



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 178 306** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 K 38/17, 39/395, C 07 K**
14/705, 16/42, C 12 N 15/12

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

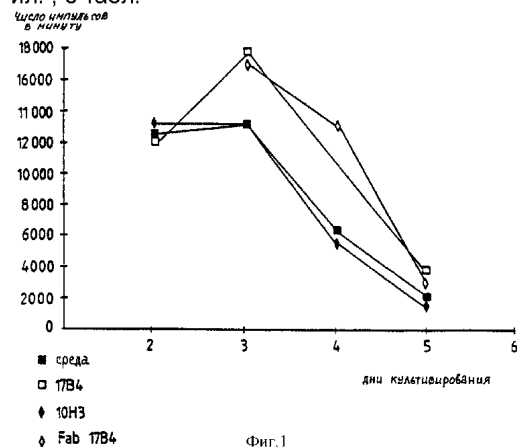
(21), (22) Заявка: 96123299/14, 05.05.1995
(24) Дата начала действия патента: 05.05.1995
(30) Приоритет: 06.05.1994 FR 94 05 643
(43) Дата публикации заявки: 20.01.1999
(46) Дата публикации: 20.01.2002
(56) Ссылки: WO 92/0092 A1, 09.01.1992. WO 91/10682 A1, 25.07.1991. LINSLEY et al., T-cell antigen CD-28 mediated adhesion with B cell by interacting with activation antigen B7/BB-1, Proc . of Natl. Acad. Sci USA, 1990, v.87, № 8, p.5031-5035
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 06.12.1996
(86) Заявка РСТ: FR 95/00593 (05.05.1995)
(87) Публикация РСТ: WO 95/30750 (16.11.1995)

(71) Заявитель:
ЭНСТИТИЮ ГЮСТАВ РУССИ (FR),
ЭНСТИТИЮ НАСЬОНАЛЬ ДЕ ЛЯ САНТЕ ДЕ ЛЯ
РЕШЕРШ МЕДИКАЛЬ (ЭНСЭРМ) (FR),
АППЛАЙД РЕЗЕЧ СИСТЕМЗ АРС ХОЛДИНГ
Н.В. (NL)
(72) Изобретатель: ФОР Флоранс (FR),
ЭРСЕН Тьерри (FR), ЮАР Бертран
(FR) , ТРИЕБЕЛЬ Фредерик (FR)
(73) Патентообладатель:
ЭНСТИТИЮ ГЮСТАВ РУССИ (FR),
ЭНСТИТИЮ НАСЬОНАЛЬ ДЕ ЛЯ САНТЕ ДЕ ЛЯ
РЕШЕРШ МЕДИКАЛЬ (ЭНСЭРМ) (FR),
АППЛАЙД РЕЗЕЧ СИСТЕМЗ АРС ХОЛДИНГ
Н.В. (NL)
(74) Патентный поверенный:
Лебедева Наталья Георгиевна

(54) РАСТВОРИМЫЕ ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ФРАКЦИИ ПРОТЕИНА LAG-3, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ, ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, АНТИТЕЛО

(57) Изобретение относится к медицине и биотехнологии и включает растворимые полипептидные фракции протеина LAG-3, способ получения, терапевтическую композицию и антитело. Сущность изобретения включает растворимые полипептидные фракции мембранного протеина LAG-3, пригодные для использования в качестве иммуносупрессоров, способ их получения, а также антитела, способные предотвращать специфическую фиксацию протеина LAG-3 на молекулах СМН (главного комплекса гистосовместимости) класса II, для применения в качестве иммуностимуляторов. Преимущество изобретения заключается в том, что заявляемые пептиды обладают способностью связываться с молекулами СМН второго класса и обладать иммуноподавляющим действием, а также неожиданным

иммуно-стимулирующим действием анти-СД4-антител. 6 с. и 8 з. п. ф-лы, 15 ил., 5 табл.





RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 178 306** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 38/17, 39/395, C 07 K**
14/705, 16/42, C 12 N 15/12

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96123299/14, 05.05.1995
(24) Effective date for property rights: 05.05.1995
(30) Priority: 06.05.1994 FR 94 05 643
(43) Application published: 20.01.1999
(46) Date of publication: 20.01.2002
(85) Commencement of national phase: 06.12.1996
(86) PCT application:
FR 95/00593 (05.05.1995)
(87) PCT publication:
WO 95/30750 (16.11.1995)

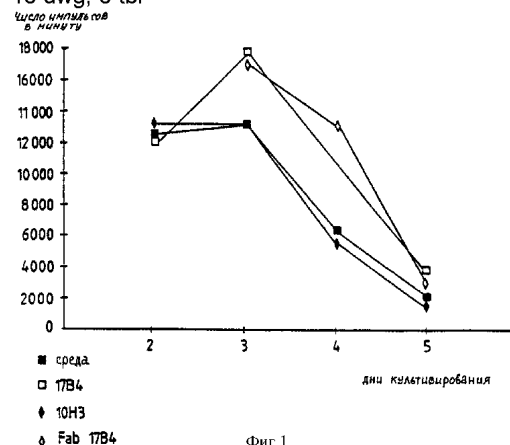
(71) Applicant:
EhNSTITJu GJuSTAV RUSSI (FR),
EhNSTITJu NAS'ONAL' DE LJJa SANTE DE LJJa
REShERSH MEDIKAL' (EhNSEhRM) (FR),
APPLAJD REZECh SISTEMZ ARS KhOLDING
N.V. (NL)
(72) Inventor: FOR Florans (FR),
EhRSEN T'erri (FR), JuAR Bertran
(FR), TRIEBEL' Frederik (FR)
(73) Proprietor:
EhNSTITJu GJuSTAV RUSSI (FR),
EhNSTITJu NAS'ONAL' DE LJJa SANTE DE LJJa
REShERSH MEDIKAL' (EhNSEhRM) (FR),
APPLAJD REZECh SISTEMZ ARS KhOLDING
N.V. (NL)
(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) SOLUBLE POLYPEPTIDE FRACTION OF PROTEIN LAG-3, METHOD OF PREPARING, THERAPEUTICAL COMPOSITION, ANTIBODY

(57) Abstract:

FIELD: medicine, biotechnology, immunology, proteins. SUBSTANCE: invention relates to soluble polypeptide fractions of protein LAG-3, method of their preparing, therapeutical composition and antibodies. Invention involves soluble polypeptide fractions of membrane protein LAG-3 that can be used as immunosuppressants, method of their preparing and antibodies that are able to prevent specific fixation of protein LAG-3 on CMH molecules (the main complex of histocompatibility) of class II and can be used as immunostimulators. The claimed peptides show ability to bind with CMH molecules of class II and immunosuppressing effect in combination with unexpected immunostimulating effect of anti-CD4-antibodies. EFFECT: improved method of preparing, valuable immunological

properties of polypeptide fraction. 14 cl, 15 dwg, 5 tbl



Изобретение относится к растворимым формам, происходящим от мембранного протеина LAG-3 и пригодным в качестве иммунодепрессоров, так же, как к антителам, способным предотвращать специфическую фиксацию протеина LAG-3 на молекулах CMH (главный комплекс гистосовместимости) класса II, в качестве иммуностимуляторов.

В ВОИС - А 91/10682 описывается протеин, обозначаемый LAG-3.

Протеин LAG-3 представляет собой протеин, селективно экспрессируемый активированными NK-клетками и активированными Т-лимфоцитами. Сходство последовательности аминокислот, сравнительная экзон-интронная структура и хромосомная локализация показывают, что LAG-3 является родственником CD 4. Первоначальная характеристика гена LAG-3 описывается TRIEBEL и др. (I).

Соответствующая ДНК кодирует трансмембранный протеин из 498 аминокислот типа I, включающий 4 внеклеточных последовательности иммуноглобулинового типа. LAG-3 является членом надсемейства иммуноглобулинов.

Зрелый протеин включает 476 аминокислот (последовательность N 1) с теоретической молекулярной массой 52 кД. Внеклеточная область содержит 8 цистеиновых остатков и 4 потенциальных сайта N-гликозилирования. С помощью Вестерн-блоттинг-анализа показано, что LAG-3 внутри ФГА-бластов или активированных NK-клеток имеет кажущуюся массу $M_r = 70000$. После обработки с помощью N-гликозидазы - достигают уменьшения размера до 60 кД, демонстрирующего также, что нативный LAG-3 гликолизирован. Подробности описаны в ВОИС-А 91/10682.

BAIXERAS и др. в J. Exp. Med, 176, 327-337 (2), кроме того, описывают, что образование розеток между трансфицированными с помощью LAG-3 клетками (экспрессирующими LAG-3 на своей поверхности) и В-лимфоцитами, экспрессирующими CMH класса II, специфически зависит от взаимодействия LAG-3 с CMH класса II.

Неожиданно оказалось, что этот лиганд CMH класса II обнаруживается в более высоких количествах на активированных лимфоцитах CD8 (ограниченных CMH класса I), чем на активированных лимфоцитах CD4. Ин vivo, некоторые одиночные рассеянные клетки LAG-3 (ограниченные CMH класса II) находят в лимфоидной негиперпластической ткани, включающей первичные лимфодные органы, то есть тимус и костный мозг.

Клетки LAG-3 находят в лимфоидных гиперпластических узлах и миндалинах, так же как в одноядерных клетках периферической крови (PBMC) пациентов, получающих инъекции повышенных доз интерлейкина-2.

Эти наблюдения подтверждают, что LAG-3 представляет собой активационный антиген в противоположность CD4, экспрессируемый в субпопуляции покоящихся лимфоцитов и других клеточных типов, особенно в макрофагах.

CMH включает молекулы класса I и класса II, являющиеся мембранными гликопротеинами, которые представляют собой фрагменты протеиновых антигенов к рецепторам Т-лимфоцитов (TCR). Молекулы класса I ответственны за презентацию

цитотоксическими клетками $CD8^+$ пептидов, происходящих большей частью от синтезированных эндогенным путем протеинов, тогда как молекулы класса II представляют собой вспомогательные лимфоциты $CD4^+$ пептидов, происходящих в первую очередь от чужеродных протеинов, которые вводят эндоцитным, то есть экзогенным, путем. Вспомогательные Т-лимфоциты регулируют и амплифицируют иммунотет, тогда как цитотоксические лимфоциты необходимы для разрушения клеток, каковы бы ни были ткани, экспрессирующие антигены чужеродного ("не своего") типа, например, вирусные антигены. Механизм распознавания вводит в действие внутриклеточные сигналы, приводящие к эффективной активации Т-лимфоцитов.

Оказывается, что для инициации иммунотета на медиацию Т-лимфоцитов ($CD4^+$) чужеродные антигены должны быть "захвачены", интернализированы в форме пептидов специализированными клетками: антигенпредставляющими клетками (АПК). Получаемые в результате антигенные пептиды реэкспрессируют на поверхности антигенпредставляющих клеток, где они ассоциируются с молекулами CMH второго класса. Этот комплекс CMH второго класса / пептид специфически распознается Т-лимфоцитным рецептором, откуда возникает активация вспомогательных Т-лимфоцитов.

Кроме того, создаваемые способами рекомбинации животные модели позволяют подчеркнуть роль, которые играют ин vivo молекулы CMH второго класса и их лиганды.

Так, мыши с недостатком молекул CMH второго класса (3) и практически не имеющие периферических Т-лимфоцитов $CD4^+$ и содержащие только несколько незрелых лимфоцитов $CD4^+$ в тимусе, полностью неспособны отвечать Т-зависимым антигенам.

Мутантные мыши $CD4^{-/-}$ (4) обладают заметно уменьшенной активностью Т-лимфоцитов, но показывают нормальное развитие и функцию Т-лимфоцитов $CD8^+$, что демонстрирует, что экспрессия CD4 в дочерних клетках и тимоцитах $CD4^+CD8^+$ не является обязательной для развития. По сравнению с нормальными мышами, мыши с недостатком CD4 имеют большее количество клеток $CD4^+CD8^-$.

Эти клетки с двойным отрицательным зарядом ограничены CMH второго класса и способны распознавать антиген.

Когда их инфицируют с помощью Leishmania, эти мыши показывают популяцию вспомогательных функциональных Т-лимфоцитов несмотря на отсутствие CD4. Эти клетки ограничены CMH второго класса и продуцируют γ -интерферон, когда они активированы антигеном. Это указывает на то, что происхождение Т-лимфоцитов и их периферическая функция необязательно должны зависеть от функции CD4.

В настоящее время считают, что кодированные участком CMH второго класса протеины вовлекаются в многочисленные аспекты иммунного распознавания, включая туда взаимодействие между различными лимфоидными клетками, как лимфоциты и антигенпредставляющие клетки. Различные наблюдения также показывают, что другие

механизмы, не через посредство CD4, принимают участие в активационной функции вспомогательных Т-лимфоцитов.

Эти различные наблюдения подчеркивают главную роль, которую играет CMH второго класса и его лиганды в иммунной системе.

Кроме того, известно участие химерных молекул, образованных внецитоплазматическим доменом протеинов, способных фиксироваться на лигандах, и константной областью цепей человеческих иммуноглобулинов (Ig) в получении растворимых форм протеинов и клеточных рецепторов, пригодных особенно в качестве терапевтических агентов.

Так, растворимые формы CD4 проявляют свою эффективность в ингибировании инфекции за счет ВИЧ ин витро зависимым от дозы образом.

Однако, клинические испытания с растворимыми молекулами CD4, особенно CD4 - Ig, не позволили выявить значительное уменьшение вирусных титров. Были "созданы" трансгенные мыши, экспрессирующие вплоть до 20 мкг/мл растворимых CD4 в их сыворотке. Эти мыши не показывают никакого отличия в том, что касается их иммунной функции, по сравнению с контрольными мышами. Вплоть до настоящего времени не установлено никакой прямой связи с CMH второго класса происходящих от CD4 молекул. Это наводит на мысль, что растворимые CD4 не взаимодействуют ин vivo с окрашенными молекулами CMH второго класса.

Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что растворимые молекулы, содержащие различные фрагменты внецитоплазматического домена протеина LAG-3, способны связываться с молекулами CMH второго класса и обладать иммуноподавляющим действием.

Внецитоплазматический участок LAG-3, обозначаемый последовательностью N 1, включает домены D1, D2, D3, D4, охватывающие аминокислоты 1-149, 150-239, 240-330 и 331-412, соответственно.

Предметом изобретения также является полипептидная растворимая (часть) фракция, образованная целиком или частью по крайней мере одного из четырех внеклеточных доменов иммуноглобулинового типа протеина LAG-3 (аминокислоты 1-149, 150-239, 240-330 и 331-412 последовательности N 1) или пептидной последовательностью, происходящей от этих доменов за счет замены, присоединения и/или делеции одной или нескольких аминокислот, и которая обладает специфичностью, по крайней мере равной или выше таковой LAG-3 в его лиганде.

Настоящее изобретение особенно относится к растворимым полипептидным фракциям, обладающим последовательностью, образованной от нативной последовательности LAG-3 вследствие хорошо известного явления полиптии.

Растворимая полипептидная фракция отличается тем, что она включает пептидный участок LAG-3, ответственный за сродство LAG-3 к молекулам CMH второго класса.

Растворимая полипептидная фракция в особенности включает пептидную последовательность, образованную из этих доменов за счет замены, присоединения и/или делеции одной или нескольких аминокислот, и

которая обладает специфичностью, равной или выше таковой LAG-3 в его лиганде, например, совокупность двух первых доменов иммуноглобулинового типа LAG-3 или 4 домена иммуноглобулинового типа внецитоплазматического участка LAG-3.

Предпочтительно, растворимая полипептидная фракция образована целиком или частью по крайней мере одного из четырех внеклеточных доменов иммуноглобулинового типа протеина LAG-3 (аминокислоты 1-149, 150-239, 240-330 и 331-412 последовательности N 1), включающего замещение глутаминовой кислотой (Glu) одного или нескольких аргининовых остатков (Arg) в положениях 73, 75 и 76 последовательности N 1.

Предпочтительно, растворимая полипептидная фракция включает петлю, среднее положение атомов которой, образующих основную цепь, представлено позицией аминокислот 46-47 (последовательность N 1), представленной в таблице 1 или таблице 2, или отличается от нее самое большее на 5%.

Растворимая полипептидная фракция, кроме того, предпочтительно включает второй внеклеточный домен (D2) иммуноглобулинового типа LAG-3 (аминокислоты 150-239).

Предпочтительно, растворимая полипептидная фракция включает, кроме вышеуказанной пептидной последовательности LAG-3, дополнительную пептидную последовательность на С-конце и/или N-конце, так, чтобы образовать слитый белок. Термин "слитый белок" означает часть любого протеина, позволяющую осуществлять модификацию физико-химических характеристик субфрагмента внецитоплазматического домена протеина LAG-3. Такие слитые белки, например, содержат фрагменты внецитоплазматического домена LAG-3, такие, как указанные выше, связанные с областью связывания $-CH_2-CH_3$ тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина, предпочтительно иммуноглобулина изотипа IgG4.

Такие слитые белки могут быть димерными или мономерными. Эти слитые белки могут быть получены с помощью хорошо известных специалисту методов рекомбинации, например, с помощью способа, описанного Trautneger и др. (5).

Вообще, способ получения этих слитых белков, включающих иммуноглобулиновую область, соединенную с вышеописанной пептидной последовательностью LAG-3, состоит в том, что в вектор вставляют фрагменты кДНК, кодирующие полипептидные области, соответствующие LAG-3 или производным LAG-3, возможно после амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), и кДНК, кодирующую подходящую область иммуноглобулина, соединенную с кДНК, кодирующей соответствующие полипептидные или образованные от LAG-3 области, и после трансфекции фрагменты кДНК экспрессируют в системе экспрессии, особенно в клетках млекопитающих, например, в клетках яичника хомяка.

Слитые белки согласно изобретению также могут быть получены путем расщепления конъюгата LAG-3 - Ig, сконструированного

так, что он содержит соответствующий сайт расщепления.

Предметом изобретения также является терапевтическая композиция с иммуноподавляющей активностью, включающая растворимую полипептидную фракцию согласно изобретению. Эта композиция пригодна для лечения патологий, при которых необходима иммуносупрессия, например, аутоиммунных заболеваний.

Предметом изобретения также является использование антител, направленных против LAG-3, или растворимых полипептидных фракций, образованных от LAG-3, таких, как указанные выше, или фрагментов таких антител, особенно фрагментов Fab, Fab', F(ab')₂, для приготовления терапевтической композиции с иммуностимулирующей активностью. Термин "иммуностимулирующий" обозначает молекулярную совокупность, способную стимулировать созревание, дифференцирование, пролиферацию и/или функцию клеток, экспрессирующих LAG-3, то есть активированных Т-лимфоцитов или NK-клеток (естественных киллерных клеток). Антитела против LAG-3 (анти-LAG-3-антитела) могут быть использованы в качестве потенциализаторов (усилителей) вакцин или иммуностимуляторов в случае пациентов с подавленной (угнетенной) иммунной системой, таких, как больные, инфицированные ВИЧ или обработанные иммуноподавляющими средствами, или они могут быть использованы для стимуляции иммунной системы за счет удаления из нее клеток, обладающих аномальным состоянием, например, раковых клеток.

Иммуностимулирующая активность анти-LAG-3 -антител является неожиданной там, где анти-CD4-антитела оказывают иммуноподавляющее воздействие.

Такие антитела могут быть поликлональными или моноклональными; однако, предпочтительны моноклональные антитела. Поликлональные антитела могут быть получены хорошо известными методами, например, таким, как описанный BENEDICT A. A. и др. (6). Предпочтительны моноклональные антитела вследствие того, что они специфичны для одного эпитопа и дают результаты с лучшей воспроизводимостью. Методы получения моноклональных антител хорошо известны из уровня техники, в особенности метод, описанный KOHLER и MILSTEIN. Этот метод, так же, как его варианты, описаны YELTON и др. (7).

Предметом изобретения также являются антиидиотипические антитела, направленные против антител согласно изобретению, которые включают "внутренний образ" LAG-3 и, следовательно, способны связываться с CMH второго класса. Такие антитела могут быть использованы особенно в качестве иммуноподавляющих средств и, например, при аутоиммунных патологиях.

Терапевтические композиции согласно настоящему изобретению включают растворимые протеины LAG-3 или антитела, такие, как указанные выше, так же как фармацевтически приемлемый эксципиент. Эти композиции могут быть сформулированы обычными способами. Эксципиент может изменяться в зависимости от выбранного пути введения: орально, парентерально,

подъязычно, ректально или через нос.

В случае предназначенных для парентерального введения композиций эксципиент обычно включает стерильную воду, так же, как другие возможные ингредиенты, повышающие растворимость или пригодность для хранения композиции. Парентеральные пути введения могут заключаться во внутривенных, внутримышечных или подкожных инъекциях.

Терапевтическая композиция может быть пролонгированного действия, особенно для обработок в течение длительного периода времени, например, в случае аутоиммунных заболеваний. Вводимая доза зависит от излечиваемого субъекта, особенно от способности его иммунной системы достигать желательной степени защиты. Точные количества вводимого активного ингредиента могут быть легко определены практикующим врачом, который назначает лечение.

Терапевтические композиции согласно изобретению могут включать, кроме растворимого LAG-3 или антител согласно изобретению, другой активный ингредиент, возможно связанный химической связью с LAG-3 или с антителом согласно изобретению. В качестве примера можно назвать растворимые протеины LAG-3 согласно изобретению, связанные с токсином: например, как рицин или дифтерийный анатоксин, способные фиксироваться на молекулах CMH второго класса и убивать клетки, против которых они направлены, например, лейкоэмические клетки или клетки меланомы; или связанные с радиоактивным изотопом.

Следующие примеры, так же, как прилагаемые стандартизованные чертежи, иллюстрируют подробно изобретение.

Пример 1: Пролиферация линий активированных Т-лимфоцитов в присутствии моноклональных антител против LAG-3

Моноклональными

анти-LAG-3-антителами, которые используют, являются 17. B4, описанное BAIXERAS и др. (2) и депонированное в Национальной коллекции культур и микроорганизмов под номером 1-1240 10 июля 1992 г. , и 11 E3, описанное HUARD и др. (8).

Эти антитела принадлежат к изотипу IgG1. Эти антитела испытывают в отношении их биологического воздействия на активированные Т-лимфоциты, стимулированные специфическими антигенными пептидами или перестроенными антигенами, представляемыми молекулами CMH второго класса, экспрессируемыми автотогичными антигенпредставляющими клетками, экспрессирующими LAG-3.

Моноклональное антитело против CD48, обозначаемое 10 H3, используют в качестве неподходящего антитела IgG1 (отрицательный контроль).

Насыщающие концентрации анти-LAG-3- и анти-CD48-антител определяют путем иммунофлуоресценции на ФГА-блестах (фитогемагглютинин) и линиях клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барра (ЭБВ). В опытах по пролиферации, моноклональные антитела добавляют в количестве, в 5 раз превышающем насыщенную концентрацию.

Используемые линии Т-лимфоцитов представляют собой, с одной стороны, клон

154, происходящий от лимфоцитов периферической крови, выращенной против пептида, имитирующего фрагмент гемагглютинина (HA) гриппа, который обладает аминокислотной последовательностью, охватывающей аминокислоты 306 - 329 (пептид p20); с другой стороны, клон 28, Т-лимфоцитный клон, происходящий от периферических лимфоцитов одного человеческого донора, выращенный против дифтерийного анатоксина (ДТ). Антигенпредставляющие клетки (АПК), соответствующие клону 154, являются В-лимфоцитами, трансформированными вирусом Эпштейна-Барра того же самого донора (DR 3/DR 11), что и Т 154. Антигенпредставляющие клетки, соответствующие клону 28, являются В-лимфоцитами, трансформированными вирусом Эпштейна-Барра одного и того же донора. Этот клон ограничен главным комплексом гистосовместимости человека - донора 7.

В случае клона 154, АПК ($5 \cdot 10^6$) инкубируют при 37°C в течение 1,5 часов с изменяемыми дозами пептида p20, затем промывают и облучают (10000 рад.). Клетки наносят монослоем на микротитрационный планшет с 96 углублениями одновременно с клетками клона 154 ($0,5 \cdot 10^5$ - $10 \cdot 10^5$ клеток на мл) в соотношении 3: 1. Для клона 28 соотношение отвечающие клетки/стимулирующие клетки составляет 1.

Антигенпредставляющие клетки главного комплекса гистосовместимости человека DR 7/ЭБВ обрабатывают митомицином или облучают, затем добавляют к Т-лимфоцитам в присутствии ДТ (который остается в культуре). Конечная концентрация клеток клона 28 составляет 100000 клеток на мл.

^3H -Тимидин (1 микрокюри/углубление) добавляют в интервалы времени, изменяющиеся от дня 2 до дня 10 культивирования.

Каждый эксперимент повторяют трижды.

Результаты выражают в виде среднеарифметического числа импульсов в минуту и после вычитания числа импульсов в минуту, обнаруженных в отрицательном контроле (Т-лимфоциты, сокультивированные с незаряженными, в виде иммуногенов, АПК). Опыты по пролиферации осуществляют на планшетах с 96 углублениями. Абсорбцию меченого тритием тимидина в индивидуальных углублениях по 200 мкл измеряют после добавления 1 микрокюри тимидина в последние 18 часов культивирования. Результаты выражают в виде среднего из трех опытов. Типичное отклонение обычно составляет величину менее 12% (немного больше в случае измерений очень незначительного числа импульсов в минуту). С другой стороны, недостаточные жидкости смешанной культуры (клон 154/АПК) собирают, отфильтровывают при использовании мембран с порами размером 0,22 мкм, разделяют на образцы и замораживают при -20°C вплоть до момента титрации с помощью имеющихся в продаже наборов для иммуно-испытаний: набор для титрации IL-2 и INF- α фирмы Иммунотех; набор IFN- γ фирмы Гензим и набор IL-4 фирмы Саунап Chemicals.

Изучение в отношении определения дозы

осуществляют для установления профилей (контуров) пролиферации клона 154 в присутствии специфического антигена p20 в изменяемых концентрациях и в присутствии или нет моноклональных анти-LAG-3-антител или моноклональных чужеродных (неподходящих) антител (отрицательный контроль).

Индивидуальные результаты 16 различных опытов показывают, что, какова бы ни была концентрация добавленного антигена, начальная точка вплоть до пика пролиферации не изменяется, однако систематически наблюдают значительное продление пролиферации Т-лимфоцитов, инкубируемых с моноклональными анти-LAC2-3-антителами. Фрагменты Fab моноклонального антитела 17B4 получают и используют в опыте по пролиферации клона 154. Профиль пролиферации Т-лимфоцитов, активированных антигеном с фрагментами Fab 17B4 (15 мкг/мл), подобен таковому клеток, инкубированных в присутствии целого моноклонального антитела 17B4 (40 мкг/мл) (фиг. 1). Эти результаты показывают, что наблюдаемые биологические эффекты нельзя приписать неспецифической реакции, индуцируемой областью Fc моноклональных анти-LAG-3-антител.

Подобные результаты получают при использовании моноклональных анти-LAG3-антител IIE3.

Клон 28 также стимулируют антигеном (столбнячный анатоксин, 10 мкг/мл) в присутствии моноклональных антител 17B4 после сокультивирования с соответствующими антигенпредставляющими клетками (АПК) в присутствии ДТ. Результаты представлены на фиг. 2.

Эффекты моноклональных анти-LAG-3-антител, наблюдаемые в случае клона 28, а именно пролонгация пролиферации, подобны таковым, наблюдаемым в случае клона 154.

Были проведены опыты, предназначенные для определения разнообразных клеточных событий (les evenements), происходящих после антигенной стимуляции клеток клона 154, инкубированных в присутствии моноклональных анти-LAG-3-антител.

Клетки собирают во время классической антигенной стимуляции клона 154 в присутствии моноклональных анти-LAG-3- или анти-CD48-антител или в присутствии антител и испытывают для экспрессии трансмембранных рецепторов LAG-3 и CB25 и образцы культуральных надосадочных жидкостей отбирают в различные интервалы времени после стимуляции и испытывают на наличие γ -интерферона, α -фактора некроза опухоли, интерлейкина-4 и интерлейкина-2.

Опыты в случае прямой иммунофлуоресценции с 2 красителями (моноклональные анти-CD3-антитела и моноклональные анти-CD25-антитела) показывают, что рецепторы для интерлейкина-2 слабо, но значительно увеличиваются спустя 5 дней после антигенной стимуляции. Подобные опыты с моноклональными анти-CD3- и IIE3 (анти-LAG-3)-антителами показывают, что LAG-3, начиная со дня активации, сверхэкспрессируется. Кроме того, секреция интерлейкина-2, интерлейкина-4, γ -интерферона и α -фактора

некроза опухоли также модулируется за счет инкубации с моноклональными анти-LAG-3-антителами, что свидетельствует о том, что различные события в клетках изменяются вследствие присутствия моноклональных анти-LAG-3-антител и что некоторые события происходят уже спустя 24 часа после стимуляции.

Эти результаты косвенно показывают, что LAG-3 играет роль регулятора в случае клеток CD4⁺. Тот факт, что моноклональные анти-LAG-3-антитела увеличивают пролиферацию, следовательно действуют как иммуностимуляторы, свидетельствует о том, что LAG-3 принимает участие в "деактивации" Т-лимфоцитов CD4⁺ при отрицательной роли LAG-3 в отношении зависимой от антигена стимуляции.

Пример 2: Транзиторная экспрессия слитых белков LAG-3

Растворимые протеины (белки), происходящие от LAG-3, получают по методу рекомбинантной ДНК с помощью соответствующих векторов, включающих ДНК, кодирующую LAG-3, и ДНК, кодирующую фрагмент иммуноглобулина. Система транзиторной экспрессии состоит из трансфицированных клеток Cos. Эта система позволяет продуцировать несколько миллиграммов рекомбинантных слитых белков. Методы рекомбинантной ДНК осуществляют как описано MANIATIS и др. (22). Изменения делают в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Конструкция LAG-3 D1-D4 Ig и LAG-3 D1 D2 Ig

Фрагменты, кодирующие области D1 D2 или D1-D4, амплифицируют (30 циклов) из фрагментов кДНК (последовательность фолликулярной дендритной клетки, FDC), включающего кДНК LAG-3 (TRIEBEL и др. , /1/), с помощью Tag-полимеразы, лишенной активности 5'-эндонуклеазы и относительно устойчивой к выдерживанию при очень высокой температуре; после амплификации следует денатурация при 98 °C (с помощью "термальной кольцевой ДНК, Перкин Элмер Цетус").

Используют специфические праймеры, перечисленные в нижеприводимой таблице.

Полученные в результате амплифицированные фрагменты (739 пар оснований и 1312 пар оснований для LAG-3 D1D2 и LAG-3 D1-D4, соответственно) вставляют в плазмиду pBS (Стратеген).

Вставки получают после переваривания с помощью XhoI и BglII и вводят в сайты XhoI/BamHI вектора pCDM7 - CD8 - IgG1 (причем pCDM7 происходит от pCDM8, выпускаемого в продажу фирмой Стратеген), как проиллюстрировано на фиг. 3, чтобы обменять последовательности ДНК, кодирующие CD8, на клетки, кодирующие субфрагменты LAG-3. Полученные в результате экспрессирующие векторы содержат последовательности, кодирующие D1D2 или D1-D4, соединенные с последовательностями ДНК, кодирующими участок соединения -CH₂-CH₃ цепи человеческого IgH1.

CDM7 представляет собой эукариотный экспрессирующий вектор, происходящий от векторов, описанных SEED и др. (10) для клонирования ДНК и ее экспрессии в E. coli и эукариотных клетках. CDM7 имеет следующие

характеристики: (I) промотор человеческого цитомегаловируса для транзиторной экспрессии в клетках млекопитающих; (II) вирусный источник SV40 для аутосомной репликации клеток млекопитающих, экспрессирующих Т-антиген; (III) π VX (тип Col EI) в качестве плазмидного источника для увеличенного числа копий; (IV) селекция SupF по резистентности к ампициллину и тетрациклину в штаммах E. coli Tet^{amb} и Amp^{amb}; (V) источник репликации M13 для высвобождения однострочной РНК (un simple brin); (VI) промотор РНК T7; (VII) полилинкер для эффективного клонирования гетерологичной ДНК.

Транзиторная экспрессия в клетках Cos

Клетки Cos (5•10⁶) трансфицируют с помощью 30 мкг ДНК соответствующих экспрессирующих векторов (кодирующей либо LAG-3 D1D2 Ig, либо LAG-3 D1-D4 Ig, либо CD8 Ig) путем электропорации (200 вольт, 1500 мкфарад, 30-40 мсек) с помощью аппарата Cellject (Eurogentech, Льеж, Бельгия). Клетки снова наносят тонким слоем (монослоем) и культивируют при использовании среды, содержащей 5% плодной телячьей сыворотки. Надосадочные жидкости отбирают спустя 6 дней после трансфекции.

За синтезом получающихся слитых белков следят путем анализа надосадочных жидкостей, так же, как экстрактов трансфицированных клеток по методу Вестерн-блоттинга с моноклональными антителами 17B4. Иммунореактивные материалы обнаруживают в надосадочной жидкости клеток, трансфицированных с помощью ДНК, кодирующей LAG-3 D1D2 Ig или LAG-3 D1-D4 Ig.

Параллельно, рекомбинантный иммуноадагезин CD8 (CD8 Ig) получают в качестве отрицательного контроля с помощью той же самой системы экспрессии и экспрессирующего вектора pCDM7-CD8 (фиг. 3).

Рекомбинантные протеины LAG-3 D1D2 Ig, LAG-3 D1-D4 Ig и CD8 Ig очищают по классическому методу на протеин А-сепарозе. Получающийся материал анализируют путем электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия с последующим Coomassie - окрашиванием или анализом по методу Вестерн-блоттинга с помощью человеческого анти-Ig-антитела.

Пример 3: Получение растворимых субфрагментов LAG-3

Для того чтобы получить большие количества рекомбинантных протеинов, была разработана стабильная система экспрессии, состоящая из трансфицированных клеток млекопитающих. Клетками-хозяевами являются клетки яичника хомяка (CHO), зависимые от анкеринки, выделяемые из CHO-клеток с недостатком дигидрофолатредуктазы (dhfr) и, следовательно, требующими для своего роста глицина, пурина и тимидина. Главная роль dhfr в синтезе нуклеиновых предшественников в сочетании с чувствительностью клеток dhfr с недостатком в отношении аналогов тетрагидрофолата, таких, как метотрексат (MTX), имеет два значительных преимущества. Трансфекция этих клеток экспрессирующими векторами, содержащими ген dhfr, позволяет выделять dhfr -

резистентные рекомбинантные клоны, и культура этих клеток на селективных средах, содержащих возрастающие количества MTX, происходит из амплификации гена dhfr и ДНК, которая ассоциирована с ним.

Конструкция LAG-3 Д1, LAG-3 Д1Д2, LAG-3 Д1-Д4

Фрагменты ДНК, кодирующей области Д1, Д2Д2 или Д1-Д4, амплифицируют с помощью способа полимеразной цепной реакции, идентичного таковому, описанному выше, с помощью праймеров, представленных в таблице 4.

Результирующие амплифицированные фрагменты переваривают с помощью Sall и вставляют в сайт Sall pUC18 (Стратеген).

Амплифицированные последовательности идентифицируют и вставки субклонируют в экспрессирующем векторе pCLH3 AXSV2 DHFR h α IVS, как описано COLE и др. (Biotechnology, II, 1014-1024, 1993) (фиг. 4).

Этот вектор представляет собой многофункциональный эукариотный экспрессирующий вектор для экспрессии кДНК и ее амплификации в эукариотных клетках. Он имеет следующие характеристики: (I) мышиный промотор гена металлотионеина-1 и последовательность полиаденилирования SV40 (включающая сайт донорно-акцепторного связывания) для осуществления транскрипции целевого гена; (II) человеческий интрон А, включающий сайт донорно-акцепторного связывания гена субъединицы α -гликопротеина, для достижения высоких степеней транскрипции кДНК; (III) последовательность pML, содержащая источник репликации pBR322 и ген устойчивости к ампицилину, для бактериальной амплификации; (IV) единица транскрипции dhfr SV 40 для осуществления транскрипции последовательностей, используемых для селекции и амплификации трансфектантов.

Стабильная экспрессия в СНО-клетках

Экспрессирующие векторы, кодирующие LAG-3 Д1, LAG-3 Д1Д2 и LAG-3 Д1-Д4, используют для трансфекции клеток СНО DUKX и эти клетки культивируют на селективной среде. Клетки, способные размножиться в этих условиях, собирают и культивируют на среде, содержащей возрастающие количества MTX. Степень экспрессии определяют с помощью анализа по методу Вестерн-блоттинга при использовании моноклонального антитела 17В4. Клоны, продуцирующие большие количества растворимых рекомбинантных молекул, происходящих от LAG-3, размножают в биореакторах и происходящий от LAG-3 материал очищают путем ионообменной и иммуноаффинной хроматографии.

Анализ по методу Вестерн-блоттинга выявляют в надосадочных жидкостях клеток, трансфицированных с помощью экспрессирующих векторов, кодирующих LAG-3 Д1, LAG-3 Д1Д2, LAG-3 Д1-Д4, полосы с кажущимися молекулярными массами Mr 15-18 кД, 34-36 кД (дубликаты) и 55 кД (2 возможные полосы). Соответствующие Mr этих иммунореактивных материалов соответствуют ожидаемым Mr для гликолизированных LAG-3 Д1 Ig (139 аминокислот и предполагаемый сайт гликолизирования), LAG-3 Д1Д2 Ig (239 аминокислот, включающих 3 сайта

гликолизирования) и LAG-3 Д1-Д4 Ig (412 аминокислот, включающих 4 сайта гликолизирования).

Пример 4: Специфическое связывание LAG-3 Ig с клетками, экспрессирующими CMH второго класса

Реакционноспособность моноклональных антител и LAG-3 Д1-Д4 Ig изучают путем косвенной (непрямой) иммуофлуоресценции. Целевые клетки (4х10) культивируют в течение 30 минут при 4°C в присутствии LAG-3 Д1-Д4 Ig, CD8 Ig, мышиного моноклонального антитела, (949) человеческого анти-CMH второго класса (DR, DP, DO), конъюгированного с изотиоцианатфторидом (FITC), клон Coulter или мышиного Ig - изотиоцианатфторида: чужеродный иммуноглобулин G, конъюгированный с изотиоцианатфторидом. Клетки промывают и инкубируют при 4°C в течение 30 минут либо с поликлональным козьим F(ab') против человеческого иммуноглобулина, конъюгированного с флуоресцеином, либо с поликлональным козьим антителом против мышиного иммуноглобулина, конъюгированного с флуоресцеином (клон Coulter).

Для подтверждения связи LAG-3/CMH второго класса, LAG-3 Д1-Д4 инкубируют с положительными или отрицательными клетками CMH второго класса. Четыре линии В-лимфоцитов, экспрессирующих CMH второго класса (L31, Phil ЭВВ, Raji, Sanchez и Personnaz), обрабатывают моноклональным антителом 949 против класса II, или надосадочными жидкостями клеток Cos, трансфицированных ДНК, кодирующей либо LAG-3 Д1-Д4 Ig, либо CD8 Ig. Пять линий клеток, экспрессирующих различные гаплотипы молекул CMH второго класса, распознаются LAG-3 Ig таким же образом, как и моноклональными антителами против класса II (положительный контроль), тогда содержащая CD8 Ig надосадочная жидкость (отрицательный контроль) не связана с этими линиями клеток, как можно было ожидать. Четыре линии отрицательных клеток CMH второго класса (CEM, RJ, HSB2, K562) обрабатывают теми же реагентами, что и указанные выше. Отсутствие реакции с анти-CMH второго класса (отрицательный контроль), а также отсутствие реакции с LAG-3 Д1-Д4 Ig показывает, что связь LAG-3 Д1-Д4 с молекулами CMH второго класса является специфичной.

Дополнительные эксперименты реализуют с помощью (I) мышиных фибробластов, трансфицированных или нетрансфицированных с помощью генов, кодирующих человеческий DR7 или человеческий DP4, (II) мышиных клеток, экспрессирующих или неэкспрессирующих молекулы CMH второго класса, (III) активированных человеческих клеток CD4⁺ или CD8⁺, и (IV) линий Т-лимфоцитов, экспрессирующих различные гаплотипы молекул CMH второго класса (фиг. 8).

В противоположность CD8 Ig, LAG-3 Д1-Д4 Ig связывается с любыми из клеток, экспрессирующих CMH второго класса, также эффективно, как моноклональное антитело 949 против CMH второго класса. LAG-3 Д1-Д4 Ig связывается с любыми из исследованных гаплотипов DR и DP, с молекулами человеческого CMH второго класса,

экспрессируемыми трансфицированными мышинными клетками, с молекулами мышиногo CMH второго класса, так же, как с молекулами CMH второго класса, экспрессируемыми Т-лимфоцитами CD4⁺ или CD8⁺.

Эти результаты впервые служат доказательством того, что растворимые молекулы, происходящие от лиганда CMH второго класса, способны фиксироваться на клетках, экспрессирующих CMH второго класса.

Подобные эксперименты показывают, что LAG-3 Д1Д2 связывается с клетками, экспрессирующими CMH второго класса, также специфически и с такой же эффективностью, что и LAG-3 Д1-Д4.

Активность связи LAG-3 Ig и распределение в клетках лиганда LAG-3 Ig Способность этого иммуноадгезина связываться с клеточными лигандами определяют с помощью козьей сыворотки, направленной против человеческих иммуноглобулинов, маркированной флуоресцеином.

В этих экспериментах целевые клетки сначала инкубируют с человеческим моноклональным антителом или иммуноадгезином в течение 30 минут при 4°C в RPMI 1640, содержащей 10% плодной телячьей сыворотки (FCS). Клетки затем инкубируют с козьей сывороткой против мышинных иммуноглобулинов, маркированной FITC (Coulter), для моноклональных мышинных антител или с козьей сывороткой против человеческих иммуноглобулинов, маркированной FITC (Tago), для иммуноадгезинов. Флуоресценцию измеряют после двух промывок, анализируя 3000 клеток на цитометре Elite (Coultronics, Hialeah, Финляндия). На фиг. 9 представлены степени фиксации LAG-3 Ig, CD8 Ig, антитела 949 или антитела ОК3Т (анти-CD3, ATCC), в виде числа подсчитанных клеток в зависимости от логарифма интенсивности измеренной флуоресценции.

LAG-3 Ig фиксируется на мышинных трансфицированных фибробластах для гена молекулы HLA DR₄, но не фиксируется на нетрансфицированных клетках. CD8 Ig неспособен связываться с фибробластами HLA DR₄⁺ в тех же условиях. Распределение по клеткам лигандов LAG-3 Ig оценивают на образе клеточных популяций путем иммунофлуоресценции.

LAG-3 Ig обнаруживают во всех положительных испытываемых клетках второго класса, включая туда линии В-клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барра (производные генетически неродственных доноров, включающих 10 гомозиготных линий типа DR₁-DR₁₀), так же как в активированных Т-клетках и NK-клетках (естественных киллерных клетках).

На фиг. 9 в качестве примера представлено соединение LAG-3 Ig положительных субклеток DAUDI с антигенами второго класса.

Средняя интенсивность флуоресценции с LAG-3 Ig подобна таковой, наблюдаемой в случае специфического антитела 949 антигенов второго класса. Фиксация LAG-3 Ig на DR₄ (фиг. 9), DR₂, DR₇ или DPw4 (не представлено), экспрессированных на поверхности мышинных фибробластов,

напротив, более слабая, чем таковая, наблюдаемая для антител 949.

Не обнаружено никакого связывания с отрицательными линиями клеток для антигенов второго класса Т-происхождения (Т-клетки периферической крови, линии CEM, HSB2, REX), В-происхождения (линии Rf 2.2.5), или нелимфоидного происхождения (человеческие линии K562 критро-миклоидного происхождения и линии, происходящие от клеток меланомы - /не представлены/).

Кроме того, LAG-3 Ig фиксируется на ксеногенных молекулах второго класса CMH, таких, как антигены, экспрессированные мышиной лимфомой А 20, и обезьяньих классов II, экспрессированные бластами, стимулированными фитогемагглютинином (данные не представлены).

Специфичность фиксации LAG-3 Ig также подтверждают путем использования моноклонального антитела 17В4, способность которого блокировать взаимодействия LAG-3 с CMH второго класса в тестах по клеточной адгезии была показана ранее (фиг. 10).

В этих экспериментах молекулы LAG-3 Ig предварительно инкубируют в течение 30 минут при 4°C либо в одной среде, либо с 17В4 (1 мг/мл), либо с ОКТ3 (1 мг/мл), до введения в соприкосновение с клетками DAUDI.

На фиг. 10 показано, что предварительная инкубация LAG-3 Ig с 17В4 ингибирует фиксацию на клетках класса II⁺, тогда как никакого ингибирования не наблюдают с контролем ОКТ3.

Пример 5: Ингибированные взаимодействия LAG-3 с CMH класса II с помощью растворимых фрагментов LAG-3

Ингибирование взаимодействия LAG-3 с CMH класса II с помощью растворимых фрагментов LAG-3 может наблюдаться непосредственно при фиксации LAG-3 Ig на CMH второго класса в экспериментах по конкуренции с растворимыми фрагментами.

Для подтверждения того, могут ли растворимые фрагменты LAG-3 Д1Д2, продуцируемые клетками яичника хомяка, заменять связь иммуноадгезинов, происходящих от LAG-3, осуществляют следующие опыты:

Клетки DAUDI инкубируют с растворимыми фрагментами LAG-3 Д1Д2, чтобы могла осуществиться фиксация этих молекул на антигенах второго класса CMH, экспрессированных на поверхности клеток DAUDI.

Во второй стадии, клетки инкубируют в присутствии LAG-3 - Д1Д4 Ig в димерной форме или LAG-3 Д1Д2Ig в мономерной форме.

Фиксацию этих иммуноадгезинов, происходящих от LAG-3, определяют с помощью козьего F(ab')₂ против человеческого иммуноглобулина, конъюгированного с флуоресцеином (GAH FITC).

Контрольные группы представлены клетками DAUDI, инкубированными с димерной формой LAG-3 Д1Д2 Ig или мономерной формой LAG-3 Д1Д2 Ig без предварительной инкубации с растворимыми фрагментами LAG-3 Д1Д2.

Результаты представлены в таблице 5, где указывается, что растворимые фрагменты

LAG-3 D1D2 способны замещать иммуноадгезины, происходящие от LAG-3 в мономерной или димерной форме.

Эти данные подтверждают, что растворимые фрагменты LAG-3 D1D2 фиксируются на молекулах второго класса CMH.

Ингибирование взаимодействия LAG-3/CMH второго класса и CD4/CMH второго класса

Образование розеток между клетками Cos, трансфицированными LAG-3 дикого типа, и В-лимфоцитами, трансформированными вирусом Эпштейн-Барра, экспрессирующим молекулы CMH второго класса, показано BAIXERAS и др. (2). Это взаимодействие ингибируется одновременно моноклональными антителами и против человеческой гемоглобиновой клетки (МНС).

Описанный в этой публикации метод видоизменяют, заменяя визуальное наблюдение и подсчет связывающихся с В-лимфоцитами клеток Cos подсчетом остаточной радиоактивности после инкубации меченных с помощью ^{51}Cr В-лимфоцитов с клетками Cos, экспрессирующими LAG-3 (опыт в отношении связывания).

Изучают возможные ингибирующие воздействия растворимых молекул, происходящих от LAG-3, на взаимодействие LAG-3/CMH второго класса, а также на взаимодействие CD4/CMH второго класса.

Клетки Cos трансфицируют соответствующим экспрессирующим вектором (кодирующим LAG-3 дикого типа или CD4). Спустя 2 дня клетки Cos обрабатывают трипсином и снова наносят тонким слоем (монослой) по $0,05 \cdot 10^6$ клеток/углубление на планшеты для культивирования ткани с 12 углублениями. Спустя 24 часа меченные с помощью ^{51}Cr клетки DAUDI ($5,5 \cdot 10^6$) инкубируют на этом монослое клеток Cos (конечный объем 1 мл) в течение 1 часа. Дикие В-клетки затем отсасывают и углубления промывают 5-7 раз, добавляя туда медленно по капле 1 мл среды. Края углублений промывают путем аспирации с помощью пипетки Пастера. Оставшиеся клетки лизируют с помощью 1 мл забуференного фосфатом физиологического раствора (ЗФР), с 1% Тритона, в течение 15 минут при 37°C. Лизаты центрифугируют со скоростью 3000 оборотов в минуту в течение 10 минут и получают 100 мкл результирующей надосадочной жидкости.

LAG-3 D1-D4 Ig используют для ингибирования взаимодействия LAG-3/CMH класса II и CD4/CMH класса II в опыте по связыванию в случае ^{51}Cr . Человеческие CD8 Ig и IgG1 испытывают параллельно и используют в качестве отрицательных контролей.

Значительное ингибирование взаимодействия LAG-3/класс II обнаруживают за счет LAG-3 D1-D4 Ig (фиг. 5A). Однако, взаимодействие LAG-3/CMH второго класса может быть частично и неспецифически ингибировано с помощью CD8 Ig и человеческих IgG1. С другой стороны, LAG-3 Ig оказывается потенциальным ингибитором взаимодействия CD4/класс II (фиг. 5B) в экспериментальных условиях, где взаимодействие CD4/CMH класса II не модифицировано с помощью CD8 Ig или

человеческих IgG1. Это подтверждает тот факт, что взаимодействие LAG-3/класс II более слабое, чем взаимодействие CD4/класс II. Эти результаты служат первым доказательством возможной конкуренции растворимых молекул при взаимодействии CMH второго класса с его лигандами.

Пример 6: Иммуно-супрессивная активность LAG-3 D1-D4

Соответствующие опыты проводят с помощью испытаний в отношении пролиферации, описанных выше для биологической активности моноклональных антител против LAG-3.

Спустя 3 дня и 5 дней (день 3 и день 5) после антигенной стимуляции, LAG-3 D1-D4 Ig показывает сильное ингибирование в отношении пролиферации клона 28, тогда как на человеческие CD8 Ig и IgG не оказывает никакого воздействия (фиг. 6). Подобные эксперименты осуществляют при использовании клона 154 (фиг. 7) и обнаруживают частичное ингибирование в присутствии LAG-3 Ig.

Реализуемый с моноклональными антителами против LAG-3 контроль показывает обратные эффекты, как наблюдалось выше.

Значительное ингибирование пролиферации клеток, инкубированных в присутствии LAG-3 D1-D4 Ig, также наблюдается для клона 28.

Эти наблюдения показывают, что LAG-3 D1-D4 Ig является потенциальным иммуно-супрессором пролиферации Т-лимфоцитов, стимулированных антигеном, и указывают на то, что LAG-3 может действовать как "поглотитель" вторичного иммунного ответа, индуцированного вспомогательными Т-лимфоцитами, активированными CD4⁺.

Роль Lag-3 Ig в отрицательной регуляции иммунных ответов Т-клеток

Для того чтобы показать, что растворимая форма LAG-3, имитирующая функции мембранной молекулы, может ингибировать активацию Т-клонов CD4⁺, стимулированных антигеном, проводят следующие опыты при использовании клона T154: Т-клетки предварительно инкубируют с насыщенным количеством LAG-3 Ig (100 нмоль). Клетки затем промывают два раза с помощью холодной RPMI и инкубируют с 10 мкг/мл козьих антител, направленных против человеческих иммуноглобулинов (Tago), при 4°C в течение 30 минут.

После двух новых промывок клетки снова суспендируют в RPMI, содержащий 10% плодной телячьей сыворотки, и инкубируют в течение 2 часов при 37°C перед добавлением "сигнала". Для перекрестного сшивания моноклональных антител используют антимишинные козы антитела в концентрации 10 мкг/мл (Tago).

На фиг. 11 представлен эксперимент, при котором клон T154 предварительно инкубируют с LAG-3 Ig, связанным ("перекрестно-сшитым") со вторым реагентом (поликлональная специфическая сыворотка для константной области человеческих иммуноглобулинов). Степень фиксации LAG-3 Ig на клетках определяют с помощью иммунофлуоресценции (фиг. 11A). На фиг. 11B показано, что ингибирования более 50%

пролиферации клона T154 достигают за счет LAG-3 Ig. В тех же экспериментальных условиях никакого эффекта не наблюдают с контролем CD8 Ig или с LAG-3 Ig без "поперечной сшивки" (на фиг. не представлено).

На фиг. 11С также показано, что никакого эффекта не наблюдают, когда LAG-3 Ig используют для связывания ("поперечное сшивание") молекул второго класса CMH, экспрессированных антигенпредставляющими В-клетками.

Возможные эффекты связанных ("поперечно-сшитых") моноклональных антител против второго класса на уровне пролиферации Т-клеток сравнивают с таковыми LAG-3 Ig. Слабое ингибирование (ниже 50%) наблюдают в случае использования антитела 949 и антитела D1.12 (анти-DR), связанных с антимышиной козьей поликлональной сывороткой (фиг. 12). Ингибирование пролиферации, следовательно, зависит от эпитопа, причем наиболее значительного эффекта достигают со специфическим эпитопом LAG-3 связи с молекулами класса II.

Воздействие LAG-3 Ig на пролиферацию Т-клеток также изучают, используя различные сигнальные последовательности, на другом клоне Т CD4⁺, специфическом клоне TDEL пептида 34-53 основного протеина миелина.

Ингибирование пролиферации наблюдают (n = 2), когда TDEL стимулируют антигеном (не представлено), иммобилизованным ОКТ3 (фиг. 13А), пектинами (РНА /фитогемагглютинин/ + РМА /форболмиристатацетат/) (фиг. 13В) и 5 МЕ/мл интерлейкина-2 (фиг. 13С). Никакого ингибирования не наблюдают со 100 МЕ/мл интерлейкина-2 (фиг. 13D).

В заключение, совокупность этих результатов указывает на то, что LAG-3 и молекулы CMH второго класса, которые представляют собой, каждый из этих факторов, активационные антигены Т-клеток, способны к ассимиляции с молекулами-эффекторами, принимающими участие в фазе инактивации ответов Т-клеток. Кроме того, эти результаты иллюстрируют значение взаимодействий между Т-клетками в контроле иммунного ответа клеток.

Пример 7: Стимуляция клеточной цитотоксичности за счет LAG-3 Ig

Роль LAG-3 Ig в отношении клеточной цитотоксичности изучают при использовании двух типов эффекторных клеток:

- свежевыделенные человеческие лимфоциты периферической крови (PBL);
- клетки линии SIB5 (клон человеческих NK-клеток /естественных киллерных клеток/).

Цитотоксическую активность этих клеток определяют путем подсчета ⁵¹Cr, содержащегося в среде за счет предварительно меченых целевых клеток, в присутствии или в отсутствие в среде LAG-3 Ig.

На фиг. 14 показана степень цитотоксичности SIB5 для линии человеческих В-клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барра и несущих антигены первого и второго классов главного комплекса гистосовместимости (линия LAZ 388), в зависимости от различных реагентов, добавляемых к культурам.

Измерения осуществляются спустя 4 часа

после сокультивирования для соотношений эффекторные клетки/целевые клетки (SIB5/LAZ 388) 3: 1 (белые колонки) или 1: 1 (заштрихованные колонки).

Отрицательные контроли представляют собой: одна среда (MED), иммуноадгезин CD8 Ig и моноклональное антитело 17. В4 (анти-LAG-3).

Положительные контроли образованы тремя различными моноклональными антителами:

- антитело L243, направленное против антигенов класса II DR;
- антитело 9.49, направленное против антигенов класса II DR, DP, DO;
- антитело W632, направленное против антигенов класса I главного комплекса гистосовместимости человека.

Антитела против главного комплекса гистосовместимости человека класса I (W632) или класса II (1.243) увеличивают лизис целевых клеток (но не контроля 17В4). Иммуноадгезин LAG-3 Ig повышает лизис; контроль CD8 Ig не оказывает воздействия.

На фиг. 15 представлены результаты эксперимента, аналогичного предыдущему, при котором измеряют цитотоксичность PBL по отношению к клеткам DAUDI (главный комплекс гистосовместимости человека класса I) для соотношения эффекторы/цели 50: 1 (белые колонки) и 15: 1 (заштрихованные колонки). Добавляемыми в среду реагентами являются те же, что и реагенты, используемые в первом эксперименте, без антитела 9.49 и антитела 17. В4. Антитело 10НЗ представляет собой специфический иммуноглобулин изотипа IgG1 поверхностного антигена CD45. Его используют в качестве отрицательного контроля.

Никакого изменения не наблюдают при использовании антитела, направленного против антигенов класса I главного комплекса гистосовместимости (W632).

Данные этих двух серий измерений указывают на то, что, по сравнению с отрицательными контролями, LAG-3 Ig активирует цитотоксичность NK-клеток. Этот эффект подобен таковому, наблюдаемому с антителами, направленными против молекул второго класса CMH.

Литература

1. TRIEBEL T. et al. , 1990, J. Exp. Med. 171, 1393-1405.
2. BAIXERAS E. et al. , 1992, J. Exp. Med. 176, 327-337.
3. COSGROVE D. et al. , 1991, Cell 66, 1051-1066.
4. RAHEMTULLA A. et al. , 1991, Nature 353, 180-184.
5. TRAUNHECKER A. et al. , 1988, Nature 331, 84-86.
6. BENEDICT A. A. et al. , 1967, Methods in Immunology 1, 197-306 (1967).
7. YELTON D. E. et al. , Ann. Rev. of Biochem. 50, 657-680 (1981).
8. HUARD B. et al. , Immunogenetics 39: 213.
9. MANIATIS T. et al. (1982), Molecular cloning: A laboratory manual - Cold Spring Harbor Laboratory, New-York.
10. SEED B. , 1987, Nature 329, 840-842.
11. COLE S. C. et al. Biotechnology II, 1014-1024, 1993.
12. COLE S. C. et al. Biotechnology II, 1014-1024, 1993.

Формула изобретения:

1. Растворимая полипептидная фракция, образованная по меньшей мере первым из четырех внеклеточных доменов иммуноглобулинового типа протеина LAG-3 (аминокислоты 1-149), в котором один или несколько остатков аргинина (Arg) в положениях 73, 75 и 76 последовательности SEQ ID n° 1 заменены глутаминовой кислотой (Glu), и, возможно, одним или несколькими из трех других внеклеточных доменов иммуноглобулинового типа протеина LAG-3 (аминокислоты 150-239, 240-330 и 331-412 последовательности SEQ ID n° 1).

2. Растворимая полипептидная фракция по п. 1, в которой по меньшей мере один из внеклеточных доменов протеина LAG-3 слит с по меньшей мере одной дополнительной пептидной последовательностью в виде слитого протеина.

3. Растворимая полипептидная фракция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что дополнительной пептидной последовательностью является последовательность иммуноглобулина человека.

4. Растворимая полипептидная фракция по п. 3, отличающаяся тем, что дополнительной пептидной последовательностью является последовательность иммуноглобулина человека типа IgG4.

5. Растворимая полипептидная фракция по одному из пп. 1-4, отличающаяся тем, что она дополнительно связана с токсином или радиоизотопом.

6. Способ получения растворимой полипептидной фракции по одному из пп. 1-5, отличающийся тем, что фрагменты кДНК, кодирующие внеклеточные домены иммуноглобулинового типа протеина LAG-3, и, возможно, фрагмент кДНК, кодирующий дополнительную пептидную последовательность, встраивают в вектор, выбранный из группы, включающей CDM7, pCDM7-CD8, pCLN3 AXS V2 DHFR h α IVS и pCDM-7-CD8-IgG1, и осуществляют экспрессию фрагментов кДНК после трансфекции в систему экспрессии.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что система экспрессии состоит из клеток яичника хомяка.

8. Растворимая полипептидная фракция, образованная целым или частью по меньшей мере одного из четырех внеклеточных доменов иммуноглобулинового типа протеина LAG-3 (аминокислоты 1-149, 150-239, 240-330 и 331-412 последовательности SEQ ID n° 1), отличающаяся тем, что пептидная последовательность LAG-3 дополнительно содержит на своем С-и/или N-конце дополнительную пептидную последовательность типа иммуноглобулина человека, образуя слитый протеин.

9. Растворимая полипептидная фракция по п. 8, отличающаяся тем, что иммуноглобулином человека является иммуноглобулин изотипа IgG4.

10. Растворимая полипептидная фракция по п. 8 или 9, отличающаяся тем, что она дополнительно связана с токсином или радиоизотопом.

11. Способ получения растворимой полипептидной фракции по одному из пп. 8-10, отличающийся тем, что фрагменты кДНК, кодирующие внеклеточные домены иммуноглобулинового типа протеина LAG-3, и, возможно, фрагмент кДНК, кодирующий дополнительную пептидную последовательность, встраивают в вектор, выбранный из группы, включающей CDM7, pCDM7-CD8, pCLN3 AXS V2 DHFR h α IVS и pCDM-7-CD8-IgG1, и осуществляют экспрессию фрагментов кДНК после трансфекции в систему экспрессии.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что система экспрессии состоит из клеток яичника хомяка.

13. Фармацевтическая композиция, обладающая иммуно-подавляющей активностью, включающая растворимую полипептидную фракцию по одному из пп. 1-5 или растворимую полипептидную фракцию по одному из пп. 8-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Антитела, специфически распознающие растворимую полипептидную фракцию по одному из пп. 1-5, выбранные из моноклональных антител или фрагментов этих антител, в частности, фрагментов Fab, Fab', F(ab')₂.

Список последовательностей

I. Общие сведения:

- (1) Заявители: ЭНСТИТУТ ГЮСТАВ РУССИ / ИНСЕРМ ,
АПИЛАЙД РЕЗЕЧ СИСТЕМЗ АРС ХОЛДИНГ Н.В.
- (2) Название изобретения: Растворимые полипептидные фракции,
происходящие от L AG-3 ; терапевтическая композиция;
использование анти-L AG-3 - антител.
- (3) Число последовательностей: I

II. Сведения о последовательности № I:

Характеристики последовательности :

Тип: нуклеотид
Длина: 476
Число нитей: двунитевая
Конфигурация: линейная
Тип молекулы: кДНК
Организм: человек
Ткань: Т-лимфоциты
Название: L AG-3
Описание последовательности:

Лидерный пептид:

-22 Met-Trp-Glu-Ala-Gln-Phe-Leu-Gly-Leu-Leu-Phe-Leu-Gln-Pro-Leu-

Trp-Val-Ala-Pro-Val-Lys-Pro

D1

1 Leu-Gln-Pro-Gly-Ala-Glu-Val-Pro-Val-Val-Trp-Ala-Gln-Glu-Gly-
16 Ala-Pro-Ala-Gln-Leu-Pro-Cys-Ser-Pro-Thr-Ile-Pro-Leu-Gln-Asp-
31 Leu-Ser-Leu-Leu-Arg-Arg-Ala-Gly-Val-Thr-Trp-Gln-His-Gln-Pro-
46 Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Ala-Ala-Ala-Pro-Gly-His-Pro-Leu-Ala-Pro-
61 Gly-Pro-His-Pro-Ala-Ala-Pro-Ser-Ser-Trp-Gly-Pro-Arg-Pro-Arg-

76 Arg-Tyr-Thr-Val-Leu-Ser-Val-Gly-Pro-Gly-Gly-Leu-Arg-Ser-Gly-
 91 Arg-Leu-Ser-Leu-Gln-Pro-Arg-Val-Gln-Leu-Asp-Glu-Arg-Gly-Arg-
 106 Gln-Arg-Gly-Asp-Phe-Ser-Leu-Trp-Leu-Arg-Pro-Ala-Arg-Arg-Ala-
 121 Asp-Ala-Gly-Glu-Tyr-Arg-Ala-Ala-Val-His-Leu-Arg-Asp-Arg-Ala-
 136 Leu-Ser-Cys-Arg-Leu-Arg-Leu-Arg-Leu-Gly-Gln-Ala-Ser-Met 149

 D2 150 Thr-
 151 Ala-Ser-Pro-Pro-Gly-Ser-Leu-Arg-Ala-Ser-Asp-Trp-Val-Ile-Leu-
 166 Asn-Cys-Ser-Phe-Ser-Arg-Pro-Asp-Arg-Pro-Ala-Ser-Val-His-Trp-
 181 Phe-Arg-Asn-Arg-Gly-Gln-Gly-Arg-Val-Pro-Val-Arg-Glu-Ser-Pro-
 196 His-His-His-Leu-Ala-Glu-Ser-Phe-Leu-Phe-Leu-Pro-Gln-Val-Ser-
 211 Pro-Met-Asp-Ser-Gly-Pro-Trp-Gly-Cys-Ile-Leu-Thr-Tyr-Arg-Asp-
 226 Gly-Phe-Asn-Val-Ser-Ile-Met-Tyr-Asn-Leu-Thr-Val-Leu-Gly 239

 D3 240 Leu-
 241 Glu-Pro-Pro-Thr-Pro-Leu-Thr-Val-Tyr-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-Arg-
 256 Val-Gly-Leu-Pro-Cys-Arg-Leu-Pro-Ala-Gly-Val-Gly-Thr-Arg-Ser-
 271 Phe-Leu-Thr-Ala-Lys-Trp-Thr-Pro-Pro-Gly-Gly-Gly-Pro-Asp-Leu-
 286 Leu-Val-Thr-Gly-Asp-Asn-Gly-Asp-Phe-Thr-Leu-Arg-Leu-Glu-Asp-
 301 Val-Ser-Gln-Ala-Gln-Ala-Gly-Thr-Tyr-Thr-Cys-His-Ile-His-Leu-
 316 Gln-Glu-Gln-Gln-Leu-Asn-Ala-Thr-Val-Thr-Leu-Ala-Ile-Ile-Thr 330

 D4 331 Val-Thr-Pro-Lys-Ser-Phe-Gly-Ser-Pro-Gly-Ser-Leu-Gly-Lys-Leu-
 346 Leu-Cys-Glu-Val-Thr-Pro-Val-Ser-Gly-Gln-Glu-Arg-Phe-Val-Trp-
 361 Ser-Ser-Leu-Asp-Thr-Pro-Ser-Gln-Arg-Ser-Phe-Ser-Gly-Pro-Trp-
 376 Leu-Glu-Ala-Gln-Glu-Ala-Gln-Leu-Leu-Ser-Gln-Pro-Trp-Gln-Cys-

RU 2178306 C2

RU 2178306 C2

391 Gln-Leu-Tyr-Gln-Gly-Glu-Arg-Leu-Leu-Gly-Ala-Ala-Val-Tyr-Phe-

406 Thr-Glu-Leu-Ser-Ser-Pro-Gly 412

трансмембранная
Transmembrane

413 Ala-Gln-Arg-Ser-Gly-Arg-Ala-Pro-

421 Gly-Ala-Leu-Pro-Ala-Gly-His-Leu-Leu-Leu-Phe-Leu-Thr-Leu-Gly-

436 Val-Leu-Ser-Leu-Leu-Leu-Leu-Val-Thr-Gly-Ala-Phe-Gly-Phe-His-

451 Leu-Trp 452

внутрицитоплазматическая
Intracytoplasmic

453 Arg-Arg-Gln-Trp-Arg-Pro-Arg-Arg-Phe-Ser-Ala-Leu-Glu-

466 Gln-Gly-Ile-His-Pro-Arg-Arg-Leu-Arg-Ala-Arg 476

RU 2178306 C2

RU 2178306 C2

Таблица 1

Название атома	x	y	Название и № остатка	Тип, заряд
Nom de l'atome			nom et n° du résidu	type, charge et n° de l'atome
N	25.172370911	27.259836197	67.855064392 AP-n 40 nj	-0.5000 1
HN2	25.667764664	26.471963882	67.420585632 AP-n 40 hn	0.1300 2
CA	24.625223160	26.867494583	69.180244446 AP-n 40 ca	0.1200 3
HN1	24.393711090	27.474891663	67.220008850 AP-n 40 hn	0.1300 4
KA	23.936895370	27.680395126	69.464080811 AP-n 40 h	0.0700 5
C	25.862780762	26.773513794	70.350120544 AP-n 40 c'	0.3800 6
O	25.295415878	27.090747833	71.482070923 AP-n 40 o'	-0.4100 7
CB	23.766021729	25.587018967	68.990669250 AP-n 40 c2	-0.2600 8
HB1	23.060285568	25.727443695	68.152351379 AP-n 40 h	0.0700 9
HB2	24.413949040	24.744903564	68.686981201 AP-n 40 h	0.0700 10
CG	22.921775818	25.153419495	70.196960449 AP-n 40 c-	0.3400 11
OD1	22.069602966	25.929233551	70.676017761 AP-n 40 o-	-0.5700 12
OD2	23.115716934	24.009321213	70.667661574 AP-n 40 o-	-0.5700 13
N	26.906179428	26.304588318	70.124969482 SER 41 n	-0.5000 14
CA	27.860145569	25.912786484	71.207519531 SER 41 ca	0.1200 15
HN	27.120641708	26.221813202	69.126319885 SER 41 hn	0.2800 16
KA	27.374551773	25.088045120	71.764326904 SER 41 h	0.1000 17
C	28.252065659	27.005065918	72.271789551 SER 41 c'	0.3800 18
O	27.987834930	28.200620651	72.115295410 SER 41 o'	-0.3800 19
CB	29.093601227	25.298025131	70.494880676 SER 41 c2	-0.1700 20
HB1	28.786190033	24.599395752	69.690521240 SER 41 h	0.1000 21
HB2	29.691856292	26.092912674	70.004081726 SER 41 h	0.1000 22
OG	29.905221939	24.578149796	71.424118042 SER 41 oh	-0.3800 23
HC	20.662555695	24.231645584	70.939277649 SER 41 ho	0.2500 24
N	28.857526779	26.588052063	73.387054443 GLY 42 n	-0.5000 25
CA	29.199718475	27.440891266	74.535232544 GLY 42 ca	0.0200 26
HN	29.251720428	25.616510391	73.267890930 GLY 42 hn	0.2800 27
HA1	28.520187378	28.312047958	74.591857910 GLY 42 h	0.1000 28
HA2	28.983697891	26.890144348	75.468444824 GLY 42 h	0.1000 29
C	30.691051483	27.875793457	74.601707458 GLY 42 c'	0.3800 30
O	31.504199982	27.026502609	74.980445862 GLY 42 o'	-0.3800 31
N	31.113182068	29.132183075	74.266487122 PRO 43 n	-0.4200 32
CA	32.558343609	29.476200104	74.126792908 PRO 43 ca	0.0600 33
KA	31.096603394	28.605407715	73.708091736 PRO 43 h	0.1000 34
CD	30.214075089	30.174203873	73.722633362 PRO 43 c2	0.0600 35
HD1	29.467987061	30.516298294	74.466743469 PRO 43 h	0.1000 36
HD2	29.664882660	29.799777985	72.832768005 PRO 43 h	0.1000 37
C	33.318023682	29.988374710	75.414916992 PRO 43 c'	0.3800 38
O	32.682361603	30.557033539	76.312332153 PRO 43 o'	-0.3800 39
CB	32.483139038	30.574260712	73.043136597 PRO 43 c2	-0.2000 40
HB1	33.350620270	31.263189316	73.049049377 PRO 43 h	0.1000 41
HB2	32.463790894	30.110534668	72.036743164 PRO 43 h	0.1000 42
CG	31.160949707	31.299732672	73.307487488 PRO 43 c2	-0.2000 43
HG1	31.279897690	32.024162292	74.137779236 PRO 43 h	0.1000 44
HG2	30.794561386	31.862808228	72.428352356 PRO 43 h	0.1000 45
N	34.683673859	29.902477264	75.503488633 PRO 44 n	-0.4200 46
CA	35.485736847	30.679145813	76.490524292 PRO 44 ca	0.0600 47
KA	35.018527985	30.645456314	77.491592407 PRO 44 h	0.1000 48
CD	35.509281158	29.014368057	74.655700684 PRO 44 c2	0.0600 49
HD1	35.411357880	29.247959137	73.377461243 PRO 44 h	0.1000 50
HD2	35.214973450	27.955932617	74.801994324 PRO 44 h	0.1000 51
C	35.700843811	32.172924042	76.063224792 PRO 44 c'	0.3800 52
O	36.448230743	32.477428436	75.126922607 PRO 44 o'	-0.3800 53
CB	36.779544830	29.842718124	76.547348022 PRO 44 c2	-0.2000 54

* Нумерация аминокислот смещена минимально на 6 по отношению к последовательности 1

HB1	37.662769116	30.430650711	76.363670349	PRO	44 h	0.1000	55
HB2	36.667564192	29.027103424	77.288825989	PRO	44 h	0.1000	56
CG	36.940769196	29.250995636	75.143180847	PRO	44 C2	-0.2000	57
HG1	37.446662903	29.982709885	74.483322144	PRO	44 h	0.1000	58
HG2	37.551295135	28.329860687	75.134750166	PRO	44 h	0.1000	59
N	35.026676178	33.104183197	76.753837585	ALA	45 n	-0.5000	60
CA	35.034278870	34.544979095	76.400695801	ALA	45 ca	0.1200	61
HN	34.452354431	32.747509003	77.536170959	ALA	45 hn	0.2800	62
HA	35.105010986	34.659946442	75.298950195	ALA	45 h	0.1000	63
C	36.209384918	35.322113037	77.076705933	ALA	45 c'	0.3800	64
O	36.163528442	35.637268066	78.268325806	ALA	45 o'	-0.3800	65
CB	33.646369934	35.083190918	76.800727844	ALA	45 C3	-0.3000	66
HB1	33.534698486	36.150661469	76.535202026	ALA	45 h	0.1000	67
HB2	32.828392029	34.539138794	76.290328979	ALA	45 h	0.1000	68
HB3	33.465579987	35.001335144	77.890525818	ALA	45 h	0.1000	69
N	37.266757965	35.613758087	76.297294617	ALA	46 n	-0.5000	70
HN	37.216701508	35.231555939	75.346885681	ALA	46 hn	0.2800	71
CA	38.489383698	36.310386658	76.786270142	ALA	46 ca	0.1200	72
HA	38.262126923	36.871456146	77.716934204	ALA	46 h	0.1000	73
C	39.058414459	37.311935425	75.727844238	ALA	46 c'	0.3800	74
O	38.922710419	37.100418091	74.518731262	ALA	46 o'	-0.3800	75
CB	39.526046753	35.215301514	77.108406067	ALA	46 C3	-0.3000	76
HB1	40.446556091	35.633434296	77.555480957	ALA	46 h	0.1000	77
HB2	39.131206512	34.469978333	77.822120667	ALA	46 h	0.1000	78
HB3	39.821903229	34.663463593	76.197715759	ALA	46 h	0.1000	79
N	39.737388611	38.384365082	76.180320740	ALA	47 n	-0.5000	80
CA	40.295833588	39.429888679	75.275863647	ALA	47 ca	0.1200	81
HN	39.717037201	38.512592316	77.196357727	ALA	47 hn	0.2800	82
HA	39.319335973	39.319335938	74.245994568	ALA	47 h	0.1000	83
C	41.869789124	39.413467407	75.170806885	ALA	47 c'	0.3800	84
O	42.518333435	40.166862488	75.906578064	ALA	47 o'	-0.3800	85
CB	39.722030640	40.769996643	75.786285400	ALA	47 C3	-0.3000	86
HB1	40.045078278	41.611721039	75.145561218	ALA	47 h	0.1000	87
HB2	38.615306854	40.778987885	75.787467957	ALA	47 h	0.1000	88
HB3	40.059757233	41.007873535	76.813346863	ALA	47 h	0.1000	89
N	42.537422180	38.621597290	74.274406433	PRO	48 n	-0.4200	90
CA	44.009857178	38.718185425	74.045745850	PRO	48 ca	0.0600	91
HA	44.539390564	38.855972290	75.008773804	PRO	48 h	0.1000	92
CO	41.903011322	37.522361755	73.516281128	PRO	48 C2	0.0600	93
HD1	41.081178758	37.871139526	72.860626221	PRO	48 h	0.1000	94
HD2	41.490718512	36.761222839	74.206848145	PRO	48 h	0.1000	95
C	44.448698322	39.844142914	73.044319153	PRO	48 c'	0.3800	96
O	43.693031311	40.225761414	72.144134521	PRO	48 o'	-0.3800	97
CB	44.301902771	37.304885864	73.500595093	PRO	48 C2	-0.2000	98
HB1	45.227554321	37.245040894	72.897834778	PRO	48 h	0.1000	99
HB2	44.442562103	36.597515106	74.341529846	PRO	48 h	0.1000	100
CG	43.051033020	36.925685883	72.702011108	PRO	48 C1	-0.2000	101
HG1	43.084365845	37.389282227	71.696128845	PRO	48 h	0.1000	102
HG2	42.948661804	35.835418701	72.555740356	PRO	48 h	0.1000	103
N	45.700798035	40.324272156	73.165817261	GLY	49 n	-0.5000	104
CA	46.289730072	41.291931132	72.184875488	GLY	49 Cq	0.0200	105
HN	46.207077026	39.986907959	73.991729736	GLY	49 hn	0.2800	106
HA1	45.620616913	41.460151672	71.317451477	GLY	49 h	0.1000	107
HA2	46.357063293	42.283206940	72.672386169	GLY	49 h	0.1000	108
C	47.482319641	40.950855255	71.400997925	GLY	49 c'	0.3800	109
O	48.560806274	41.811416626	71.601501465	GLY	49 o'	-0.3800	110
N	47.842975616	39.718383789	71.091018677	HIS	50 n	-0.5000	111
HN	46.947166443	39.222202301	71.052452087	HIS	50 hn	0.2800	112
CA	49.020114899	39.216835022	70.306198120	HIS	50 ca	0.1200	113
HA	49.124539185	38.296161652	70.836235046	HIS	50 h	0.1000	114
C	50.400863647	39.993576050	70.182189941	HIS	50 c'	0.3800	115

O	50.733478546	40.446022014	69.081466675	HIS	50	a'	-0.3800	116
CB	48.455345154	38.673969269	68.953773499	HIS	50	c2	-0.2000	117
HB1	49.238502502	38.051708221	68.481765747	HIS	50	h	0.1000	118
HB2	47.639427185	37.951225281	69.144165039	HIS	50	h	0.1000	119
CG	47.954322815	39.695293427	67.919425964	HIS	50	c5	0.1000	120
ND1	46.759342194	40.404747009	68.035293579	HIS	50	np	-0.4200	121
CE1	46.825572968	41.133701324	66.873245239	HIS	50	c5	0.2700	122
NE2	47.887611389	40.964004517	66.014495850	HIS	50	np	-0.5000	123
CD2	48.617565155	40.019775391	66.717041016	HIS	50	c5	0.0100	124
HE1	46.043247223	41.852840424	66.655242920	HIS	50	h	0.1300	125
HE2	48.092224121	41.403381348	65.108955383	HIS	50	hn	0.2800	126
HD2	49.566501617	39.599807739	66.396347046	HIS	50	h	0.1300	127
N	51.278770447	40.105480194	71.226615906	PRO	51	n	-0.4200	128
CA	52.667034149	40.618915558	71.077911377	PRO	51	ca	0.0600	129
HA	52.723186493	41.393623352	70.287094116	PRO	51	h	0.1000	130
CD	50.956447601	39.767082214	72.624496460	PRO	51	c2	0.0600	131
HD1	50.920970917	38.670558929	72.747383118	PRO	51	h	0.1000	132
HD2	49.988422394	40.190521240	72.947166443	PRO	51	h	0.1000	133
C	53.707103729	39.478122711	70.804489136	PRO	51	c'	0.3800	134
O	53.623699188	38.391666412	71.191418457	PRO	51	o'	-0.3800	135
CB	52.846694946	41.283794403	72.455955505	PRO	51	c2	-0.2000	136
HB1	53.907955170	41.442169189	72.729286194	PRO	51	h	0.1000	137
HB2	52.373264113	42.285846710	72.449127197	PRO	51	h	0.1000	138
CG	52.105823517	40.370025635	73.440399170	PRO	51	c2	-0.2000	139
HG1	52.782051086	39.565395355	73.789718628	PRO	51	h	0.1000	140
HG2	51.753723145	40.912036896	74.337333679	PRO	51	h	0.1000	141
N	54.704883575	39.729522705	69.933471680	LEU	52	n	-0.5000	142
CA	55.791530609	38.746330261	69.603820801	LEU	52	ca	0.1200	143
HN	54.653743744	40.652229309	69.490356445	LEU	52	hn	0.2800	144
HA	56.479202271	39.288208008	68.927917480	LEU	52	h	0.1000	145
C	55.301837921	37.525024614	68.745040894	LEU	52	c'	0.3800	146
O	55.637695313	37.425930023	67.562049866	LEU	52	o'	-0.3800	147
CB	56.671589083	38.316761017	70.829437256	LEU	52	c2	-0.2000	148
HB1	56.036743164	37.710464478	71.502593994	LEU	52	h	0.1000	149
HB2	57.445941382	37.602729797	70.487434387	LEU	52	h	0.1000	150
CG	57.363307953	39.420749664	71.675102234	LEU	52	c1	-0.1000	151
HG	56.617597526	40.200679779	71.926834106	LEU	52	h	0.1000	152
CD1	57.875057220	38.833915710	73.004547119	LEU	52	c3	-0.3000	153
HD11	58.153130341	39.601875305	73.642135620	LEU	52	h	0.1000	154
HD12	57.048751831	38.403957367	73.601577759	LEU	52	h	0.1000	155
HD13	58.618564606	38.028480530	72.852462769	LEU	52	h	0.1000	156
CD2	58.531608582	40.085853577	70.927200317	LEU	52	c3	-0.3000	157
HD21	59.028976440	40.857166290	71.545303345	LEU	52	h	0.1000	158
HD22	59.309509277	39.355545044	70.614819031	LEU	52	h	0.1000	159
HD23	58.192760468	40.592193604	70.005569458	LEU	52	h	0.1000	160
N	54.534648895	36.601863861	69.354270935	ALA	53	n	-0.5000	161
CA	53.940563202	35.420303345	68.673507690	ALA	53	ca	0.1200	162
HN	54.159572601	36.958141327	70.246543884	ALA	53	hn	0.2800	163
HA	53.600482941	35.753322601	67.671340942	ALA	53	h	0.1000	164
C	52.639778137	34.863575439	69.383995056	ALA	53	c'	0.3800	165
O	51.628326416	34.818698883	68.677047729	ALA	53	o'	-0.3800	166
CB	55.008785248	34.330768585	68.423698425	ALA	53	c3	-0.3000	167
HB1	54.582756042	33.460170746	67.892036438	ALA	53	h	0.1000	168
HB2	55.828662872	34.711517334	67.787284851	ALA	53	h	0.1000	169
HB3	55.479701996	33.961406708	69.351325989	ALA	53	h	0.1000	170
K	52.555103302	34.484893799	70.698265076	PRO	54	n	-0.4200	171
CA	51.304950714	33.917499542	71.286506653	PRO	54	ca	0.0600	172
HA	50.878768921	33.172523499	70.584587097	PRO	54	h	0.1000	173
CD	53.705833435	34.435420990	71.626182556	PRO	54	c2	0.0600	174
HD1	54.215991974	35.409980774	71.739936829	PRO	54	h	0.1000	175
HD2	54.453365326	33.693523407	71.288909912	PRO	54	h	0.1000	176

C	50.177021027	34.945980072	71.642837524	PRO	54	c'	0.1800	177
O	50.177983093	36.164409637	71.677795410	PRO	54	o'	-0.1800	178
CB	51.867893219	33.173828125	72.519187927	PRO	54	c2	-0.2000	179
HB1	51.135505676	33.051830292	73.340660095	PRO	54	h	0.1000	180
HB2	52.181377411	32.150829315	72.232276917	PRO	54	h	0.1000	181
CG	53.087123871	33.989192963	72.949317932	PRO	54	c2	-0.2000	182
HG1	52.768703461	34.871643066	73.538475037	PRO	54	h	0.1000	183
HG2	53.791828156	33.414070129	73.579086304	PRO	54	h	0.1000	184
N	48.977416066	34.414421082	71.936706543	GLY	55	n	-0.5000	185
CA	47.822620392	35.225021362	72.404747009	GLY	55	cg	0.0200	186
HN	48.958133698	33.389709473	71.929512024	GLY	55	hn	0.2800	187
HA1	47.830284119	36.238574982	71.963676453	GLY	55	h	0.1000	188
HA2	46.896526337	34.772380829	72.004432678	GLY	55	h	0.1000	189
C	47.670829773	35.263648987	73.950416565	GLY	55	c'	0.3800	190
O	47.247509003	34.242198944	74.498336792	GLY	55	o'	-0.3800	191
N	47.956153870	36.372848511	74.696281433	PRO	56	n	-0.4200	192
CA	47.830066681	36.396587372	76.179130554	PRO	56	ca	0.0600	193
HA	48.225147247	35.457695007	76.619560242	PRO	56	h	0.1000	194
CD	48.653686523	37.556163788	74.163940430	PRO	56	c2	0.0600	195
HD1	48.108860016	38.040233612	73.332565308	PRO	56	h	0.1000	196
HD2	49.652721405	37.256084442	73.799308777	PRO	56	h	0.1000	197
C	46.161907959	36.604877472	76.668052673	PRO	56	c'	0.3800	198
O	45.890090942	37.732730865	76.845039368	PRO	56	o'	-0.3800	199
CB	48.804897308	37.531764984	76.560951233	PRO	56	c2	-0.2000	200
HB1	48.542221069	38.034294128	77.511970520	PRO	56	h	0.1000	201
HB2	49.825593041	37.124542236	76.697402954	PRO	56	h	0.1000	202
CG	48.782566071	38.488700867	75.368530273	PRO	56	c2	-0.2000	203
HG1	47.903289795	39.158111572	75.434867859	PRO	56	h	0.1000	204
HG2	49.679012299	39.133480072	75.321792603	PRO	56	h	0.1000	205
N	45.650573730	35.488880157	76.896896362	HIS	57	n	-0.5000	206
HN	46.046119690	34.657379150	76.439048767	HIS	57	hn	0.2800	207
CA	44.244419098	35.504474640	77.387596130	HIS	57	ca	0.1200	208
HA	43.667560577	36.307649231	76.759368896	HIS	57	h	0.1000	209
C	44.173530579	35.943927765	78.901000977	HIS	57	c'	0.3800	210
O	44.750030518	35.234142303	79.736030579	HIS	57	o'	-0.3800	211
CB	43.610416412	34.095542908	77.185058994	HIS	57	c2	-0.2000	212
HB1	44.270858765	33.323795319	77.623748779	HIS	57	h	0.1000	213
HB2	42.689029694	34.034877777	77.796188354	HIS	57	h	0.1000	214
CG	43.250400543	33.671833038	75.751731873	HIS	57	c5	0.1000	215
ND1	44.116428375	33.723644257	74.666069031	HIS	57	np	-0.4200	216
CE1	43.325973511	33.139041901	73.713264465	HIS	57	c5	0.2700	217
NE2	42.066158295	32.716590881	74.036811829	HIS	57	np	-0.5000	218
CD2	42.045005798	33.048488617	75.379264832	HIS	57	c5	0.0100	219
HE1	43.712070465	33.001682281	72.711807251	HIS	57	h	0.1300	220
HE2	41.370864868	32.229383759	73.464263916	HIS	57	hn	0.2800	221
HD2	41.236827850	32.815635681	76.058380127	HIS	57	h	0.1300	222
N	43.513858795	37.068405151	79.318038940	PRO	58	n	-0.4200	223
CA	43.593978882	37.569736481	80.719970703	PRO	58	ca	0.0600	224
HA	44.657642365	37.630648640	81.026939392	PRO	58	h	0.1000	225
CD	42.833599091	38.010932922	78.407653809	PRO	58	c2	0.0600	226
HD1	42.093393271	37.516807556	77.751007080	PRO	58	h	0.1000	227
HD2	43.569110870	38.527889252	77.758674622	PRO	58	h	0.1000	228
C	42.805988312	36.695770264	81.747009277	PRO	58	c'	0.3800	229
O	41.549808960	36.491984985	81.769706726	PRO	58	o'	-0.3800	230
CB	43.072513580	39.016571045	80.579101563	PRO	58	c2	-0.2000	231
HB1	42.559799194	39.392253876	81.485702515	PRO	58	h	0.1000	232
HB2	43.920654297	39.706352234	80.396040771	PRO	58	h	0.1000	233
CG	42.156440735	38.999496460	79.353309631	PRO	58	c2	-0.2000	234
HG1	41.151851654	38.629653931	79.634307861	PRO	58	h	0.1000	235
HG2	42.021620605	39.998752594	78.896965027	PRO	58	h	0.1000	236
N	43.540618896	35.961261749	82.605430603	ALA	59	n	-0.5000	237

HN	44.537130627	35.932937622	82.365699768	ALA	59	hn	0.2800	238
CA	42.949653625	34.946208954	83.526855469	ALA	59	ca	0.1200	239
HA	42.197692871	34.355514526	82.965911865	ALA	59	h	0.1000	240
C	42.208984375	35.488883972	84.803985596	ALA	59	c'	0.3800	241
O	42.496433258	35.127353668	85.948333740	ALA	59	o'	-0.3800	242
CB	44.107444763	33.975612640	83.839767456	ALA	59	c3	-0.1000	243
HB1	43.761249542	33.130538940	84.463287354	ALA	59	h	0.1000	244
HB2	44.544620514	33.531585693	82.924507141	ALA	59	h	0.1000	245
HB3	44.925910950	34.467308044	84.399597168	ALA	59	h	0.1000	246
N	41.192062378	36.323741913	84.559051514	ALA	60	n	-0.5000	247
HN	41.124549866	36.554992676	83.555343628	ALA	60	hn	0.2800	248
CA	40.203086853	36.790748596	85.562988281	ALA	60	ca	0.1200	249
HA	40.023948669	35.965785980	86.283721924	ALA	60	h	0.1000	250
C	38.823528290	37.027305603	84.846977234	ALA	60	c'	0.3800	251
O	37.897804260	36.283885956	85.186340332	ALA	60	o'	-0.3800	252
CB	40.756233215	37.971691132	86.389617920	ALA	60	c3	-0.3000	253
HB1	40.004146576	38.357006073	87.102043152	ALA	60	h	0.1000	254
HB2	41.631908417	37.656120300	86.987319946	ALA	60	h	0.1000	255
HB3	41.090072632	38.818138123	85.765472412	ALA	60	h	0.1000	256
N	38.616340637	37.921970367	83.823921204	PRO	61	n	-0.4200	257
CA	37.403762817	37.874496460	82.948486338	PRO	61	ca	0.0600	258
HA	36.491020203	37.824863434	83.573593140	PRO	61	h	0.1000	259
CB	39.556003571	39.003845215	83.459777832	PRO	61	c2	0.0600	260
HD1	40.594814301	38.658184052	83.304046631	PRO	61	h	0.1000	261
HD2	39.571029663	39.778694153	84.250648499	PRO	61	h	0.1000	262
C	37.275394440	36.712963104	81.892074585	PRO	61	c'	0.3800	263
O	36.266387939	36.670307159	81.183494568	PRO	61	o'	-0.3800	264
CB	37.473857880	39.266963959	82.286987305	PRO	61	c2	-0.2000	265
HB1	36.949714661	39.321308136	81.312759399	PRO	61	h	0.1000	266
HB2	36.985511780	40.017913818	82.938987732	PRO	61	h	0.1000	267
CG	38.968631744	39.371613312	82.168632507	PRO	61	c2	-0.2000	268
HG1	39.397396088	39.046298981	81.292793274	PRO	61	h	0.1000	269
HG2	39.180202484	40.649600983	82.039207458	PRO	61	h	0.1000	270
N	38.342324829	35.777751923	81.785034180	SER	62	n	-0.5000	271
CA	38.186004639	34.624855042	80.844123840	SER	62	ca	0.1200	272
HN	39.035541514	35.927360535	82.416992188	SER	62	hn	0.2800	273
HA	37.921787262	35.006183624	79.841125488	SER	62	h	0.1000	274
C	37.145660400	33.532897949	81.261909485	SER	62	c'	0.3800	275
O	37.466091156	32.626064301	82.041137695	SER	62	o'	-0.3800	276
CB	39.620265961	34.048240662	80.725196838	SER	62	c2	-0.1700	277
HB1	39.660293579	33.306644440	79.904281616	SER	62	h	0.1000	278
HB2	40.349685669	34.832687378	80.442802429	SER	62	h	0.1000	279
OG	40.032703400	33.414188385	81.938880920	SER	62	oh	-0.3800	280
HG	39.252239699	32.931293488	82.256263733	SER	62	ho	0.3500	281
N	35.902244568	33.647918701	80.764541626	SER	63	n	-0.5000	282
CA	34.747528076	32.874465942	81.297317505	SER	63	ca	0.1200	283
HN	35.768447876	34.503852844	80.205200195	SER	63	hn	0.2800	284
HA	35.064254761	32.265518188	82.170570374	SER	63	h	0.1000	285
C	34.106758118	31.936998367	80.231674194	SER	63	c'	0.3800	286
O	33.716896057	32.367130280	79.142120361	SER	63	o'	-0.3800	287
CB	33.716815948	33.889484406	81.843544006	SER	63	c2	-0.1700	288
HB1	34.199871063	34.571384430	82.572105408	SER	63	h	0.1000	289
HB2	33.328830719	34.543502808	81.036796570	SER	63	h	0.1000	290
OG	32.634590149	33.222091675	82.496467590	SER	63	oh	-0.3800	291
HG	32.159793854	32.710407257	81.832328796	SER	63	ho	0.3500	292
N	33.914913177	30.658897400	80.588378906	TRP	64	n	-0.5000	293
CA	33.112319946	29.694124222	79.783546448	TRP	64	ca	0.1200	294
HN	34.221500397	30.422899246	81.538955688	TRP	64	hn	0.2800	295
HA	33.404731750	29.812168121	78.721931458	TRP	64	h	0.1000	296
C	31.573041916	29.961977005	79.883049011	TRP	64	c'	0.3800	297
O	30.996980667	29.940891266	80.975959778	TRP	64	o'	-0.3800	298

CB	11.525466919	26.235471725	80.142707825	TRP	64	c2	-0.2000	299
HB1	12.950366974	27.534402847	79.508041382	TRP	64	h	0.1000	300
HB2	14.571674147	28.078489304	79.816658020	TRP	64	h	0.1000	301
CG	11.405326841	27.783784866	81.611763000	TRP	64	c5	0.0000	302
CD1	12.267101288	27.214570999	82.221214294	TRP	64	c5	0.0100	303
NE1	12.481933594	26.953943253	83.590408325	TRP	64	np	-0.5000	304
CE2	13.781982422	27.378627777	83.812319783	TRP	64	c5	0.1100	305
CD2	14.355152130	27.881061554	82.617965698	TRP	64	c5	0.0000	306
HD1	11.332025528	27.036033630	81.708480835	TRP	64	h	0.1000	307
HE1	11.820940018	26.578481674	84.279945374	TRP	64	hn	0.2800	308
CE3	15.681034088	28.394184113	82.615905762	TRP	64	cp	-0.1000	309
HE3	16.128986159	28.784986496	81.714393616	TRP	64	h	0.1000	310
CZ3	16.396430969	28.387191772	83.815704346	TRP	64	cp	-0.1000	311
HZ3	17.405311584	28.776082993	83.832160950	TRP	64	h	0.1000	312
CH2	15.830604553	27.888952255	84.994010925	TRP	64	cp	-0.1000	313
HH2	16.410472870	27.896844864	85.906951904	TRP	64	h	0.1000	314
CZ2	14.527233124	27.382776260	85.014289856	TRP	64	cp	-0.1000	315
HZ2	14.097515106	27.006088257	85.929389954	TRP	64	h	0.1000	316
N	10.921329498	30.232547760	78.740600586	GLY	65	n	-0.5000	317
CA	29.460748672	30.504768372	78.692192078	GLY	65	cq	0.0200	318
HN	11.520374298	30.302478790	77.901519775	GLY	65	hn	0.2800	319
HA1	29.073087692	30.896234512	79.650825500	GLY	65	h	0.1000	320
HA2	29.288171768	31.333106995	77.981094360	GLY	65	h	0.1000	321
C	28.633579254	29.293350220	78.197364807	GLY	65	c'	0.3800	322
O	28.566907883	29.137302399	76.975486755	GLY	65	o'	-0.3800	323
N	27.989013672	28.429246902	79.038352966	PRO	66	n	-0.4200	324
CA	27.282257080	27.212890625	78.546752930	PRO	66	ca	0.0600	325
HA	27.989650726	26.634012222	77.917152405	PRO	66	h	0.1000	326
CD	28.016592026	28.532529831	80.911337280	PRO	66	c2	0.0600	327
HD1	27.731333279	29.536006927	80.880874634	PRO	66	h	0.1000	328
HD2	29.027824402	28.301166534	80.897590637	PRO	66	h	0.1000	329
C	25.977466583	27.479314804	77.725341797	PRO	66	c'	0.3800	330
O	25.217950821	28.417262104	77.982574463	PRO	66	o'	-0.3800	331
CB	17.045602798	26.422634125	79.851196289	PRO	66	c2	-0.2000	332
HB1	26.132562637	25.797079086	79.827728271	PRO	66	h	0.1000	333
HB2	27.890687943	25.729280472	80.029365540	PRO	66	h	0.1000	334
CG	17.003501892	27.477243423	80.958015442	PRO	66	c2	-0.2000	335
HG1	25.990892410	27.921483994	81.014678955	PRO	66	h	0.1000	336
HG2	27.232566833	27.061700821	81.956459045	PRO	66	h	0.1000	337
N	25.734319687	26.626403809	76.719802856	ARG+	67	n	-0.5000	338
CA	24.603988647	26.793025970	75.767257690	ARG+	67	ca	0.1200	339
HN	26.386735916	25.841371536	76.6498803162	ARG+	67	hn	0.2800	340
HA	24.496238708	27.874828339	75.561668396	ARG+	67	h	0.1000	341
C	23.227464676	26.224872589	76.267372131	ARG+	67	c'	0.3800	342
O	23.178310394	25.034952164	76.603759766	ARG+	67	o'	-0.3800	343
CB	24.990058899	26.165225797	74.398826599	ARG+	67	c2	-0.2000	344
HB1	24.135663986	26.318639755	73.709175110	ARG+	67	h	0.1100	345
HB2	25.787433624	26.779323578	73.940032959	ARG+	67	h	0.1100	346
CG	25.439929962	24.676465988	74.361564636	ARG+	67	c2	-0.2000	347
HG1	26.546255112	24.646316528	74.415458679	ARG+	67	h	0.1300	348
HG2	25.092146191	24.131168365	75.261718750	ARG+	67	h	0.1300	349
CD	24.934387207	23.941221237	73.112297058	ARG+	67	c2	-0.0900	350
HD1	23.858283539	23.774566650	73.188652039	ARG+	67	h	0.1300	351
HD2	25.070211411	24.585262299	72.220893860	ARG+	67	h	0.1300	352
NE	25.665744781	22.657058716	72.968780518	ARG+	67	n1	-0.5000	353
HE	26.251846313	22.313175473	73.731925964	ARG+	67	hn	0.3600	354
CZ	25.689014435	21.902687073	71.871635437	ARG+	67	cr	0.4500	355
HH1	26.493299484	20.879484177	71.859733582	ARG+	67	n2	-0.5000	356
HH11	27.072675705	20.740955353	72.690315247	ARG+	67	hn	0.3600	357
HH12	26.520929337	20.319580078	71.006805420	ARG+	67	hn	0.3600	358
HH2	24.956668854	22.117029190	70.805320740	ARG+	67	n2	-0.5000	359

HM21	25.030595779	21.456792811	70.033142090	ARG+	67	hn	0.1600	360
HM22	24.266489029	22.916227141	70.850784302	ARG+	67	hn	0.1600	361
N	22.080270767	26.971176147	76.244255066	PRO	68	n	-0.4200	362
CA	20.743734360	26.358839035	76.485237122	PRO	68	ca	0.0600	363
HA	20.817556381	25.605155945	77.294357300	PRO	68	h	0.1000	364
CD	22.076143265	28.448001862	76.342918396	PRO	68	c2	0.0600	365
HD1	22.539228439	28.949869156	75.469612122	PRO	68	h	0.1000	366
HD2	22.632146835	28.776126862	77.244499207	PRO	68	h	0.1000	367
C	20.182382584	25.586324692	75.240180969	PRO	68	c'	0.1800	368
O	20.420539856	24.381649017	75.139877319	PRO	68	o'	-0.1800	369
CB	19.948141098	27.549791336	77.062515259	PRO	68	c2	-0.2000	370
HB1	18.858430862	27.490163803	76.877128601	PRO	68	h	0.1000	371
HB2	20.066789627	27.567596436	78.163002014	PRO	68	h	0.1000	372
CG	20.592071533	28.804227829	76.467758179	PRO	68	c2	-0.2000	373
HG1	20.158363342	29.031393051	75.478172302	PRO	68	h	0.1000	374
HG2	20.428398132	29.704229355	77.092338562	PRO	68	h	0.1000	375
N	19.458055496	26.229068756	74.300010681	ARG+	69	n	-0.5000	376
CA	18.893756866	25.542047501	73.096710205	ARG+	69	ca	0.1200	377
HN	19.221296310	27.198928833	74.529014587	ARG+	69	hn	0.2800	378
HA	19.667610168	24.872461319	72.660797119	ARG+	69	h	0.1000	379
C	18.514461517	26.608341217	72.012504578	ARG+	69	c'	0.1800	380
O	17.383218765	27.099323273	72.036094666	ARG+	69	o'	-0.1800	381
CB	17.681777954	24.654710770	73.539657593	ARG+	69	c2	-0.2000	382
HB1	18.011884689	23.935596466	74.315147400	ARG+	69	h	0.1100	383
HB2	16.954420090	25.310214996	74.061965942	ARG+	69	h	0.1100	384
CG	16.946891785	23.862810135	72.427490234	ARG+	69	c2	-0.2000	385
HG1	16.649517059	24.551628113	71.612152100	ARG+	69	h	0.1300	386
HG2	17.638776779	23.127803802	71.965805054	ARG+	69	h	0.1300	387
CD	15.688191414	23.166488647	72.975959778	ARG+	69	c2	-0.0900	388
HD1	15.980383873	22.365550995	73.686569214	ARG+	69	h	0.1300	389
HD2	15.090404510	23.898859024	73.554351807	ARG+	69	h	0.1300	390
NE	14.889810562	22.612804413	71.848815918	ARG+	69	n1	-0.5000	391
HE	15.272388458	22.616128922	70.898582458	ARG+	69	hn	0.1600	392
CZ	13.644455910	22.143890381	71.942466736	ARG+	69	cr	0.4500	393
NH1	13.048615456	21.755460739	70.850708008	ARG+	69	n2	-0.5000	394
NH11	13.576630592	21.832328796	69.979103088	ARG+	69	hn	0.1600	395
NH12	12.090744019	21.411947250	70.936080933	ARG+	69	hn	0.1600	396
NH2	12.989639282	22.056533813	73.074882507	ARG+	69	n2	-0.5000	397
NH21	12.033639908	21.696094513	73.066261292	ARG+	69	hn	0.1600	398
NH22	13.529273987	22.372974396	71.883934021	ARG+	69	hn	0.1600	399
N	19.436628342	26.928932190	71.074501038	ARG+	70	n	-0.5000	400
CA	19.223009109	27.811206818	69.878326416	ARG+	70	ca	0.1200	401
HA	20.357131958	26.451332092	71.165985107	ARG+	70	hn	0.2800	402
HA	19.087914877	27.065124512	69.071128845	ARG+	70	h	0.1000	403
C	20.512538910	28.575149536	69.398536682	ARG+	70	c'	0.1800	404
O	20.872812271	28.468791962	68.228363037	ARG+	70	o'	-0.1800	405
CB	17.935552597	28.697717667	69.732887268	ARG+	70	c2	-0.2000	406
HB1	17.889257431	29.085472107	68.694030762	ARG+	70	h	0.1100	407
HB2	17.053388596	28.031058167	69.807891846	ARG+	70	h	0.1100	408
CG	17.775762558	29.883768082	70.717842102	ARG+	70	c2	-0.2000	409
HG1	18.004568100	29.546030045	71.747383118	ARG+	70	h	0.1300	410
HG2	18.540782928	30.651863098	70.495643616	ARG+	70	h	0.1300	411
CD	16.368116379	30.502414703	70.693214417	ARG+	70	c2	-0.0900	412
HD1	16.095691681	30.812221527	69.664886475	ARG+	70	h	0.1300	413
HD2	15.630161285	29.711160660	70.937812805	ARG+	70	h	0.1300	414
NE	16.255954742	31.590759277	71.711013794	ARG+	70	n1	-0.5000	415
HE	16.253637314	31.350564957	72.706428528	ARG+	70	hn	0.1600	416
CZ	16.144437790	32.900745392	71.464561462	ARG+	70	cr	0.4500	417
NH1	16.055492401	33.712890625	72.481109619	ARG+	70	n2	-0.5000	418
NH11	16.071464539	33.294216156	73.413330078	ARG+	70	hn	0.1600	419
NH12	15.975571632	34.708621979	72.277374268	ARG+	70	hn	0.1600	420
NH2	16.120351791	33.420074463	70.259872437	ARG+	70	n2	-0.5000	421
HM21	16.025018692	34.432674408	70.167800903	ARG+	70	hn	0.1600	422
HM22	16.187112808	32.736862183	69.505996704	ARG+	70	hn	0.1600	423
N	21.115812302	29.562902451	70.071769714	TYRC	71	n	-0.5000	424
HN	21.515977859	30.157514572	69.338050842	TYRC	71	hn	0.2800	425
CA	22.034273148	29.314456940	71.218978882	TYRC	71	ca	0.1200	426
HA	22.671009064	28.444923401	70.976676941	TYRC	71	h	0.1000	427
C	21.352920532	28.953493118	72.563385010	TYRC	71	c'	0.4100	428
OXT	20.392858505	29.553161621	71.048652649	TYRC	71	o'	-0.1800	429
O	21.928325653	27.853042603	73.145797729	TYRC	71	oh	-0.1800	430
HO	21.429273605	27.558662415	73.909782410	TYRC	71	ho	0.1500	431
CB	22.969152451	30.555358887	71.361984253	TYRC	71	c2	-0.2000	432
HB1	22.368267059	31.487627029	71.355415344	TYRC	71	h	0.1000	433
HB2	23.401992798	30.559690475	72.381835938	TYRC	71	h	0.1000	434
CG	24.144546509	30.666173935	70.352111816	TYRC	71	cp	0.0000	435
CD1	23.927837372	31.126276016	69.044418335	TYRC	71	cp	-0.1000	436
HD1	22.944635391	31.424867630	68.717597961	TYRC	71	h	0.1000	437
CE1	24.987041473	31.212265015	68.143028259	TYRC	71	cp	-0.1000	438
HE1	24.819047928	31.555503845	67.131973267	TYRC	71	h	0.1000	439
CZ	26.273118973	30.861675262	68.542274475	TYRC	71	cp	0.0300	440
OH	27.314481735	30.957365036	67.652267456	TYRC	71	oh	-0.1800	441
HN	26.980180740	31.236070633	66.796859741	TYRC	71	ho	0.1500	442
CE2	26.504697800	30.422637939	69.841377258	TYRC	71	cp	-0.1000	443
HE2	27.503232956	30.148866653	70.140815735	TYRC	71	h	0.1000	444
CD2	25.447391510	30.325349808	70.743820190	TYRC	71	cp	-0.1000	445
HD2	25.652494431	29.968608856	71.745338440	TYRC	71	h	0.1000	446

Таблица 2

Название атома			Название и № остатка	Тип, заряд № атома
Nom de l'atome	x	y	nom et n° du résidu	type, charge et n° de l'atome
N	24.753738403	26.435615540	68.244300842 CYSn 40	-0.5000 1
CA	24.503000259	26.356292725	69.707687378 CYSn 40	0.1200 2
HN1	23.861560822	26.429992676	67.714397888 CYSn 40	0.1400 3
HN2	25.250690460	25.603437424	67.909477234 CYSn 40	0.1400 4
HA	23.890571594	27.247760771	69.940788269 CYSn 40	0.1000 5
C	25.747190475	26.505004883	70.632949829 CYSn 40	0.1800 6
O	25.611124039	27.204542160	71.634971619 CYSn 40	-0.1800 7
CB	23.602088928	25.125436783	69.979545593 CYSn 40	-0.1000 8
HB1	22.555475235	25.378625870	69.716011047 CYSn 40	0.1000 9
HB2	23.865217209	24.277284622	69.317871094 CYSn 40	0.1000 10
SG	23.613842010	24.466741562	71.679084778 CYSn 40	0.1000 11
N	26.910152435	25.881416321	70.350471497 SER 41	-0.5000 12
CA	28.052598953	25.721015930	71.310394287 SER 41	0.1200 13
HN	26.921674728	25.473436356	69.412322998 SER 41	0.2800 14
HA	27.761577606	24.886217117	71.978584290 SER 41	0.1000 15
C	28.477056503	26.929338455	72.326699829 SER 41	0.1800 16
O	28.412267685	28.057608566	71.829902649 SER 41	-0.1800 17
CB	29.257335663	25.212779999	70.480110168 SER 41	-0.1700 18
HB1	28.957101822	24.401222229	69.786743164 SER 41	0.1000 19
HB2	29.657680511	26.030597687	69.845893860 SER 41	0.1000 20
OG	30.284814835	24.713315964	71.339111328 SER 41	-0.1800 21
HG	31.027490616	24.448732376	70.785003662 SER 41	0.3500 22
N	28.904022217	26.617259979	73.466476440 GLY 42	-0.5000 23
CA	29.236711273	27.639400482	74.497131348 GLY 42	0.0200 24
HN	29.140472412	25.626163483	73.587532043 GLY 42	0.2800 25
HA1	28.567264557	28.519987106	74.394309998 GLY 42	0.1000 26
HA2	28.949186325	27.329663849	75.483924866 GLY 42	0.1000 27
C	30.728670120	28.040773392	74.587509155 GLY 42	0.1800 28
O	31.522300720	27.171119690	74.961143494 GLY 42	-0.1800 29
N	31.175983429	29.296203613	74.282577515 PRO 43	-0.4200 30
CA	32.627410889	29.612504959	74.140579224 PRO 43	0.0600 31
HA	33.153442383	28.731788635	73.723632813 PRO 43	0.1000 32
CO	30.293356750	30.374078751	73.784042358 PRO 43	0.0600 33
HB1	29.605636597	30.735929489	74.571166992 PRO 43	0.1000 34
HB2	29.683467865	30.026647568	72.928161621 PRO 43	0.1000 35
C	33.389945984	30.112844467	75.429031372 PRO 43	0.1800 36
O	32.754360199	30.681560516	76.327354431 PRO 43	-0.1800 37
CB	32.565906525	30.710325241	73.057388306 PRO 43	-0.2000 38
HB1	33.449081421	31.378034592	73.055488586 PRO 43	0.1000 39
HB2	32.524932861	30.247560501	72.051818848 PRO 43	0.1000 40
OG	31.263490677	31.466632843	73.332626343 PRO 43	-0.2000 41
HG1	31.413110733	32.204200745	74.146759033 PRO 43	0.1000 42
HG2	30.894020081	32.022109985	72.450286865 PRO 43	0.1000 43
N	34.754848480	30.015562057	75.523460388 PRO 44	-0.4200 44
CA	35.553565979	30.763086319	76.536285400 PRO 44	0.0600 45
HA	35.083564758	30.695350647	77.536567688 PRO 44	0.1000 46
CO	35.574893951	29.135835648	74.665214539 PRO 44	0.0600 47
HB1	35.471595764	29.373666763	73.588935852 PRO 44	0.1000 48
HB2	35.281650543	28.076414108	74.807399935 PRO 44	0.1000 49
C	35.747509460	32.265411377	76.141113281 PRO 44	0.1800 50
O	36.544441223	32.599441528	75.238464355 PRO 44	-0.1800 51
CB	36.849227905	29.927103043	76.567779541 PRO 44	-0.2000 52
HB1	37.732776642	30.502979279	76.899009705 PRO 44	0.1000 53

* Нумерация аминокислот смещена минимально на 6 по отношению к последовательности 1

HB2	36.711722687	29.095384598	77.239811069	PRO	44	n	0.1000	54
CG	37.005489349	29.169808197	75.152618408	PRO	44	c2	-0.2000	55
HG1	37.502185822	30.119005203	74.534158020	PRO	44	n	0.1000	56
HG2	37.625408173	28.451385498	75.115615645	PRO	44	n	0.1000	57
N	35.047088623	31.173435211	76.816978455	ALA	45	n	-0.5000	58
CA	35.011333466	34.609920502	76.449218750	ALA	45	ca	0.1200	59
HN	34.471405029	32.798248291	77.590728760	ALA	45	hn	0.2800	60
HA	35.065180096	34.699813843	75.343650818	ALA	45	h	0.1000	61
C	36.187728882	35.414947510	77.090148926	ALA	45	c'	0.3800	62
O	36.133388519	35.819305420	78.255142212	ALA	45	o'	-0.3800	63
CB	33.615478516	35.135440826	76.831176758	ALA	45	c3	-0.3000	64
HB1	33.490375519	36.187480927	76.517280579	ALA	45	h	0.1000	65
HB2	32.811222076	34.556259155	76.338432312	ALA	45	h	0.1000	66
HB3	33.433517456	35.098365784	77.922419575	ALA	45	h	0.1000	67
N	37.264499664	35.613868713	76.306388855	ALA	46	n	-0.5000	68
HN	37.248832703	35.072978973	75.433502197	ALA	46	hn	0.2800	69
CA	38.503662109	36.298694611	76.764076233	ALA	46	ca	0.1200	70
HA	38.303600311	36.883266449	77.688095093	ALA	46	h	0.1000	71
C	39.082061768	37.273509979	75.687866211	ALA	46	c'	0.3800	72
O	38.951850891	37.052509308	74.481193542	ALA	46	o'	-0.3800	73
CB	39.509185791	35.179004669	77.103065491	ALA	46	c3	-0.3000	74
HB1	40.441535950	35.582756042	77.535072327	ALA	46	h	0.1000	75
HB2	39.106670380	34.460605621	77.839447021	ALA	46	h	0.1000	76
HB3	39.780502319	34.597728729	76.205062866	ALA	46	h	0.1000	77
N	39.768814087	38.344066620	76.133750916	ALA	47	n	-0.5000	78
CA	40.322643280	39.391151428	75.225708008	ALA	47	ca	0.1200	79
HN	39.783836365	38.455593109	77.149337769	ALA	47	hn	0.2800	80
HA	39.932807922	39.265201569	74.196365356	ALA	47	h	0.1000	81
C	41.900882721	39.401374817	75.126907349	ALA	47	c'	0.3800	82
O	42.538444519	40.171451569	75.854652405	ALA	47	o'	-0.3800	83
CB	39.728843689	40.731719971	75.714279175	ALA	47	c3	-0.3000	84
HB1	40.043342590	41.567916870	75.059875488	ALA	47	h	0.1000	85
HB2	38.621978760	40.726497650	75.711242676	ALA	47	h	0.1000	86
HB3	40.062076569	40.987442017	76.739311218	ALA	47	h	0.1000	87
N	42.578651428	38.603939056	74.242019653	PRO	48	n	-0.4200	88
CA	44.052474976	38.702857971	74.013595581	PRO	48	ca	0.0600	89
HA	44.576034546	38.850185394	74.977058411	PRO	48	h	0.1000	90
CD	41.956359863	37.474979401	73.520225525	PRO	48	c2	0.0600	91
HD1	41.114963531	37.788272858	72.872795105	PRO	48	h	0.1000	92
HD2	41.576156616	36.723918915	74.239135742	PRO	48	h	0.1000	93
C	44.493458344	39.820354462	73.002609253	PRO	48	c'	0.3800	94
O	43.782276154	40.131282806	72.040626526	PRO	48	o'	-0.3800	95
CB	44.356296539	37.289741516	73.4797736328	PRO	48	c2	-0.2000	96
HB1	45.273612976	37.234390259	72.865592957	PRO	48	h	0.1000	97
HB2	44.513816833	36.591526031	74.322021484	PRO	48	h	0.1000	98
CG	43.102409363	36.884414673	72.700988770	PRO	48	c2	-0.2000	99
HG1	43.119277954	37.331111908	71.685241699	PRO	48	h	0.1000	100
HG2	43.010280609	35.788948059	72.572326660	PRO	48	h	0.1000	101
N	45.709659762	40.366821289	73.185493469	GLY	49	n	-0.5000	102
CA	46.317604065	41.332912445	72.214889526	GLY	49	ca	0.0200	103
HN	46.169986725	40.089691162	74.058357239	GLY	49	hn	0.2800	104
HA1	45.654991150	41.537052155	71.351181030	GLY	49	h	0.1000	105
HA2	46.406318665	42.313266754	72.719123840	GLY	49	h	0.1000	106
C	47.710880280	40.963481903	71.654007476	GLY	49	c'	0.3800	107
O	48.630664825	41.772521973	71.754951477	GLY	49	o'	-0.3800	108
N	47.830738068	39.763301849	71.063682556	HIS	50	n	-0.5000	109
HN	46.918842316	39.110573578	70.943237305	HIS	50	hn	0.2800	110
CA	49.045799255	39.210880280	70.375061035	HIS	50	ca	0.1200	111
HA	49.315334320	38.320884705	70.972137451	HIS	50	h	0.1000	112
C	50.433021545	39.981941223	70.267852783	HIS	50	c'	0.3800	113
O	50.773132324	40.456230164	69.178672791	HIS	50	o'	-0.3800	114

CD	48.558776855	38.590164165	69.024101257	HIS	50	c2	-0.2000	115
HB1	49.390335083	38.009521484	68.577232361	HIS	50	h	0.1000	116
HB2	47.792594910	37.817192078	69.227310181	HIS	50	h	0.1000	117
CG	47.997627258	39.545143127	67.956726074	HIS	50	c5	0.1000	118
ND1	46.669281006	39.956676483	67.918121338	HIS	50	np	-0.4200	119
CE1	46.730144501	40.789539337	66.829002380	HIS	50	c5	0.2700	120
NE2	47.911670685	40.950614929	66.152328491	HIS	50	np	-0.5000	121
CD2	48.729324341	40.126430511	66.904235840	HIS	50	c5	0.0100	122
HE1	45.843067169	41.327060699	66.517631531	HIS	50	h	0.1300	123
HE2	48.138290405	41.548683167	65.349815369	HIS	50	hn	0.2800	124
HD2	49.789726257	39.981491089	66.738136292	HIS	50	h	0.1300	125
N	51.307849884	40.071182251	71.317932129	PRO	51	n	-0.4200	126
CA	52.692558289	40.596851349	71.184913635	PRO	51	ca	0.0600	127
HA	52.742668152	41.390510559	70.412712097	PRO	51	h	0.1000	128
CD	50.980678558	39.703777313	72.706970215	PRO	51	c2	0.0600	129
HD1	50.998199463	38.605384827	72.818397522	PRO	51	h	0.1000	130
HD2	49.987606049	40.071315765	73.019950867	PRO	51	h	0.1000	131
C	53.739063263	39.471630096	70.880722046	PRO	51	c'	0.3800	132
O	53.708900452	38.394466400	71.488830566	PRO	51	o'	-0.3800	133
CB	52.868911743	41.240936279	72.572486877	PRO	51	c2	-0.2000	134
HB1	53.929355621	41.364253998	72.864852905	PRO	51	h	0.1000	135
HB2	52.429229736	42.258647919	72.565872192	PRO	51	h	0.1000	136
CG	52.087848663	40.349472046	73.547019958	PRO	51	c2	-0.2000	137
HG1	52.750400543	39.566276550	73.963310242	PRO	51	h	0.1000	138
HG2	51.686916351	40.923263550	74.403717041	PRO	51	h	0.1000	139
N	54.676445007	39.726749420	69.946899414	LEU	52	n	-0.5000	140
CA	55.768096924	38.764469147	69.570259094	LEU	52	ca	0.1200	141
HN	54.573549325	40.637013482	69.488586426	LEU	52	hn	0.2800	142
HA	56.414031982	39.325927734	68.869346619	LEU	52	h	0.1000	143
C	55.281269073	37.540004730	68.718757629	LEU	52	c'	0.3800	144
O	55.654800415	37.411125183	67.550910950	LEU	52	o'	-0.3800	145
CB	56.713882446	38.354763031	70.751991272	LEU	52	c2	-0.2000	146
HB1	56.125553131	37.737205505	71.456863403	LEU	52	h	0.1000	147
HB2	57.488136292	37.658962250	70.374801636	LEU	52	h	0.1000	148
CG	57.411731720	39.487998962	71.552589417	LEU	52	c1	-0.1000	149
HG	56.652648926	40.244640350	71.8344617615	LEU	52	h	0.1000	150
CD1	58.010108948	38.936943054	72.859535217	LEU	52	c3	-0.3000	151
HD11	58.475826263	39.735752106	73.467353821	LEU	52	h	0.1000	152
HD12	57.236072540	38.469894409	73.497505188	LEU	52	h	0.1000	153
HD13	58.787303925	38.171112061	72.675750732	LEU	52	h	0.1000	154
CD2	58.517623901	40.187110901	70.742630605	LEU	52	c3	-0.3000	155
HD21	58.993679047	41.001243591	71.321037292	LEU	52	h	0.1000	156
HD22	59.321178436	39.487018585	70.445312500	LEU	52	h	0.1000	157
HD23	58.125030518	40.647811890	69.818283081	LEU	52	h	0.1000	158
N	54.475013733	36.643035889	69.315246582	ALA	53	n	-0.5000	159
CA	53.896503448	35.451416016	68.639259338	ALA	53	ca	0.1200	160
HN	54.100524902	37.007503510	70.205230713	ALA	53	hn	0.2800	161
HA	53.553531647	35.773445129	67.634338379	ALA	53	h	0.1000	162
C	52.602260590	34.908508301	69.353744507	ALA	53	c'	0.3800	163
O	51.589202881	34.828308105	68.650024414	ALA	53	o'	-0.3800	164
CB	54.970031738	34.364234924	68.394615173	ALA	53	c3	-0.3000	165
HB1	54.534633636	33.449993134	67.949813843	ALA	53	h	0.1000	166
HB2	55.742454529	34.720954895	67.688003540	ALA	53	h	0.1000	167
HB3	55.500236511	34.068145752	69.316299438	ALA	53	h	0.1000	168
N	52.528438568	34.519321442	70.670852661	PRO	54	n	-0.4200	169
CA	51.288402557	33.944232941	71.268875122	PRO	54	ca	0.0600	170
HA	50.860397339	33.194515228	70.573081970	PRO	54	h	0.1000	171
CD	53.678298950	34.511732910	71.601814270	PRO	54	c2	0.0600	172
HD1	54.146690369	35.509193420	71.717323303	PRO	54	h	0.1000	173
HD2	54.456859589	33.804187775	71.264945984	PRO	54	h	0.1000	174
C	50.163700104	34.973747253	71.631500244	PRO	54	c'	0.3800	175

O	50.381851156	36.180335425	71.709472650	PRO	54	o'	-0.1300	176
CB	51.868888855	33.209735870	72.497810364	PRO	54	c2	-0.2000	177
HB1	51.140216827	33.071922302	73.319641113	PRO	54	h	0.1000	178
HB2	52.201725006	32.193626404	72.207275391	PRO	54	h	0.1000	179
CG	53.074722290	34.047100067	72.925216675	PRO	54	c2	-0.2000	180
HG1	52.742275238	34.920612335	73.520271301	PRO	54	h	0.1000	181
HG2	53.794158936	33.482940674	73.547462463	PRO	54	h	0.1000	182
N	48.950717926	34.451553345	71.882225037	GLY	55	n	-0.5000	183
CA	47.799011230	35.264900208	72.354187012	GLY	55	cq	0.0200	184
HN	48.913242340	33.427757263	71.833122253	GLY	55	hn	0.2800	185
HA1	47.829734802	36.291049957	71.943481445	GLY	55	h	0.1000	186
HA2	46.873668671	34.838825226	71.925086975	GLY	55	h	0.1000	187
C	47.624210358	35.262092590	73.898422241	GLY	55	c'	0.3800	188
O	47.184692383	34.228916168	74.411125183	GLY	55	o'	-0.3800	189
N	47.910079956	36.345748901	74.679351807	PRO	56	n	-0.4200	190
CA	47.789894104	36.319248139	76.162750244	PRO	56	ca	0.0600	191
HA	48.177116394	35.361667833	76.567420959	PRO	56	h	0.1000	192
CD	48.602729797	37.547939301	74.184982300	PRO	56	c2	0.0600	193
HD1	48.046642303	38.065422058	73.380996704	PRO	56	h	0.1000	194
HD2	49.595470428	37.261718750	73.794586182	PRO	56	h	0.1000	195
C	46.336736450	36.529109955	76.663719177	PRO	56	c'	0.3800	196
O	45.857757568	37.657508850	76.842826843	PRO	56	o'	-0.3800	197
CB	48.777050018	37.430667877	76.578651428	PRO	56	c2	-0.2000	198
HB1	48.524734497	37.898471832	77.549873352	PRO	56	h	0.1000	199
HB2	49.795513153	37.009433746	76.691307068	PRO	56	h	0.1000	200
CG	48.752750397	38.431644440	75.422836304	PRO	56	c2	-0.2000	201
HG1	47.879917145	39.105598450	75.522354126	PRO	56	h	0.1000	202
HG2	49.655212402	39.069591522	75.391311646	PRO	56	h	0.1000	203
N	45.616943359	35.415058136	76.897827148	HIS	57	n	-0.5000	204
HN	46.014194489	34.579135895	76.450401306	HIS	57	hn	0.2800	205
CA	44.212440491	35.434158325	77.393867493	HIS	57	ca	0.1200	206
HA	43.635601044	36.135776520	76.762809753	HIS	57	h	0.1000	207
C	44.146274567	35.882919312	78.904235840	HIS	57	c'	0.3800	208
O	44.718753815	35.174930573	79.742973328	HIS	57	o'	-0.3800	209
CB	43.577262878	34.025093079	77.198188782	HIS	57	c2	-0.2000	210
HB1	44.242053986	33.250709534	77.626487732	HIS	57	h	0.1000	211
HB2	42.665222168	33.964206696	77.822631836	HIS	57	h	0.1000	212
CG	43.190551758	33.606594086	75.770996094	HIS	57	c5	0.1000	213
ND1	44.009815216	33.724720001	74.654800415	HIS	57	np	-0.4200	214
CE1	43.220783234	33.103317361	73.724327087	HIS	57	c5	0.2700	215
ME2	42.000507355	32.603866577	74.087806702	HIS	57	np	-0.5000	216
CD2	42.008693695	32.921348572	75.433784485	HIS	57	c5	0.0100	217
HG1	43.579235077	32.995296478	72.708923340	HIS	57	h	0.1300	218
HG2	41.324546814	32.061363220	73.538429360	HIS	57	hn	0.2800	219
HD2	41.238662720	32.638732910	76.138023376	HIS	57	h	0.1300	220
N	43.493415833	37.014366150	79.314620972	PRO	58	n	-0.4200	221
CA	43.576023102	37.521991730	80.713331042	PRO	58	ca	0.0600	222
HA	44.640773773	37.575752258	81.019523621	PRO	58	h	0.1000	223
CD	42.828823090	37.960189819	78.395561218	PRO	58	c2	0.0600	224
HD1	42.088195801	37.471439362	77.735382080	PRO	58	h	0.1000	225
HD2	43.573791504	38.467678070	77.749885559	PRO	58	h	0.1000	226
C	42.782455444	36.660888672	81.747703552	PRO	58	o'	0.3800	227
O	41.546211243	36.662284851	81.766304016	PRO	58	o'	-0.3800	228
CB	43.067096710	38.972381592	80.563407898	PRO	58	c2	-0.2000	229
HB1	42.553604126	39.355644226	81.465919495	PRO	58	h	0.1000	230
HB2	43.922830310	39.652961731	80.382720947	PRO	58	h	0.1000	231
CG	42.156223297	38.958541870	79.333923340	PRO	58	c2	-0.2000	232
HG1	41.146640778	38.599040985	79.611282349	PRO	58	h	0.1000	233
HG2	42.036239624	39.954802368	78.871780396	PRO	58	h	0.1000	234
N	43.511478424	35.934528351	82.617271423	ALA	59	n	-0.5000	235
HN	44.509765625	35.905010223	82.386589050	ALA	59	hn	0.2800	236

CA	42.9113761139	34.928112030	81.544029236	ALA	59	ca	0.1200	237
HA	42.154701233	34.341350555	82.987910298	ALA	59	h	0.1000	238
C	42.181308746	35.481468201	84.821502686	ALA	59	c'	0.3800	239
O	42.459964752	35.112228394	85.965652466	ALA	59	o'	-0.3800	240
CB	44.063701630	33.948829651	83.858291626	ALA	59	c3	-0.3000	241
HB1	43.708641052	33.104522705	84.478195190	ALA	59	h	0.1000	242
HB2	44.502014160	33.503505707	82.944122314	ALA	59	h	0.1000	243
HB3	44.882900238	34.413902740	84.422813416	ALA	59	h	0.1000	244
N	41.178901672	36.333106995	84.577079773	ALA	60	n	-0.5000	245
HN	41.112052917	36.562049866	83.573013306	ALA	60	hn	0.2800	246
CA	40.189502716	36.803413391	85.578857422	ALA	60	ca	0.1200	247
HA	40.008514404	35.981742859	86.302818298	ALA	60	h	0.1000	248
C	38.811019897	37.037807465	84.860046387	ALA	60	c'	0.3800	249
O	37.881835938	36.301105499	85.205276489	ALA	60	o'	-0.3800	250
CB	40.746566772	37.985549927	86.401333782	ALA	60	c3	-0.3000	251
HB1	39.997776031	38.372333527	87.116531372	ALA	60	h	0.1000	252
HB2	41.624504089	37.670467377	86.996170044	ALA	60	h	0.1000	253
HB3	41.079444885	38.830841064	85.774902344	ALA	60	h	0.1000	254
N	38.609931946	37.922218323	83.826889038	PRO	61	n	-0.4200	255
CA	37.398490906	37.873073578	82.950836182	PRO	61	ca	0.0600	256
HA	36.485267619	37.839759827	83.576164246	PRO	61	h	0.1000	257
CD	39.552070618	39.001556396	83.460945129	PRO	61	c2	0.0600	258
HD1	40.590957642	38.653537750	83.311111450	PRO	61	h	0.1000	259
HD2	39.564543751	39.780744660	84.247795105	PRO	61	h	0.1000	260
C	37.256782532	36.700027466	81.909835615	PRO	61	c'	0.3800	261
O	36.243316650	36.657413483	81.209106445	PRO	61	o'	-0.3800	262
CB	37.477272024	39.256717682	82.271400452	PRO	61	c2	-0.2000	263
HB1	36.964195251	39.398637390	81.390786743	PRO	61	h	0.1000	264
HB2	36.981357574	40.016944885	82.906776428	PRO	61	h	0.1000	265
CG	38.972518921	39.562260492	82.163795471	PRO	61	c2	-0.2000	266
HG1	39.409160614	39.034259796	81.293624878	PRO	61	h	0.1000	267
HG2	39.183399200	40.640045166	82.032295227	PRO	61	h	0.1000	268
N	38.213741302	35.753643036	81.804443359	SER	62	n	-0.5000	269
CA	38.144962311	34.600208282	80.863403320	SER	62	ca	0.1200	270
HN	39.009967804	35.895751953	82.434890747	SER	62	hn	0.2800	271
HA	37.892338726	34.983673096	79.856529236	SER	62	h	0.1000	272
C	37.085021973	33.524326324	81.273231506	SER	62	c'	0.3800	273
O	37.382484436	32.625568760	82.070343018	SER	62	o'	-0.3800	274
CB	39.569152832	33.994393213	80.760513306	SER	62	c2	-0.1700	275
HB1	39.601100922	33.242229462	79.949050903	SER	62	h	0.1000	276
HB2	40.317050934	34.759819031	80.475799861	SER	62	h	0.1000	277
OG	39.958038330	33.367904663	81.986091614	SER	62	oh	-0.3800	278
HG	39.157286709	32.928077698	82.316406250	SER	62	bo	0.3500	279
N	35.853912354	33.643447876	80.748901367	SER	63	n	-0.5000	280
CA	34.681579590	32.893772125	81.280097961	SER	63	ca	0.1200	281
HN	35.734226227	34.507610321	80.200576782	SER	63	hn	0.2800	282
HA	34.978878021	32.281963348	82.158424377	SER	63	h	0.1000	283
C	34.028987885	31.963005066	80.214485168	SER	63	c'	0.3800	284
O	33.624388834	32.404701233	79.114857178	SER	63	o'	-0.3800	285
CB	33.674541473	33.937458038	81.815757751	SER	63	c2	-0.1700	286
HB1	34.172107697	34.614356995	82.538948059	SER	63	h	0.1000	287
HB2	33.303077698	34.594402313	81.003784180	SER	63	h	0.1000	288
OG	32.576236725	33.301517487	82.471984863	SER	63	oh	-0.3800	289
HG	32.084590912	32.806625366	81.807708740	SER	63	bo	0.3500	290
N	33.852622986	30.677625656	80.556045532	TRP	64	n	-0.5000	291
CA	33.070865631	29.709415436	79.732810974	TRP	64	ca	0.1200	292
HN	34.153343201	30.435497284	81.506057739	TRP	64	hn	0.2800	293
HA	33.375720978	29.840501785	78.676765442	TRP	64	h	0.1000	294
C	31.526346207	29.958730698	79.816453026	TRP	64	c'	0.3800	295
O	30.936735153	29.911306381	80.900970459	TRP	64	o'	-0.3800	296
CB	33.498836517	28.253648758	80.086425781	TRP	64	c2	-0.2000	297

MB1	32.936897278	27.550512114	79.443245483	TRP	64 h	0.1000	298
MB2	34.548812866	26.110004425	79.767990112	TRP	64 h	0.1000	299
CG	33.372638702	27.788063049	81.551361084	TRP	64 c5	0.0000	300
CD1	32.236022949	27.198472977	82.145193372	TRP	64 c5	0.0100	301
HE1	32.442039490	26.926628113	83.513259888	TRP	64 np	-0.5000	302
CE2	33.734771729	27.365074158	83.750877380	TRP	64 c5	0.1100	303
CD2	34.313194275	27.885219574	82.565856934	TRP	64 c5	0.0000	304
HD1	31.308589935	27.011001587	81.622375488	TRP	64 h	0.1000	305
HE1	31.781488419	26.532098770	84.192108154	TRP	64 hn	0.2800	306
CE3	35.633460999	28.410655975	82.581642151	TRP	64 cp	-0.1000	307
HE3	36.086208344	28.812973022	81.686943054	TRP	64 h	0.1000	308
CZ3	36.338203430	28.401332855	83.786201477	TRP	64 cp	-0.1000	309
HZ3	37.342418671	28.800062180	83.616780090	TRP	64 h	0.1000	310
CH2	35.766292572	27.887487411	84.956939697	TRP	64 cp	-0.1000	311
HM2	36.336753845	27.895225525	85.875114441	TRP	64 h	0.1000	312
CZ2	34.469055176	27.367534637	84.956939909	TRP	64 cp	-0.1000	313
HZ2	34.033626556	26.978828430	85.868453979	TRP	64 h	0.1000	314
N	30.884126663	30.253189087	78.672058105	GLY	65 n	-0.5000	315
CA	29.433704376	30.582933426	78.625785828	GLY	65 cg	0.0200	316
HN	31.490442276	30.324733827	77.837860107	GLY	65 hn	0.2800	317
HA1	29.049486160	30.927183151	79.604759216	GLY	65 h	0.1000	318
HA2	29.301883698	31.462034225	77.967575073	GLY	65 h	0.1000	319
C	28.566276550	29.436250687	78.049335453	GLY	65 c'	0.3800	320
O	28.476503372	29.383417130	76.820671082	GLY	65 o'	-0.3800	321
N	27.919076920	28.520057678	78.830680847	PRO	66 n	-0.4200	322
CA	27.254581451	27.307062149	78.266265869	PRO	66 ca	0.0600	323
HA	28.007204056	26.749544144	77.674018860	PRO	66 h	0.1000	324
CD	27.931732178	28.547025681	80.307373047	PRO	66 c2	0.0600	325
HD1	27.674114227	29.538535263	80.727989197	PRO	66 h	0.1000	326
HD2	28.930458069	28.264209747	80.693565369	PRO	66 h	0.1000	327
C	25.991449356	27.540506363	77.367637634	PRO	66 c'	0.3800	328
O	25.234470367	28.498056412	77.550445557	PRO	66 o'	-0.3800	329
CB	26.947065353	26.487516403	79.540168762	PRO	66 c2	-0.2000	330
HB1	26.021696091	25.883453369	79.467781067	PRO	66 h	0.1000	331
HB2	27.765922546	25.768106461	79.730659485	PRO	66 h	0.1000	332
CG	26.879997253	27.505201340	80.680580139	PRO	66 c2	-0.2000	333
HG1	25.878761292	27.974979401	80.712356567	PRO	66 h	0.1000	334
HG2	27.057765961	27.053478241	81.674545288	PRO	66 h	0.1000	335
N	25.764133453	26.624628067	76.406608582	CYS	67 n	-0.5000	336
CA	24.578670502	26.665664673	75.512832642	CYS	67 ca	0.1200	337
HN	26.474828720	25.893448783	76.320098877	CYS	67 hn	0.2800	338
HA	24.437746048	27.701400757	75.152099609	CYS	67 h	0.1000	339
C	23.256376266	26.130277634	76.174392700	CYS	67 c'	0.3800	340
O	23.219629288	24.940492630	76.516906738	CYS	67 o'	-0.3800	341
CB	24.900175095	25.815908432	74.260444641	CYS	67 c2	-0.3000	342
HB1	25.807971954	26.178848267	73.749794006	CYS	67 h	0.1000	343
HB2	25.105169296	24.761932373	74.532623291	CYS	67 h	0.1000	344
SG	23.472158432	25.844451904	73.133270264	CYS	67 s1	0.1000	345
N	22.124137878	26.895683289	76.264381409	PRO	68 n	-0.4200	346
CA	20.786550522	26.297697067	76.529830933	PRO	68 ca	0.0600	347
HA	20.877141853	25.506265640	77.300382886	PRO	68 h	0.1000	348
CD	22.161409378	28.364057541	76.432929993	PRO	68 c2	0.0600	349
HD1	22.628620148	28.901371002	75.585960388	PRO	68 h	0.1000	350
HD2	22.732339859	28.631174088	77.345329285	PRO	68 h	0.1000	351
C	20.190311432	25.593938828	75.255737305	PRO	68 c'	0.3800	352
O	20.566764832	24.451507566	74.984413147	PRO	68 o'	-0.3800	353
CB	20.033475876	27.483673096	77.173645020	PRO	68 c2	-0.2000	354
HB1	18.940057755	27.449979782	77.017181396	PRO	68 h	0.1000	355
HB2	20.183664322	27.458950043	78.271354675	PRO	68 h	0.1000	356
CG	20.687761307	28.746078491	76.604209900	PRO	68 c2	-0.2000	357
HG1	20.214010696	29.017192841	75.632743835	PRO	68 h	0.1000	358

HG2	20.559530258	29.623554230	77.265640259	PRO	68	h	0.1000	359
H	19.297069550	26.226366043	74.460205078	ARG+	69	n	-0.5000	360
CA	18.727945328	25.594141006	73.229873657	ARG+	69	ca	0.1200	361
HN	18.899488449	27.074655533	74.874603271	ARG+	69	hn	0.2800	362
HA	19.468439102	24.889890671	72.798027039	ARG+	69	h	0.1000	363
C	18.426181793	26.666866302	72.127845764	ARG+	69	c'	0.3800	364
O	17.302417755	27.170328140	72.057907104	ARG+	69	o'	-0.3800	365
CB	17.487716675	24.741283417	73.645401001	ARG+	69	c2	-0.2000	366
HB1	17.790594101	24.038330078	74.447227478	ARG+	69	h	0.1100	367
HB2	16.742151260	25.409061432	74.119949341	ARG+	69	h	0.1100	368
CG	16.806570053	23.930654526	72.510940552	ARG+	69	c2	-0.2000	369
HG1	16.500089645	24.624885559	71.702163696	ARG+	69	h	0.1300	370
HG2	17.539186478	23.235509872	72.053100586	ARG+	69	h	0.1300	371
CD	15.574311417	23.148860931	73.007453918	ARG+	69	c2	-0.0900	372
HD1	15.890284538	22.374292374	73.738624573	ARG+	69	h	0.1300	373
HD2	14.902976036	23.843069077	73.554016113	ARG+	69	h	0.1300	374
NE	14.865137563	22.521680832	71.855873108	ARG+	69	n1	-0.5000	375
HE	15.293711662	22.507183075	70.926025391	ARG+	69	hn	0.3600	376
CZ	13.645489693	21.980854034	71.902374268	ARG+	69	cr	0.4500	377
NH1	13.127552986	21.522832870	70.798370361	ARG+	69	n2	-0.5000	378
NH11	13.689088821	21.608518600	69.948852539	ARG+	69	hn	0.3600	379
NH12	12.188611031	21.122539520	70.853891318	ARG+	69	hn	0.3600	380
NH2	12.936479568	21.886768341	73.000465393	ARG+	69	n2	-0.5000	381
NH21	12.008401871	21.462900162	72.952354431	ARG+	69	hn	0.3600	382
NH22	13.405644417	22.251142502	73.831558228	ARG+	69	hn	0.3600	383
N	19.430337906	26.966600418	71.273384094	ARG+	70	n	-0.5000	384
CA	19.316965103	27.784976905	70.016807556	ARG+	70	ca	0.1200	385
HN	20.317523956	26.522159576	71.527793884	ARG+	70	hn	0.2800	386
HA	19.139877319	27.013029284	69.241798401	ARG+	70	h	0.1000	387
C	20.690151215	28.397680283	69.573341370	ARG+	70	c'	0.3800	388
O	21.267679214	27.963806152	68.579154968	ARG+	70	o'	-0.3800	389
CB	18.103752136	28.753881454	69.796676636	ARG+	70	c2	-0.2000	390
HB1	18.134477615	29.133897781	68.754875183	ARG+	70	h	0.1100	391
HB2	17.183977127	28.135446548	69.816154460	ARG+	70	h	0.1100	392
CG	17.944366455	29.952959061	70.767364502	ARG+	70	c2	-0.2000	393
HG1	18.201717377	29.630409241	71.795295715	ARG+	70	h	0.1300	394
HG2	18.686578751	30.737589809	70.523498535	ARG+	70	h	0.1300	395
CD	16.516407013	30.528032303	70.757499695	ARG+	70	c2	-0.0900	396
HD1	16.205293655	30.812314987	69.732498169	ARG+	70	h	0.1300	397
HD2	15.804359436	29.724859238	71.041206360	ARG+	70	h	0.1300	398
NE	16.396289825	31.632083893	71.751823425	ARG+	70	n1	-0.5000	399
HE	16.381929398	31.418577194	72.754409790	ARG+	70	hn	0.3600	400
CZ	16.270032883	32.931114197	71.475357086	ARG+	70	cr	0.4500	401
NH1	16.119342804	33.758121490	72.470024109	ARG+	70	n2	-0.5000	402
NH11	16.097789764	33.352241516	73.407394409	ARG+	70	hn	0.3600	403
NH12	16.020824432	34.751869202	72.242614746	ARG+	70	hn	0.3600	404
NH2	16.295974731	33.427280426	70.262794495	ARG+	70	n2	-0.5000	405
NH21	16.191591263	34.436088562	70.142570496	ARG+	70	hn	0.3600	406
NH22	16.439620972	32.732715607	69.527351379	ARG+	70	hn	0.3600	407
N	21.215826039	29.506198883	70.104598999	TYRC	71	n	-0.5000	408
CA	21.492993164	29.961484909	69.319816589	TYRC	71	ca	0.2800	409
HN	22.037544250	29.469250543	71.348724365	TYRC	71	hn	0.1200	410
HA	22.737062225	28.601654053	71.296867371	TYRC	71	h	0.1000	411
C	21.330804443	29.295030594	72.663772583	TYRC	71	c'	0.4100	412
QXT	20.420524597	30.105148315	73.113685608	TYRC	71	o'	-0.3800	413
O	21.522335052	28.107995987	73.273979187	TYRC	71	oh	-0.3800	414
RO	20.994127274	28.000011444	74.066841125	TYRC	71	ho	0.3500	415
CB	22.938613892	30.740638733	71.402084351	TYRC	71	c2	-0.2000	416
HB1	22.321226120	31.652799606	71.283157349	TYRC	71	h	0.1000	417
HB2	23.363500595	30.853305817	72.420455933	TYRC	71	h	0.1000	418
CG	24.110603333	30.760416031	70.402580261	TYRC	71	cp	0.0000	419
CD1	21.933057785	31.274461746	69.111869812	TYRC	71	cp	-0.1000	420
HD1	22.977622986	31.679159164	68.809974670	TYRC	71	h	0.1000	421
CE1	24.985538483	31.264329910	68.201301575	TYRC	71	cp	-0.1000	422
HE1	24.833002090	31.650396347	67.203536987	TYRC	71	h	0.1000	423
CZ	26.227394104	30.757091522	68.577186584	TYRC	71	cp	0.0300	424
OH	27.265848160	30.762763977	67.686424253	TYRC	71	oh	-0.3800	425
HN	26.9666134750	31.154380798	66.863917178	TYRC	71	ho	0.3500	426
CE2	26.415199280	30.251981735	69.859985352	TYRC	71	cp	-0.1000	427
HE2	27.377700806	29.852491379	70.147177014	TYRC	71	h	0.1000	428
CD2	25.360828400	30.253871918	70.770927429	TYRC	71	cp	-0.1000	429
HD2	25.521846771	29.846044540	71.760574341	TYRC	71	h	0.1000	430

Таблица 3

Праймеры, используемые для амплификации последовательностей ДНК

LAG-3 с помощью полимеразной цепной реакции

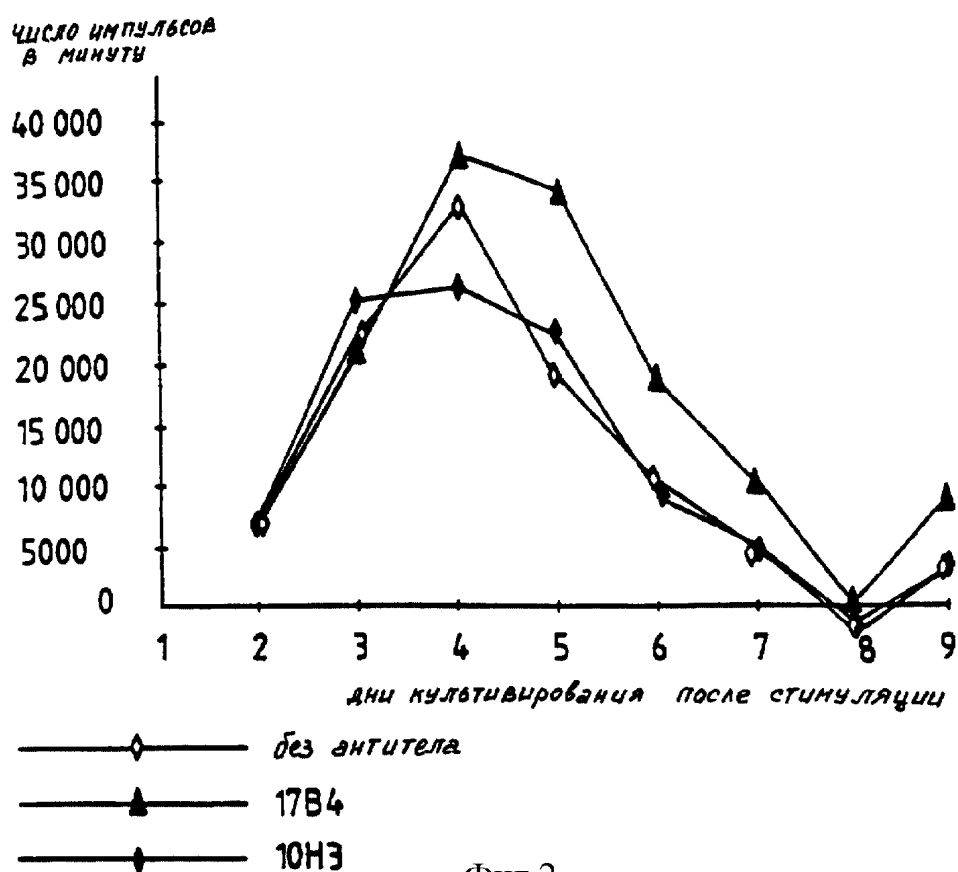
Праймеры, используемые для амплификации ДНК	Кодированный резуль-тирующий субфрагмент, соединенный с субфрагментом Ig
Праймер (5') 5' GCGCCTCGAGGCCAGACCATAGGAGAGATGT 3' сайт нетранслирован- начало прикрепле- ные 5 - последо- трансляции ния вательности Праймер (3') 5' GCGCAGATCTCTCCAGACCCAGAACAGTGAGGTTATACAT 3' сайт конец Д2 прикрепления Bgl II	Lag-3 д1д2 начиная с ли- дерной после- довательности вплоть до ами- ноукислоты 241
Праймер (5) идентичный LAG-3 Д1Д2 Праймер (3) 5 GCGGCAGATCTACCTGGGCTAGACAGCTCTGTGAA 3 сайт конец Д4 прикрепления Bgl II	LAG-3 Д1-Д4 начиная с ли- дерной после- довательности вплоть до ами- ноукислоты 412

Праймеры, используемые для амплификации ДНК-последовательностей
LAG-3 путем полимеразной цепной реакции

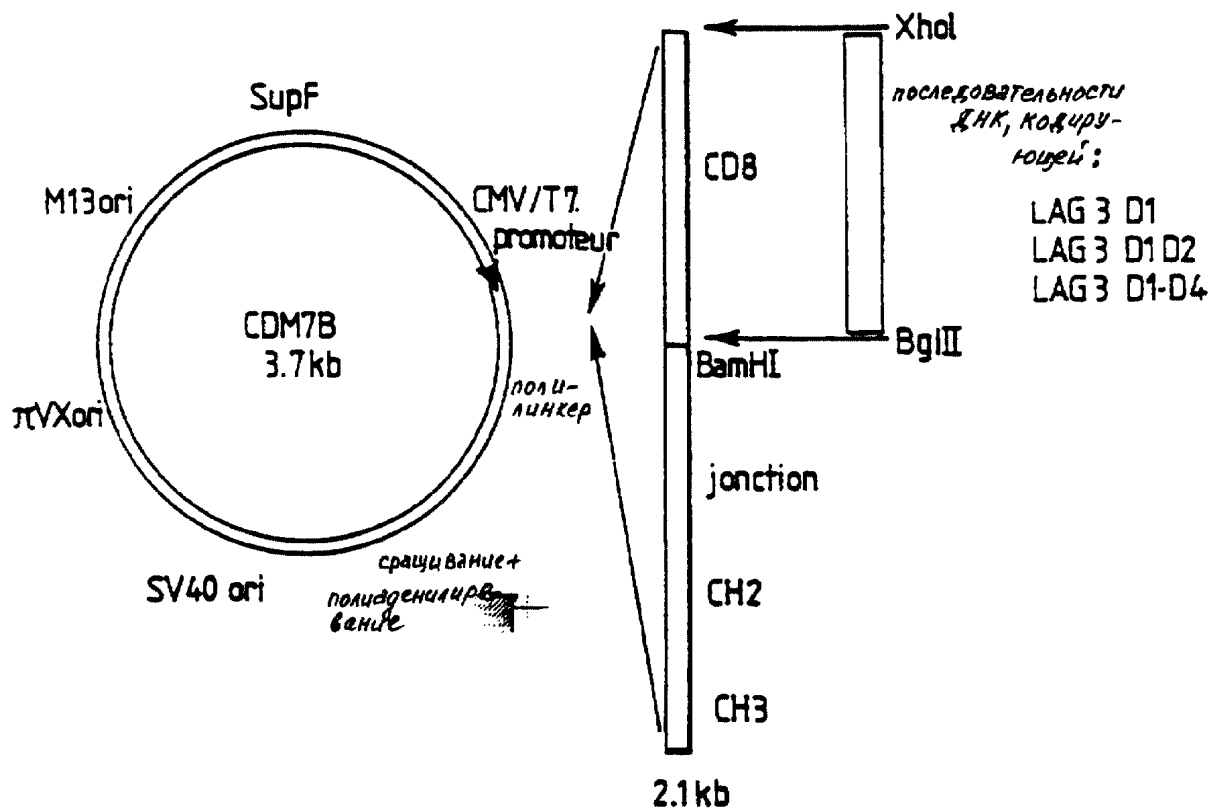
Праймеры, используемые для амплификации ДНК	Кодированный резуль-тирующий субфрагмент
Праймер (5') 5' CGCCGTCGACCGCTGCCCAGACCATAGGAGAGATGTG 3' сайт нетранслирован- начало прикрепле- ные 5 - последо- трансляции ния Sal I вательности Праймер (3') 5' GCGCGTCGACTTACATCGAGGCCTGGCCCAGGCGCAG 3' сайт конец Д1 прикрепления Sal I	Lag-3 Д1 начиная с ли- дерной после- довательности вплоть до ами- ноислоты 149
Праймер (5') идентичный LAG-3 Д1 Праймер (3') 5' GCGCGTCGACTTAACCCAGAACAGTGAGGTTATAC 3' сайт конец Д2 прикрепления Sal I	Lag-3 Д1Д2 начиная с ли- дерной после- довательности вплоть до ами- ноислоты 239
Праймер (5') идентичный LAG-3 Д1 Праймер (3') 5' GCGCGTCGACTTAACCTGGGCTAGACAGCTCTGGTG 3' сайт конец Д4 прикрепления Sal I	LAG-3 Д1-Д4 начиная с ли- дерной после- довательности вплоть до ами- ноислоты 412

Таблица 5

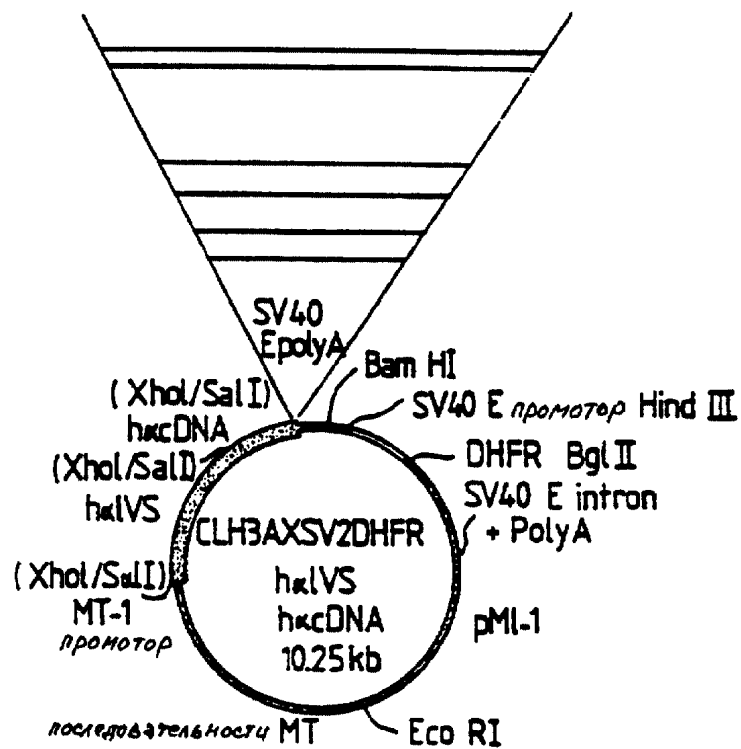
Реагенты	Обнару- жение	Среднее арифметическое флуоресценции	Заключение
-----	ГАН-FITC	0,3	ГАН не интерферирует
LAG-3 Д1Д4 Ig димерный	ГАН-FITC	20,8	Связь CHO/LAG-3 Д1Д2 ингибирует связь LAG-3- Д1Д4 Ig в димерной форме (58 %)
CHO/LAG-3 Д1Д2, затем LAG-3 Д1Д4 Ig в димерной форме	ГАН-FITC	8,5	
LAG-3 Д1Д2 Ig в мономерной форме	ГАН-FITC	62,5	Связь CHO/LAG-3 Д1Д2 ингибирует связь LAG-3 Д1Д2 Ig в мономерной форме (27 %)
CHO/LAG-3 Д1Д2, затем LAG-3 Д1Д2 Ig в мономерной форме	ГАН- FUTC	10,9	



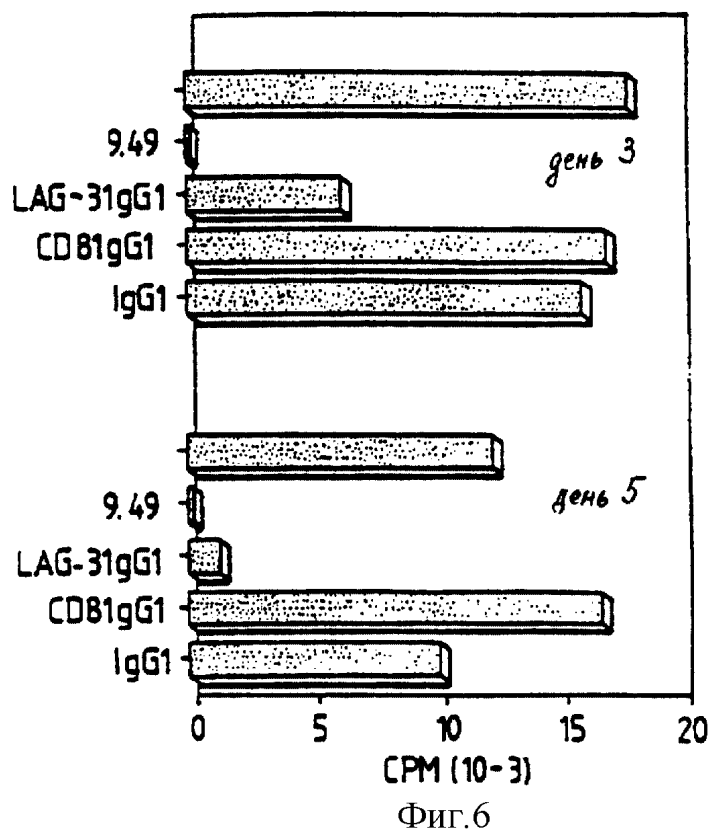
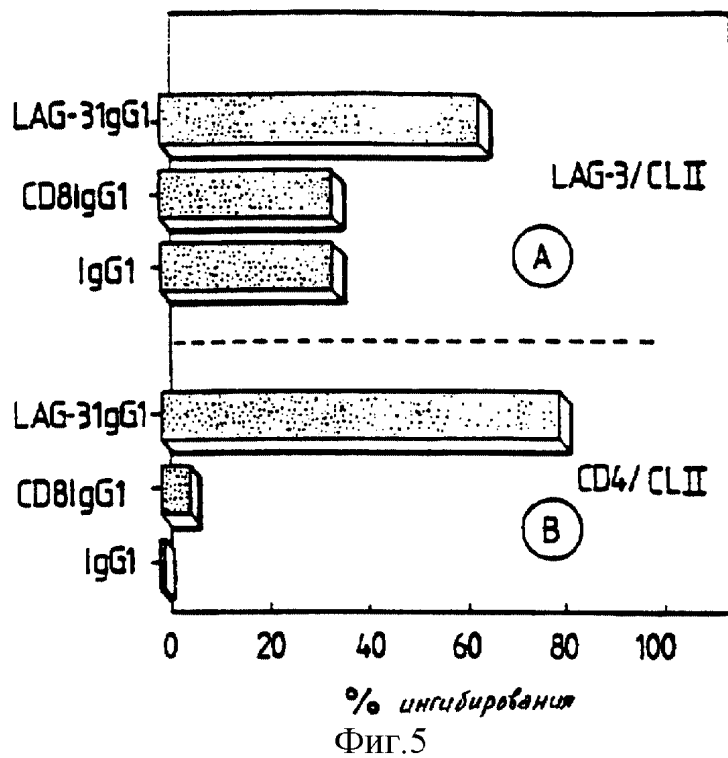
Фиг.2

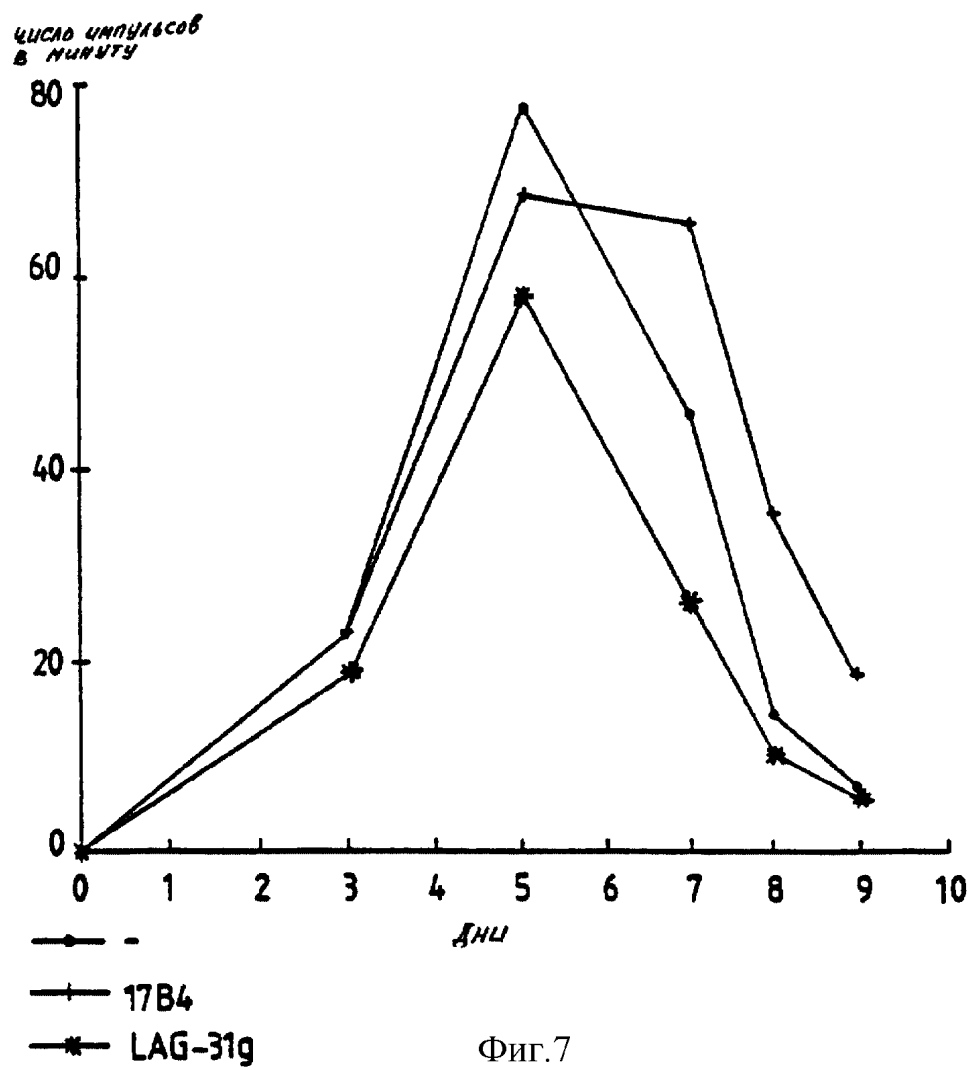


Фиг.3

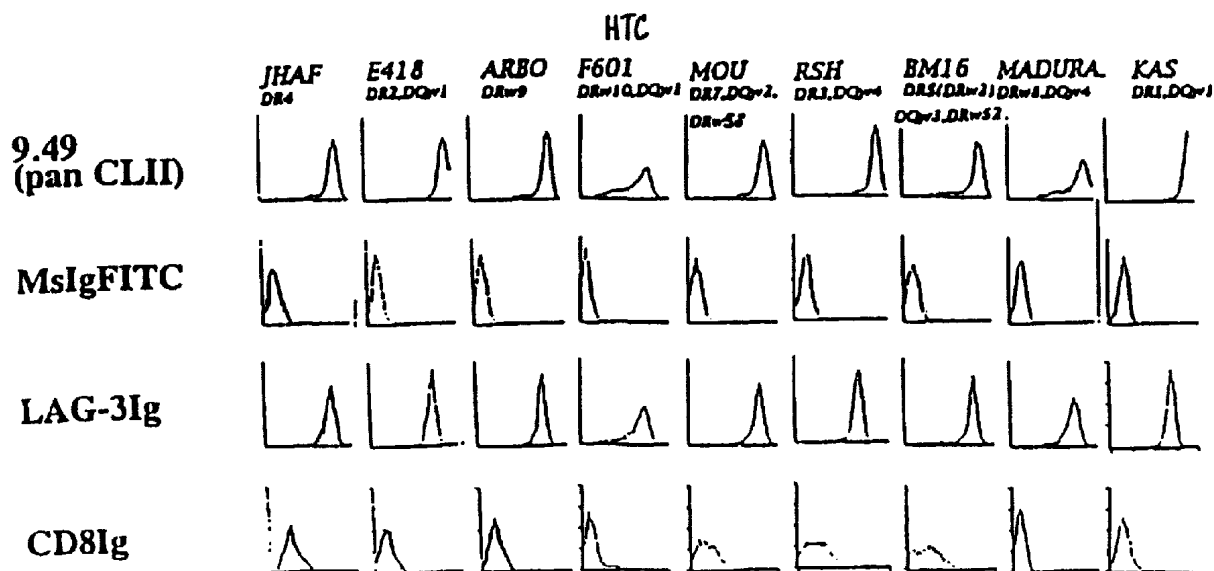
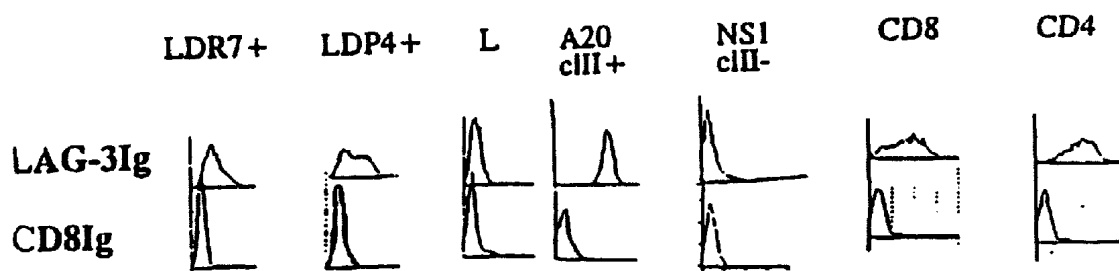


Фиг.4

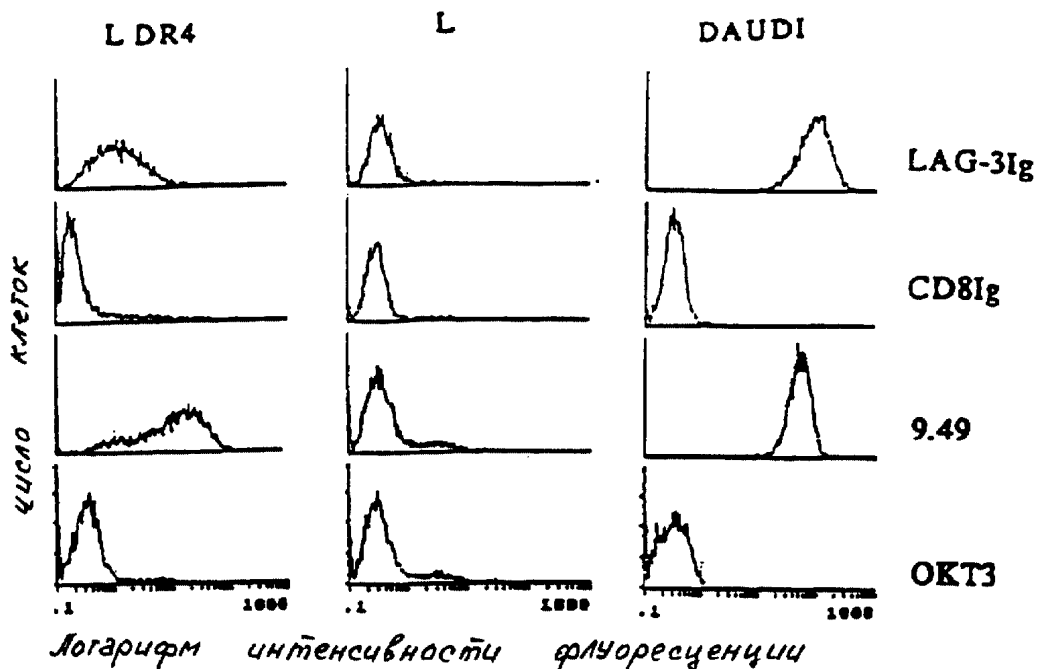




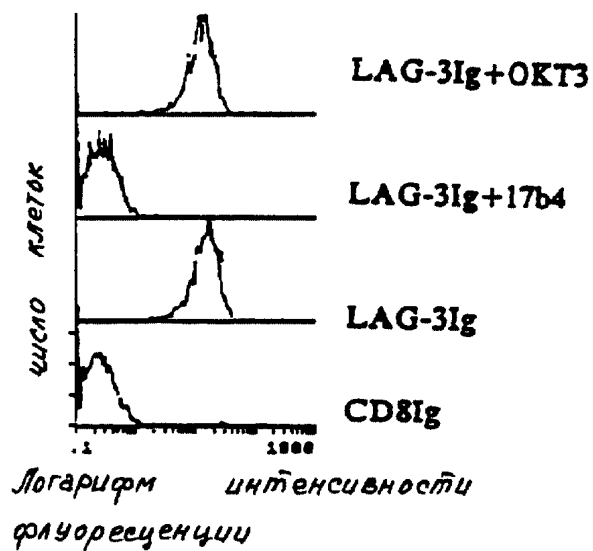
Клетки, экспрессирующие СМН класса II
 человеческие фибробласты мышечные клетки активированные T_H клетки



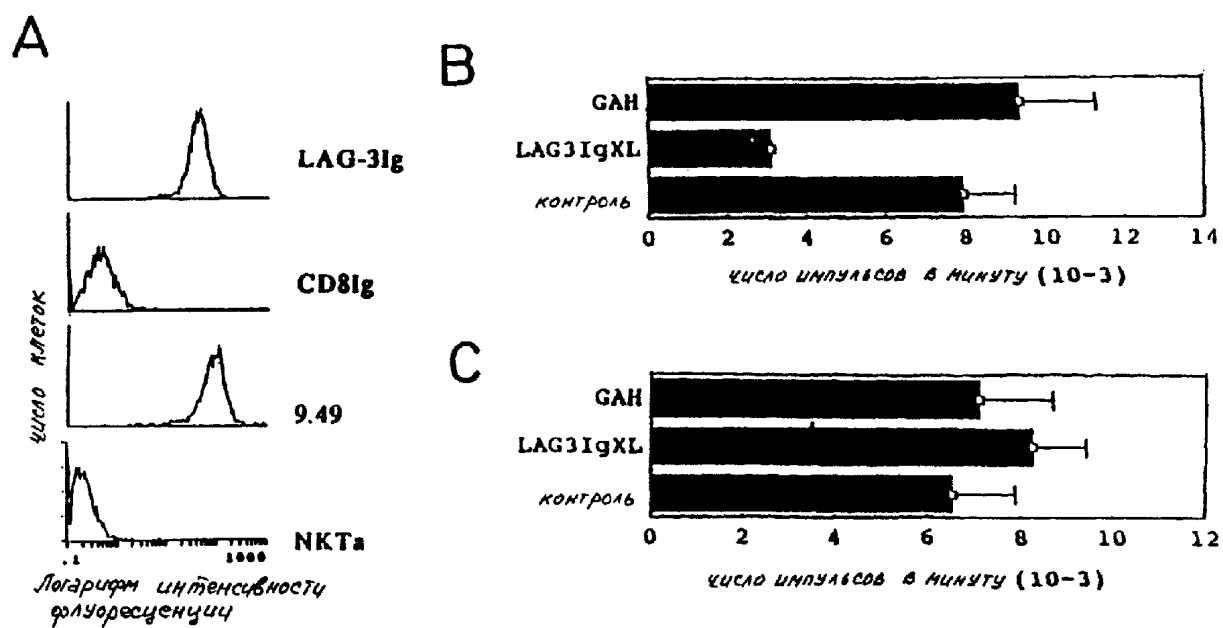
Фиг.8



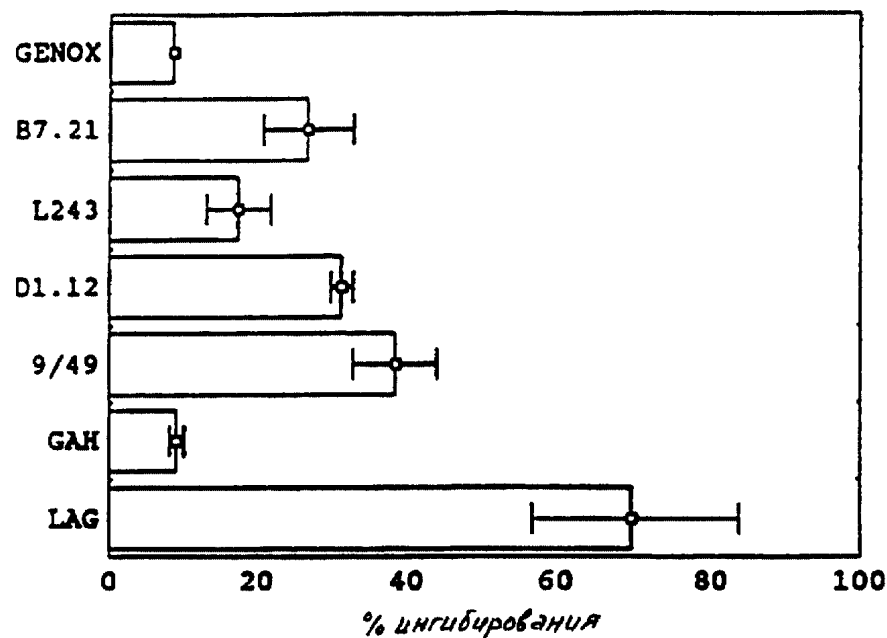
Фиг.9



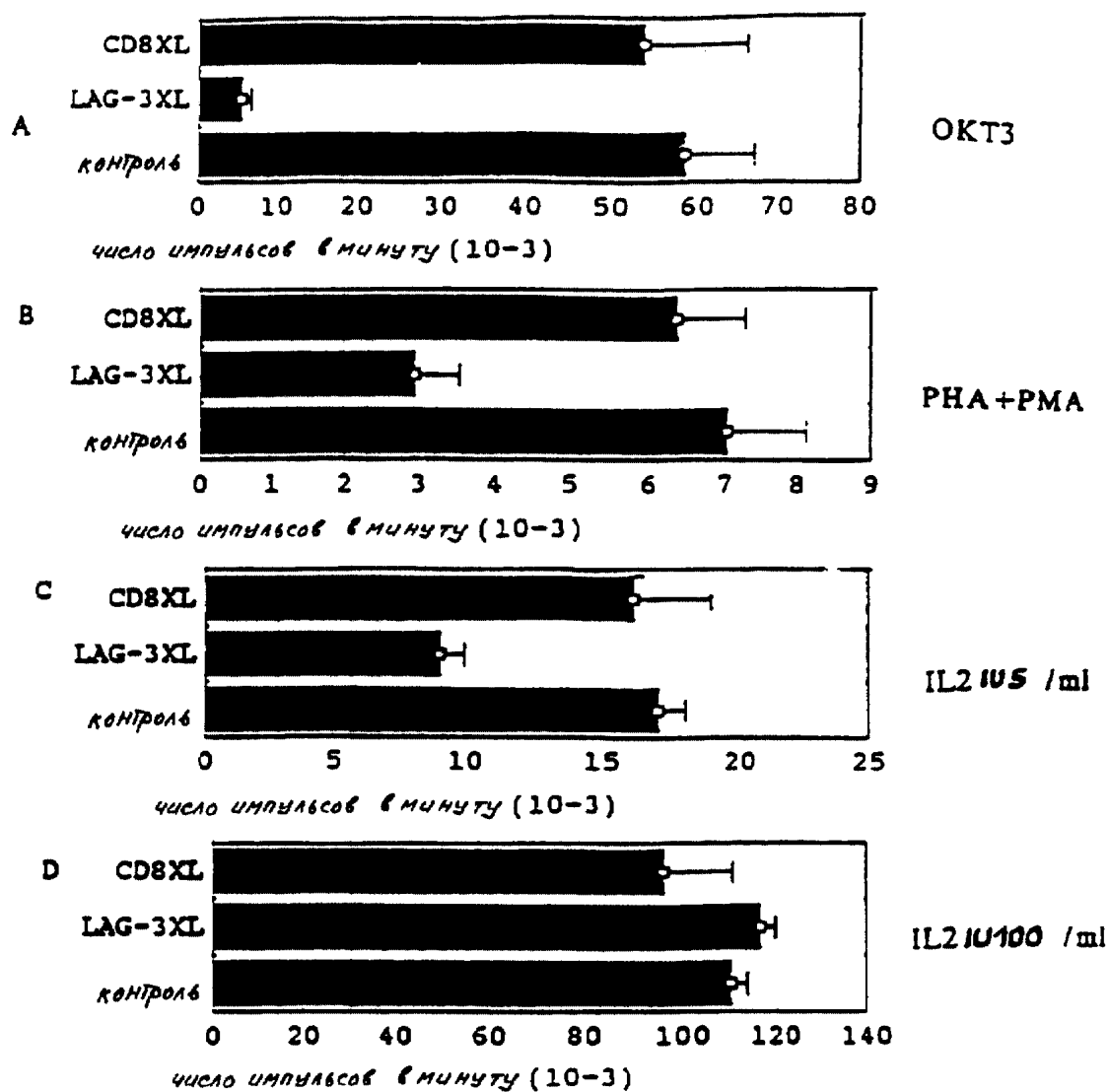
Фиг.10



Фиг.11

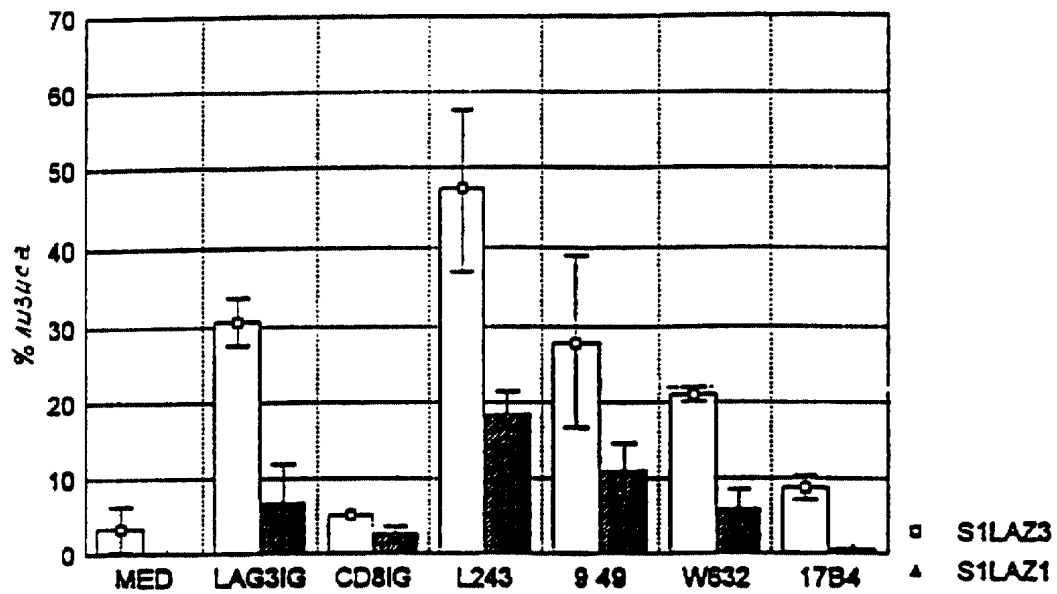


Фиг.12



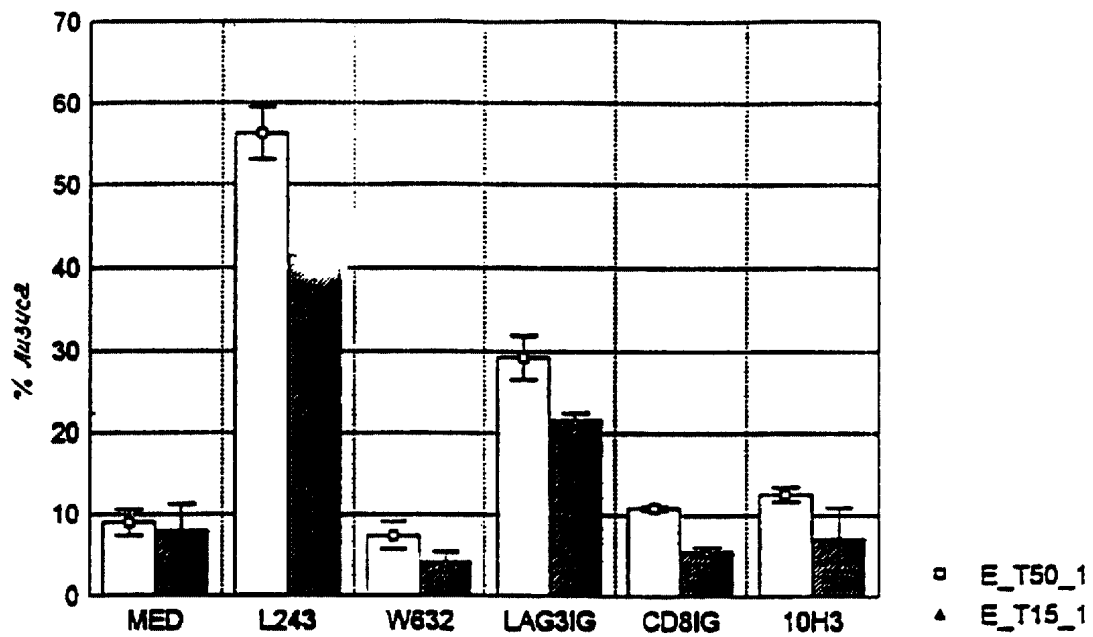
Фиг.13

Цитотоксичность S1B5 le 12/4/95
3/1 et 1/1 против LAZ 388



Фиг.14

PBL P/DAUDI le 25/4/95



Фиг.15