штата или указанный в фармакопейном списке США или другой общепризнанной фармакопее для применения на животных и более конкретно на человеке. Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такими фармацевтическими носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и

масла, включая масла из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобные. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция при желании также может содержать небольшие количества увлажнителей, или эмульгаторов, или агентов для забуферивания pH. Указанные композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, препаратов длительного высвобождения и тому подобные. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в «Remington's Pharmaceutical Sciences», E. W. Martin.

Миниловушка VEGF согласно изобретению может быть приготовлена в виде нейтральной или солевой формы. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные со свободными аминогруппами, такие как соли, полученные из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные со свободными карбоксильными группами, такие как соли, полученные с гидроксидами натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламином, триэтиламином, 2-этиламиноэтанолом, гистидином, прокаином и т.д.

Кроме того, водные композиции, применимые для практического осуществления способов согласно изобретению, имеют совместимые с глазом pH и осмотическое давление. Один или несколько приемлемых для глаз агентов для корректировки pH и/или буферных агентов могут быть введены в композицию согласно изобретению, включая кислоты, такие как уксусная, борная, лимонная, молочная, фосфорная и соляная кислоты; основания, такие как гидроксид натрия, фосфат натрия, борат натрия, цитрат натрия, ацетат натрия и лактат натрия; и буферы, такие как цитрат/декстроза, бикарбонат натрия и хлорид аммония. Такие кислоты, основания и буферы вводят в количестве, требуемом для поддержания pH композиции в приемлемых для глаза пределах. Одна или несколько приемлемых для глаза солей могут быть включены в композицию в количестве, достаточном для доведения осмотического давления композиции до приемлемых для глаза пределов. К таким солям относятся соли, имеющие катионы натрия, калия или аммония и анионы хлорида, цитрата, аскорбата, бората, фосфата, бикарбоната, сульфата, тиосульфата или бисульфата.

Количество ловушки, которое будет эффективным в случае ее планируемого терапевтического применения, можно определить стандартными клиническими способами, основанными на данном описании. Кроме того, необязательно можно использовать анализы *in vitro*, помогающие идентифицировать оптимальные пределы доз. В общем, подходящие пределы доз для внутривенного введения обычно составляют примерно 50-5000 мг активного соединения на килограмм массы тела. Подходящие пределы доз для интраназального введения обычно составляют примерно от 0,01 мг/кг массы тела до 1 мг/кг массы тела. Эффективные дозы могут быть экстраполированы на основе кривых дозовой зависимости, полученных в тест-системах *in vitro* или в моделях на животных.

Для системного введения терапевтически эффективная доза может быть сначала определена в анализах *in vitro*. Например, доза может быть разработана в моделях на животных, чтобы достичь пределов циркулирующей концентрации, которые включают IC₅₀, определенную в культуре клеток. Такую информацию можно

использовать для более точного определения доз, приемлемых для человека.

Исходные дозы также можно оценить на основе данных *in vivo*, например, в моделях на животных, используя способы, которые хорошо известны в данной области.

5 Специалист в данной области без труда может оптимизировать введение человеку на основе данных, полученных на животных.

Дозовое количество и интервал можно корректировать индивидуально, чтобы обеспечить уровни соединений в плазме, которые являются достаточными для поддержания терапевтического эффекта. В случаях локального введения или
10 избирательного поглощения эффективная локальная концентрация соединений может быть не связана с концентрацией в плазме. Специалист в данной области сможет оптимизировать терапевтически эффективные локальные дозы без чрезмерного экспериментирования.

15 Количество вводимого соединения, конечно, будет варьироваться в зависимости от субъекта, подвергаемого лечению, массы субъекта, тяжести болезни, способа введения и решения лечащего врача. Терапию можно повторять периодически, пока симптомы выявляются или даже когда они не регистрируются. Терапия может проводиться отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами.

20 Трансфекция клеток и генная терапия

Настоящее изобретение относится к применению нуклеиновых кислот, кодирующих слитый полипептид согласно изобретению, для трансфекции клеток *in vitro* и *in vivo*. Указанные нуклеиновые кислоты могут быть встроены в любой из ряда хорошо известных векторов для трансфекции клеток-мишеней и организмов. Нуклеиновые
25 кислоты трансфицируют в клетки *ex vivo* и *in vivo* посредством взаимодействия вектора и клетки-мишени. Композиции вводят (например, посредством инъекции в мышцу) субъекту в количестве, достаточном, чтобы вызвать терапевтический ответ. Количество, адекватное для осуществления указанного, определяют как
30 «терапевтически эффективную дозу или количество».

В другом аспекте изобретение относится к способу снижения уровней VEGF у человека или другого животного, включающему в себя трансфекцию клетки нуклеиновой кислотой, кодирующей слитый полипептид согласно изобретению, при этом нуклеиновая кислота содержит индуцируемый промотор, функционально
35 связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей слитый полипептид или миниловушку. Способы генной терапии при лечении или профилактике болезни человека смотри, например, в Van Brunt (1998) *Biotechnology* 6: 1149-1154.

Наборы

40 Изобретение также относится к предметам производства, содержащим упаковочный материал и фармацевтическое средство, находящееся в упаковочном материале, при этом фармацевтическое средство содержит, по меньшей мере, одну ловушку VEGF, состоящую из двух или более слитых полипептидов согласно изобретению, и упаковочный материал содержит этикетку или вкладыш в упаковку,
45 на котором указано, что VEGF-специфичный слитый полипептид можно применять для лечения опосредованного VEGF заболевания или состояния.

Трансгенные животные

Изобретение включает трансгенных животных, отличных от человека,
50 экспрессирующих ловушку согласно изобретению. Трансгенное животное может быть получено введением нуклеиновой кислоты в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки, например микроинъекцией, ретровирусной инфекцией, и обеспечением возможности для развития яйцеклетки у псевдобеременной приемной самки. Любые

регуляторные или другие последовательности, применяемые в экспрессирующих векторах, могут образовывать часть трансгенной последовательности.

Тканеспецифичная регуляторная последовательность(ти) могут быть оперативно связаны с трансгеном, чтобы управлять экспрессией трансгена в конкретных клетках.

Трансгенное животное, отличное от человека, экспрессирующее слитый полипептид или миноловушку согласно изобретению, применимо для множества применений, включая применение в качестве средств получения такого слитого полипептида.

Кроме того, трансген может быть помещен под контроль индуцируемого промотора так, чтобы экспрессию слитого полипептида или миноловушки можно было регулировать, например, введением малой молекулы.

Конкретные варианты

В описанных ниже экспериментах создавали меньшие по размеру ловушки VEGF и исследовали их способность связывать VEGF. Такие миноловушки предпочтительно используются в конкретных применениях. Например, некоторые состояния или заболевания предпочтительно можно лечить с помощью локального введения ловушки VEGF в конкретный орган, ткань или клетку, а не системным введением. В одном иллюстративном примере миноловушек согласно изобретению создавали меньшую по размеру ловушку VEGF прямым расщеплением димеризованной ловушки VEGF, имеющей область расщепления (С-область), созданную в домене Fc (пример 2). Укороченная ловушка проявляла сравнимую аффинность по отношению к VEGF и время полужизни как и полноразмерная исходная ловушка. В примерах 3-5 описана конструкция слитого полипептида, имеющего компонент рецептора VEGF и мультимеризующий компонент, состоящий из одного или двух остатков цистеина.

Измерения аффинности показали, что негликозилированный слитый полипептид, экспрессированный в *E. coli*, или гликозилированный полипептид, экспрессированный в клетках CHO, имели сравнимую аффинность связывания для VEGF, как и полноразмерная исходная ловушка. Пример 6, кроме того, иллюстрирует мономерную ловушку VEGF, состоящую из (R1R2)₂, которая способна связывать и ингибировать VEGF. В примере 7 описана конструкция миноловушки VEGF (SEQ ID NO: 26), имеющей высокую аффинность связывания VEGF по сравнению с полноразмерной ловушкой (SEQ ID NO: 10).

Другие отличительные признаки изобретения будут очевидными в ходе дальнейшего описания примерных вариантов, которые приведены для иллюстрации изобретения и не предназначены для его ограничения.

ПРИМЕРЫ

Следующий пример приведен с тем, чтобы представить специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как получать и применять способы и композиции согласно изобретению, и не предназначен для ограничения объема того, что авторы изобретения рассматривают как свое изобретение. Были предприняты усилия для того, чтобы обеспечить точность в отношении используемых числовых значений (например, количеств, температуры и т.д.), но следует принимать во внимание некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не оговорено особо, части являются частями по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах по Цельсию и давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Конструкция Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)

Конструкция исходной ловушки VEGF Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) (SEQ ID NO: 7-8), VEGFR1R2.FcΔC1(a) (SEQ ID NO: 9-10) и Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) (SEQ ID NO:

12-13) подробно описана в публикации PCT WO/0075319, специально включенной в данное описание в виде ссылки в полном объеме. Также в WO/0075319 описаны способы конструирования и экспрессии конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих ловушки VEGF, способы регистрации и измерения связывания ловушки VEGF с VEGF, способы определения стехиометрии связывания VEGF с использованием анализа BIAcore и фармакокинетические анализы.

Пример 2. Расщепленная тромбином димерная миниловушка VEGF

Конструкцию VEGFR1R2.FcΔC1(a) (SEQ ID NO: 9-10) модифицировали инсерцией сайта расщепления тромбином после CPPC (SEQ ID NO: 1) домена Fc. Очищенную ловушку VEGF (5 мкг) инкубировали с тромбином (Novagen) в 20 mM трис-HCl, pH 8,4, 50 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂ в течение 16 час при 37°C. Контроли включали белок для контроля расщепления (CCP) и белок исходной ловушки VEGF, инкубированный без тромбина. SDS-ПААГ-анализ (трис-глициновый 4-20% гель; 5 мкг белка на дорожку) подтвердил правильное расщепление (результаты не показаны).

Определение аффинности. K_d связывания каждой ловушки VEGF с hVEGF₁₆₅ определяли, как описано в WO/0075319, для исходной ловушки VEGF, нерасщепленной ловушки VEGF, содержащей сайт расщепления тромбином («нерасщепленная ловушка VEGF»), расщепленной миниловушки VEGF и рекомбинантной мономерной R1R2-мус мус his. Более конкретно способность ловушек блокировать VEGF₁₆₅-зависимое фосфорилирование рецептора определяли, используя первичные эндотелиальные клетки человека (HUVEC). VEGF₁₆₅ инкубировали в присутствии различных концентраций тестируемых ловушек и смесь добавляли к HUVEC, чтобы стимулировать фосфорилирование тирозина VEGFR2. При субстехиометрических концентрациях ловушки VEGF несвязанный VEGF индуцировал фосфорилирование рецептора. Однако при молярном отношении 1:1 или больше ловушки VEGF к лиганду наблюдали полное блокирование передачи сигнала рецептором, установив, что одна молекула димерной ловушки способна блокировать одну молекулу VEGF₁₆₅ человека. Таким образом, высокая аффинность связывания ловушки VEGF в отношении VEGF приводит к образованию комплекса, который предотвращает взаимодействие VEGF с рецепторами клеточной поверхности. Эквивалентные результаты получили в случае идентичных экспериментов по ингибированию фосфорилирования для исходной ловушки VEGF, нерасщепленной ловушки VEGF и расщепленной миниловушки VEGF. Результаты показаны в таблице 1.

Таблица 1		
Ловушка	Кинетическая скорость диссоциации (1/с)	T _{1/2} (ч)
Исходная ловушка VEGF	5,51×10 ⁻⁵ ±0,94%	3,5
Нерасщепленная ловушка VEGF	4,93×10 ⁻⁵ ±0,70%	3,9
Расщепленная миниловушка VEGF	5,46×10 ⁻⁵ ±0,62%	3,53
Мономер R1R2-мус мус his	6,74×10 ⁻³ ±0,38%	0,028

Пример 3. Конструкция плазмид, кодирующих миниловушки VEGF

Миниловушки VEGF конструировали из предшественника исходной ловушки VEGF, VEGFR1R2.FcΔC1(a) (SEQ ID NO: 9-10), в котором три аминокислоты глицин-аланин-пролин служили в качестве линкера между Flk1D3 и FcΔC1(a). Данную плазмиду pTE115 использовали для конструирования миниловушек VEGF, так как линкерная последовательность ДНК содержала последовательность узнавания

эндонуклеазой рестрикции Srf I, что облегчало конструирование ловушки VEGF. Во всех других отношениях ловушка VEGF, кодируемая рТЕ115, идентична ловушке VEGF VEGFR1R2.FcΔC1(a) (SEQ ID NO: 9-10), подробно описанной в публикации РСТ WO/0075319.

5 Конструировали две миниловушки VEGF с доменами для мультимеризации, состоящими либо из одного остатка цистеина (R1R2_C) (SEQ ID NO: 2), либо аминокислот ACGC (SEQ ID NO: 4) (R1R2_{ACGC}) (SEQ ID NO: 5), добавляемых к С-концу рецепторных компонентов Flt1D2.Flk1D3. Обе полученные конструкции 10 способны образовывать гомодимерные молекулы, стабилизированные одной (R1R2_C) или двумя (R1R2_{ACGC}) межмолекулярными дисульфидными связями.

Плазмиду рТЕ517 получали удалением фрагмента длиной 690 п.о., вызванного расщеплением ДНК рТЕ115 с помощью Srf I и Not I, и встраиванием фрагмента 15 синтетической ДНК, образованного отжигом олигонуклеотидов R1R2NC (SEQ ID NO: 14) и R1R2CC (SEQ ID NO: 15). Полученная в результате плаزمиды кодирует R1R2_C, которая состоит из доменов Flt1D2.Flk1D3, за которыми следует остаток цистеина (SEQ ID NO: 23). Подобным образом получали плазмиду рТЕ518 удалением фрагмента 20 длиной 690 п.о., вызванного расщеплением ДНК рТЕ115 с помощью Srf I и NotI, с последующим лигированием фрагмента синтетической ДНК, образованного отжигом олигонуклеотидов R1R2NACGC (SEQ ID NO: 16) и R1R2CACGC (SEQ ID NO: 17). Полученная в результате плазмиды кодирует R1R2_{ACGC}, которая состоит из 25 доменов Flt1D2.Flk1D3, за которыми следуют аминокислоты ACGC (SEQ ID NO: 25).

Также конструировали плазмиды для управления экспрессией указанных миниловушек в E. coli. Использовали праймеры R1R2N-Nco1 (SEQ ID NO: 18) и R1R2CNot1 (SEQ ID NO: 19), чтобы амплифицировать фрагмент ДНК рТЕ115, 30 который кодирует аминокислоты с G30 по K231 относительно исходной ловушки VEGF (SEQ ID NO: 10). Амплификация данной последовательности приводила к слиянию начального кодона метионина на 5'-конце и слиянию кодона цистеина с последующим стоп-кодоном на 3'-конце (SEQ ID NO: 2). Затем полученный фрагмент ДНК клонировали в сайтах Nco I и Not I экспрессирующей плазмиды E. coli рRG663, получая рRG1102, так чтобы экспрессия R1R2_C была зависима от 35 транскрипции с промотора Φ1.1 фага Т7. Индукция генной экспрессии с рRG1102 приводит к накоплению R1R2_C в цитоплазме штамма-хозяина E. coli RFJ238. Подобным образом праймеры R1R2N-Nco1 (SEQ ID NO: 18) и R1R2ACGC-Not1 (SEQ ID NO: 20) использовали для амплификации фрагмента ДНК из рТЕ115, который 40 кодирует аминокислоты с G30 по K231 (SEQ ID NO: 10), получая в результате слияние начального кодона метионина на 5'-конце и слияние кодонов ACGC (SEQ ID NO: 4) с последующим стоп-кодоном на 3'-конце (SEQ ID NO: 5). Затем полученный фрагмент клонировали в сайтах Nco I и Not I экспрессирующей плазмиды E. coli рRG663, получая рRG1103, так чтобы экспрессия R1R2_{ACGC} зависела от транскрипции с 45 промотора Φ1.1. фага Т7. Индукция генной экспрессии как с рRG1102, так и с рRG1103 приводила к накоплению R1R2_C или R1R2_{ACGC} соответственно в цитоплазме штамма-хозяина E. coli RFJ238.

Пример 4. Очистка и характеристика миниловушек VEGF из E. coli

50 И R1R2_C и R1R2_{ACGC} экспрессировали в виде цитоплазматических белков в E. coli и очищали одним и тем же способом. Индукция промотора Φ1.1 фага Т7 либо в рRG1102, либо в рRG1103 в E. coli K12 штамма RFJ238 приводила к накоплению белка в

цитоплазме. После индукции клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в 50 мМ трис-НСl, pH 7,5, 20 мМ EDTA и лизировали пропусканием через гомогенизатор для клеток Niro-Soavi. Тельца включения собирали из лизированных клеток центрифугированием, один раз промывали дистиллированной H₂O, затем растворяли в 8М гуанидин-НСl, 50 мМ трис-НСl, pH 8,5, 100 мМ сульфите натрия, 10 мМ тетрагидрате натрия и инкубировали при комнатной температуре в течение 16 часов. Осветленный надосадок фракционировали на колонке S300, уравновешенной 6М гуанидин-НСl, 50 мМ трис-НСl, pH 7,5. Фракции, содержащие R1R2_C, объединяли и диализовали против 6М мочевины, 50 мМ трис-НСl, pH 7,5. Диализованный белок разбавляли до 2М мочевины, 50 мМ трис-НСl, pH 8,5, 2 мМ цистеин, затем медленно перемешивали в течение 7 дней при 4°C. Подвергнутый рефолдингу белок диализовали против 50 мМ трис-НСl, pH 7,5, затем наносили на колонку с SP-сефарозой, уравновешенную 50 мМ трис-НСl, pH 7,5, и элюировали градиентом NaCl от 0 до 1М в 50 мМ трис-НСl, pH 7,5. Фракции, содержащие R1R2_C, объединяли, концентрировали и наносили на колонку Superdex 200, уравновешенную 50 мМ трис-НСl, pH 7,5, 150 мМ NaCl. Фракции, содержащие димер миниловушки, собирали и объединяли. С помощью SDS-ПААГ определили молекулярную массу очищенной миниловушки, составляющую примерно 46 кДа.

Проводили анализ BIAcore (как описано в WO/0075319), чтобы определить аффинность ловушки по отношению к VEGF, и результаты показали, что миниловушки R1R2_C и R1R2_{ACGC} имели аффинность к VEGF, сравнимую с аффинностью полноразмерной ловушки VEGF (таблица 2).

Таблица 2		
Ловушка	Кинетическая скорость диссоциации (1/с)	T _{1/2} (ч)
Ловушка VEGF	4,23×10 ⁻⁵	4,53
R1R2 _C	3,39×10 ⁻⁵	5,68
R1R2 _{ACGC}	3,41×10 ⁻⁵	5,65

Пример 5. Экспрессия миниловушек VEGF в CHO K1

Экспрессия миниловушек VEGF, кодируемых pTE517 и pTE518, зависит от транскрипции с промотора CMV-MIE человека и приводит к секреции миниловушек в культуральную среду при экспрессии в клетках CHO. При экспрессии в виде секретируемых белков в CHO K1 обе миниловушки обнаруживали в кондиционированных средах, и определение их молекулярной массы в SDS-ПААГ свидетельствовало, как и ожидалось, что белки были гликозилированы. Анализ в SDS-ПААГ также показал, что миниловушки способны образовывать гомодимерные молекулы, стабилизированные межмолекулярной дисульфидной связью(ями) между C-концевыми цистеинами. В частности, миниловушка R1R2_C эффективно образовывала ковалентные димеры при экспрессии в виде секретируемого белка в клетках CHO.

Пример 6. Конструирование и экспрессия одноцепочечной миниловушки VEGF

Также конструировали миниловушку VEGF, в которой не требуется домен для мультимеризации (SEQ ID NO: 24). Данную миниловушку конструировали непосредственным слиянием одного домена Flt1D2.Flk1D3 (R1R2) (аминокислоты 30-231 SEQ ID NO: 24) со вторым доменом Flt1D2.Flk1D3 (R1R2) (аминокислоты 234-435 SEQ ID NO: 24) с помощью линкера Gly-Pro между рецепторными доменами тандема (аминокислоты 232-233 SEQ ID NO: 24).

Чтобы сконструировать ген, кодирующий tandemные домены Flt1D2.Flk1D3, синтезировали фрагмент ДНК (Blue Heron Biotechnology), который кодировал один домен Flt1D2.Flk1D3, который минимизировал гомологию ДНК с ДНК, кодирующей домен Flt1D2.Flk1D3, обнаруженной в рТЕ115. Полученный синтезированный фрагмент ДНК клонировали в виде фрагмента Srf I-Not I в сайтах Srf I-Not I рТЕ115, чтобы получить рТЕ570, которая экспрессирует миниловушку VEGF R1R2-R1R2 с промотора CMV-MIE. Когда данную плазмиду трансфицируют в клетки CHO K1, миниловушка VEGF R1R2-R1R2 накапливается в культуральной среде.

Пример 7. Конструирование и экспрессия миниловушки VEGF

Миниловушку VEGF конструировали, как описано выше, непосредственным слиянием одного домена Flt1D2.Flk1D3 (R1R2) (аминокислоты 30-231 SEQ ID NO: 26) с С-концевой последовательностью из девяти аминокислот, заканчивающейся CPPC. Когда такую плазмиду трансфицируют в клетки CHO K1, миниловушка VEGF с SEQ ID NO: 26 секретируется в культуральную среду. Последующая очистка электрофорезом в невосстанавливающем SDS-ПААГ, а также простой анализ светорассеяния выявляли молекулу ловушки с молекулярной массой примерно 64 кДа. Указанная молекулярная масса свидетельствует, что был образован ковалентный димер между двумя слитыми полипептидами с SEQ ID NO: 26. Сходные эксперименты проводили с плазмидами, кодирующими слитые полипептиды с SEQ ID NO: 27 и 28, и подобным образом показали, что указанные молекулы образовывали гомодимерные ловушки. Определения аффинности для связывания VEGF-165 человека с ловушками EGF, состоящими из димеров с SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 26, показаны в таблице 3.

Таблица 3

Ловушка VEGF	k_a (1/Ms)	k_d (1/c)	KD (M)
SEQ ID NO: 10	$2,73 \times 10^{+7}$	$1,79 \times 10^{-5}$	$6,55 \times 10^{-13}$
SEQ ID NO: 26	$2,00 \times 10^{+7}$	$6,56 \times 10^{-6}$	$3,28 \times 10^{-13}$
SEQ ID NO: 26	$2,61 \times 10^{+7}$	$5,77 \times 10^{-6}$	$2,21 \times 10^{-13}$

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- 5 <120> Ловушки VEGF и их терапевтические применения
- <130> RGE 710D2
- 10 <140> Переуступлен
<141> 2004-06-29
- <150> 10/609,775
<151> 2003-06-30
- 15 <160> 29
- <170> FastSEQ для версии Windows 4.0
- 20 <210> 1
<211> 4
<212> Белок
<213> homo sapiens
- 25 <400> 1
Cys Pro Pro Cys
1
- 30 <210> 2
<211> 200
<212> Белок
<213> homo sapiens
- 35 <400> 2
Met Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile
1 5 10 15
His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser
20 25 30
40 Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile
35 40 45
Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile
50 55 60
Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr
65 70 75 80
45 Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr Gln Thr Asn Thr
- 50

				85				90					95			
	Ile	Ile	Asp	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	Val
				100					105					110		
5	Gly	Glu	Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	Val
			115					120					125			
	Gly	Ile	Asp	Phe	Asn	Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	Lys
			130				135					140				
	Lys	Leu	Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Lys
	145					150					155				160	
10	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln
				165					170						175	
	Gly	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr
			180					185						190		
	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Cys								
15			195					200								

<210> 3
 <211> 4
 20 <212> белок
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> вариант
 25 <222> 1, 3
 <223> Хаа = любая аминокислота

<400> 3
 Хаа Cys Хаа Cys
 30 1

<210> 4
 <211> 4
 35 <212> белок
 <213> homo sapiens

<400> 4
 Ala Cys Gly Cys
 40 1

<210> 5
 <211> 203
 45 <212> белок
 <213> homo sapiens

50

<400> 5
 Met Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile
 1 5 10 15
 His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser
 5 20 25 30
 Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile
 35 40 45
 Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile
 50 55 60
 10 Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr
 65 70 75 80
 Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr Gln Thr Asn Thr
 85 90 95
 Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val
 100 105 110
 15 Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val
 115 120 125
 Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys
 130 135 140
 Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys
 20 145 150 155 160
 Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln
 165 170 175
 Gly Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 180 185 190
 25 Phe Val Arg Val His Glu Lys Ala Cys Gly Cys
 195 200

<210> 6
 <211> 6
 30 <212> белок
 <213> homo sapiens

<400> 6
 Leu Val Pro Arg Gly Ser
 35 1 5

<210> 7
 <211> 1453
 40 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

<400> 7
 aagcttgggc tgcaggtcga tcgactctag aggatcgatc cccgggcgag ctcgaaattcg 60
 45 caaccaccat ggtcagctac tgggacaccg gggctctgct gtgcgcgctg ctgagctgtc 120

50

tgcttctcac aggatctagt tccggaggta gacctttcgt agagatgtac agtgaaatcc 180
 ccgaaattat acacatgact gaaggaaggg agctcgcat tccctgccgg gttacgtcac 240
 ctaacatcac tggtacttta aaaaagtttc cacttgacac tttgatccct gatggaaaac 300
 gcataatctg ggacagtaga aagggttca tcatatcaaa tgcaacgtac aaagaaatag 360
 5 ggcttctgac ctgtgaagca acagtcaatg ggcatattgta taagacaaac tatctcacac 420
 atcgacaaac caatacaatc atagatgtgg ttctgagtc gtctcatgga attgaactat 480
 ctgttgagga aaagcttgtc tttaaattgta cagcaagaac tgaactaaat gtgggggattg 540
 acttcaactg ggaataccct tcttcgaagc atcagcataa gaaacttgta aaccgagacc 600
 taaaaaccca gtctgggagt gagatgaaga aatttttgag caccttaact atagatgggtg 660
 10 taacccggag tgaccaagga ttgtacacct gtgcagcatc cagtgggctg atgaccaaga 720
 agaacagcac atttgtcagg gtccatgaaa agggcccggg cgacaaaact cacacatgcc 780
 caccgtgcc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt ctctctcttc ccccaaaaac 840
 ccaaggacac cctcatgac tcccggaacc ctgagggtcac atgctgtggg gtggacgtga 900
 gccacgaaga cctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg 960
 ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca 1020
 15 ccgtctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag 1080
 cctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcgagccc cgagaaccac 1140
 aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct 1200
 gcctggtcaa aggtctctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc 1260
 cggagaacaa ctacaagacc acgcctccc tgctggactc cgacggctcc ttcttctct 1320
 20 atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg 1380
 tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta 1440
 aatgagcggc cgc 1453

<210> 8

<211> 458

25 <212> белок

<213> homo sapiens

<400> 8

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 30 Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu
 20 25 30
 Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu
 35 35 40 45
 Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu
 50 55 60
 Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile
 65 70 75 80
 Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu
 85 90 95
 40 Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys
 100 105 110
 Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val
 115 120 125
 Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val

45

50

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

<210> 9

<211> 1377

<212> ДНК

<213> homo sapiens

<400> 9

```

atggtcagct actgggacac cggggtcctg ctgtgogcgc tgctcagctg tctgcttctc 60
acaggatcta gttccggaag tgataccggt agacctttcg tagagatgta cagtgaatc 120
cccgaaatta tacacatgac tgaaggaagg gagctcgtca ttccctgccg gggtacgtca 180
5 cctaacaatca ctgttacttt aaaaaagttt ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa 240
cgcataatct gggacagtag aaagggcttc atcatatcaa atgcaacgta caaagaaata 300
gggcttctga cctgtgaagc aacagtcaat gggcatttgt ataagacaaa ctatctcaca 360
catcgacaaa ccaatacaat catagatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaacta 420
tctgttggag aaaagcttgt cttaaattgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt 480
10 gacttcaact gggaataccc ttcttcgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac 540
ctaaaaaccc agtctgggag tgagatgaag aaatttttga gcaccttaac tatagatggg 600
gtaaccgga gtagcaagg attgtacacc tgtgcagcat ccagtgggct gatgaccaag 660
aagaacagca catttgtcag ggtccatgaa aaggacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 720
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac 780
accctcatga tctcccgga ccttgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 840
15 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 900
aagccgcgga aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 960
caccaggact ggctgaatgg caaggagtag aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 1020
gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1080
accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgtc 1140
20 aaaggcttct atccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1200
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct cttcttctct ctacagcaag 1260
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaagctt tctcatgctc cgtgatgcac 1320
gaggctctgc acaaccacta cagcgagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1377

```

<210> 10

25 <211> 458

<212> белок

<213> homo sapiens

<400> 10

```

30 Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
      1          5          10          15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
      20          25          30
Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
35      35          40          45
Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
      50          55          60
Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
65      70          75          80
Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
40      85          90          95
Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
      100          105          110

```

45

50

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

45

<210> 11

50

<211> 4
 <212> белок
 <213> homo sapiens

5 <220>
 <221> вариант
 <222> 1, 2, 3, 4
 <223> Хаа = любая аминокислота

<400> 11
 10 Хаа Хаа Хаа Хаа
 1

<210> 12
 15 <211> 1444
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

<400> 12
 20 aagcttgggc tgcaggtcga tcgactctag aggatcgatc cccgggcgag ctcgaattcg 60
 caaccaccat ggtcagctac tgggacaccg gggctcctgt gtgcgcgctg ctcagctgtc 120
 tgcttctcac aggatctagt tccggaggta gacctttcgt agagatgtac agtgaaatcc 180
 ccgaaattat acacatgact gaaggaaggg agctcgtcat tccctgcgag gttacgtcac 240
 ctaacatcac tgttacttta aaaaagtttc cacttgacac ttgatccct gatggaaaac 300
 gcataatctg ggacagtaga aagggttca tcatatcaaa tgcaacgtac aaagaaatag 360
 25 ggcttctgac ctgtgaagca acagtcaatg ggcatattgt taagacaaac tatctcacac 420
 atcgacaaac caatacaatc atagatatcc agctgttgcc caggagctg ctggagctgc 480
 tggtagggga gaagctgggc ctcaactgca ccgtgtgggc tgagtttaac tcaggtgtca 540
 cctttgactg ggactaccca ggggaagcag cagagcgggg taagtgggtg cccgagcgac 600
 gctcccaaca gaccacaca gaactctcca gcatcctgac catccacaac gtcagccagc 660
 acgacctggg ctctgtatgt tgcaaggcca acaacggcat ccagcgattt cgggagagca 720
 30 ccgaggtcat tgtgcatgaa aatggcccg ggcacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc 780
 cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca 840
 ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag 900
 accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca 960
 agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtcctgc 1020
 35 accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag 1080
 ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca 1140
 ccttgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca 1200
 aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca 1260
 actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tatagcaagc 1320
 40 tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcagtctcc gtgatgcatg 1380
 aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatgagcgg 1440
 ccgc 1444

<210> 13

45

50

<211> 455
 <212> белок
 <213> homo sapiens

5 <400> 13
 Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu
 20 25 30
 10 Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu
 35 40 45
 Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu
 50 55 60
 Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile
 65 70 75 80
 15 Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu
 85 90 95
 Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys
 100 105 110
 20 Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Ile Gln
 115 120 125
 Leu Leu Pro Arg Lys Ser Leu Glu Leu Leu Val Gly Glu Lys Leu Val
 130 135 140
 Leu Asn Cys Thr Val Trp Ala Glu Phe Asn Ser Gly Val Thr Phe Asp
 145 150 155 160
 25 Trp Asp Tyr Pro Gly Lys Gln Ala Glu Arg Gly Lys Trp Val Pro Glu
 165 170 175
 Arg Arg Ser Gln Gln Thr His Thr Glu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Ile
 180 185 190
 30 His Asn Val Ser Gln His Asp Leu Gly Ser Tyr Val Cys Lys Ala Asn
 195 200 205
 Asn Gly Ile Gln Arg Phe Arg Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu
 210 215 220
 Asn Gly Pro Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 35 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 40 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 45 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

50

	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
				340					345					350		
	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
			355					360					365			
5	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
		370					375					380				
	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
	385					390					395					400
	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
					405					410					415	
10	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				420					425					430		
	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
			435					440					445			
15	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
		450					455									

<210> 14
 <211> 24
 20 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

<400> 14
 gggctgttga gagagagaga gaggc 24

25 <210> 15
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

30 <400> 15
 ggccgctctc tctctctctc aacagccc 28

35 <210> 16
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

<400> 16
 gggcgcatgc ggttggtgag agc 23

40 <210> 17
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

45

50

<400> 17
 ggccgctctc aacaaccgca tgcgccc 27

 <210> 18
 5 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 18
 10 gagagagacc atgggtagac ctttcgtaga gatgta 36

 <210> 19
 <211> 48
 <212> ДНК
 15 <213> homo sapiens

 <400> 19
 agagaggcgg ccgctttatc aacacttttc atggaccctg acaaatgt 48

 <210> 20
 20 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 20
 25 agagaggcgg ccgctttatc aacaaccgca tgccttttca tggaccctga caaatgt 57

 <210> 21
 <211> 39
 <212> ДНК
 30 <213> homo sapiens

 <400> 21
 agttccggaa gtgccatggg tagacctttc gtagagatg 39

 <210> 22
 35 <211> 44
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 22
 40 agagaggcgg ccgctgttat cacttctcgt gcacgcgcac gaag 44

 <210> 23
 <211> 235
 <212> белок
 45 <213> homo sapiens

 50

<400> 23

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

<210> 24

<211> 435

<212> белок

<213> homo sapiens

<400> 24

40	Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser
	1				5					10					15	
	Cys	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Gly	Arg	Pro
				20					25					30		
45	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu
			35					40					45			

50

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

50

His Glu Lys 420 425 430
435

5

<210> 25
<211> 238
<212> белок
<213> homo sapiens

10

<400> 25
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
15 20 25 30
Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
35 40 45
Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
50 55 60
20 Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asn Thr Leu Ile Pro Asn Gly Lys
65 70 75 80
Ala Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
85 90 95
Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
100 105 110
25 Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
115 120 125
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
130 135 140
30 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
145 150 155 160
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
165 170 175
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
180 185 190
35 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
195 200 205
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
210 215 220
40 Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Pro Gly Ala Cys Gly Cys
225 230 235

40

<210> 26
<211> 240
45 <212> белок
<213> homo sapiens

50

<400> 26

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

<210> 27

<211> 240

35 <212> белок

<213> homo sapiens

<400> 27

40	Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser
	1				5					10					15	
	Cys	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Gly	Arg	Pro
				20					25					30		
	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu
			35					40					45			
45	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr

50

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

25
 <210> 28
 <211> 237
 <212> белок
 <213> homo sapiens

30	<400> 28
	Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
	1 5 10 15
	Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
	20 25 30
35	Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
	35 40 45
	Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
	50 55 60
40	Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
	65 70 75 80
	Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
	85 90 95
	Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
	100 105 110
45	Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
	115 120 125

50

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 130 135 140
 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
 145 150 155 160
 5 Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
 165 170 175
 Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
 180 185 190
 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
 195 200 205
 10 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 210 215 220
 Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr His Thr Cys
 225 230 235

15

<210> 29

<211> 434

<212> белок

20 <213> homo sapiens

<400> 29

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

50

	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Glu	Ser	Lys
			195					200					205			
	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly
		210					215					220				
5	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
	225					230					235					240
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu
					245					250					255	
	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
10				260					265					270		
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		275						280					285			
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
		290					295					300				
15	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu
	305					310					315					320
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
					325					330					335	
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
20				340					345					350		
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
		355						360					365			
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
		370					375					380				
25	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp
	385					390					395					400
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
					405					410					415	
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu
				420					425					430		
30	Gly	Lys														

Формула изобретения

1. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый полипептид, способный связывать фактор роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF), где полипептид состоит из компонента $(R1R2)_X$ и, необязательно, мультимеризующего компонента (MC), который представляет собой аминокислотную последовательность длиной от 1 до 200 аминокислот, имеющую по меньшей мере один остаток цистеина, где $X \geq 1$, R1 означает иммуноглобулин-подобный (Ig) домен 2 рецептора VEGF Flt-1, представляющий собой аминокислоты 27-126 SEQ ID NO:8, 27-129 SEQ ID NO:10; и R2 означает Ig-домен 3 рецептора VEGF Flk-1, представляющий собой аминокислоты 127-228 SEQ ID NO:8 или 130-231 SEQ ID NO:10 и, где слитый полипептид не содержит мультимеризующего компонента в случае, когда $X=2$, и мультимеризующий компонент представляет собой аминокислотную последовательность длиной от 1 до 15 аминокислот в случае, когда $X=1$.
2. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где мультимеризующий компонент (MC) выбран из группы, состоящей из XCXC, ACGC и CPPC.
3. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, в которой X равно 1 и мультимеризующим компонентом является аминокислотная последовательность длиной 1-15 аминокислот с 1-2 остатками цистеина.
4. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, в которой X равно 2 и

которая не содержит мультимеризующего компонента.

5. Слитый полипептид, способный связывать фактор роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF), имеющий аминокислотную последовательность, определяемую последовательностью нуклеиновой кислоты по пп.1-4.

6. Слитый полипептид по п.5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26, 27 или 28.

7. Реплицируемый экспрессионный вектор, способный к экспрессии в трансформированной клетке-хозяине, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по пп.1-4.

8. Способ получения слитого полипептида, способного связывать фактор роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF), включающий стадии введения в подходящую систему экспрессии экспрессирующего вектора по п.7, осуществления экспрессии слитого полипептида VEGF и извлечения полученного слитого полипептида.

9. Ловушка фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF), содержащая мультимер из двух или более слитых полипептидов по п.5.

10. Ловушка VEGF по п.9, которая является димером.

11. Димерная ловушка VEGF, содержащая два слитых полипептида, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26, 27 или 28.

12. Фармацевтическая композиция для лечения VEGF-опосредованного заболевания или состояния, содержащая эффективное количество ловушки VEGF по п.9 или 10 и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Способ лечения VEGF-опосредованного заболевания или состояния, включающий введение фармацевтической композиции по п.12 нуждающемуся в этом субъекту.

14. Способ по п.13, в котором VEGF-опосредованным заболеванием или состоянием является заболевание или состояние глаз.

15. Способ по п.14, в котором заболеванием или состоянием глаз является связанная с возрастом дегенерация желтого пятна.

16. Набор для лечения VEGF-опосредованного заболевания или состояния, содержащий:

(a) упаковочный материал; и

(b) фармацевтическое средство, находящееся в упаковочном материале; при этом фармацевтическое средство содержит, по меньшей мере, одну ловушку VEGF по любому из пп.9-11, и где упаковочный материал содержит этикетку или вкладыш в упаковку, в котором написано, что указанный VEGF-специфичный слитый полипептид можно применять для лечения VEGF-опосредованного заболевания или состояния.