



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2002100071/13, 23.05.2000

(24) Дата начала действия патента: 23.05.2000

(30) Приоритет: 08.06.1999 (пп.1-23) US 60/138,133

(43) Дата публикации заявки: 10.08.2003

(45) Опубликовано: 10.12.2005 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: DAVIS-SMYTH ET AL., EMBO Journal, v.15, no.18, p.4919-4927, 1996. WO 9744453 A, 27.11.1997.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 08.01.2002

(86) Заявка РСТ:
US 00/14142 (23.05.2000)(87) Публикация РСТ:
WO 00/75319 (14.12.2000)

Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

ПАПАДОПОУЛОС Николас Дж. (US),
ДЭВИС Сэмюель (US),
ЯНКОПОУЛОС Джордж Д. (US)

(73) Патентообладатель(ли):

РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(54) СЛИТЫЙ ПОЛИПЕПТИД, СПОСОБНЫЙ СВЯЗЫВАТЬСЯ С ПОЛИПЕПТИДОМ VEGF, И КОДИРУЮЩАЯ ЕГО МОЛЕКУЛА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ИХ ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области генной инженерии и может быть использовано в фармацевтической и медико-биологической промышленности. Предложена химерная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый полипептид, способный связываться с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и ингибировать его специфическое митогенное действие. Молекула слитого полипептида включает иммуноглобулин-подобный домен 2 VEGF-рецептора Flt1, иммуноглобулин-подобный домен 3 VEGF-рецептора Flk1 или Flt4 и

мультемизующий компонент, представленный либо доменом Fc IgG, либо тяжелой цепью IgG. Путем экспрессии предложенной химерной последовательности или двух ее последовательно связанных копий в клетке-хозяине получают, соответственно, мономер или димер слитого полипептида, которые предлагается использовать для подавления активности VEGF у млекопитающих, в частности у человека. Новые ингибиторы VEGF отличаются от известных улучшенной фармакокинетикой. 9 н. и 14 з.п. ф-лы, 67 ил., 1 табл.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) RU (11)

2 265 661 C2

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 15/62, 15/12, C 07 K

19/00, 14/71, A 61 K 38/17

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2002100071/13, 23.05.2000**

(24) Effective date for property rights: **23.05.2000**

(30) Priority: **08.06.1999 (cl.1-23) US 60/138,133**

(43) Application published: **10.08.2003**

(45) Date of publication: **10.12.2005 Bull. 34**

(85) Commencement of national phase: **08.01.2002**

(86) PCT application:
US 00/14142 (23.05.2000)

(87) PCT publication:
WO 00/75319 (14.12.2000)

Mail address:
**129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

PAPADOPOULOS Nikolas Dzh. (US),

DEhVIS Sehmjuel' (US),

JaNKOPOULOS Dzhordzh D. (US)

(73) Proprietor(s):

RIDZhENERON FARMAS'JuTIKALZ, INK. (US)

(54) **FUSED POLYPEPTIDE ABLE FOR BINDING WITH VEGF POLYPEPTIDE AND NUCLEIC ACID MOLECULE ENCODING THEREOF, THEIR PREPARING AND USING**

(57) Abstract:

FIELD: genetic engineering, pharmaceutical and medical-biological industry.

SUBSTANCE: invention proposes a chimeric sequence of nucleic acid encoding a fused polypeptide able to bind with the vessel endothelium growth factor (VEGF) and to inhibit its specific mitogenic effect. The fused polypeptide molecule comprises immunoglobulin-like domain 2 of VEGF-receptor Flt1, immunoglobulin-like domain 3 of VEGF-receptor Flk 1 or Flt4 and multimerizing component represented

by either domain Fc IgG or heavy chain IgG. By expression of the proposed chimeric sequence or its two successively joined copies in a host-cell a monomer or dimer of the fused polypeptide are prepared, respectively, that can be used for suppression of VEGF activity in mammals, in particular, in humans. New VEGF inhibitors differ from the known one by the improved pharmacokinetics.

EFFECT: improved preparing method, valuable biological properties of polypeptide.

23 cl, 67 dwg, 1 tbl, 35 ex

Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки США №60/138133, поданной 8 июня 1999 г. В данной заявке содержатся ссылки на разные публикации. Указанные публикации в полном объеме включены в данную заявку в качестве ссылок.

Введение

5 Настоящее изобретение относится к модифицированным полипептидам с улучшенной фармакокинетикой. В частности, данное изобретение относится к полипептидам рецепторов Flt1, которые модифицированы с целью улучшения их фармакокинетического профиля. Данное изобретение относится также к способам получения и применения модифицированных полипептидов, которые включают использование модифицированных

10 полипептидов для уменьшения или подавления потери плазмы и/или проницаемости сосудов у млекопитающего, но не ограничиваются указанным применением.

Предпосылки изобретения

Способность полипептидных лигандов связываться с клетками и таким образом вызывать фенотипическую реакцию, такую как рост, сохранение жизнеспособности,

15 секреция продуктов жизнедеятельности или дифференцировка клеток, часто опосредована трансмембранными рецепторами на клетках. Внеклеточный домен таких рецепторов (то есть часть рецептора, расположенная на поверхности клетки) является наиболее выраженной частью молекулы, так как он содержит белок, способный связываться с лигандом. Связывание лиганда с внеклеточным доменом обычно вызывает трансдукцию

20 сигнала, благодаря которой биологический сигнал передается к внутриклеточным мишеням. Трансдукция сигнала обычно происходит через каталитический внутриклеточный домен. Определенная совокупность элементов последовательности указанного каталитического внутриклеточного домена определяет его доступ к потенциальным субстратам киназы (Mohammadi, et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 11:5068-5078; Fantl, et

25 al., 1992, Cell 69:413-413). Примерами рецепторов, трансдуцирующих сигналы через каталитические внутриклеточные домены, являются рецепторные тирозинкиназы (RTK), в частности семейство рецепторов Trk, которое обычно ограничивается клетками нервной системы, семейство рецепторов цитокинов, включая трехчленный рецепторный комплекс CNTF (Stahl & Yancopoulos, 1994, J. Neurobio, 25:1454-1466), которое также ограничено

30 клетками нервной системы, рецепторы, связанные с G-белком, такие как β_2 -адренергический рецептор, обнаруженный, например, на клетках сердечной мышцы, и мультимерный рецептор Fc ϵ RI с высоким сродством к иммуноглобулину E (IgE), который находится в основном на тучных клетках и базофилах (Sutton & Gould, 1993, Nature 366: 421-428).

35 Все вышеописанные рецепторы, по-видимому, подвержены димеризации, мультимеризации или некоторым родственным структурным изменениям, происходящим в результате связывания лиганда (Schlessinger, J., 1988, Trend Biochem. Sci. 13:443-447; Ullrich & Schlessinger, 1990, Cell 61:203-212; Schlessinger & Ullrich, 1992, Neuron 9:383-391), при этом межмолекулярные взаимодействия между димеризуемыми

40 внутриклеточными доменами ведут к активации каталитической функции. Например, в случае полученного из тромбоцитов фактора роста (PDGF) лиганд является димером, который связывает молекулы двух рецепторов (Hart, et al., 1988, Science, 240:1529-1531; Heldin, 1989, J. Biol. Chem. 264:8905-8912), а в случае эпидермального фактора роста (EGF) лиганд является мономером (Weber, et al., 1984, J. Biol. Chem. 259:14631-

45 14636). В случае рецептора Fc ϵ RI лиганд IgE связан с Fc ϵ RI как мономер и активируется только тогда, когда антиген связывается с комплексом IgF/Fc ϵ RI и образует поперечные сшивки с соседними молекулами IgE (Sutton & Gould, 1993, Nature 366:421-428).

Распределение конкретного рецептора в тканях высших организмов часто позволяет

50 выявить биологическую функцию данного рецептора. В некоторых факторах роста и дифференцировки, таких как фактор роста фибробластов (FGF), сильно экспрессированы RTK, из чего следует, что они играют определенную роль в росте и сохранении тканей. Члены семейства рецепторов Trk RTK (Glass & Yancopoulos, 1993, Trends in Cell Biol. 3:262-268), как правило, ограничены клетками нервной системы, и семейство факторов

роста нервной ткани, включающее фактор роста нервной ткани (NGF), выделяемый из головного мозга нейротрофический фактор (BDNF), нейротрофин-3 (NT-3) и нейротрофин-4/5 (NT-4/5), которые связывают рецепторы семейства Trk RTK, стимулируют дифференцировку разных групп нейронов в головном мозге и периферической системе (Lindsay, R.M., 1993, in *Neurotrophic Factors*, S.E. Loughlin & J.H.Fallon, eds., pp.257-284, San Diego, CA, Academic Press). Рецептор Fc ϵ RI находится в очень ограниченном числе типов клеток, таких как тучные клетки и базофилы. Тучные клетки продуцируются линией полипотентных кроветворных стволовых клеток костного мозга, но созревают в ткани после миграции из кровотока (см. Janeway & Travers, 1996, in *Immunobiology*, 2d Edition, M. Robertson & E. Lawrence, eds., pp.1:3-1:4, Current Biology Ltd., London, UK, Publisher) и принимают участие в аллергической реакции.

Многие исследования показывают, что внеклеточный домен рецептора обладает свойством связывания специфических лигандов. Кроме того, клеточная среда, в которой экспрессирован рецептор, может влиять на биологическую реакцию, возникающую при связывании лиганда с рецептором. Например, воздействие на нервную клетку, экспрессирующую рецептор Trk, нейротрофином, который связывается с данным рецептором, обуславливает выживаемость и дифференцировку нейронов. Когда тот же рецептор экспрессирован фибробластом, под действием нейротрофина происходит пролиферация фибробластов (Glass, et al., 1991, *Cell* 66:405-413).

Идентифицирован класс выделяемых из клеток димерных митогенов с избирательностью в отношении эндотелиальных клеток сосудов, который назван фактором роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF). VEGF выделен из кондиционированной питательной среды клеток глиомы крыс [Conn et al., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, pp.2628-2632]; кондиционированной питательной среды звездчатых клеток гипофизарных фолликул крупного рогатого скота [Ferrara and Henzel, (1989), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 161, pp.851-858; Gozpadarowicz et al., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, pp.7311-7315] и кондиционированной питательной среды клеток U937 человека [Connolly, D.T. et al. (1989), *Science*, 246, pp.1309-1312]. VEGF является димером со средней молекулярной массой около 46 кДа, при этом каждая субъединица имеет среднюю молекулярную массу около 23 кДа. VEGF имеет некоторое структурное сходство с полученным из тромбоцитов фактором роста (PDGF), который является митогеном для клеток соединительной ткани и не является митогеном для эндотелиальных клеток крупных сосудов.

Установлено, что мембраносвязанный рецептор тирозинкиназы, известный как Flt, является рецептором VEGF [DeVries, C. et al., (1992), *Science*, 255, pp.989-991]. Рецептор Flt связывает VEGF, который индуцирует митогенез. Известно, что другая форма рецептора VEGF, именуемая KDR, также связывает VEGF и индуцирует митогенез. Кроме того, известна неполная последовательность кДНК и почти полноразмерная белковая последовательность KDR [Terman. B.I. et al., (1991), *Oncogene* 6, pp.1677-1683; Terman, B.I. et al., (1992), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 187, pp.1579-1586].

Постоянный ангиогенез может стать причиной возникновения или обострения некоторых заболеваний, таких как псориаз, ревматоидный артрит, гемангиома, ангиофиброма, диабетическая ретинопатия и неоваскулярная глаукома. Ингибитор активности VEGF должен быть полезен для лечения таких заболеваний и других типов VEGF-индуцированного патологического ангиогенеза, а также заболеваний, связанных с проницаемостью сосудов, таких как васкуляризация опухоли. Настоящее изобретение относится к ингибитору VEGF на основе рецептора Flt1 VEGF.

Потеря плазмы, которая является основным показателем воспалительного процесса, возникает в отдельной совокупности микрососудов. В частности, потеря плазмы в большинстве органов происходит в венах. В отличие от артериол и капилляров потеря плазмы из венул возникает под действием многочисленных медиаторов воспаления, включая гистамин, брадикинин и серотонин. Одной отличительной особенностью воспаления является потеря плазмы, которая происходит из межклеточных брешей,

образующихся в эндотелии венул. Экспериментальные модели воспалительного процесса показывают, что указанные межклеточные бреши возникают между эндотелиальными клетками посткапиллярных и собирающих венул (Baluk, P., et al., Am. J. Pathol. 1998, 152:1463-76). Установлено, что определенные лектины можно использовать для

5 обнаружения очагов потери плазмы, эндотелиальных брешей и патологических процессов на границах эндотелиальных клеток в воспаленных венулах (Thurston, G., et al., Am. J. Physiol, 1996, 271: H2547-62). В частности, растительные лектины используют для визуализации морфологических изменений на границах эндотелиальных клеток в воспаленных венулах, например, трахеи крыс. Лектины, такие как конконавалин А и

10 рицин, которые очагово связываются с воспаленными венулами, позволяют обнаружить области в стенке субэндотелиального сосуда с брешами, соответствующими местам потери плазмы (Thurston, G., et al., Am. J. Physiol, 1996, 271: H2547-62).

Капиллярные сосуды характеризуются динамическими свойствами. Хронические воспалительные заболевания обусловлены, в частности, изменением микрососудов,

15 включая ангиогенез и увеличение капиллярных микрососудов. Капиллярные сосуды могут также измениться в результате приобретения неправильных фенотипических свойств. В мышинной модели хронического воспаления дыхательных путей капилляры дыхательных путей приобретают свойства венул, выражающиеся в увеличении диаметра сосудов, повышенной иммунореактивности на фактор фон Виллебранда и повышенной

20 иммунореактивности на Р-селектин. Кроме того, просачиваемость измененных сосудов может возникать под воздействием таких воспалительных медиаторов, которые не оказывают влияния на аналогичные сосуды дыхательных путей у здоровых мышей.

Установлено, что определенные вещества уменьшают или подавляют проницаемость сосудов и/или потерю плазмы. Например, мистиксины являются синтетическими

25 полипептидами, которые подавляют потерю плазмы, не блокируя образование эндотелиальных брешей (Baluk, P., et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1998, 284: 693-9). Кроме того, формотерол - агонист бета-2-адренергических рецепторов - уменьшает просачиваемость капиллярных сосудов, подавляя образование эндотелиальных брешей (Baluk, P., and McDonald, D.M., Am. J. Physiol., 1994, 266:L461-8).

30 Ангиопоэтины и члены семейства факторов роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF) являются единственными факторами роста, которые, как известно, являются в высшей степени специфичными для эндотелиальных клеток сосудов. Исследования по инактивации гена-мишени у мышей показывают, что VEGF необходим на ранних стадиях развития сосудов и Ang-1 необходим на поздних стадиях изменения сосудов.

35 В патенте США №6011003, выданном 4 января 2000 г. фирме Metris Therapeutics Limited, описана измененная растворимая форма полипептида FLT, способная связываться с VEGF и оказывать таким образом ингибирующее действие на указанный фактор, причем данный полипептид содержит пять или меньше полных доменов иммуноглобулина.

В патенте США №5712380, выданном 27 января 1998 г. фирме Merck & Co., описаны

40 ингибиторы фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF), которые представляют собой природные или полученные методом рекомбинантных ДНК растворимые формы, содержащие или не содержащие С-концевую трансмембранную область рецептора для VEGF.

Фирме Merck & Co. принадлежит также заявка PCT № WO 98/13071, опубликованная 2

45 апреля 1998 г., в которой описаны методы гемотерапии для подавления первичного роста опухоли и метастазов путем переноса генов нуклеотидной последовательности, кодирующей растворимый рецепторный белок, связывающийся с VEGF.

В заявке фирмы Genentech, Inc. PCT № WO 97/44453, опубликованной 27 ноября 1997 г., описаны новые химерные белки рецепторов VEGF, содержащие аминокислотные

50 последовательности, полученные из рецепторов Flt1 и KDR фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF), включая мышинный гомолог рецептора FLK1 KDR человека, в которых указанные химерные белки рецепторов VEGF связываются с VEGF и оказывают антагонистическое действие на пролиферативную и ангиогенную активность

эндотелиальных клеток.

В заявке фирмы Toa Gosei Co., LTD PCT № WO 97/13787, опубликованной 17 апреля 1997 г., описан низкомолекулярный ингибитор VEGF, используемый для лечения болезней, сопровождающихся образованием новых сосудов, таких как солидные опухоли.

5 Полипептид, содержащий первый и второй иммуноглобулиноподобные домены во внеклеточной области рецептора FLT VEGF, но не имеющий шестого и седьмого иммуноглобулиноподобных доменов, оказывает ингибирующее действие на VEGF.

Sharifi, J. et al., 1998, The Quarterly Jour. of Nucl. Med. 42:242-249, указывают, что, поскольку моноклональные антитела (MAb) являются основными, положительно
10 заряженными белками, а клетки млекопитающего заряжены отрицательно, то электростатическое взаимодействие между указанными элементами может вызывать более высокие уровни фоновое связывания, что ведет к низкому соотношению между объемом опухоли и нормального органа. Чтобы преодолеть указанных эффект, исследователи попытались увеличить выведение MAb разными методами, в частности при
15 помощи вторичных агентов, а также химической модификации и изменения заряда самого MAb.

Jensen-Pippo, et al., 1996, Pharmaceutical Research 13:102-107, указывают, что обработка полиэтиленгликолем лечебного белка, рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (PEG-G-CSF) человека увеличивает стабильность и
20 сохраняет биологическую активность in vivo при интра-дуоденальном способе введения.

Tsutsumi, et al., 1997, Thromb Haemost. 77:168-73, описывают эксперименты, в которых тромбопоэтическую активность in vivo модифицированного полиэтиленгликолем интерлейкина-6 (MPEG-IL-6), в котором 54% 14 аминокислот лизина в IL-6 связано с PEG, сравнивали с активностью природного IL-6.

25 Yang, et al., 1995, Cancer 76:687-94, указывают, что конъюгируя полиэтиленгликоль с рекомбинантным интерлейкином-2 (IL-2) человека, можно получить соединение, а именно модифицированный полиэтиленгликолем IL-2 (PEG-IL-2), которое сохраняет in vitro и in vivo активность IL-2, но характеризуется значительно более продолжительным периодом полужизни в кровотоке.

30 R. Duncan and F. Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27: 290-306, 296 (1994), описывают эксперименты по увеличению периода полужизни в плазме аспарагиназы путем конъюгирования с полиэтиленгликолем.

В международной патентной заявке № WO 99/03996 фирмы Regeneron Pharmaceuticals, Inc. и правления Калифорнийского университета, опубликованной 28 января 1999 г.,
35 описаны модифицированные полипептиды человека с делениями областей основных аминокислот. Установлено, что модифицированные "ноггин" - полипептиды человека сохраняют биологическую активность, обладая более низким сродством к гепарину и более высокой фармакокинетикой в сыворотке животного по сравнению с немодифицированными "ноггин" - полипептидами человека.

40 Краткое изложение существа изобретения

Настоящее изобретение относится к антагонистам VEGF с улучшенными фармакокинетическими свойствами. Предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый полипептид, способный связывать полипептид VEGF, включающий (а) нуклеотидную
45 последовательность, кодирующую компонент рецептора VEGF, функционально связанный с (b) нуклеотидной последовательностью, кодирующей мультимеризующий компонент, и в котором компонент рецептора VEGF является единственным компонентом рецептора VEGF слитого полипептида и при этом нуклеотидная последовательность (а) состоит по существу из нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную
50 последовательность домена 2 Ig внеклеточного домена первого рецептора VEGF, и из нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность домена 3 Ig внеклеточного домена второго рецептора VEGF.

В другом варианте осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота

первого рецептора VEGF является Flt1.

В другом варианте осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота второго рецептора VEGF является Flk1.

В другом варианте осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота
5 второго рецептора VEGF является Flt4.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая домен 2 Ig внеклеточного домена первого рецептора VEGF, расположена выше нуклеотидной последовательности, кодирующей домен 3 Ig внеклеточного домена второго рецептора VEGF.

10 В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая домен 2 Ig внеклеточного домена первого рецептора VEGF, расположена ниже нуклеотидной последовательности, кодирующей домен 3 Ig внеклеточного домена второго рецептора VEGF.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения мультимеризующий
15 компонент содержит домен иммуноглобулина.

В другом варианте осуществления изобретения домен иммуноглобулина выбирают из группы, состоящей из домена Fc IgG, тяжелой цепи IgG и легкой цепи IgG.

Предпочтительные варианты осуществления изобретения относятся к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность,
20 кодирующую модифицированный слитый полипептид рецептора Flt1, в которой кодирующая область молекулы нуклеиновой кислоты состоит из нуклеотидной последовательности, выбираемой из группы, состоящей из:

- (a) нуклеотидной последовательности, показанной на фиг. 13A-13D;
- (b) нуклеотидной последовательности, показанной на фиг. 14A-14C;
- 25 (c) нуклеотидной последовательности, показанной на фиг. 15A-15C;
- (d) нуклеотидной последовательности, показанной на фиг. 16A-16D;
- (e) нуклеотидной последовательности, показанной на фиг. 21A-21C;
- (f) нуклеотидной последовательности, показанной на фиг. 22A-22C;
- (g) нуклеотидной последовательности, показанной на фиг. 24A-24 C и
- 30 (h) нуклеотидной последовательности, которая вследствие вырожденности генетического кода отличается от нуклеотидной последовательности (a), (b), (c), (d), (e), (f) или (g) и которая кодирует молекулу слитого полипептида, обладающую биологической активностью модифицированного слитого полипептида рецептора Flt1.

В другом варианте осуществления изобретения слитый полипептид кодируется
35 вышеописанными выделенными молекулами нуклеиновой кислоты.

Предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к композиции, способной связывать молекулу VEGF с образованием нефункционального комплекса, содержащего мультимер слитого полипептида.

Кроме того, предпочтительной является композиция, в которой мультимер является
40 димером.

В другом варианте осуществления изобретения указанная композиция находится в носителе.

Другой вариант осуществления изобретения относится к вектору, который содержит вышеописанные молекулы нуклеиновой кислоты, включая экспрессирующий вектор,
45 содержащий описанные молекулы нуклеиновой кислоты, в котором молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с регулирующей экспрессию последовательностью.

Другие варианты осуществления изобретения относятся к системе вектор-хозяин, предназначенной для продуцирования слитого полипептида, которая содержит экспрессирующий вектор в приемлемой клетке-хозяине; к системе вектор-хозяин, в
50 которой приемлемая клетка-хозяин является бактериальной клеткой, дрожжевой клеткой, клеткой насекомого или клеткой млекопитающего; к системе вектор-хозяин, в которой приемлемая клетка-хозяин является E.Coli; к системе вектор-хозяин, в которой приемлемая клетка-хозяин является клеткой COS; к системе вектор-хозяин, в которой

приемлемая клетка-хозяин является клеткой CHO.

Другой вариант осуществления изобретения относится к способу получения слитого полипептида, который включает выращивание клеток системы вектор-хозяин в условиях, обеспечивающих продуцирование и выделение таким образом полученного слитого полипептида.

Дополнительные варианты осуществления изобретения относятся к слитому полипептиду, кодируемому нуклеотидной последовательностью, показанной на фиг. 10A-10D или 24A-24C, который модифицирован ацетилизацией или обработкой полиэтиленгликолем, причем ацетилизацию производят по крайней мере при 100-кратном молярном избытке ацетилирующего реагента или при молярном избытке ацетилирующего реагента в пределах от примерно 10-кратного молярного избытка до около 100-кратного молярного избытка либо обработку этиленгликолем производят при использовании PEG с молекулярной массой 10000 или 20000.

Предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к способу уменьшения или подавления потери плазмы у млекопитающего, который включает введение млекопитающему вышеописанного слитого полипептида, включая варианты осуществления изобретения, в которых млекопитающее является человеком, слитый полипептид ацетилизирован или обработан полиэтиленгликолем.

Другие варианты осуществления изобретения относятся к слитому полипептиду, который специфически связывает лиганд рецептора VEGF.

Предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к способу блокирования роста кровеносных сосудов у человека, который включает введение эффективного количества вышеописанного слитого полипептида.

Кроме того, предпочтительным является способ подавления активности лиганда рецептора VEGF у млекопитающего, который включает введение млекопитающему эффективного количества вышеописанного слитого полипептида.

Предпочтительные варианты осуществления изобретения относятся к указанным способам, в которых млекопитающее является человеком.

Другие варианты осуществления изобретения относятся к способам замедления или предотвращения роста опухоли у человека; уменьшения или предотвращения отека у человека, в частности отека мозга; уменьшения или предотвращения образования асцита у человека, в частности асцита, обусловленного раком яичника.

Предпочтительные варианты осуществления изобретения относятся к слитому полипептиду, способному связывать полипептид VEGF, который включает: (a) компонент рецептора VEGF, функционально связанный с (b) мультимеризующим компонентом, причем компонент рецептора VEGF является единственным компонентом рецептором VEGF в слитом полипептиде и состоит по существу из аминокислотной последовательности домена 2 Ig внеклеточного домена первого рецептора VEGF и аминокислотной последовательности домена 3 Ig внеклеточного домена второго рецептора VEGF.

Другой вариант осуществления изобретения относится к слитому полипептиду, в котором первый рецептор VEGF является Flt1.

Другой вариант осуществления изобретения относится к слитому полипептиду, в котором второй рецептор VEGF является Flk1.

Другой вариант осуществления изобретения относится к слитому полипептиду, в котором второй рецептор VEGF является Flt4.

Предпочтительные варианты осуществления изобретения относятся к слитому полипептиду, в котором аминокислотная последовательность домена 2 Ig внеклеточного домена первого рецептора VEGF расположена выше от аминокислотной последовательности домена 3 Ig внеклеточного домена второго рецептора VEGF, и к слитому полипептиду, в котором аминокислотная последовательность домена 2 Ig внеклеточного домена первого рецептора VEGF расположена ниже от аминокислотной последовательности домена 3 Ig внеклеточного домена второго рецептора VEGF.

В другом варианте осуществления изобретения мультимеризующий компонент слитого полипептида содержит домен иммуноглобулина, включая вариант осуществления изобретения, в котором домен иммуноглобулина выбирают из группы, включающей домен Fc IgG, тяжелую цепь IgG и легкую цепь IgG.

5 Предпочтительные варианты осуществления изобретения относятся к слитому полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность модифицированного рецептора Flt1, причем аминокислотную последовательность выбирают из группы, состоящей из:

- (a) аминокислотной последовательности, показанной на фиг. 13A-13D;
- 10 (b) аминокислотной последовательности, показанной на фиг. 14A-14C;
- (c) аминокислотной последовательности, показанной на фиг. 15A-15C;
- (d) аминокислотной последовательности, показанной на фиг. 16A-16D;
- (e) аминокислотной последовательности, показанной на фиг. 21A-21C;
- (f) аминокислотной последовательности, показанной на фиг. 22A-22C; и
- 15 (g) аминокислотной последовательности, показанной на фиг. 24A-24C.

Другой предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к способу уменьшения или подавления потери плазмы у млекопитающего, который включает введение указанному млекопитающему вышеописанного слитого полипептида.

Альтернативный предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к способу подавления активности лиганда рецептора VEGF у млекопитающего, который включает введение млекопитающему эффективного количества вышеописанного слитого полипептида.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. IEF-анализ в геле немодифицированного и ацетилированного белка Flt1(1-3)-Fc. Немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc не способен проникать в гель из-за своего показателя $pI > 9,3$, в то время как ацетилированный белок Flt1(1-3)-Fc проникает в гель и уравнивается при pI 5/2.

Фиг. 2. Связывание немодифицированного и ацетилированного белка Flt1(1-3)-Fc с планшетами, покрытыми Matrigel®. Немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc хорошо связывается с компонентами внеклеточного матрикса в Matrigel®, в то время как ацетилированный белок Flt1(1-3)-Fc не связывается с указанными компонентами.

Фиг. 3. Связывание немодифицированного, ацетилированного и обработанного полиэтиленгликолем белка Flt1(1-3)-Fc при выполнении анализа на основе Biacore. Ацетилированный белок (столбцы 13-16), обработанный полиэтиленгликолем белок (столбцы 17-20) и обработанный гепарином белок Flt1(1-3)-Fc (столбцы 21-24) способны успешно конкурировать со связанным с чипом Biacore белком Flt1(1-3)-Fc по связыванию с VEGF по сравнению с контрольным белком (столбцы 1-4) и посторонним белком (столбцы 5-8). Немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc (столбцы 5-6), по-видимому, лишь частично конкурируют со связанным с чипом Biacore белком Flt1(1-3)-Fc по связыванию с VEGF.

Однако в результате промывки связанных образцов 0,5 М раствором NaCl (столбцы 7-8) получают профиль связывания, аналогичный модифицированным формам Flt1(1-3)-Fc, который свидетельствует о том, что немодифицированный белок проявляет неспецифическое связывание с чипом, которое можно разрушить, производя промывку солевым раствором.

Фиг. 4. Связывание немодифицированного, ацетилированного и обработанного полиэтиленгликолем белка Flt1(1-3)-Fc с VEGF при выполнении твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Обработанные полиэтиленгликолем и ацетилированные белки Flt1(1-3)-Fc связываются с VEGF со сродством, приближающимся к значению, характерному для немодифицированного белка Flt1(1-3)-Fc.

Фиг. 5. Фармакокинетические профили немодифицированного, ацетилированного и обработанного полиэтиленгликолем белка Flt1(1-3)-Fc. Мышам Balb/c (23-28 г) подкожно вводят 4 мг/кг немодифицированного, ацетилированного или обработанного полиэтиленгликолем белка Flt1(1-3)-Fc. У мышей из хвоста берут кровь через 1, 2, 4,

6, 24 часа, 2 дня и 3 дня после инъекции белка и анализируют сыворотку, выполняя стандартный анализ ELISA, предназначенный на обнаружения белка Flt1(1-3)-Fc. T_{max} для всех белков Flt1(1-3)-Fc находится в интервале от 6 до 24 часов. C_{max} для разных белков имеет следующие значения: немодифицированный белок: 0,06 мкг/мл - 0,15 мкг/мл;
 5 ацетилованный белок: 1/5 мкг/мл - 4,0 мкг/мл и обработанный полиэтиленгликолем белок: примерно 5 мкг/мл.

Фиг. 6A-6B. IEF-анализ в геле немодифицированного и ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc. Немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc не способен проникать в гель из-за своего показателя $pI > 9,3$, в то время как большинство образцов ступенчато
 10 ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc (образцы, ацетилованные 30-100-кратным молярным избытком) проникают в гель и уравниваются при pI 4/55-8,43 в зависимости от степени ацетилирования.

Фиг. 7. Связывание немодифицированного и ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc с планшетами, покрытыми Matrigel®. Как и в случае постороннего
 15 контрольного белка, rTie2-Fc, ступенчато ацетилованный белок Flt1(1-3)-Fc (образцы, ацетилованные 20- и 30-кратным молярным избытком) не связываются с планшетом, покрытым Matrigel, в то время как неацетилованный белок Flt1(1-3)-Fc характеризуется значительным связыванием. Образец, ацетилованный 10-кратным
 20 молярным избытком, отличается пониженным связыванием, но данная степень ацетилирования не является достаточной для полного блокирования связывания с компонентами внеклеточного матрикса.

Фиг.8. Связывание немодифицированного и ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc при выполнении анализа на основе Bioscore. При субстехиометрическом соотношении (0,5 мкг/мл немодифицированного или ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc на
 25 0,2 мкг/мл VEGF) в растворе недостаточно белка Flt1(1-3)-Fc (немодифицированного или ступенчато ацетилованного белка) для полного связывания VEGF. При концентрации 1,0 мкг/мл, которая приближается к стехиометрическому соотношению 1:1, как немодифицированный белок, так и ступенчато ацетилованный белок Flt1(1-3)-Fc лучше конкурируют за преимущественное связывание с VEGF, но при этом по-прежнему
 30 недостаточно белка Flt1(1-3)-Fc (немодифицированного или ступенчато ацетилованного белка) для полного насыщения имеющегося VEGF. Однако при концентрации 5, 0 мкг/мл, которая в несколько раз выше стехиометрического соотношения 1:1, как белок Flt1(1-3)-Fc, так и ступенчато ацетилованный белок Flt1(1-3)-Fc способны насыщать VEGF независимо от степени ацетилирования.

Фиг. 9. Фармакокинетические профили немодифицированного и ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc. Мышам Balb/c (23-28 г) подкожно инъецируют 4
 35 мг/кг немодифицированного белка или ступенчато ацетилованных 10-, 20-, 40-, 60-и 100-кратным избытком белков Flt1(1-3)-Fc (3 мыши для немодифицированного белка и образцов, ацетилованных 10-, 20- и 40-кратным избытком, 2 мыши для образцов, ацетилованных 60-и 100-кратным избытком). У мышей из хвоста берут кровь через 1, 2,
 40 4, 6, 24 часа, 2 дня и 3 дня после инъекции. Сыворотку анализируют при помощи стандартного анализа на основе ELISA, предназначенного на обнаружения белка Flt1(1-3)-Fc. T_{max} для всех испытанных белков Flt1(1-3)-Fc соответствует 6 часам. C_{max} имеет следующие значения: немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc - 0/06 мкг/мл; образец, ацетилованный 10-кратным избытком, - 0/7 мкг/мл, образец, ацетилованный 20-кратным избытком, - 2 мкг/мл, образец, ацетилованный 40-кратным избытком, - 4 мкг/мл, образец, ацетилованный 60-кратным избытком, - 2 мкг/мл, образец, ацетилованный 100-кратным избытком, - 1 мкг/мл.

Фиг. 10A-10D. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательность белка
 50 Flt1(1-3)-Fc.

Фиг. 11. Схематическое изображение структуры Flt1.

Фиг. 12A и 12B. Анализ гидрофильности аминокислотных последовательностей домена 2 Ig и домена 3 Ig Flt1.

Фиг. 13A-13D. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательность Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc.

Фиг. 14A-14C. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательность Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc.

5 Фиг. 15A-15C. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательность Mut3: Flt1(2-3)-Fc.

Фиг. 16A-16D. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательность Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc.

10 Фиг. 17. Связывание немодифицированного белка Flt1(1-3)-Fc, мутантного белка с делецией основной области Flt1(1-3)-Fc и мутантного белка Flt1(1-3)_{R→N} при выполнении анализа на основе Biacore. При субстехиометрическом соотношении (0,25 мкг/мл Flt1(1-3)-Fc немодифицированных, ацетилированных или генетически модифицированных образцов на 0,1 мкг/мл VEGF) белка Flt1(1-3)-Fc недостаточно для блокирования

15 связывания VEGF с белком Flt1(1-3)-Fc, иммобилизованным на чипе Biacore. При концентрации 0,5 мкг/мл немодифицированного, ацетилированного или генетически модифицированного белка Flt1(1-3)-Fc стехиометрическое соотношение приближается к 1:1 и при этом возрастает способность блокировать связывание VEGF с чипом Biacore. При

20 концентрации 1,0 мкг/мл немодифицированного, ацетилированного или генетически модифицированного белка Flt1(1-3)-Fc, которая примерно соответствует стехиометрическому соотношению 10:1, белки Flt1(1-3)-Fc способны блокировать связывание VEGF с чипом Biacore, но их действие не является эквивалентным. Немодифицированный и ацетилированный белок, а также мутантный белок Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc по существу одинаково блокируют связывание VEGF, в то время как

25 мутантный белок Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc блокирует связывание менее эффективно.

Фиг. 18. Связывание немодифицированного белка Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc , Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc и Flt1(2-3) мутантных белков с планшетами, покрытыми Matrigel®.

30 Немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc интенсивно связывается с указанными лунками, белок Mut3: Flt1(2-3)-Fc связывается несколько слабее, белок Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc связывается еще слабее и белок Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc имеет лучший профиль, связываясь гораздо слабее, чем любые другие мутантные белки. Гликозилированный мутантный белок Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc характеризуется минимальным

35 преимуществом при выполнении анализа с использованием Matrigel.

Фиг. 19. Связывание немодифицированного белка Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc , Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc и Flt1(2-3) мутантных белков при выполнении анализа на основе

40 ELISA. При испытанных концентрациях немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc и мутантные белки Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc , Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc и Flt1(2-3) одинаково связывают VEGF.

Фиг. 20. Фармакокинетические профили немодифицированного белка Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc , Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc и Flt1(2-3) мутантных белков. Указанные реагенты

45 имеют следующие значения C_{max}: немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc - 0,15 мкг/мл; белок Flt1(1-3)-Fc, ацетилированный 40-кратным молярным избытком, - 1,5 мкг/мл; и Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc - 0,7 мкг/мл.

Фиг. 21A-21C. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательность модифицированного рецептора Flt1, обозначенного Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a).

50 Фиг. 22A-22C. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательность модифицированного рецептора Flt1, рецептора Flt1, обозначенного Flt1D2.VEGFR3D3.Fc ΔC1 (a).

Фиг. 23. Анализ внеклеточного матрикса (ECM). Результаты данного анализа

показывают, что белки Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) и Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1 (a) значительно хуже связываются с ECM, чем белок Flt1(1-3)-Fc.

Фиг. 24A-24C. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательность модифицированного рецептора Flt1, обозначенного VEGFR1R2-FcΔC1 (a).

5 Фиг. 25A-25C. Анализ фосфорилирования. При 1,5-молярном избытке белка Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40) или временно экспрессированного белка Flt1D2F1k1D3.FcΔC1 (a) полностью блокируется стимуляция рецептора тремя вышеуказанными модифицированными рецепторами Flt1 по сравнению со стимуляцией контрольной средой. В отличие от этого временно экспрессированный белок Flt1D2VEGFR3D3.FcΔC1 (a) не
10 вызывает существенного блокирования при указанном молярном избытке по сравнению со стимуляцией положительным контрольным белком VEGF. Аналогичные результаты показаны на фиг. 25B, где модифицированные рецепторы Flt1 использованы в трехкратном молярном избытке относительно лиганда VEGF165. На фиг. 25C, где модифицированные рецепторы Flt1 использованы в шестикратном молярном избытке относительно лиганда
15 VEGF165, показано, что временно экспрессированный белок Flt1D2VEGFR3D3.FcΔC1 (a) частично блокирует обусловленную VEGF165 стимуляцию рецепторов на поверхности клетки.

Фиг. 26A-26B. Анализ фосфорилирования. Обнаружение при помощи вестерн-блоттинга фосфорилированного тирозином белка VEGFR2(Flk1) в результате стимуляции лигандом
20 VEGF165 показывает, что рецепторы на поверхности клетки не фосфорилируются стимулирующими образцами, содержащими VEGF165, который предварительно инкубируют с 1- и 2-кратным молярным избытком (фиг. 26A) или 3- или 4-кратным молярным избытком (фиг. 26B) временно экспрессированного белка Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a), постоянно экспрессированного белка Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a) или временно
25 экспрессированного белка VEGFR1R2-FcΔC1 (a). При всех испытанных концентрациях модифицированного рецептора Flt1 происходит полное связывание лиганда VEGF165 во время предварительной инкубации, в результате чего отсутствует детектируемая стимуляция рецепторов на поверхности клеток несвязанным VEGF165 по сравнению со
30 стимуляцией контрольной средой.

Фиг. 27. Анализ пролиферации клеток MG/R2. Следующие модифицированные рецепторы Flt, в частности Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) и Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1 (a), а также посторонний рецептор, обозначенный как Tie2-Fc, используемый в качестве отрицательного контрольного образца, титруют в пределах от 40 нМ до 20 пМ и
35 инкубируют на клетках в течение 1 часа при 37°C. Затем во все лунки добавляют рекомбинантный белок VEGF165 человека в концентрации 1,56 нМ, находящийся в среде определенного состава. Отрицательный контрольный рецептор Tie2-Fc, используемый в любой концентрации, не блокирует обусловленную VEGF165 пролиферацию клеток, в то время как Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) блокирует 1,56 нМ VEGF165 при половине максимальной
40 дозы, равной 0,8 нМ. Белки Flt1(1-3)-Fc и Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1 (a) менее эффективно блокируют VEGF165 в данном анализе при половине максимальной дозы, равной ~2 нМ. Используемый отдельно белок VEGF165 дает результат, равный 1,2 единицам поглощения, при этом фоновое поглощение равно 0,38 единицы.

Фиг. 28. Определение стехиометрии связывания анализом на основе Biacore. Стехиометрию связывания вычисляют в виде молярного отношения связанного VEGF165 к
45 иммобилизованному Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) или VEGFR1R2-FcΔC1 (a), используя коэффициент превращения, равный 1000 крысиных единиц (RU), который эквивалентен 1 нг/мл. Результаты показывают, что стехиометрия связывания равна одной димерной молекуле VEGF165 на одну молекулу Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a) или VEGFR1R2-FcΔC1 (a).

50 Фиг. 29 и 30. Определение стехиометрии вытеснительной хроматографией. Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a) или VEGFR1R2-FcΔC1 (a) в концентрации 1 нМ (которая в 1000 раз превышает KD взаимодействия Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a) или VEGFR1R2-FcΔC1 (a) /VEGF165 смешивают с VEGF165 в разных концентрациях. После инкубации измеряют

концентрацию свободного Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) в растворе. Данные показывают, что добавление 1 нМ VEGF165 в раствор Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) полностью блокирует связывание Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) с поверхностью VEGF165. Полученный результат позволяет предположить, что стехиометрия связывания равна одной молекуле VEGF165 на одну молекулу Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a).

Фиг. 31. Вытеснительная хроматография (SEC) в естественных условиях. Пик №1 соответствует комплексу Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) /VEGF165 и пик №2 соответствует несвязанному белку VEGF165. Фракции, элюированные в пределах 1,1 и 1,2 мл, объединяют и добавляют гидрохлорид гуанидина (GuHCl) до конечной концентрации 4,5 М для диссоциации комплекса.

Фиг. 32. Вытеснительная хроматография (SEC) в условиях диссоциации. Чтобы разделить компоненты комплекса рецептор-лиганд и определить их молярное соотношение, 50 мкл диссоциированного комплекса загружают на колонку с суперозой Superose 12 PC 3.2/30, уравновешенную 6 М раствором GuHCl, и элюируют. Пик №1 соответствует Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и пик №2 соответствует VEGF165.

Фиг. 33, 34 и 35. Вытеснительная хроматография (SEC) со светорассеянием в оперативном режиме. Для определения молекулярной массы (MW) комплекса рецептор-лиганд используют колонку для вытеснительной хроматографии с детектором светорассеяния в оперативном режиме MiniDawn (Wyatt Technology, Santa Barbara, California) и детекторами показателя преломления (RI) (Shimadzu, Kyoto, Japan). Как показано на фиг. 33, профиль элюирования включает два пика. Пик №1 соответствует комплексу рецептор-лиганд и пик №2 соответствует несвязанному белку VEGF165. Молекулярную массу высчитывают на основании сигналов светорассеяния (LS) и показателя преломления (RI). Аналогичную процедуру используют для определения молекулярной массы отдельных компонентов комплекса рецептор-лиганд. Ниже приведены результаты указанных определений: молекулярная масса комплекса Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a)/VEGF165 в положении пика равна 157300 (фиг. 33), молекулярная масса VEGF165 в положении пика равна 44390 (фиг. 34) и молекулярная масса R1R2 в положении пика равна 113300 (фиг. 35).

Фиг. 36. Пептидное картирование и анализ гликозилирования. Дисульфидные структуры и сайты гликозилирования в Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) определяют методом пептидного картирования. Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) содержит в общей сложности десять цистеинов, шесть из которых относятся к области Fc. Cys27 связан дисульфидной связью с Cys76. Cys121 связан дисульфидной связью с Cys182. Два первых цистеина в области Fc (Cys211 и Cys214) образуют межмолекулярную дисульфидную связь с двумя аналогичными цистеинами в другой цепи Fc. Однако невозможно определить, образуется ли дисульфидная связь между одинаковыми цистеинами (например, Cys211 с Cys211) или между Cys211 и Cys214. Cys216 связан дисульфидной связью с Cys 306. Cys352 связан дисульфидной связью с Cys410.

В Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) имеется пять вероятных N-связанных сайтов гликозилирования, которые, как известно, гликозилированы в разной степени. Полное гликозилирование наблюдается на сайтах Asn 33, Asn193 и Asn282. Частичное гликозилирование наблюдается на сайтах Asn65 и Asn120. Сайты гликозилирования на чертеже подчеркнуты.

Фиг. 37. Фармакокинетика Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a). Мышам Balb/c подкожно инъецируют 4 мг/кг Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a), временно экспрессированного в яичнике китайского хомячка (CHO), Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a), постоянно экспрессированного в CHO, и VEGFR1R2-Fc Δ (a), временно экспрессированного в CHO. У мышей из хвоста берут кровь через 1, 2, 4, 6, 24 часа, 2 дня, 3 дня и 6 дней после инъекции. Сыворотку анализируют при помощи ELISA, предназначенного для обнаружения Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a). T_{max} для Flt1(1-3)-Fc (A40) соответствует 6 часам, в то время

как $T_{\max}$ для временно и постоянно экспрессированного белка Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и временно экспрессированного белка VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) соответствует 24 часам. $C_{\max}$ для Flt1(1-3)-Fc (A40) равно 8 мкг/мл, $C_{\max}$ для временно экспрессированных белков Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) равно 18 мкг/мл и $C_{\max}$ для постоянно экспрессированного белка VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) равно 30 мкг/мл.

Фиг. 38. Фармакокинетика Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и Flt1D2.VEGFR3D3-Fc Δ C1 (a). Мышам Balb/c подкожно инъецируют 4 мг/кг Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a), временно экспрессированного в яичнике китайского хомячка (CHO), и Flt1D2.VEGFR3D3-Fc Δ C1 (a), временно экспрессированного в CHO. У мышей из хвоста берут кровь через 1, 2, 5, 6, 7, 8, 12, 15 и 20 дней после инъекции. Сыворотку анализируют при помощи ELISA, предназначенного для обнаружения Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или Flt1D2.VEGFR3D3-Fc Δ C1 (a). Flt1(1-3)-Fc (A40) не обнаружен в сыворотке через 5 дней, а Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и Flt1D2.VEGFR3D3-Fc Δ C1 (a) обнаружены через 15 и более дней.

Фиг. 39. Способность Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) подавлять рост опухоли фибросаркомы HT-1080 *in vivo*. Введение мышам SCID через день или 2 раза в неделю Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) в дозе 25 мг/кг существенно уменьшает рост подкожных опухолей фибросаркомы HT-1080.

Фиг. 40. Способность Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) подавлять рост опухоли глиомы C6 *in vivo*. Введение мышам SCID через день или 2 раза в неделю Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) в дозе 2,5 мг/кг существенно уменьшает рост подкожных опухолей глиомы C6.

Фиг. 41. VEGF-индуцированная повышенная проницаемость матки. Подкожное введение PMSG (5 м.е.) с целью овуляции самок крыс в препубертатном периоде стимулирует выброс эстрадиола через 2 дня, что в свою очередь вызывает индукцию VEGF в матке. Указанная индукция увеличивает проницаемость матки и содержание в ней жидкости. Подкожное введение Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или Flt1D2.VEGFR3D3-Fc Δ C1 (a) в дозе 25 мг/кг через 1 час после введения PMSG примерно на 50% уменьшает массу жидкости в матке.

Фиг. 42A-42B. Оценка ангиогенеза желтого тела с использованием прогестерона в качестве тестирующего агента. Подкожное введение PMSG (5 м.е.) для индуцирования овуляции самок крыс в препубертатном периоде вызывает образование активного желтого тела с плотной сетью кровеносных сосудов, которое секретирует прогестерон в кровоток, подготавливая матку к оплодотворению. Для образования кровеносных сосудов в желтом теле необходим VEGF. Уровни прогестерона в состоянии покоя равны примерно 5 нг/мл и могут быть доведены до 25-40 нг/мл после введения PMSG. Подкожная инъекция Flt1(1-3)-Fc (A40) или Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) в дозе 25 мг/кг или 5 мг/кг через 1 час после введения PMSG полностью подавляет индукцию прогестерона на 4-й день.

Подробное описание изобретения

В данной области давно существует проблема получения антагониста VEGF на основе рецептора, фармакокинетический профиль которого позволил бы рассматривать антагонист в качестве возможного лекарственного средства. Авторы настоящего изобретения впервые описывают молекулу химерного полипептида, способную подавлять активность VEGF, которая обладает улучшенными фармакокинетическими свойствами по сравнению с другими известными антагонистами VEGF на основе рецептора. Молекулы химерного полипептида, рассматриваемые в данном описании изобретения, впервые стали пригодны для применения в лечебной практике, целью которой является подавление активности VEGF.

Настоящее изобретение относится к новым молекулам химерного полипептида, полученным путем слияния модифицированного внеклеточного связывающего лиганд домена рецептора Flt1 с областью Fc иммуноглобулина G (IgG).

Внеклеточный связывающий лиганд домен определяется как часть рецептора, который по своей нативной конформации в клеточной мембране имеет внеклеточную ориентацию,

где он может контактировать с родственным лигандом. Внеклеточный связывающий лиганд домен не содержит гидрофобных аминокислот, характерных для трансмембранного домена рецептора, или любых других аминокислот, характерных для внутриклеточного домена рецептора. Внутриклеточный или цитоплазматический домен рецептора обычно включает

5 положительно заряженные или полярные аминокислоты (то есть лизин, аргинин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту). Предшествующие (15-30), преимущественно гидрофобные или неполярные аминокислоты (то есть лейцин, валин, изолейцин и фенилаланин) образуют трансмембранный домен. Внеклеточный домен содержит аминокислоты, которые предшествуют гидрофобному трансмембранному

10 фрагменту аминокислот. Трансмембранный домен обычно фланкирован положительно заряженными или полярными аминокислотами, такими как лизин или аргинин. Фон Гейне опубликовал детальные правила, позволяющие специалистам в данной области определить, какие аминокислоты данного рецептора относятся к внеклеточным, трансмембранным или внутриклеточным доменам (см. von Heijne, 1995, BioEssays 17:25-

15 30). Информацию о прогнозировании доменов белка можно альтернативно получить на таких Web-сайтах сети Интернет, как http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED_form.html.

Настоящее изобретение относится к конструированию молекул нуклеиновых кислот, кодирующих молекулы химерных полипептидов, которые встраивают в вектор, способный экспрессировать молекулы химерных полипептидов при введении в приемлемую клетку-

20 хозяина. Приемлемыми клетками-хозяевами являются, но не ограничиваются ими, бактериальные клетки, дрожжевые клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Для конструирования экспрессирующих векторов, кодирующих молекулы химерных полипептидов под контролем сигналов транскрипционного/трансляционного контроля, можно использовать любые методы, применяемые специалистами в данной области для

25 встраивания фрагментов ДНК в вектор. Указанные методы могут включать методы рекомбинантных ДНК и методы синтеза *in vitro* и рекомбинации *in vivo* (генетическую рекомбинацию) (см. Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY).

30 Экспрессию молекул нуклеиновых кислот, кодирующих молекулы химерных полипептидов, можно регулировать второй нуклеотидной последовательностью так, чтобы молекула химерного полипептида была экспрессирована в хозяине, трансформированном молекулой рекомбинантной ДНК. Например, экспрессию описанных молекул химерных полипептидов можно регулировать любым промотором/энхансером, известным в данной

35 области. Промоторы, которые можно использовать для регулирования экспрессии молекул химерных полипептидов, включают, но не ограничиваются ими, длинный концевой повтор, описанный в статье Скуинто и др. (Squinto et al., 1991, Cell 65:1-20); раннюю промоторную область SV40 (Beruoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), промотор CMV, 5'-концевой повтор M-MuLV, промотор, находящийся в длинном 3'-концевом повторе

40 вируса саркомы Рауса (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797), промотор тимидинкиназы герпеса (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:144-1445), регуляторные последовательности гена металлотионина (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); про-кариотические экспрессирующие векторы, такие как промотор β -лактамазы (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:

45 3727-3731) или tac-промотор (DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 21-25, см. также "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94); промоторы из дрожжей или других грибов, такие как промотор Gal 4, промотор ADH (алкогольдегидрогеназы), промотор PGK (фосфоглицеролкиназы), промотор щелочной фосфатазы и нижеследующие животные области транскрипционного контроля

50 животных, которые характеризуются тканевой специфичностью и используются в трансгенных животных: область генного контроля эластазы I, которая активна в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987,

Hepatology 7:425-515); область генного контроля инсулина, которая активна в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122), область генного контроля иммуноглобулина, которая активна в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), область вирусного контроля опухоли молочной железы у мышей, которая активна в клетках яичка, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), область генного контроля альбумина, которая активна в печени (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276), область генного контроля альфа-фетопротеина, которая активна в печени (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58); область генного контроля альфа-1-антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171), область генного контроля бета-глобина, которая активна в миелоидных клетках (Mogam et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); область генного контроля основного белка миелина, которая активна в олигодендроцитах головного мозга (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); область генного контроля легкой цепи-2 миозина, которая активна в скелетных мышцах (Shani, 1985, Nature 314:283-286) и область генного контроля гонадотропного гормона, которая активна в гипоталамусе (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением экспрессирующие векторы, способные реплицироваться в бактериальном или эукариотическом хозяине и содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую вышеописанную молекулу химерного полипептида, используют для трансфекции хозяина, тем самым регулируя экспрессию таких нуклеиновых кислот с целью продуцирования молекул химерного полипептида, которые затем могут быть выделены в биологически активной форме. В используемом здесь значении термин "биологически активная форма" означает форму, способную связываться с VEGF.

Экспрессирующие векторы, содержащие описанные молекулы химерной нуклеиновой кислоты, можно идентифицировать по трем общим признакам: (а) гибридизация ДНК-ДНК, (b) наличие или отсутствие функций гена-"маркера" и (с) экспрессия встроенных последовательностей. В соответствии с первым признаком наличие чужеродного гена, встроенного в экспрессирующий вектор, можно обнаружить по гибридизации ДНК-ДНК, используя зонды, содержащие последовательности, которые гомологичны вставленным последовательностям молекул химерных полипептидов. В соответствии с вторым подходом рекомбинантную систему вектор/хозяин можно идентифицировать и выбрать с учетом наличия или отсутствия определенных функций гена-"маркера" (например, активность тимидинкиназы, устойчивость к антибиотикам, фенотип трансформации, образование телец включения в бакуловирусе и т.д.), вызванных введением чужеродных генов в вектор. Например, если последовательность ДНК молекулы химерного полипептида встроена в последовательность гена-маркера вектора, рекомбинанты, содержащие вставку, можно обнаружить по отсутствию функции гена-маркера. В соответствии с третьим подходом рекомбинантные экспрессирующие векторы можно идентифицировать, анализируя продукт чужеродного гена, экспрессированный рекомбинантом. Такие анализы могут быть основаны, например, на физических или функциональных свойствах молекул химерных полипептидов.

Клетки по настоящему изобретению могут временно или предпочтительно структурно и постоянно экспрессировать молекулы химерных полипептидов.

Молекулы химерных полипептидов можно очистить любым методом, который в дальнейшем позволяет получить устойчивую, биологически активную молекулу химерного полипептида. В качестве примера, не ограничивающего объем изобретения, можно отметить, что факторы можно выделить из клеток в виде растворимых белков или телец включения, из которых их можно экстрагировать в количественном отношении 8 М раствором гидрохлорида гуанидина и диализом (см., например, Builder, et al., патент США №5663304). Для дальнейшей очистки факторов можно использовать стандартную

ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, хроматографию с обращенной фазой и гель-фильтрацию.

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая первый компонент, расположена сверху от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй компонент. В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая первый компонент, расположена внизу от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй компонент. Возможны другие варианты осуществления изобретения, в которых изменен порядок расположения первого, второго и третьего компонентов слитого полипептида.

Например, если нуклеотидная последовательность, кодирующая первый компонент, обозначена 1, нуклеотидная последовательность, кодирующая второй компонент, обозначена 2 и нуклеотидная последовательность третьего компонента обозначена 3, то порядок компонентов в выделенной нуклеиновой кислоте по данному изобретению при считывания от 5'-конца к 3'-концу может представлять собой любую из следующих шести комбинаций: 1, 2, 3; 1, 3, 2; 2, 1, 3; 2, 3, 1; 3, 1, 2 или 3, 2, 1.

Настоящее изобретение может быть также использовано для диагностических и терапевтических целей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения методы обнаружения aberrаций в функции или экспрессии вышеописанных молекул химерных полипептидов можно использовать для диагностики расстройств. В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения, манипулируя молекулами химерных полипептидов, агонистами или антагонистами, которые связывают молекулы химерных полипептидов, можно лечить болезни. В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения молекулу химерного полипептида можно использовать в качестве агента, блокирующего связывание связывающего агента с его мишенью.

В качестве примера, не ограничивающего объем изобретения, следует отметить, что способ по данному изобретению можно эффективно использовать для лечения клинических состояний, которые характеризуются проницаемостью сосудов, отеком или воспалением, таких как отек головного мозга, вызванный травмой, инсультом или опухолью; отек, вызванный воспалительными процессами, такими как псориаз или артрит, включая ревматоидный артрит; астма, генерализованный отек, вызванный ожогами; асциты и плеврит, вызванные опухолями, воспалением или травмой; хроническое воспаление дыхательных путей; синдром проницаемости капиллярных сосудов; сепсис; заболевание почек, вызванное повышенной потерей белка; и заболевания глаз, такие как старческая дегенерация желтого пятна и диабетическая ретинопатия.

Анализ аминокислотной последовательности Flt1(1-3)-Fc показывает наличие необычайно большого числа (46) основного аминокислотного остатка лизина. IEF-анализ белка Flt1(1-3)-Fc показывает, что значение *pI* белка превышает 9,3, подтверждая предположение, что данный белок является в высшей степени основным. Существует гипотеза о том, что основная природа белка Flt1(1-3)-Fc заставляет его связываться с компонентами внеклеточного матрикса и что указанное взаимодействие может быть вызвано чрезвычайно коротким обнаруживаемым периодом полувыведения из сыворотки крови, характерным для Flt1(1-3)-Fc, при инъектировании мышам. Для проверки данной гипотезы белок Flt1(1-3)-Fc ацетируют у остатков лизина, чтобы уменьшить основность. Ацетилированный белок Flt1(1-3)-Fc испытывают, выполняя описанные ниже анализы.

Следующие примеры приведены только для иллюстрации и не ограничивают объем изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Экспрессия белка Flt1(1-3)-Fc в клетках K1 CHO

Используя стандартные методы молекулярной биологии (см., например, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY)), ген, кодирующий Flt1(1-3)-Fc, вводят в экспрессирующий

вектор pEE14.1 (Lonza Biologies, plc) на сайте множественного клонирования ниже промотора CMV. Клетки K1 CHO трансфецируют конструкцией ДНК pEE14.1/Flt1(1-3)-Fc, используя липофектамин (Gaithersburg, MD). Трансфецированные клетки K1 CHO выращивают в не содержащей глутамина среде DMEM (JRH, Kansas City, MO), включающей 25 мкМ метионинсульфоксими́на (MSX) фирмы Sigma Inc., St. Louis, MO, и получают экспрессоры рекомбинантного белка, исследуя супернатанты клеток K1 CHO из более чем 100 собранных вручную изолятов колоний при помощи стандартного иммуноанализа, который позволяет обнаружить и выделить Fc человека. Выбранный собранный вручную клон амплифицируют в присутствии 100 мкМ MSX и выполняют вторую серию исследований амплифицированных клонов. Специфическая продуктивность рекомбинантного белка Flt1(1-3)-Fc самого продуцирующего клона равна 55 пг/клетку/в день.

Выбранный клон размножают в Т-образных колбах емкостью 225 см² (Corning, Acton, MA) и затем вводят во вращающиеся флаконы емкостью 8/5 л (Corning, Acton, MA), используя вышеописанные среды для культивирования клеток. Клетки удаляют из вращающихся флаконов при помощи стандартной обработки трипсином и помещают в 3,5 л суспендирующей среды. Суспендирующая среда представляет собой не содержащую глутамина среду ISCHO (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), включающую 5% фетальной телячьей сыворотки (FBS фирмы Hyclone Labs, Logan, UT), 100 мкМ MSX и добавку GS (JRH Scientific, Kansas City, MO), которая находится в биореакторе Celligen емкостью 5 л (New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ) с плотностью $0,3 \times 10^6$ клеток/мл. Когда клетки достигают плотности $3,6 \times 10^6$ /мл и адаптируются к суспензии, их переносят в биореактор емкостью 60 л (ABEC, Allentown, PA) с плотностью $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в 20 л среды ISCHO с 5% фетальной телячьей сыворотки. Через два дня в биореактор дополнительно вводят 20 л ISCHO+5% фетальной телячьей сыворотки. Клетки выращивают в течение еще двух дней до достижения конечной плотности, равной $3,1 \times 10^6$ клеток/мл, при этом конечная концентрация Flt1(1-3)-Fc во время сбора клеток равна 95 мг/л. Собранные клетки удаляют фильтрацией тангенциального потока, используя 0,45 мкм фильтры Prostack (Millipore, Inc., Bedford, MA).

Пример 2. Очистка белка Flt1(1-3)-Fc, полученного из клеток K1 CHO

Белок Flt1(1-3)-Fc первоначально очищают аффинной хроматографией. Для связывания с высокой специфичностью части Fc молекулы используют колонку Protein A. Очищенный по сродству белок концентрируют и пропускают через колонку SEC. Затем белок элюируют в буфере. Ниже подробно описаны указанные способы.

Материалы и методы

Все химические вещества предоставлены фирмой J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, за исключением PBS, который предоставлен в виде 10-кратного концентрата фирмой Life Technologies, Gaithersburg, MD. Смолы для препаратов Protein A Fast Flow и Superdex 200 предоставлены фирмой Pharmacia, Piscataway, NJ. Оборудование и мембраны для концентрирования белка предоставлены фирмой Millipore, Bedford, MA.

Примерно 40 л фильтрованной через 0,45 мкм фильтры кондиционированной клетками CHO среды, содержащей белок Flt1(1-3)-Fc, вводят в 290 мл колонку Protein A Fast Flow (диаметр 10 см), которую предварительно уравнивают PBS. Колонку промывают PBS, содержащим 350 мМ NaCl и 0,02% CHAPS, и связанный белок элюируют 20 мМ лимонной кислоты, содержащей 10 мМ Na₂HPO₄. В результате элюирования получен один пик и его показатель pH доведен до нейтрального значения 1М раствором NaOH. Фракции элюата концентрируют примерно до 9 мг/мл фильтрацией тангенциального потока через регенерированные целлюлозные мембраны с молекулярной массой 10000 и концентрированием перемешиваемых клеток. Чтобы удалить агрегаты и другие загрязняющие примеси, концентрированный белок вводят в колонку, заполненную смолой для препаратов Superdex 200 (10 см × 5 см), и исследуют в PBS, содержащем 5% глицерина. Основные пиковые фракции объединяют, фильтруют в стерильных условиях,

отбирают аликвоту белка и хранят при -80°C.

Пример 3. Ацетилирование белка Flt1(1-3)-Fc

Два миллиграмма белка Flt1(1-3)-Fc ацетируют в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору для модификации сульфо-NHS-ацетатом (Pierce Chemical Co.,
5 Rockford, IL, Cat.#26777).

Пример 4. Исследование ацетилированного белка Flt1(1-3)-Fc

(a) IEF-анализ. Белок Flt1(1-3)-Fc и ацетилированный белок Flt1(1-3)-Fc анализируют, выполняя стандартный IEF-анализ. Как показано на фиг. 1, белок Flt1(1-3)-Fc не способен проникать в гель, поэтому он должен иметь показатель pI выше 9,3,
10 который является наибольшим показателем pI в контроле. Однако ацетилированный белок Flt1(1-3)-Fc может проникать в гель и уравнивается при pI около 5,2. Полученный результат показывает, что ацетилирование значительно уменьшает суммарный положительный заряд белка, а также показатель pI.

(b) Связывание с компонентами внеклеточного матрикса

15 Связывание белка Flt1(1-3)-Fc и ацетилированного белка Flt1(1-3)-Fc с компонентами внеклеточного матрикса испытывают, выполняя анализ, имитирующий взаимодействие с компонентами внеклеточного матрикса. При выполнении данного анализа 96-луночные планшеты для культивирования ткани покрывают Matrigel (96-луночный планшет с тонким
20 слоем матрикса Biosoat MATRIGEL®, № каталога 40607, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Планшеты инкубируют, добавляя в лунки разные концентрации белка Flt1(1-3)-Fc, ацетилированного белка Flt1(1-3)-Fc или rTie2-Fc (посторонний контрольный белок). Планшеты инкубируют в течение 1-2 часов при комнатной температуре или 37°C и детектируют связанные белки, добавляя в лунки вторичное, конъюгированное со щелочной
25 фосфатазой антитело против Fc человека. Затем в лунки добавляют субстрат на основе щелочной фосфатазы и измеряют оптическую плотность. На фиг.2 показаны результаты данного анализа. Подобно постороннему контрольному белку rTie2-Fc ацетилированный белок Flt1(1-3)-Fc не связывается с планшетом, покрытым Matrigel, в то время как неацетилированный белок Flt1(1-3)-Fc характеризуется значительным связыванием. Полученные результаты показывают, что ацетилирование основных аминокислотных
30 остатков является эффективным способом подавлять взаимодействие зарядов, которое происходит между положительно заряженными белками и отрицательно заряженными компонентами внеклеточного матрикса in vivo.

Пример 5. Обработка белка Flt1(1-3)-Fc полиэтиленгликолем

35 Хотя известно, что обработка белков полиэтиленгликолем (PEG) усиливает их активность in vivo, повышая устойчивость и биологическую доступность и доводя до минимума иммуногенность (см. приведенные выше ссылки), существует противоположное мнение, что молекулы полиэтиленгликоля, которые являются слишком большими и не могут быть отфильтрованы клубочками почек, улучшают фармакокинетические свойства
40 белков. Не ограничивая себя теорией, авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что обработка молекул Flt1(1-3)-Fc полиэтиленгликолем может улучшить фармакокинетические свойства, но не вследствие изменения положительного заряда или уменьшения значения pI Flt1(1-3)-Fc, а в результате физической защиты положительных зарядов от взаимодействия с внеклеточным матриксом. Авторы настоящего изобретения
45 сделали попытку улучшить фармакокинетические свойства молекул Flt1(1-3)-Fc путем присоединения цепей полиэтиленгликолей с молекулярной массой 20000, как это описано ниже.

Материалы и методы

50 Очищенный белок Flt1(1-3)-Fc, выделенный из клеток CHO (см. выше), используют в нижеследующих экспериментах по обработке полиэтиленгликолем. Функциональные полиэтиленгликоли предоставлены фирмой Shearwater Polymers, Huntsville, AL.; бицин предоставлен фирмой Sigma, St. Louis, MO; колонка с суперозой Superose 6 предоставлена фирмой Pharmacia, Piscataway, NJ; PBS в виде 10-кратного концентрата предоставлен фирмой Life Technologies, Gaithersburg, MD; глицерин предоставлен фирмой

J.T.Baker, Phillipsburg, NJ; и преформированные гели Bis-Tris предоставлены фирмой Novex, CA.

В лабораторных исследованиях использованы цепи PEG с молекулярной массой 20000, имеющие функциональные аминспецифические концевые части, которые предназначены для оценки разных условий реакций, в которых изменяется стехиометрия PEG:белок. Выполняя указанные реакции и анализируя образцы стандартным методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE), белок Flt1(1-3)-Fc в концентрации 1,5 мг/мл подвергают взаимодействию при pH 8,1 с молекулами SPA-PEG (сукцинимидилпропионат полиэтиленгликоля) с молекулярной массой 20000 при молярном соотношении PEG и мономера Flt1(1-3)-Fc, равном 1:6. Реакцию выполняют при 8°C в течение ночи. Для первичной очистки продукты реакции вводят в колонку с суперозой Superose 6, 10 мм×30 см, уравновешенную PBS, содержащим 5% глицерина. В колонке происходит разделение обработанных полиэтиленгликолем молекул Flt1(1-3)-Fc в соответствии со степенью обработки полиэтиленгликолем. Объединяют фракции, соответствующие однократно и двукратно обработанному полиэтиленгликолем димерному белку Flt1(1-3)-Fc, судя по характеру полос на восстанавливающих и невосстанавливающих гелях для SDS-PAGE. Концентрацию белка определяют, измеряя оптическую плотность при 280 нм. Обработанный полиэтиленгликолем белок Flt1(1-3)-Fc фильтруют в стерильных условиях, отбирают аликвоту белка и хранят при -40°C.

Пример 6. Связывание немодифицированного, ацетилированного и обработанного полиэтиленгликолем белка Flt1(1-3)-Fc при выполнении анализа на основе Biacore

Немодифицированные, ацетилированные и обработанные полиэтиленгликолем белки Flt1(1-3)-Fc испытывают, выполняя анализ на основе Biacore, с целью оценки их способности связываться с лигандом Flt1, VEGF. При выполнении данного анализа немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc иммобилизуют на поверхности чипа Biacore (см. инструкции по использованию чипа Biacore, фирма Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, для выполнения стандартных анализов) и образец, содержащий 0,2 мкг/мл VEGF и немодифицированный, ацетилированный или обработанный полиэтиленгликолем белок Flt1(1-3)-Fc (каждый в концентрации 25 мкг/мл) пропускают через чип, покрытый Flt1(1-3)-Fc. Чтобы свести до минимума эффекты неспецифического связывания, связанные образцы промывают 0,5 М раствором NaCl. В одном образце немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc смешивают с гепарином. Гепарин имеет отрицательно заряженную молекулу, и белок Flt1(1-3)-Fc имеет положительно заряженную молекулу, поэтому при смешивании двух таких молекул они должны взаимодействовать благодаря своим зарядам. Это по существу нейтрализует присущий белку Flt1(1-3)-Fc положительный заряд, при этом молекула приобретает свойства химически или генетически модифицированной молекулы, в связи с чем уменьшается ее заряд и способность связываться в результате взаимодействия зарядов. Как показано на фиг. 3, ацетилированные (столбцы 13-16), обработанные полиэтиленгликолем (столбцы 17-20) и обработанные гепарином белки Flt1(1-3)-Fc (столбцы 21-24) способны полностью конкурировать со связанным с чипом Biacore белком Flt1(1-3)-Fc за связывание с VEGF по сравнению с контрольным образцом (столбцы 1-4) и посторонним белком (столбцы 5-8). Немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc (столбцы 5-6), по-видимому, только частично конкурирует со связанным с чипом Biacore белком Flt1(1-3)-Fc за связывание VEGF. Однако, промывая связанные образцы 0,5 М раствором NaCl (столбцы 7-8), получают профиль связывания, аналогичный модифицированным формам белка Flt1(1-3)-Fc, который свидетельствует о том, что немодифицированный белок образует неспецифическую связь с чипом, которую можно разрушить, производя промывку солевым раствором.

Пример 7. Связывание немодифицированного, ацетилированного и обработанного полиэтиленгликолем белка Flt1(1-3)-Fc при выполнении анализа на основе ELISA

Немодифицированные, ацетилированные и обработанные полиэтиленгликолем белки Flt1(1-3)-Fc испытывают при помощи стандартного анализа на основе ELISA с целью

оценки их способности связывать лиганд VEGF рецептора Flt1. Как показано на фиг. 4, как обработанные полиэтиленгликолем, так и ацетилованные белки Flt1(1-3)-Fc способны связываться с VEGF, свидетельствуя о том, что модификация белка обработкой полиэтиленгликолем или ацетилированием не влияет на его способность связывать указанный лиганд.

Пример 8. Фармакокинетический анализ немодифицированного, ацетилованного и обработанного полиэтиленгликолем белка Flt1(1-3)-Fc

Эксперименты *in vivo* выполняют для оценки фармакокинетических профилей немодифицированного, ацетилованного и обработанного полиэтиленгликолем белка Flt1(1-3)-Fc. Мышам Balb/c (23-28 г; 3 мыши в группе) подкожно инъецируют 4 мг/кг немодифицированного, ацетилованного или обработанного полиэтиленгликолем белка Flt1(1-3)-Fc. У мышей из хвоста берут кровь через 1, 2, 4, 6, 24 часа, 2 дня и 3 дня после инъекции белка. Сыворотку анализируют при помощи стандартного анализа на основе ELISA, предназначенного для обнаружения белка Flt1(1-3)-Fc. Процедуру анализа можно кратко описать следующим образом: планшет для ELISA покрывают VEGF, связывают сыворотку, содержащую немодифицированный, ацетилованный или обработанный полиэтиленгликолем белок Flt1(1-3)-Fc, и считывают результаты, используя антитело против Fc, связанное со щелочной фосфатазой. Как показано на фиг. 5, T_{max} для всех белков Flt1(1-3)-Fc находится в интервале от 6 до 24 часов. C_{max} для разных белков имеет следующие значения: немодифицированный белок: 0,06 мкг/мл - 0,15 мкг/мл; ацетилованный белок: 1,5 мкг/мл - 4,0 мкг/мл и обработанный полиэтиленгликолем белок: примерно 5 мкг/мл.

Пример 9. Ступенчатое ацетилирование белка Flt1(1-3)-Fc

Чтобы определить минимальную степень ацетилирования, необходимую для устранения связывания с компонентами внеклеточного матрикса, производят ступенчатое ацетилирование белка Flt1(1-3)-Fc, используя возрастающие количества молярного избытка ацетилирующего реагента в ацетилируемой реакционной смеси. Используют следующие молярные избытки: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100 молей ацетилирующего реагента на 1 моль мономера Flt1(1-3)-Fc. Реакции выполняют в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору для модификации сульфо-NHS-ацетатом (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, Cat. #26777).

Пример 10. Исследование ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc

(a) IEF-анализ. Немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc и ступенчато ацетилованные белки Flt1(1-3)-Fc анализируют, выполняя стандартный IEF-анализ. Как показано на фиг. 6А-6В, немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc не способен проникать в гель из-за чрезвычайно высокого значения pI (выше 9,3). Однако большинство ступенчато ацетилованных белков Flt1(1-3)-Fc (образцы, ацетилованные 30-100-кратным молярным избытком) способны проникать в гель и уравниваются при значениях pI 4,55-8,43 в зависимости от степени ацетилирования. Полученный результат показывает, что ацетилирование может изменять положительный заряд белка в зависимости от дозы и что значение pI можно уменьшить, регулируя степень ацетилирования.

(b) Связывание ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc с компонентами внеклеточного матрикса

Белок Flt1(1-3)-Fc и ступенчато ацетилованный белок Flt1(1-3)-Fc испытывают на связывание с компонентами внеклеточного матрикса, выполняя вышеописанный анализ, позволяющий имитировать взаимодействие с компонентами внеклеточного матрикса. В лунки планшета добавляют разные концентрации немодифицированного белка Flt1(1-3)-Fc, ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc (образцы, ацетилованные 10-, 20- и 30-кратным молярным избытком) или белок rTie2-Fc (посторонний контрольный белок). Планшеты инкубируют в течение 1-2 часов при комнатной температуре или 37°C и детектируют связанные белки, добавляя в лунки вторичное, конъюгированное со щелочной фосфатазой антитело против Fc человека. Затем в лунки добавляют субстрат на основе щелочной фосфатазы и измеряют оптическую плотность. На фиг. 7 показаны результаты

данного анализа. Подобно постороннему контрольному белку rTie2-Fc ступенчато ацетилованный белок Flt1(1-3)-Fc (образцы, ацетилованные 20-и 30-кратным молярным избытком) незначительно связывается с планшетом, покрытым Matrigel, в то время как неацетилованный белок Flt1(1-3)-Fc характеризуется значительным связыванием. Связывание является насыщаемым, показывая, что белок Flt1(1-3)-Fc скорее всего связывается со специфичными сайтами, а не вступает в более общее обусловленное зарядом взаимодействие, которое не может быть насыщаемым. Образец, ацетилованный 10-кратным молярным избытком, характеризуется меньшим связыванием, но данная степень ацетилирования является недостаточной для полного блокирования связывания с компонентами внеклеточного матрикса. У образцов, ацетилованных 20-кратным и большим молярным избытком, детектируемое связывание отсутствует несмотря на то, что при выполнении IEF-анализа (фиг. 6А и 6В) у образцов, ацетилованных более низким молярным избытком, обнаружен большой суммарный положительный заряд. Полученный результат показывает, что необязательно полностью ацетилировать все имеющиеся основные аминокислоты, чтобы устранить связывание с компонентами внеклеточного матрикса.

(с) Связывание ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc при выполнении анализа на основе Biacore

Немодифицированные и ступенчато ацетилованные белки Flt1(1-3)-Fc испытывают, выполняя анализ на основе Biacore, с целью оценки их способности связываться с лигандом Flt1, VEGF. При выполнении данного анализа немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc (0,5, 1,0 или 5,0 мкг/мл) иммобилизуют на поверхности чипа Biacore (см. инструкции по использованию чипа Biacore, фирма Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, для выполнения стандартных анализов) и раствор, содержащий 0,2 мкг/мл VEGF и немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc (в концентрации 0,5, 1,0 или 5,0 мкг/мл) или 10 разных образцов ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc (в концентрации 0,5, 1,0 или 5,0 мкг/мл каждый), наносят на чип, покрытый Flt1(1-3)-Fc. Как показано на фиг. 8, при субстехиометрическом соотношении (0,5 мкг/мл немодифицированного или ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc на 0/2 мкг/мл VEGF) белка Flt1(1-3)-Fc (как немодифицированного, так и ступенчато ацетилованного) недостаточно в растворе для полного связывания VEGF. При концентрации 1,0 мкг/мл, которая приближается к стехиометрическому соотношению 1:1, как немодифицированные, так и ступенчато ацетилованные белки Flt1(1-3)-Fc лучше конкурируют за преимущественное право связывать VEGF, но белка Flt1(1-3)-Fc (как немодифицированного, так и ступенчато ацетилованного) по-прежнему недостаточно для полного связывания имеющегося VEGF. Однако при концентрации 5,0 мкг/мл, которая в несколько раз превышает стехиометрическое соотношение 1:1, как белок Flt1(1-3)-Fc, так и ступенчато ацетилованные белки Flt1(1-3)-Fc способны связывать VEGF независимо от степени ацетилирования. Это ясно показывает, что ацетилирование не изменяет способность белка Flt1(1-3)-Fc связывать VEGF.

(d) Фармакокинетический анализ ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc

Эксперименты *in vivo* выполняют для оценки фармакокинетических профилей немодифицированного и ступенчато ацетилованного белка Flt1(1-3)-Fc. Мышам Balb/c (23-28 г) подкожно инъецируют 4 мг/кг немодифицированного белка Flt1(1-3)-Fc или ступенчато ацетилованных белков Flt1(1-3) - Fc (образцы, ацетилованные 10-, 20-, 40-, 60- и 100-кратным молярным избытком) (3 мышам вводят немодифицированный белок, а также образцы, ацетилованные 10-, 20- и 40-кратным молярным избытком, и 2 мышам вводят образцы, ацетилованные 60- и 100-кратным молярным избытком). У мышей из хвоста берут кровь через 1, 2, 4, 6, 24 часа, 2 дня и 3 дня после инъекции. Сыворотку анализируют при помощи анализа на основе ELISA, предназначенного для обнаружения Flt1(1-3)-Fc (описанного выше). На фиг. 9 показаны результаты данного исследования. T_{max} для всех испытанных белков Flt1(1-3)-Fc соответствует 6 часам, и C_{max} имеет следующие значения: немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc - 0,06 мкг/мл;

образец, ацетилованный 10-кратным молярным избытком, - 0,7 мкг/мл, образец, ацетилованный 20-кратным молярным избытком, - 2 мкг/мл, образец, ацетилованный 40-кратным молярным избытком, - 4 мкг/мл, образец, ацетилованный 60-кратным молярным избытком, - 2 мкг/мл, образец, ацетилованный 100-кратным молярным избытком, - 1 мкг/мл. Полученные результаты показывают, что ацетилирование или обработка полиэтиленгликолем белка Flt1(1-3)-Fc значительно улучшает его фармакокинетический профиль.

Пример 11. Создание мутанта с делецией основной области Flt1(1-3)-Fc, обозначенного Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc

С учетом того, что ацетилованный белок Flt1(1-3)-Fc, у которого показатель pI ниже 6, характеризуется гораздо лучшей фармакокинетикой, чем немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc с высоким положительным зарядом ($pI > 9,3$), возникает вопрос, можно ли отнести различия в фармакокинетике за счет суммарного заряда белка, который вызывает его сцепление с отрицательно заряженным компонентом внеклеточного матрикса, или имеются на поверхности белка Flt1(1-3)-Fc конкретные участки, которые образуют специфичные сайты связывания для компонентов внеклеточного матрикса. Например, известно, что многие белки имеют сайты связывания гепарина, которые часто образуют кластер основных остатков. Иногда указанные остатки встречаются в виде кластера в первичной последовательности белка; в некоторых научных источниках описаны "согласованные последовательности" для таких сайтов связывания гепарина (см., например, Hileman, et al., 1998, Bioassays 20 (2):156-67). В других случаях известная кристаллическая структура белка позволяет выявить кластер положительно заряженных остатков на поверхности белка, но указанные остатки поступают из разных областей первичной последовательности и объединяются только при трехмерной укладке цепи в белке. Таким образом, трудно установить, образует ли выделенный аминокислотный остаток часть кластера основных остатков на поверхности белка. Однако, если в первичной последовательности имеется кластер положительно заряженных аминокислотных остатков, можно небеспричинно предположить, что указанные остатки расположены близко друг от друга в пространственном отношении и поэтому могут быть частью сайта связывания компонентов внеклеточного матрикса. Проведены всесторонние исследования рецептора Flt1 и описаны разные домены (см., например, Tanaka et al., 1997, Jpn. J. Cancer Res. 88:867-876). Рассматривая нуклеотидную и аминокислотную последовательность, показанную на фиг. 10A-10D, можно идентифицировать сигнальную последовательность, регулирующую секрецию, которая расположена в начале последовательности и доходит до глицина, кодируемого нуклеотидами 76-78. Зрелый белок начинается с Ser-Lys-Leu-Lys, начиная с нуклеотида 79 нуклеотидной последовательности. Домен 1 Ig рецептора Flt1 охватывает нуклеотиды 79-393 и заканчивается аминокислотами Ser-Asp-Thr. Домен 2 Ig рецептора Flt1 охватывает нуклеотиды 394-687 (кодирующие аминокислоты от Gly-Arg-Pro до Asn-Thr-Ile), и домен 3 Ig рецептора Flt1 охватывает нуклеотиды 688-996 (кодирующие аминокислоты от Ile-Asp-Val до Asp-Lys-Ala). Указанный белок имеет связывающую аминокислотную последовательность, Gly-Pro-Gly, кодируемую нуклеотидами 997-1005, за которой следует нуклеотидная последовательность, кодирующая Fc человека (нуклеотиды 1006-1701 или аминокислоты от Glu-Pro-Lys до Pro-Gly-Lys-терминирующего кодона).

Более детальный анализ аминокислотной последовательности Flt1 показывает, что существует кластер, а именно аминокислотные остатки 272-281 (KNKRASVRR), показанные на фиг. 10A-10D, в которых 6 из 10 аминокислотных остатков являются основными. Данная последовательность расположена в домене 3 Ig рецептора Flt1 (см. фиг. 11) и сама по себе не имеет существенного значения для связывания лиганда VEGF, но определяет повышенное сродство связывания с лигандом. Сравнительный анализ последовательности домена 3 Ig с последовательностью домена 2 Ig показывает, что в данной области два домена Ig имеют низкий уровень сопоставления друг с другом и в домене 3 Ig имеется примерно 10 дополнительных аминокислот. Анализ профилей гидрофильности

(программное обеспечение MacVector) двух указанных доменов отчетливо указывает на наличие гидрофильной области в белке (фиг. 12A-12B). На основании полученных данных можно предположить, что действительная трехмерная конформация домена 3 Ig рецептора Flt1 делает возможной некоторое расширение, что невозможно в домене 2 Ig рецептора

Flt1. Для проверки данной гипотезы удаляют 10 дополнительных аминокислот и исследуют полученный белок, чтобы определить, оказывает ли указанная делеция благоприятное влияние на фармакокинетику без серьезного ухудшения сродства рецептора к VEGF. Конструкция ДНК, созданная стандартными методами молекулярной биологии (см., например, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY)) в экспрессирующем векторе pMT21

млекопитающего (Genetics Institute, Inc., Cambridge, MA), именуется Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc .

Конструкцию Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc получают из Flt1(1-3)-Fc путем делеции нуклеотидов 814-843 (показанных на фиг. 10A-10D), позволяющей удалить высокоосновную последовательность, состоящую из 10 аминокислотных остатков Lys-Asn-Lys-Arg-Ala-Ser-Val-Arg-Arg-Arg, из домена 3 Ig рецептора Flt1.

Последовательность конечной конструкции ДНК секвенирована при помощи секвенатора ДНК ABI 373A и набора для циклического секвенирования терминатора дидезокси методом (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Последовательность

Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc показана на фиг. 13A-13D.

Пример 12. Создание мутанта с делецией основной области Flt1(1-3)-Fc, обозначаемого Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc

Вторая делеционная мутантная конструкция, обозначаемая Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc , получена из конструкции Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc путем делеции домена 1 Ig рецептора Flt1, кодируемого нуклеотидами 79-393 (см. фиг. 10A-10D); для удобства нуклеотиды 73-78 (TCA GGT) заменены TCC GGA. Благодаря этому введен сайт рестрикции (BspE1) без изменения связанной с ним аминокислотной последовательности Ser-Gly. В данной конструкции ДНК, созданной стандартными методами молекулярной биологии (см., например, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY)) в экспрессирующем векторе pMT21 млекопитающего (Genetics Institute, Inc., Cambridge, MA), последовательность также была секвенирована с помощью секвенатора ДНК ABI 373A и набора для циклического секвенирования терминатора дидезокси методом (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Последовательность Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc показана на фиг. 14A-14C.

Пример 13. Создание делеционного мутанта Flt1(1-3)-Fc, обозначенного Mut3: Flt1(2-3)-Fc

Третья делеционная мутантная конструкция, обозначаемая Mut3: Flt1(2-3)-Fc, создана аналогично мутантной конструкции Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc , за исключением того, что домен 3 Ig рецептора Flt1 оставлен без изменения (аминокислоты основной области не удалены). Данная конструкция создана стандартными методами молекулярной биологии и ее последовательность секвенирована так, как это описано выше. Последовательность Mut3: Flt1(2-3)-Fc показана на фиг. 15A-15C.

Пример 14. Создание N-гликозилированного мутанта основной области Flt1(1-3)-Fc, обозначенного Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc

Была создана конечная конструкция, в которой сайт N-гликозилирования введен в середину основной области домена 3 Ig рецептора Flt1. Данная конструкция, обозначенная как Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc , создана путем замены нуклеотидов 824-825 с GA на AC при одновременной замене кодируемого остатка Arg (AGA) остатком Asn (AAC) (см.

фиг. 10A-10D). Поэтому полученная аминокислотная последовательность изменена с Arg-Ala-Ser на Asn-Ala-Ser, что соответствует обязательному сигналу (Asn-Xxx-Ser/Thr) для добавления сайта N-гликозилирования у остатка Asn. Последовательность Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc показана на фиг.16A-16D.

5 Пример 15. Исследование ацетилированного белка Flt1(1-3)-Fc и мутантов Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc и Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc

(а) Связывание с компонентами внеклеточного матрикса

10 Чтобы определить, обладают ли три модифицированных белка улучшенными фармакокинетическими свойствами, 96-луночные планшеты, покрытые Matrigel (описанные выше), инкубируют с разными концентрациями мутантных белков и обнаруживают конъюгированные со щелочной фосфатазой антитела против Fc человека. Как показано на фиг. 18, выполненный эксперимент показывает, что если немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc интенсивно связывается с указанными лунками, то белок Mut3: Flt1(2-3)-Fc связывается несколько слабее, белок Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc связывается еще слабее и
15 белок Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc характеризуется лучшим профилем, связываясь слабее, чем любые другие мутантные белки. Гликозилированный мутантный белок Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc обладает минимальным преимуществом, о чем свидетельствуют
20 результаты анализа на Matrigel. Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что линейную последовательность положительно заряженных аминокислот можно удалить из первичной последовательности, в результате чего уменьшается взаимодействие зарядов с компонентами внеклеточного матрикса.

(b) Связывание Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc и Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc при выполнении анализа
25 на основе Biacore

Немодифицированные и ацетилированные белки Flt1(1-3)-Fc, а также генетически модифицированные белки Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc и Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc испытывают, выполняя анализ на основе Biacore, с целью оценки их способности связываться с лигандом Flt1, VEGF. При выполнении данного анализа немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc (0,25, 0,5 или 1,0 мкг/мл) иммобилизуют на поверхности чипа Biacore (см.
30 инструкции по использованию чипа Biacore, фирма Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, для выполнения стандартных анализов) и раствор, содержащий 0,1 мкг/мл VEGF и очищенный немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc или супернатант клеток COS, содержащий немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc (в концентрации около 0,25, 0,5 или 1,0
35 мкг/мл), очищенный ацетилированный белок Flt1(1-3)-Fc (в концентрации 0,25, 0,5 или 1,0 мкг/мл), супернатант клеток COS, содержащий Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc (в концентрации примерно 0,25, 0,5 или 1,0 мкг/мл), или супернатант клеток COS, содержащий Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc (в концентрации 0,25, 0,5 или 1,0 мкг/мл), пропускают через чип,
40 покрытый Flt1(1-3)-Fc. Как показано на фиг. 17, при субстехиометрическом соотношении (0,25 мкг/мл Flt1(1-3)-Fc немодифицированных, ацетилированных или генетически модифицированных образцов на 0,1 мкг/мл VEGF) белка Flt1(1-3)-Fc недостаточно, чтобы блокировать связывание VEGF с Flt1(1-3)-Fc, иммобилизованным на чипе Biacore. При концентрации 0,5 мкг/мл немодифицированных, ацетилированных или генетически
45 модифицированных белков Flt1(1-3)-Fc стехиометрическое соотношение приближается к 1:1, при этом увеличивается способность белков блокировать связывание VEGF с чипом Biacore. При концентрации 1,0 мкг/мл немодифицированных, ацетилированных или генетически модифицированных белков Flt1(1-3)-Fc стехиометрическое соотношение приближается к 10:1, в результате чего белки Flt1(1-3)-Fc обеспечивают связывание
50 VEGF с чипом Biacore, но их способность не является эквивалентной. Немодифицированные, ацетилированные белки и Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc по существу в равной степени блокируют связывание VEGF, в то время как

Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc блокирует связывание менее эффективно. Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что можно уменьшить неспецифичное связывание положительно заряженной молекулы, удаляя генетическим путем линейную последовательность преимущественно отрицательно заряженных аминокислот.

(с) Связывание Muti: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc, Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc и Mut3: Flt1(2-3)-Fc при выполнении анализа на основе ELISA

Способность трех мутантных белков связывать лиганд VEGF рецептора Flt1 определяют, выполняя эксперименты по связыванию, в которых 96-луночные планшеты, покрытые VEGF, инкубируют с разными концентрациями соответствующего мутантного белка, после промывки определяют связанное количество лиганда, инкубируя культуры с конъюгированным со щелочной фосфатазой антителом против Fc человека, и производят количественное определение колориметрическим методом, добавляя соответствующий субстрат на основе щелочной фосфатазы. Как показано на фиг. 19, результаты данного эксперимента свидетельствуют о том, что все мутантные белки способны одинаково связывать VEGF при испытанных концентрациях.

Пример 16. Фармакокинетический анализ ацетилированного белка Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc и немодифицированного белка Flt1(1-3)-Fc

Эксперименты *in vivo* выполняют для оценки фармакокинетических профилей немодифицированного белка Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc и ацетилированного 40-кратным молярным избытком белка Flt1(1-3)-Fc. Мышам Balb/c (25-30 г) подкожно инъецируют 4 мг/кг немодифицированного белка Flt1(1-3)-Fc, ацетилированного 40-кратным молярным избытком белка Flt1(1-3)-Fc и белка Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc (по 4 мыши в каждой группе). У мышей из хвоста берут кровь через 1, 2, 4, 6, 24 часа, 2 дня, 3 дня и 5 дней после инъекции. Сыворотку анализируют при помощи анализа ELISA, предназначенного для обнаружения белка Flt1(1-3)-Fc, который заключается в том, что планшеты для ELISA покрывают VEGF, осуществляют связывание Flt1(1-3)-Fc и считывают данные, используя антитело против Fc, связанное со щелочной фосфатазой. Как показано на фиг. 20, C_{max} для указанных реагентов имеет следующие значения: немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc - 0,15 мкг/мл; ацетилированный 40-кратным молярным избытком белок Flt1(1-3)-Fc - 1,5 мкг/мл и Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc - 0,7 мкг/мл.

Пример 17. Создание вектора модифицированного рецептора Flt1

Логическим обоснованием для создания модифицированных вариантов рецептора Flt1 (известного также как VEGFR1) является то, что белковая последовательность Flt1 является высокоосновной и, вероятно, поэтому связывается с внеклеточным матриксом (ECM). Основной характер Flt1, по-видимому, объясняет тот факт, почему немодифицированный белок Flt1(1-3)-Fc (описанный выше) имеет плохую фармакокинетику, что затрудняет его использование в качестве лекарственного средства. Как указывалось выше, химически модифицированная форма ацетилированного 40-кратным молярным избытком белка Flt1(1-3)-Fc, далее именуемая A40, имеет гораздо лучший фармакокинетический (PK) профиль по сравнению с неацетилированным белком Flt1(1-3)-Fc. Поэтому были предприняты попытки сконструировать молекулы ДНК, которые можно использовать для рекомбинантной экспрессии модифицированных форм молекулы рецептора Flt1, обладающих улучшенным фармакокинетическим профилем, характерным для A40, но сохраняющих способность прочно связываться с VEGF.

Из научной литературы известно, что первый домен Ig рецептора Flt1 (который имеет суммарный заряд +5 при нейтральном pH) не имеет важного значения для прочного связывания с VEGF, поэтому данный домен удаляют. Третий домен Ig (имеющий суммарный заряд +11) не имеет важного значения для связывания, но определяет более высокое сродство к VEGF, чем второй домен Ig, поэтому его полностью не удаляют, а заменяют эквивалентными доменами Flk1 (известного также как VEGFR2) и Flt4 (известного также как VEGFR3), родственными рецептору Flt1. Полученные химерные

молекулы, обозначаемые соответственно R1R2 (Flt1.D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a)) и R1R3 (Flt1D2.VEGFR3D3-Fc Δ C1 (a) и VEGFR1R3-Fc Δ C1 (a)), где R1 и Flt1D2 означают домен 2 Ig рецептора Flt1 (VEGFR1); R2 и Flk1D3 означают домен 3 Ig рецептора Flk1 (VEGFR2) и R3 и VEGFR3D3 означает домен 3 Ig рецептора Flt4 (VEGFR3), в гораздо меньшей степени связываются с ECM, о чем свидетельствуют результаты описанного ниже анализа связывания с ECM in vitro, и обладают гораздо лучшей фармакокинетикой, как это описано ниже. Кроме того, указанные молекулы способны прочно связываться с VEGF и блокировать фосфорилирование нативного рецептора Flk1, экспрессированного в эндотелиальных клетках, как это описано ниже.

(a) Создание экспрессирующей плазмиды pFlt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a)

Экспрессирующие плазмиды pMT21.Flt1(1-3).Fc (6519 п.о.) и pMT21.Flk-1(1-3).Fc (5230 п.о.) представляют собой плазмиды, которые кодируют устойчивость к ампициллину и Fc-меченные варианты доменов 1-3 Ig рецепторов Flt1 и Flk1 человека. Указанные плазмиды используют для создания фрагмента ДНК, состоящего из химеры домена 2 Ig рецептора Flt1 с доменом 3 Ig рецептора Flk1, достигаемого амплификацией соответствующих доменом Ig при помощи полимеразной реакции синтеза цепи (PCR) с последующим выполнением цикла PCR для слияния указанных двух доменов в один фрагмент. Для домена 2 Ig рецептора Flt1 использованы следующие затравки для амплификации 5'- и 3'-концов:

5': bsp/flt1D2 (5'-GACTAGCAGTCCGGAGGTAGACCTTTCGTAGAGATG-3')

3': Flt1D2-Flk1D3.as (5'-CGGACTCAGAACCACATCTATGATTGTATTGGT-3')

Затравка для амплификации 5'-конца кодирует сайт рестриционного фермента BspE1, расположенный выше от домена 2 Ig рецептора Flt1 и определяемый аминокислотной последовательностью GRPFVEM (соответствующей аминокислотам 27-33 на фиг. 21A-21C). Затравка для 3'-конца кодирует обратный комплемент 3'-конца домена 2 Ig рецептора Flt1, слитый непосредственно с 5'-концом, начинающийся у домена 3 Ig рецептора Flk1, где точка слияния обозначена как TIID рецептора Flt1 (соответствуя аминокислотам 123-126 на фиг. 21A-21C), и доходящий до VVLS (соответствуя аминокислотам 127-130 на фиг. 21A-21C) рецептора Flk1.

Для домена 3 Ig рецептора Flk1 использованы следующие затравки для амплификации 5'- и 3'-концов:

5': Flt1D2-Flk1D3.s (5'-ACAATCATAGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATGG-3')

3': Flk1D3/apa/srf.as (5'-GATAATGCCCGGGCCCTTTCATGGACCCTGACAAATG-3')

Затравка для амплификации 5'-конца кодирует конец домена 2 Ig рецептора Flt1, слитый непосредственно с началом домена 3 Ig рецептора Flk1, как это описано выше. Затравка для амплификации 3'-конца кодирует конец домена 3 Ig рецептора Flk1, определяемый аминокислотами VRVHEK (соответствующими аминокислотам 223-228 на фиг. 21A-21C), за которыми следует соединяющая последовательность, которая включает распознающую последовательность для рестриционного фермента SrfI и кодирует аминокислоты GPG. Соединяющая последовательность соответствует аминокислотам 229-231 на фиг. 21A-21C.

После цикла амплификации PCR с целью получения отдельных доменов продукты объединяют в пробирке и подвергают еще одному циклу PCR с использованием затравок bsp/Flt1D2 и Flk1D3/apa/srf.as (описанных выше) для получения слитого продукта. Затем продукт PCR расщепляют рестриционными ферментами BspE1 и SmaI и полученный фрагмент длиной 614 п.о. субклонируют на сайтах рестрикции с BspE1 по SrfI вектора pMT21/ Δ B2.Fc, создавая таким образом плазмиду pMT21/Flt1D2.Flk1D3.Fc. Нуклеотидную последовательность слитой вставки гена Flt1D2-Flk1D3 проверяют, выполняя стандартное секвенирование. Указанную плазмиду затем расщепляют рестриционными ферментами EcoRI и SrfI и полученный фрагмент длиной 702 п.о. переносят на сайты рестрикции с EcoRI по SrfI плазмиды pFlt1(1-3)B2-Fc Δ C1 (a), получая при этом плазмиду pFlt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a). Полная ДНК и выведенные аминокислотные последовательности химерной молекулы Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) показаны на фиг. 21A-21C.

(b) Создание экспрессирующей плазмиды pFlt1D2VEGFR3D3Fc Δ C1 (a)

Экспрессирующая плазида pMT21.Flt1(1-3).Fc (6519 п.о.) кодирует устойчивость к ампициллину и Fc-меченый вариант доменов 1-3 Ig рецептора Flt1 человека. Данную плазмиду используют для получения фрагмента ДНК, содержащего домен 2 Ig рецептора Flt1 при помощи PCR. РНК из линии клеток HEL921.7 используют для получения домена 3 Ig рецептора Flk1 при помощи стандартного метода RT-PCR. Еще один цикл амплификации PCR выполняют для слияния двух доменов Ig в один слитый фрагмент. Для домена 2 Ig рецептора Flt1 используют следующие затравки для амплификации 5'- и 3'-концов:

5': bsp/Flt1D2 (5'-GACTAGCAGTCCGGAGGTAGACCTTTCGTAGAGATG-3')

3': Flt1D2.VEGFR3D3.as(TTCCTGGGCAACAGCTGGATATCTATGATTGTATTGGT)

Затравка для амплификации 5'-конца кодирует сайт рестрикции BspE1, расположенный выше от домена 2 Ig рецептора Flt1, определяемый аминокислотной последовательностью GRPFVEM (соответствующей аминокислотам 27-33 на фиг. 22A-22C). Затравка для амплификации 3'-конца кодирует обратный комплемент конца домена 2 Ig рецептора Flt1, слитый непосредственно с началом домена 3 Ig рецептора VEGFR3, где точка слияния обозначена как TIID рецептора Flt1 (соответствуя аминокислотам 123-126 на фиг. 22A-22C), и доходящий до IQLL рецептора VEGFR3 (соответствуя аминокислотам 127-130 на фиг. 22A-22C).

Для домена 3 Ig рецептора VEGFR3 используют следующие 5'- и 3'-концевые затравки для выполнения RT-PCR:

5': R3D3.s (ATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAGCTGCTGGTA)

3': R3D3.as (ATTTTCATGCACAATGACCTCGGTGCTCTCCCGAAATCG)

Затравки для амплификации 5'- и 3'-концов соответствуют последовательности VEGFR3. Продукт амплификации длиной 296 п.о., полученный в результате выполнения реакции RT-PCR, выделяют стандартными методами и подвергают второму циклу PCR для введения приемлемых последовательностей, необходимых для слияния доменов Flt1D2 и Flk1D3, а также доменов Flk1D3 и Fc при помощи мостика GPG (см. ниже). Используют следующие затравки для амплификации:

5': Flt1D2.VEGFR3D3.s (TCATAGATATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAG)

3': VEGFR3D3/srf.as (GATAATGCCCGGGCCATTTTCATGCACAATGACCTCGGT)

Затравка для амплификации 5'-конца кодирует 3'-конец домена 2 Ig рецептора Flt1, слитого непосредственного с началом (5'-конец) домена 3 Ig рецептора VEGFR3, как это описано выше. Затравка для амплификации 3'-конца кодирует 3'-конец домена 3 Ig рецептора VEGFR3, определяемый аминокислотами VIVHEN (соответствующими аминокислотам 221-226 на фиг. 22A-22C), за которым следует соединяющая последовательность, которая включает распознающую последовательность для Srf1 и кодирует аминокислоты GPG. Соединяющая последовательность соответствует аминокислотам 227-229 на фиг. 22A-22C.

После одного цикла (для домена 2 Ig рецептора Flt1) или двух циклов (для домена 3 Ig рецептора Flt4) PCR, выполняемой для получения отдельных доменов Ig, продукты PCR объединяют в пробирке и подвергают еще одному циклу амплификации PCR с использованием вышеописанных амплифицирующих затравок bsp/Flt1D2 и VEGFR3D3/srf.as для получения слитого продукта. Затем продукт PCR расщепляют при помощи рестрикционных ферментов BspEI и SmaI и полученный фрагмент длиной 625 п.о. субклонируют в сайтах рестрикции BspEI-SrfI вектора pMT21/Flt1 Δ B2.Fc (описанного выше) для создания плазмиды pMT21/Flt1D2.VEGFR3D3.Fc. Последовательность слитой вставки гена Flt1D2-VEGFR3D3 проверяют, выполняя стандартное секвенирование. Указанную плазмиду затем расщепляют рестрикционными ферментами EcoRI и SrfI и полученный фрагмент длиной 693 п.о. субклонируют в сайтах рестрикции EcoRI-SrfI плазмиды pFlt1(1-3) Δ B2-Fc Δ C1 (a) и получают плазмиду, обозначаемую pFlt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a).

Полная ДНК и выведенная аминокислотная последовательность химерной молекулы Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a) показаны на фиг. 22A-22C.

Пример 18. Анализ связывания внеклеточного матрикса (ECM)

Покрытые ECM планшеты (№35-4607 по каталогу Becton Dickinson) повторно гидратируют теплым DME, с добавлением глутамина (2 мМ), 100 ед. пенициллина, 100 ед. стрептомицина и 10% BCS, в течение по крайней мере 1 часа перед введением образцов. Затем планшеты инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре с разными концентрациями Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) и Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1 (a), начиная с концентрации 10 нМ с последующим 2-кратным разведением в PBS и добавлением 10% BCS. Затем планшеты трижды промывают PBS с 0,1% Triton-X и инкубируют с конъюгированным со щелочной фосфатазой антителом против Fc человека (Promega, 1:4000 в PBS с 10% BCS) в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты 4 раза промывают PBS с 0,1% Triton-X, добавляют буфер на основе щелочной фосфатазы и раствор pNPP (Sigma) для окрашивания культуры. Результаты считывают при λ=405-570 нм. Результаты эксперимента показаны на фиг. 23 и свидетельствуют о том, что белки Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) и Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) в гораздо меньшей степени связываются с ECM по сравнению с белком Flt1(1-3)-Fc.

Пример 19. Временная экспрессия pFlt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) в клетках K1-CHO (E1A)

Большое количество (2 л) культуры клеток DH10B E.coli, содержащих плазмиду pFlt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a), описанную выше в примере 17(a), выращивают в течение ночи в бульоне TB, содержащем 100 мкг/мл ампициллина. На следующий день плазмидную ДНК экстрагируют, используя набор QIAgen Endofree Megaprep в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию очищенной плазмидной ДНК определяют стандартными методами, используя ультрафиолетовый спектрофотометр и флуорометр. Плазмидную ДНК проверяют стандартным методом расщепления рестрикционным ферментом аликвот образцов с использованием рестрикционных ферментов EcoRI с NotI и AseI. Все фрагменты, расщепленные рестрикционными ферментами, соответствуют прогнозируемым размерам по результатам анализа на 1% агарозном геле.

Сорок 15 см чашек Петри засевают клетками CHO-K1/E1A с плотностью 4×10^6 клеток/чашку. В качестве среды для чашек Петри используют среду F-12 фирмы Gibco Ham с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS), 100 ед. пенициллина/100 ед. стрептомицина и глутамина (2 мМ). На следующий день все чашки с клетками трансфецируют 6 мкг плазмидной ДНК pFlt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a), используя препараты OptiMax и Lipofectamine фирмы Gibco в объеме 12 мл в соответствии с инструкциями производителя. Через четыре часа после добавления к клеткам трансфецирующей смеси добавляют 12 мл/чашку препарата OptiMax, содержащего 10% FBS. Чашки инкубируют при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день среды удаляют из всех чашек и добавляют 25 мл экстрессивной среды (CHO-S-SFM II фирмы Gibco, с добавлением глутамина (2 мМ) и 1 мМ бутирата натрия). Чашки инкубируют при 37°C в течение 3 дней. После инкубации в течение 3 дней среды отсасывают из всех чашек и центрифугируют со скоростью 400 оборотов/минуту в роторе с качающейся корзиной для осаждения клеток. Супернатант декантируют в стерильные флаконы емкостью 1 л и экспрессированный белок очищают, как это описано ниже.

Пример 20. Создание экспрессирующего вектора pVEGFR1R2-FcΔC1 (a)

Экспрессирующую плазмиду pVEGFR1R2.FcΔC1 (a) создают путем введения ДНК, кодирующей аминокислоты SDT (соответствующие аминокислотам 27-29 на фиг. 24A-24C), между аминокислотами 26 и 27 Flt1D2-Flk1D3-FcΔC1 (a) на фиг. 21A-21C (GG), и удаления ДНК, кодирующей аминокислоты GPG, соответствующие аминокислотам 229-231 на данной чертеже. Аминокислотная последовательность SDT родственна рецептору Flt1 и ее вводят для уменьшения вероятности гетерогенного процессинга N-конца. GPG (соединяющую последовательность) удаляют для достижения прямого слияния доменов Flt1 и Flk1 Ig друг с другом. Полная ДНК и выведенные аминокислотные последовательности химерной молекулы pVEGFR1R2.FcΔC1 (a) показаны на фиг. 24A-24C.

Пример 21. Способ культивирования клеток, используемый для продуцирования модифицированных рецепторов Flt1

(а) Способ культивирования клеток, используемый для продуцирования Flt1D3.Flk1D3.Fc Δ C1(a)

Способ продуцирования белка Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (а) с использованием экспрессирующей плазмиды pFlt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (а), описанный выше в примере 1, включает применение суспензионной культуры рекомбинантных клеток яичника китайского хомячка (K1/E1A CHO), которые структурно экспрессируют белковый продукт. Указанные клетки выращивают в биореакторах, белковый продукт выделяют и очищают аффинной и вытеснительной хроматографией. Данный способ более подробно описан ниже.

Размножение клеток

Линию клеток, экспрессирующую Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (а), находящуюся в двух обеспечивающих слияние клеток колбах Т-225 см², размножают, пассируя клетки в восемь колб Т-225 см² со средой (GMEM+10% сыворотки, фирма GIBCO) и инкубируют при 37°C и 5% CO₂. Когда в колбах происходит слияние клеток (примерно через 3-4 дня), клетки отделяют при помощи трипсина. Добавляют свежую среду для защиты клеток от дальнейшего воздействия трипсина. Клетки центрифугируют, повторно суспендируют в свежей среде, переносят в восемь вращающихся флаконов емкостью 850 см² и инкубируют при 37°C и 5% CO₂ до слияния.

Суспензионная культура в биореакторах

Клетки, выращенные во вращающихся флаконах, отделяют от поверхности, производя обработку трипсином, и промывают средой для суспензионной культуры. Клетки переносят в асептических условиях в биореактор емкостью 5 л (New Brunswick Celligen Plus), где клетки выращивают в 3,5 л суспензионной культуры. Среда для суспензионной культуры представляет собой модифицированную среду IS-CHO без глутамина с низким содержанием глюкозы (Irvine Scientific), в которую добавляют 5% фетальной телячьей сыворотки (Hyclone), добавку GS (Life Technologies) и 25 мкМ метионинсульфоксимида (Sigma). Показатель pH доводят до 7,2, добавляя в биореактор углекислый газ к подаваемому газу или жидкий раствор карбоната натрия. Растворенный кислород поддерживают на уровне 30% насыщения, добавляя кислород или азот к подаваемому газу, при температуре 37°C. После достижения плотности, равной 4 $\times$ 10⁶ клеткам/мл, клетки переносят в биореактор емкостью 40 л, содержащий такую же среду и имеющий аналогичные параметры. Температуру понижают до 34°C, чтобы замедлить рост клеток и увеличить относительную скорость экспрессии белка.

(b) Способ культивирования клеток, используемый для продуцирования Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (а)

Для продуцирования Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (а) используют те же способы, которые описаны выше для получения Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (а).

Пример 22. Сбор и очистка модифицированных рецепторов Flt1

(а) Сбор и очистка Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (а)

Белковый продукт собирают в асептических условиях из биореактора, сохраняя клетки при помощи модулей для фильтрации тангенциального потока Millipore Prostack и механического насоса со слабым сдвигающим усилием (Fristam). В биореактор добавляют свежую среду для замены среды, удаленной во время фильтрации собранных клеток. Примерно 40 л фильтрата собранных клеток вводят в 400 мл колонку, заполненную смолой Protein A Sepharose (Amersham Pharmacia). Введенную смолу промывают буфером, содержащим 10 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH 7/2, чтобы удалить любые несвязанные загрязняющие белки. Белок Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (а) элюируют цитратным буфером с pH 3,0. Элюированный белок нейтрализуют, добавляя Tris-основание и замораживают при -20°C.

Несколько замороженных партий Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (а) белка А, полученных при выполнении вышеописанной стадии, оттаивают, объединяют и концентрируют, используя мембрану для фильтрации тангенциального потока, отделяющую вещества с номинальной молекулярной массой 30 кДа (NMWCO). Белок переносят в концентратор с

перемешиванием клеток (Millipore) и концентрируют до 30 мг/мл, используя мембрану NMWCO для 30 кДа. Концентрированный белок вводят в вытеснительную колонку, заполненную смолой Superdex 200 (Amersham Pharmacia), которая уравновешена физиологическим раствором с фосфатным буфером и 5% глицерина. Такой же буфер используют для промывки колонки. Фракции, соответствующие димеру Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a), объединяют, фильтруют в стерильных условиях через фильтр 0,22 микрона, отбирают алквоту белка и замораживают.

(b) Сбор и очистка Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a)

Для сбора и очистки Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a) используют те же способы, которые описаны выше для получения Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a).

Пример 23. Анализ фосфорилирования временно экспрессированного VEGFR2 Первичные эндотелиальные клетки пупковой вены человека (HUVEC), пассирование 4-6, выдерживают в течение 2 часов в бессывороточной среде DME с высоким содержанием глюкозы. Образцы, содержащие 40 нг/мл (1 нМ) VEGF165 человека, который является лигандом для рецепторов Flt1, Flk1 и Flt4 (VEGFR3) VEGF, предварительно инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре с разными количествами модифицированных рецепторов Flt1, таких как Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и Flt1D2VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a), в бессывороточной среде DME с высоким содержанием глюкозы, включающей 0,1% BSA. Клетки стимулируют в течение 5 минут полученными выше образцами +/-VEGF165 и лизируют цельные клетки, используя буфер для полного лизиса. Клеточные лизаты иммуноосаждают антителом против С-конца рецептора VEGFR2. Иммуноосажденные лизаты помещают на 4-12% гель Novex для SDS-PAGE и затем переносят на поливинилиденфторидную мембрану при помощи стандартных методов переноса. Фосфорилированный VEGFR2 обнаруживают иммуноблоттингом с использованием антифосфотирозинового mAb, обозначаемого 4G10 (UBI), и окрашивают при помощи ECL-реагента (Amersham).

На фиг. 25A-25C и 26A-26B приведены результаты данного эксперимента. На фиг. 25A-25C показано, что обнаружение вестерн-блоттингом фосфорилированного тирозином VEGFR2(Flk1) в результате стимуляции лигандом VEGF165 свидетельствует о том, что рецепторы на поверхности клетки фосфорилированы в разной степени в зависимости от того, какой модифицированный рецептор Flt1 использован во время предварительной инкубации с VEGF. Как показано на фиг. 25A, при 1,5-молярном избытке Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40) или временно экспрессированного Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) полностью блокируется стимуляция рецептора указанными тремя модифицированными рецепторами Flt1 по сравнению со стимуляцией контрольной средой. В отличие от этого временно экспрессированный белок Flt1D2VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a) не вызывает значительного блокирования при указанном молярном избытке по сравнению со стимуляцией положительным контрольным белком VEGF. Аналогичные результаты приведены на фиг. 25B, где модифицированные рецепторы Flt1 использованы в трехкратном молярном избытке относительно лиганда VEGF165. На фиг. 25C показано, что в том случае, когда модифицированные рецепторы Flt1 использованы в шестикратном молярном избытке относительно лиганда VEGF165, временно экспрессированный белок Flt1D2VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a) частично блокирует вызванную VEGF165 стимуляцию рецепторов на поверхности клеток.

На фиг. 26A-26B показано, что обнаружение вестерн-блоттингом фосфорилированного тирозином VEGFR2 (Flk1) в результате стимуляции лигандом VEGF165 свидетельствует о том, что рецепторы на поверхности клеток не фосфорилированы стимулирующими образцами, содержащими VEGF165, предварительно инкубированный с 1- и 2-кратным молярным избытком (фиг. 26A) или 3- и 4-кратным молярным избытком (фиг. 26B) временно экспрессированного белка Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a), постоянно экспрессированного белка Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или временно экспрессированного белка VEGFR1R2Fc Δ C1 (a). При всех испытанных концентрациях модифицированного рецептора

Flt1 происходит полное связывание лиганда VEGF165 во время предварительной инкубации, в результате чего не обнаружена стимуляция рецепторов на поверхности клеток несвязанным VEGF165 по сравнению со стимуляцией контрольной средой.

Пример 24. Биоанализ пролиферации клеток

5 Популяция испытуемых клеток представляет собой клетки MG87, которые устойчиво трансфецированы экспрессирующей плазмидой, содержащей ДНК-вставку, кодирующую внеклеточный домен VEGFR2 (Flk1), слитый с внутриклеточным доменом киназы TrkB, образуя таким образом химерную молекулу. Причина использования внутриклеточного домена киназы TrkB вместо нативного внутриклеточного домена киназы VEGFR2 (Flk1) заключается в том, что внутриклеточный домен киназы VEGFR2 (Flk1) не вызывает

10 сильной пролиферативной реакции при стимуляции VEGF165 в указанных клетках. Известно, что в клетках MG87, содержащих полноразмерный рецептор TrkB, возникает сильная пролиферативная реакция при стимуляции BDNF, поэтому внутриклеточный домен киназы VEGFR2 (Flk1) заменяют внутриклеточным доменом киназы TrkB, чтобы

15 воспользоваться возможностями, предоставляемыми данной пролиферативной реакцией.

5×10^3 клеток/лунку культивируют в 96-луночной планшете в течение 2 часов при 37°C. Следующие модифицированные рецепторы Flt, такие как Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a), а также посторонний рецептор, именуемый Tie2-Fc и используемый в качестве отрицательного контрольного образца, титруют в пределах от 40

20 нМ до 20 пМ и инкубируют на клетках в течение 1 часа при 37°C. Затем во все лунки добавляют рекомбинантный VEGF165 человека в среде определенного состава с концентрацией 1,56 нМ. Планшеты инкубируют в течение 72 часов при 37°C, добавляют MTS (реагент Овена, Promega) и планшеты инкубируют еще 4 часа. Затем планшеты считывают спектрофотометром при 450/570 нм. Результаты данного эксперимента

25 показаны на фиг. 27. Контрольный рецептор Tie2-Fc, используемый в любой концентрации, не блокирует вызванную VEGF165 пролиферацию клеток, в то время как Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) блокирует 1,56 нМ VEGF165 при половине максимальной дозы, равной 0,8 нМ. Flt1(1-3)-Fc и Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a) менее эффективно блокируют VEGF165 в данном анализе при половине максимальной дозы, равной ~2 нМ.

30 Используемый отдельно VEGF165 дает результат, равный 1,2 единицы поглощения, при этом фоновое излучение равно 0,38 единицы поглощения.

Пример 25. Стехиометрия связывания модифицированных рецепторов Flt с VEGF165 (a) Анализ на основе BIAcore

35 Стехиометрию взаимодействия Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) с VEGF165 человека определяют, измеряя уровень насыщения связывания VEGF с поверхностями Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) или измеряя концентрацию VEGF165, необходимую для полного предотвращения связывания Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) с поверхностью чипа BIAcore,

40 покрытого VEGF.

Модифицированные рецепторы Flt, такие как Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a), захватываются со специфическим антителом против Fc, которое сначала иммобилизуют на чипе BIAcore (BIAcore) методом связывания с амином. В качестве отрицательного контрольного образца используют поверхность контрольного антитела.

45 VEGF165 инъецируют с концентрацией 1 нМ, 10 нМ и 50 нМ на поверхности Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) со скоростью 10 мкл/мин в течение одного часа. Регистрируют сигнал связывания в реальном времени и в конце каждой инъекции достигают насыщения связывания. Стехиометрию связывания вычисляют в виде молярного отношения связанного VEGF165 к иммобилизованному Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a), используя коэффициент пересчета, равный 1000 крысиным

50 единицам, который эквивалентен 1 нг/мл. Результаты показывают, что стехиометрия связывания равна одной димерной молекуле VEGF165 на одну молекулу Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) (фиг. 28).

Белок Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a), находящийся в растворе с концентрацией 1 нМ (которая в 1000 раз выше, чем KD взаимодействия Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) с VEGF165), смешивают с разными концентрациями VEGF165. Смесь инкубируют в течение одного часа и измеряют концентрации свободного Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) в растворе в виде сигнала связывания с поверхностью связанного амином VEGF165. Калибровочную кривую используют для превращения сигнала связывания Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) с BIAcore в его молярную концентрацию. Приведенные данные показывают, что добавление 1 нМ VEGF165 в раствор Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) полностью блокирует связывание Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) с поверхностью VEGF165. Полученный результат позволяет предположить, что стехиометрия связывания равна одной молекуле VEGF165 на одну молекулу Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) (фиг. 29 и 30). При построении кривой зависимости концентрации Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) от увеличения концентрации VEGF165 наклон линейной части равен -1,06 для Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и -1/07 для VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a). Величина наклона вблизи от -1 свидетельствует о том, что одна молекула VEGF165 связывается с одной молекулой Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a).

(b) Вытеснительная хроматография

Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) смешивают с трехкратным избытком VEGF165 и комплекс рецептор-лиганд очищают, используя колонку для вытеснительной хроматографии Pharmacia Superose 6. Затем комплекс рецептор-лиганд инкубируют в буфере, содержащем 6М раствора гидрохлорида гуанидина, для его расщепления на составные белки.

Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) отделяют от VEGF165 в колонке для вытеснительной хроматографии Superose 6 с использованием 6 М раствора хлорида гуанидина. Чтобы определить стехиометрию комплекса, инъецируют несколько доз Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и VEGF165 и строят график высоты или общей интенсивности пика в зависимости от концентрации вводимого белка. Калибровку выполняют в условиях, идентичных разделению компонентов комплекса Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a)/VEGF. Количественное определение состава комплекса Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a)/VEGF производят на основе калибровочных кривых. Результаты данного эксперимента, приведенные на фиг. 28, показывают, что соотношение VEGF165 и Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) в комплексе равно 1:1.

Пример 26. Определение стехиометрии связывания комплекса Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a)/VEGF165 при помощи вытеснительной хроматографии

Получение комплекса Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a)/VEGF165

VEGF165 (концентрация =3,61 мг/мл) смешивают с Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a), временно экспрессированным в клетках CHO (концентрация 0,9 мг/мл), в молярном отношении 3:1 (VEGF165:Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a)) и инкубируют в течение ночи при 4°C.

(a) Вытеснительная хроматография (SEC) в естественных условиях

Чтобы отделить комплекс от избытка несвязанного VEGF165, 50 мкл комплекса вводят в колонку Pharmacia Superose 12 PC 3.2/30, которая уравновешена в буфере на основе PBS. Образец элюируют тем же буфером со скоростью потока 40 мкл/мин при комнатной температуре. Результаты SEC показаны на фиг. 31. Пик №1 соответствует комплексу, и пик №2 соответствует несвязанному VEGF165. Фракции, элюированные в пределах 1,1 и 1,2 мл, объединяют и добавляют гидрохлорид гуанидина (GuHCl) до конечной концентрации 4,5 М с целью диссоциации комплекса.

(b) Вытеснительная хроматография (SEC) в условиях диссоциации

Чтобы разделить компоненты комплекса рецептор-лиганд и определить их молярное соотношение, 50 мкл описанного выше диссоциированного комплекса вводят в колонку Superose 12 PC 3.2/30, уравновешенную 6 М раствором GuHCl, и элюируют тем же раствором со скоростью потока 40 мкл/мин при комнатной температуре. Результаты SEC показаны на фиг. 32. Пик №1 соответствует Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и пик №2 соответствует VEGF165.

(с) Вычисление стехиометрии комплекса Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a) VEGF165

Стехиометрию комплекса рецептор-лиганд определяют с учетом площади или высоты пиков компонентов. Концентрации VEGF165 и Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a), соответствующие высоте или площади пиков, получают на основании стандартных кривых для VEGF165 и Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a). Чтобы построить стандартную кривую, четыре разные концентрации (0,04 мг/мл - 0,3 мг/мл) любого компонента инъецируют в колонку Pharmacia Superose 12 PC 3,2/30, уравновешенную 6 М раствором хлорида гуанидина, и элюируют тем же раствором со скоростью потока 40 мкл/мин при комнатной температуре. Стандартную кривую получают, вычерчивая график площади или высоты пика в зависимости от концентрации белка. Молярное соотношение VEGF165:Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a), определенное на основании площади пиков компонентов, равно 1,16. Молярное соотношение VEGF165:Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a), определенное на основании высоты пиков компонентов, равно 1,10.

Пример 27. Определение стехиометрии комплекса Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a)/VEGF165 при помощи вытеснительной хроматографии со светорассеянием в оперативном режиме

Получение комплекса

VEGF165 смешивают с временно экспрессированным в клетках CHO белком Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) в молярном соотношении 3:1 (VEGF165: Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a)) и инкубируют в течение ночи при 4°C.

(a) Вытеснительная хроматография (SEC) со светорассеянием в оперативном режиме

Для определения молекулярной массы (MW) комплекса рецептор-лиганд используют колонку для вытеснительной хроматографии с детектором светорассеяния в оперативном режиме MiniDawn (Wyatt Technology, Santa Barbara, California) и детекторы показателя преломления (RI) (Shimadzu, Kyoto, Japan). Образцы вводят в колонку Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia), уравновешенную буфером на основе PBS, и элюируют таким же буфером со скоростью потока 0,5 мл/мин при комнатной температуре. Как показано на фиг. 33, профиль элюирования имеет два пика. Пик №1 соответствует комплексу рецептор-лиганд, и пик №2 соответствует несвязанному VEGF165. Молекулярную массу высчитывают на основании сигналов LS и RI. Аналогичную процедуру используют для определения молекулярной массы отдельных компонентов комплекса рецептор-лиганд. Получены следующие результаты указанных определений: молекулярная масса комплекса Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a)/VEGF165 в положении пика равна 157300 (фиг. 33), молекулярная масса VEGF165 в положении пика равна 44390 (фиг. 34) и молекулярная масса R1R2 в положении пика равна 113300 (фиг. 35).

Полученные данные свидетельствуют о том, что стехиометрия соотношения компонентов в комплексе Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a)/VEGF равна 1:1, так как это соответствует сумме молекулярных масс для Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a) и VEGF165. Важно отметить, что указанный способ позволяет доказать в конечном счете, что комплекс Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a)/VEGF165 действительно состоит из одной молекулы лиганда VEGF165 и одной молекулы Flt1D2Flk1D3.FcΔC1 (a).

Пример 28. Пептидное картирование Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a)

Дисульфидные структуры и сайты гликозилирования в Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) определяют методом пептидного картирования. В соответствии с данным методом белок сначала расщепляют трипсином. Расщепленные трипсином фрагменты анализируют и идентифицируют при помощи ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией и секвенированием N-конца. Восстановление трипсинового гидролизата помогает идентифицировать фрагменты, имеющие дисульфидные связи. Обработка трипсинового гидролизата препаратом PNGase F (Glyko, Novato, CA) помогает идентифицировать фрагменты с N-связанными сайтами гликозилирования. Результаты суммированы на прилагаемой фиг. 36.

Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) содержит в общем сложности десять цистеинов, шесть из которых относятся к области Fc. Установлено, что Cys27 связан дисульфидной связью с

Cys76. Cys121 связан дисульфидной связью с Cys182. Первые два цистеина в области Fc (Cys211 и Cys214) образуют межмолекулярную дисульфидную связь с такими же двумя цистеинами в другой цепи Fc. Однако, поскольку указанные два цистеина невозможно
 5 дисульфидная связь между одинаковыми цистеинами (например, между Cys211 и Cys211) или между Cys211 и Cys214. Установлено, что Cys216 связан дисульфидной связью с Cys306. Установлено, что Cys352 связан дисульфидной связью с Cys410.

Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) содержит пять вероятных N-связанных сайтов гликозилирования. Установлено, что все пять сайтов гликозилированы в разной степени.

10 Полное гликозилирование наблюдается на сайтах Asn33 (аминокислотная последовательность NIT), Asn193 (аминокислотная последовательность NST) и Asn282 (аминокислотная последовательность NST). Кроме того, частичное гликозилирование обнаружено на сайтах Asn65 и Asn120. Сайты гликозилирования подчеркнуты на фиг. 36.

Пример 29. Фармакокинетический анализ модифицированных рецепторов Flt

15 (a) Фармакокинетический анализ Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a)

Мышам Balb/с (25-30 г) подкожно инъецируют 4 мг/кг Flt1(1-3)-Fc (A40), временно экспрессированного в клетках CHO белка Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a), постоянно экспрессированного в клетках CHO белка Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и временно
 20 экспрессированного в клетках CHO белка VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a). У мышей из хвоста берут кровь через 1, 2, 4, 6, 24 часа, 2 дня, 3 дня и 6 дней после инъекции. Сыворотку анализируют при помощи анализа ELISA, предназначенного для обнаружения Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a). При выполнении анализа ELISA
 25 планшеты для ELISA покрывают VEGF165, связывают с ним детектируемый белок Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) и считывают результаты при помощи антитела против Fc, связанного с пероксидазой хрена. Результаты экспериментов показаны на фиг. 37. T_{max} для Flt1(1-3)-Fc (A40) соответствует 6 часам, в то время как T_{max} для временно и постоянно экспрессированного белка Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и временно экспрессированного белка VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) соответствует 24
 30 часам. C_{max} для Flt1(1-3)-Fc (A40) равно 8 мкг/мл. Для обоих временно экспрессированных белков (Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a)) C_{max} равно 18 мкг/мл и C_{max} для постоянно экспрессированного белка VEGFR1R2-Fc Δ C1 (a) равно 30 мкг/мл.

35 (b) Фармакокинетический анализ Flt1(1-3)-Fc (A40) Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a)

Мышам Balb/с (25-30 г) подкожно инъецируют 4 мг/кг Flt1(1-3)-Fc (A40), временно экспрессированного в клетках CHO белка Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и временно экспрессированного в клетках CHO белка Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a). У мышей из хвоста
 40 берут кровь через 1, 2, 5, 6, 7, 8, 12, 15 и 20 дней после инъекции. Сыворотку анализируют при помощи анализа ELISA, предназначенного для обнаружения Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a). При выполнении анализа ELISA планшеты для ELISA покрывают VEGF165, связывают с ним белок Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) или Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a) и считывают результаты при
 45 помощи антитела против Fc, связанного с пероксидазой хрена. Flt1(1-3)-Fc (A40) не обнаружен в сыворотке через 5 дней, в то время как Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) и Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (a) обнаружены через 15 или более дней. Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 38.

50 Пример 30. Оценка способности Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) подавлять рост опухоли in vivo

Для оценки способности Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (a) подавлять рост опухоли in vivo используют животную модель, которую получают, имплантируя суспензии опухолевых клеток подкожно в правый бок самцам мышей с тяжелым комбинированным

иммунодефицитом (SCID). При выполнении данного анализа используют две линии клеток, в частности линию клеток фибросаркомы человека HT-1080 (№ доступа ATCC CCL-121) и линию клеток глиомы крыс C6 (№ доступа ATCC CCL-107), которые обладают совершенно разной морфологией и характеристиками роста. Первую дозу Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) (в дозе 25 мг/кг или как показано на фиг. 39 и 40) вводят в день имплантации опухоли. Затем животным делают подкожные инъекции Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) или носителя через день или два раза в неделю в течение 2 недель. Через 2 недели животных обрабатывают фиксатором, опухоли удаляют и образцы анализируют слепым методом. Объем опухоли определяют, измеряя длину и ширину видимых подкожных опухолей. Как Flt1(1-3)-Fc (A40), так и Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1 (a) значительно уменьшают рост опухолей, образованных клетками HT-1080 и C6. Результаты указанных экспериментов приведены на фиг. 39 и 40.

Пример 31. Влияние VEGF165 и модифицированных рецепторов Flt на женскую репродуктивную систему

Стереотипическая картина изменения сосудов, которая имеет место в матке и яичнике на протяжении репродуктивного цикла, хорошо исследована, что делает указанные ткани особенно пригодными для изучения механизмов, регулирующих возникновение, изменение и разрушение сосудов. Действительно, исследования гибридизации *in situ* в репродуктивных тканях впервые свидетельствуют о том, что VEGF выступает в качестве медиатора физиологического ангиогенеза у взрослых грызунов, а также у человека и приматов, кроме человека (Phillips et al., 1990; Ravindranafch et al., 1992; Shweiki et al., 1993; Kamat et al. 1995). Поскольку циклическое возникновение и изменение сосудов являются главными характеристиками нормального яичника и матки, неудивительно, что аномальный рост и/или неправильное функционирование кровеносных сосудов стали считать признаком многих патологических состояний, которые влияют на данные органы. Кроме того, считается, что указанные патогенные аномалии кровеносных сосудов вызваны или обусловлены неправильной экспрессией одного или нескольких ангиогенных или антиангиогенных факторов, в частности VEGF.

Например, аномальное развитие кровеносных сосудов характерно для поликистозного заболевания яичника, эндометриоза и внутриматочного рака, и в каждом случае VEGF избыточно экспрессирован в пораженной ткани (Kamat et al., 1995; Shifren et al., 1996; Guidi et al., 1996; Donnez et al., 1998). Считается также, что сверхэкспрессия VEGF участвует в патогенезе развития повышенной проницаемости сосудов в случае синдрома гиперстимуляции яичника (McClure et al., 1994; Levin et al., 1998) и преэклампсии (Baker et al., 1995; Sharkey et al., 1996). Кроме того, VEGF действует в качестве фактора увеличения проницаемости, вызывающего асцит, характерный для рака яичника и других опухолей (Senger et al., 1983; Boock et al., 1995). Весьма вероятно, что вещества, которые эффективно нейтрализуют биологические действия VEGF, должны обладать терапевтическим действием при лечении вышеуказанных и родственных заболеваний.

Возникновение и изменение сосудов являются также признаками внедрения бластоцисты и развития плаценты (Findlay, 1986). VEGF интенсивно экспрессируется в отпадающей оболочке матки и эмбриональных трофобластах, где указанный фактор сначала стимулирует увеличение и повышенную проницаемость сосудистой сети матки в период оплодотворения и последующего образования материнских и эмбриональных компонентов в сосудистой сети плаценты (Shweiki et al., 1993; Cullinan-Bove and Koos, 1993; Chakraborty et al., 1995; Das et al., 1997). VEGF также вызывает развитие кровеносных сосудов желтого тела и обусловленную им секрецию прогестерона, что необходимо для подготовки матки к оплодотворению (Ferrara et al., 1998). Таким образом, вещества, которые подавляют биологическую активность VEGF, могут быть полезны в качестве противозачаточных средств (для предотвращения оплодотворения) или средств, вызывающих аборт на ранних стадиях беременности. Последнее применение может оказаться особенно полезным в качестве нехирургического способа прерывания

эктопических беременностей.

Хотя экспрессия рецепторов VEGF в основном ограничена эндотелием сосудов в нормальных репродуктивных тканях, Flt1 также экспрессируется трофобластами в плаценте человека и животных (Clark et al., 1996; He et al., 1999), где, как предполагается, данный белок участвует в инвазии трофобластов. Интересно отметить, что Flt1 и KDR (Flk1) экспрессируются линией клеток хориокарциномы BeWo (Charnock-Jones et al., 1994), при этом установлено, что VEGF стимулирует синтез ДНК и фосфорилирование тирозином MAP-киназы в указанных клетках. Кроме того, первичные и метастатические опухоли яичника не только экспрессируют большие количества VEGF, но в дополнении к эндотелию сосудов опухолевые клетки сами секретируют KDR и/или Flt1 (Boockvar et al., 1995). Полученные результаты позволяют предположить, что VEGF не только играет существенную роль в образовании и сохранении сосудистой сети опухоли, но и по крайней мере в некоторых опухолях репродуктивных органов VEGF играет вспомогательную роль, способствуя выживанию и пролиферации опухолевых клеток. Таким образом, вещества, которые блокируют действие VEGF, можно эффективно применять при лечении опухолей репродуктивных органов.

Способы и результаты

(а) Оценка VEGF-индуцированной повышенной проницаемости матки

Сывороточный гонадотрофин беременной кобылы (PMSG) инъецируют подкожно (5 м.д.) самкам крыс для индуцирования овуляции в препубертатном периоде. Это стимулирует выброс эстрадиола через 2 дня, что в свою очередь вызывает индукцию VEGF в матке. Как известно, указанная индукция вызывает повышенную проницаемость матки и увеличение сырой массы матки через 6 часов, что потенциально можно блокировать модифицированными рецепторами Flt, такими как Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (а) и Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (а). В данной модели *in vivo* нормальная масса матки крысы равна примерно 50 мг, причем ее можно увеличить до 300-350 мг при помощи PMSG. Обезвоживание ткани показывает, что масса увеличивается за счет воды. Подкожная инъекция Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (а) и Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1 (а) в дозе 25 мг/кг через 1 час после инъекции PMSG примерно на 50% подавляет увеличение сырой массы матки. Увеличение дозы модифицированного рецептора Flt не сокращает увеличение сырой массы, позволяя предположить, что в указанной модели есть независимый от VEGF компонент. Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 41.

(а) Оценка ангиогенеза желтого тела с использованием прогестерона в качестве тестирующего агента

Сывороточный гонадотропин беременной кобылы (PMSG) инъецируют подкожно (5 м.д.) самкам крыс для их овуляции в препубертатном периоде. Через 4 дня образуется активное желтое тело с плотной сетью кровеносных сосудов, которое секретирует прогестерон в кровоток, подготавливая матку к оплодотворению. Для индуцирования образования кровеносных сосудов в желтом теле необходим VEGF; поэтому блокирование VEGF должно устранить образование новых кровеносных сосудов и, следовательно, уменьшить количество прогестерона, секретируемого в кровоток. В данной модели *in vivo* уровни прогестерона в состоянии покоя равны примерно 5 нг/мл и могут быть увеличены до 25-40 нг/мл после введения PMSG. Подкожная инъекция Flt1(1-3)-Fc (A40) или Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1 (а) в дозе 25 мг/кг или 5 мг/кг через 1 час после введения PMSG полностью подавляет индукцию прогестерона на 4-й день. Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 42A-42B.

Пример 33. Фармакокинетический анализ Flt1(1-3)-Fc (A40) и обработанного полиэтиленгликолем Flt1(1-3)-Fc

Flt1(1-3)-Fc обрабатывают полиэтиленгликолем с длиной цепи 10 кДа или 20 кДа и исследуют их фармакокинетический профиль, используя мышей Balb/c. Установлено, что обе обработанные полиэтиленгликолем формы Flt1(1-3)-Fc имеют гораздо лучшие фармакокинетические профили, чем Flt1(1-3)-Fc (A40), при этом T_{max} для обработанных полиэтиленгликолем молекул соответствует 24 часам по сравнению с 6 часами для Flt1(1-

3)-Fc (A40).

Пример 34. Анализ VEGF165 при помощи ELISA для определения сродства модифицированных вариантов рецепторов Flt1

10 pM VEGF165 инкубируют в течение ночи при комнатной температуре с

5 модифицированными вариантами рецепторов Flt1 в количестве от 160 pM до 0,1 pM. При выполнении данного эксперимента использованы такие модифицированные варианты рецепторов Flt1, как Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40), временно экспрессированный Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a), временно экспрессированный Flt1D2VEFGFR3D3-Fc Δ C1 (a), Flt1(1-3_{NAS})-Fc, Flt1(1-3_{R→N})-Fc и Tie2-Fc. Flt1(1-3_{NAS})-Fc является модифицированным

10 вариантом Flt1(1-3)-Fc, в котором высокоосновная аминокислотная последовательность KNKRASVRRR заменена NASVNGSR, что позволяет ввести два новых сайта гликозилирования и суммарно удалить пять положительных зарядов с целью уменьшения неблагоприятного воздействия данной последовательности на фармакокинетический

15 профиль. Flt1(1-3_{R→C})-Fc является модификацией, в которой один остаток аргинина (R) в той же основной аминокислотной последовательности заменен цистеином (C) (KNK RASVRRR→KNKCASVRRR), что делает возможной обработку полиэтиленгликолем у

данного остатка, благодаря чему основная область перестает оказывать неблагоприятное воздействие на фармакокинетический профиль. После инкубации раствор переносят на

20 планшет, содержащий иммобилизованное антитело для VEGF165 (R&D). Затем определяют количество свободного VEGF165, используя антитело для считывания свободного VEGF165. Полученные результаты показывают, что модифицированным вариантом рецептора Flt1 с наибольшим сродством к VEGF165 (определяемым в виде наименьшего количества свободного VEGF165) является Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1 (a), за

25 которым следуют Flt1(1-3)-Fc и Flt1(1-3)-Fc (A40) и затем Flt1(1-3_{R→C})-Fc, Flt1(1-3_{NAS})-Fc и Flt1D2VEFGFR3D3-Fc Δ C1 (a). Tie2Fc не обладает сродством к VEGF165.

Пример 35. Варианты слитых белков рецептора VEGF с доменами разной ориентации

1. Конструирование и экспрессия вариантов слитых белков рецептора VEGF с доменами

30 Каждый отдельный домен слитого белка рецептора VEGF, Flt1.Ig2 ("R1"), Flk1.Ig3 ("R2") и hFc Δ C1(a) ("Fc"), амплифицировали с помощью ПЦР, применяя специфические олигонуклеотидные праймеры, все из которых содержали одну и ту же дополнительную

линкерную последовательность ДНК, дающую возможность расщеплять ее последовательно рестриктазами и лигировать ДНК в заранее определенном порядке так,

35 чтобы каждый отдельный домен мог быть отнесен к какому-либо из трех районов последовательности, кодирующей конечный транслируемый белок. Например, рестрикционное расщепление ферментами "А" и "В" направит фрагмент ДНК в положение один, расщепление ферментами "В" и "С" направит фрагмент ДНК в положение два, а

расщепление ферментами "D" и "E" направит фрагмент ДНК в положение три. Эта стратегия

40 позволяет использовать ПЦР-продукт каждого исходного отдельного домена для конструирования шести возможных комбинаций из трех доменов, являющихся компонентами слитого белка ((1) R1.R2.Fc, (2) R2.R1.Fc, (3) Fc.R1.R2, (4) Fc.R2.R1, (5) R1.Fc.R2 и (6) R2.Fc.R1), со стандартными пептидными линкерами между ними.

После очистки плазмидных ДНК, имеющих желаемые последовательности, каждый из

45 шести типов плазмид, а также "пустой" вектор в качестве отрицательного контроля, индивидуально трансфицировали в клетки CHO RGC38 с использованием Lipofectamine. После трансфекции клетки культивировали в течение трех дней в среде F12, содержащей фетальную телячью сыворотку с крайне низким содержанием IgG.

50 Кондиционированную среду собирали и определяли при помощи Вестерн-анализа уровень экспрессии для различных конструкций. Также анализировали способность вариантов в кондиционированной среде связывать VEGF.

2. Способность связывать VEGF при выполнении анализа на основе BioCore

Анализ на основе BioCore выполняли как описано в примере 6 данного описания для

оценки способности связываться с поверхностью, обработанной VEGF, каждого из шести слитых белков VEGF-рецептора. В этом анализе использовались следующие параметры: чип - CM5; буфер - HBS-T; скорость потока - 5 мкл/мин; инъекция - 150 мкл; образец - IX супернатант, двойная инъекция; поверхность - hVEGF165-аминосвязанный 3400RU.

3. Результаты

В таблице 1 демонстрируется относительное связывание с VEGF каждого из слитых белков рецептора VEGF: pTE903=R1.R2.Fc, pTE904=R2.R1.Fc, pTE905=Fc.R1.R2, pTE906=Fc.R2.R1, pTE907=R1.Fc.R2, pTE908=R2.Fc.R1. Каждый из шести слитых белков рецептора VEGF продемонстрировал специфическую активную относительную реакцию (RU) на hVEGF165-поверхность. Кроме того, относительное связывание вариантов с различной ориентацией доменов сравнивали с относительным связыванием белка в исходной ориентации (pTE903). Никакого фонового связывания не было обнаружено с супернатантом культуры клеток, трансфицированных "пустым" вектором.

Таблица 1		
Плазмида	Конфигурация	Сред. RU
pTE903	R1.R2.Fc	2449
pTE904	R2.R1.Fc	1474
pTE905	Fc.R1.R2	1430
pTE906	Fc.R2.R1	2188
pTE907	R1.Fc.R2	2090
pTE908000	R2.Fc.R1.	1016
"Пустая"		-12

4. Выводы

Эти экспериментальные данные показывают, что специфическое связывание с VEGF было получено для каждого из шести слитых белков рецептора VEGF. Соответственно, позиция компонентов в заявленных конструкциях может меняться, тогда как способность связывать VEGF сохраняется.

Формула изобретения

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый полипептид, способный связываться с полипептидом VEGF, включающая функционально связанные

(а) нуклеотидную последовательность, кодирующую компонент первого рецептора фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF), состоящий, по существу, из иммуноглобулинподобного (Ig) домена 2 первого рецептора VEGF,

(b) нуклеотидную последовательность, кодирующую компонент второго рецептора VEGF, состоящий, по существу, из иммуноглобулинподобного домена 3 второго рецептора VEGF,

(с) нуклеотидную последовательность, кодирующую мультимеризующий компонент, при этом первым рецептором VEGF является Flt1, вторым рецептором VEGF является Flk1 или Flt4 и компоненты рецептора VEGF согласно а) и б) являются единственными компонентами рецептора VEGF слитого полипептида.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая Ig-домен 2 внеклеточного домена первого рецептора VEGF, расположена выше нуклеотидной последовательности, кодирующей Ig-домен 3 внеклеточного домена второго рецептора VEGF.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая Ig-домен 2 внеклеточного домена первого рецептора VEGF, расположена ниже нуклеотидной последовательности, кодирующей Ig-домен 3 внеклеточного домена второго рецептора VEGF.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что мультимеризующий компонент включает иммуноглобулиновый домен.

5. Молекула нуклеиновой кислоты по п.4, отличающаяся тем, что иммуноглобулиновый домен выбран, из группы, состоящей из домена Fc IgG и тяжелой цепи IgG.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

- (a) нуклеотидной последовательности, представленной на фигуре 21A-21C;
- (b) нуклеотидной последовательности, представленной на фигуре 22A-22C;
- (c) нуклеотидной последовательности, представленной на фигуре 24A-24C; и
- (d) нуклеотидной последовательности, которая отличается от нуклеотидной

последовательности (a), (b) или (c) вследствие вырожденности генетического кода.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что компоненты слитого полипептида расположены как 1, 2, 3; 1, 3, 2; 2, 1, 3; 2, 3, 1; 3, 1, 2; или 3, 2, 1,

при этом 1 является компонентом первого рецептора VEGF, 2 является компонентом второго рецептора VEGF и 3 является мультимеризующим компонентом.

8. Слитый полипептид, способный связываться с полипептидом VEGF, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7.

9. Клонированный вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7.

10. Экспрессирующий вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7, которая функционально связана с регулирующей экспрессию последовательностью.

11. Способ получения системы вектор - хозяин для продуцирования слитого полипептида, включающий введение экспрессирующего вектора по п.10 в приемлемую клетку-хозяина.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что приемлемой клеткой-хозяином является бактериальная клетка, дрожжевая клетка, клетка насекомого или клетка млекопитающего.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что приемлемой клеткой-хозяином является клетка E.coli или CHO.

14. Способ получения слитого полипептида, включающий выращивание клеток системы вектор - хозяин, полученной способом по любому из пп.11-13, в условиях, обеспечивающих продуцирование слитого полипептида, и выделение полученного таким образом слитого полипептида.

15. Димерный антагонист фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF), включающий два слитых полипептида по п.1.

16. Димерный антагонист по п.15, отличающийся тем, что модифицирован ацетилированием или обработкой полиэтиленгликолем.

17. Слитый полипептид, способный связываться с полипептидом VEGF, включающий (a) компонент рецептора VEGF, состоящий, по существу, из иммуноглобулинподобного (Ig) домена 2 рецептора VEGF Fit1 и Ig-домена 3 рецептора VEGF Flk1 или Fit4; и (b) мультимеризующий компонент, при этом компонент рецептора VEGF согласно (a) является единственным компонентом рецептора VEGF слитого полипептида.

18. Слитый полипептид по п.17, отличающийся тем, что мультимеризующий компонент включает иммуноглобулиновый домен.

19. Слитый полипептид по п.18, отличающийся тем, что иммуноглобулиновый домен выбран из группы, состоящей из домена Fc IgG и тяжелой цепи IgG.

20. Слитый полипептид по п.19, отличающийся тем, что включает аминокислотную последовательность, представленную на фигуре 21A-21C, фигуре 22A-22C или фигуре 24A-24C.

21. Способ подавления активности фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF) у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества слитого полипептида по любому из пп.17-20 или димерного антагониста по п.15 или 16.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что млекопитающим является человек.

23. Способ по п.21 или 22, отличающийся тем, что используется для уменьшения или предотвращения роста опухоли, для уменьшения или предотвращения отека, для уменьшения или предотвращения образования асцита, для уменьшения или подавления

потери плазмы или для блокирования роста кровеносных сосудов у человека.

5

10

15

20

25

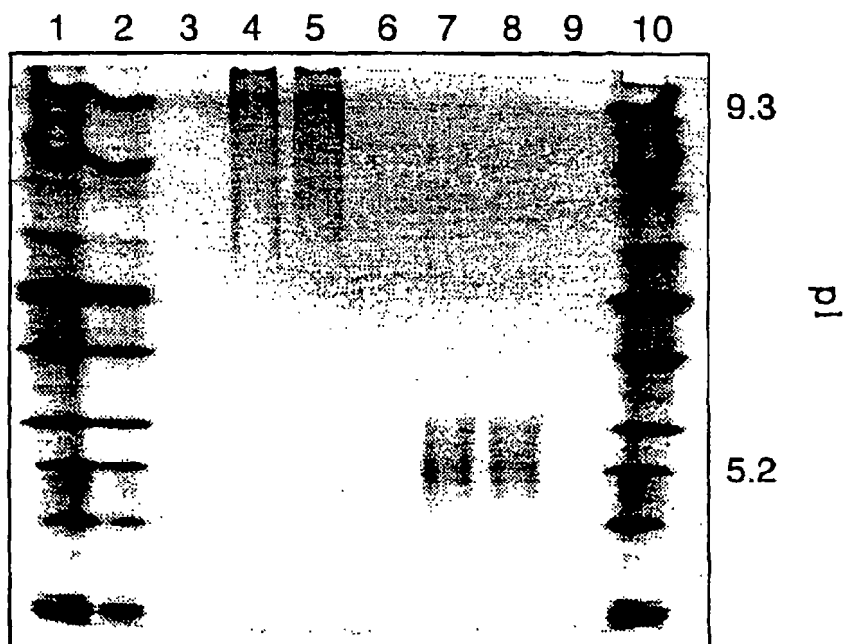
30

35

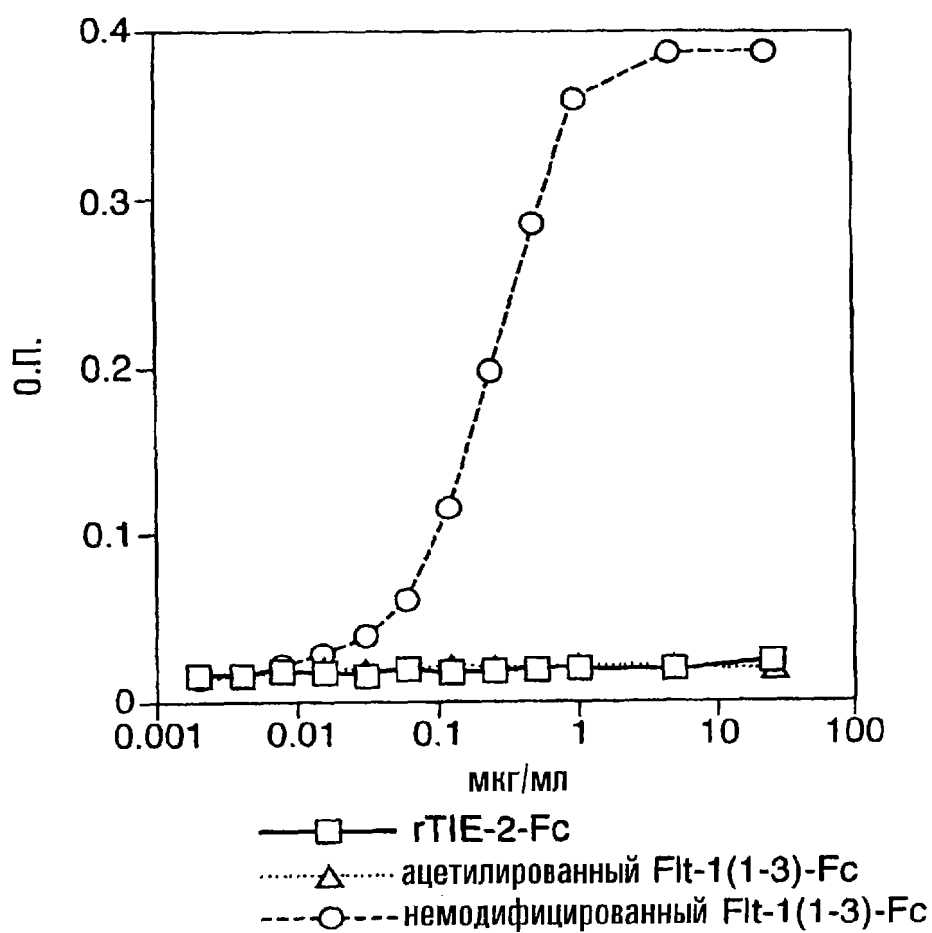
40

45

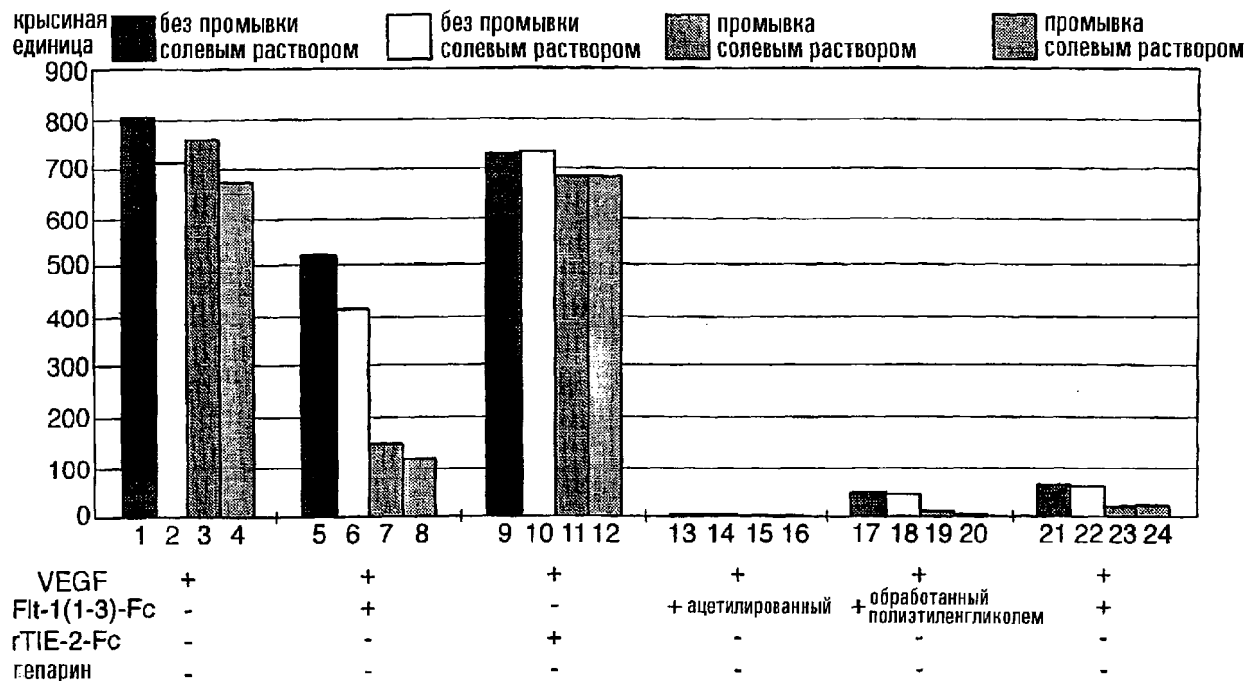
50



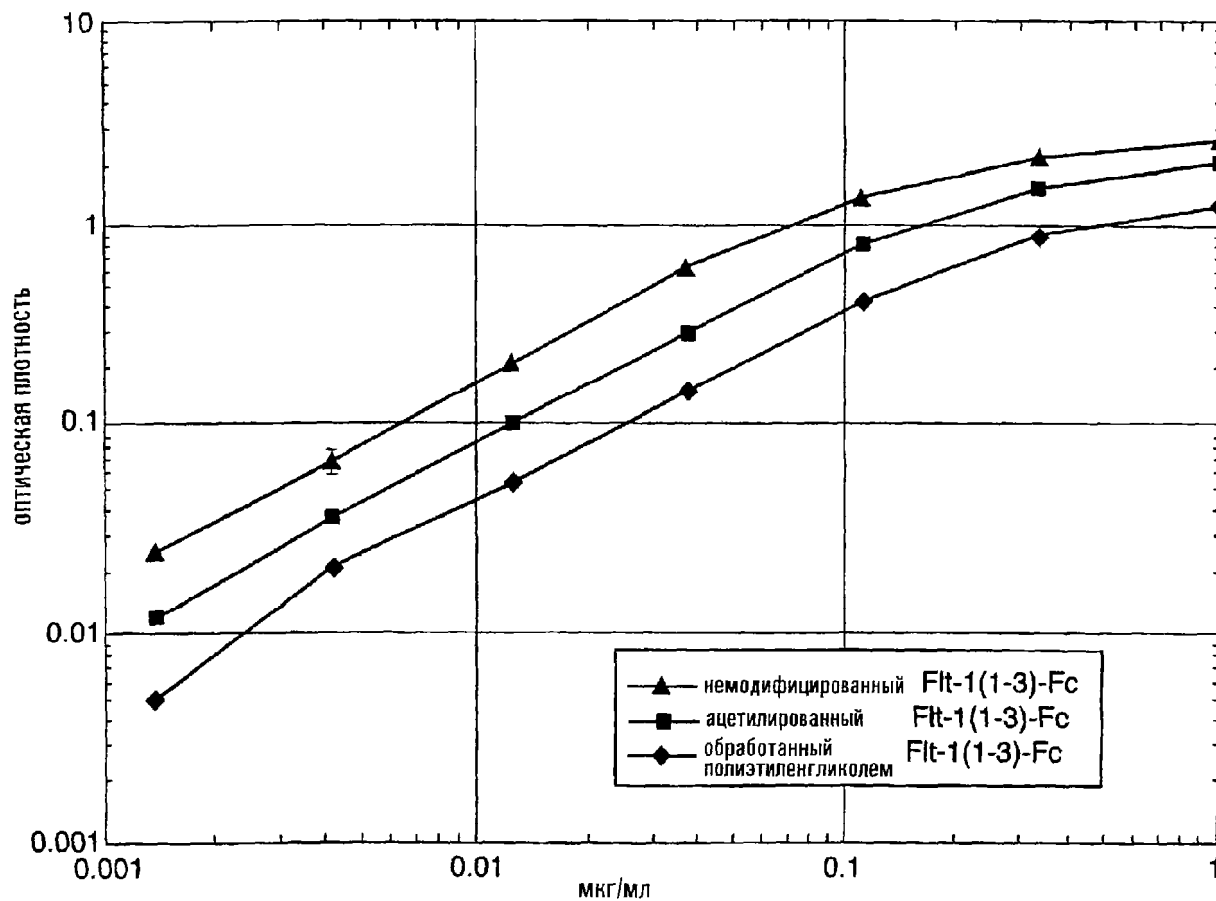
Фиг.1



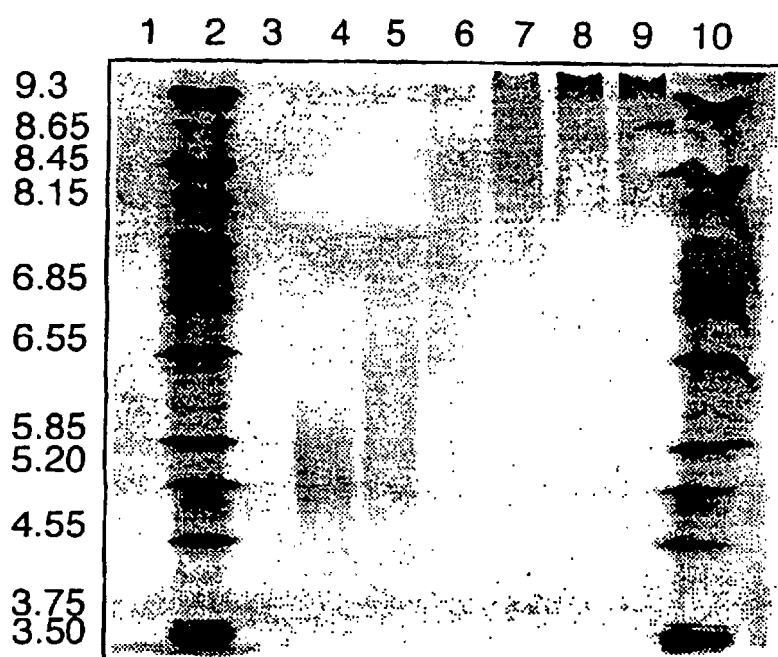
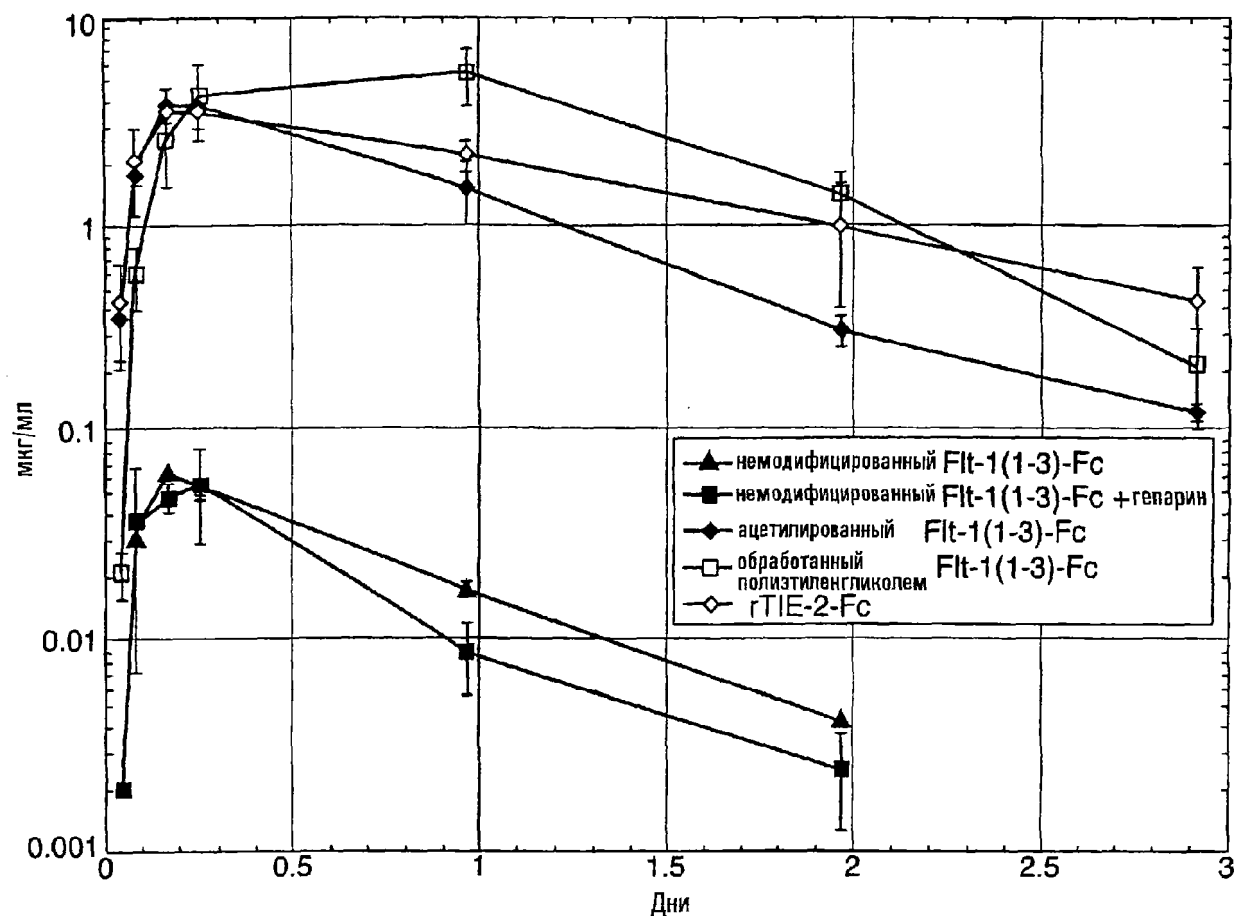
Фиг.2

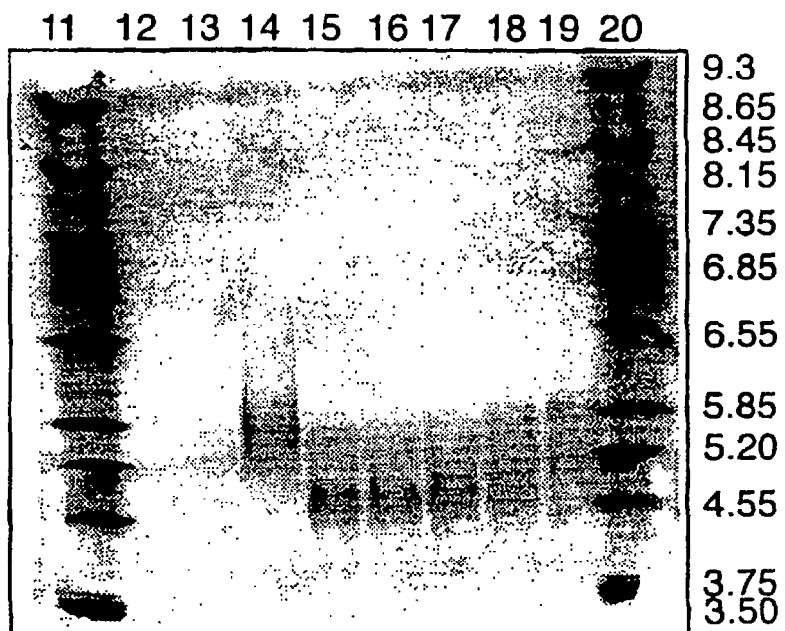


Фиг.3

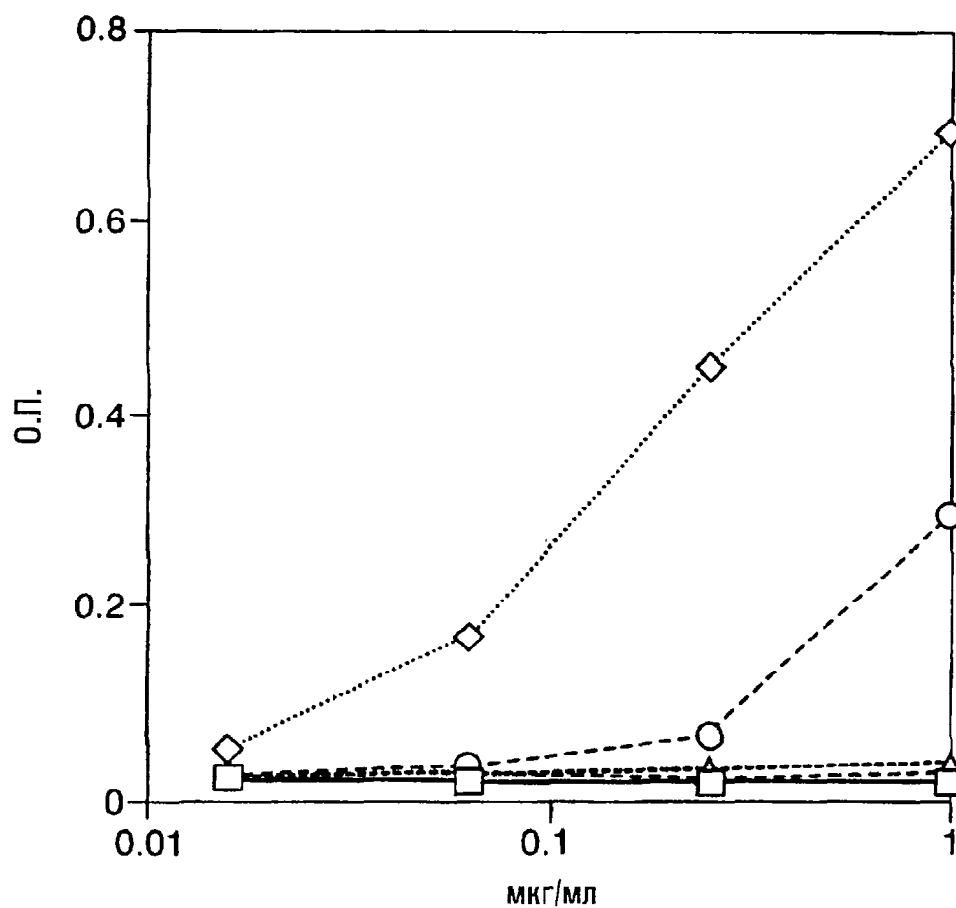


Фиг.4



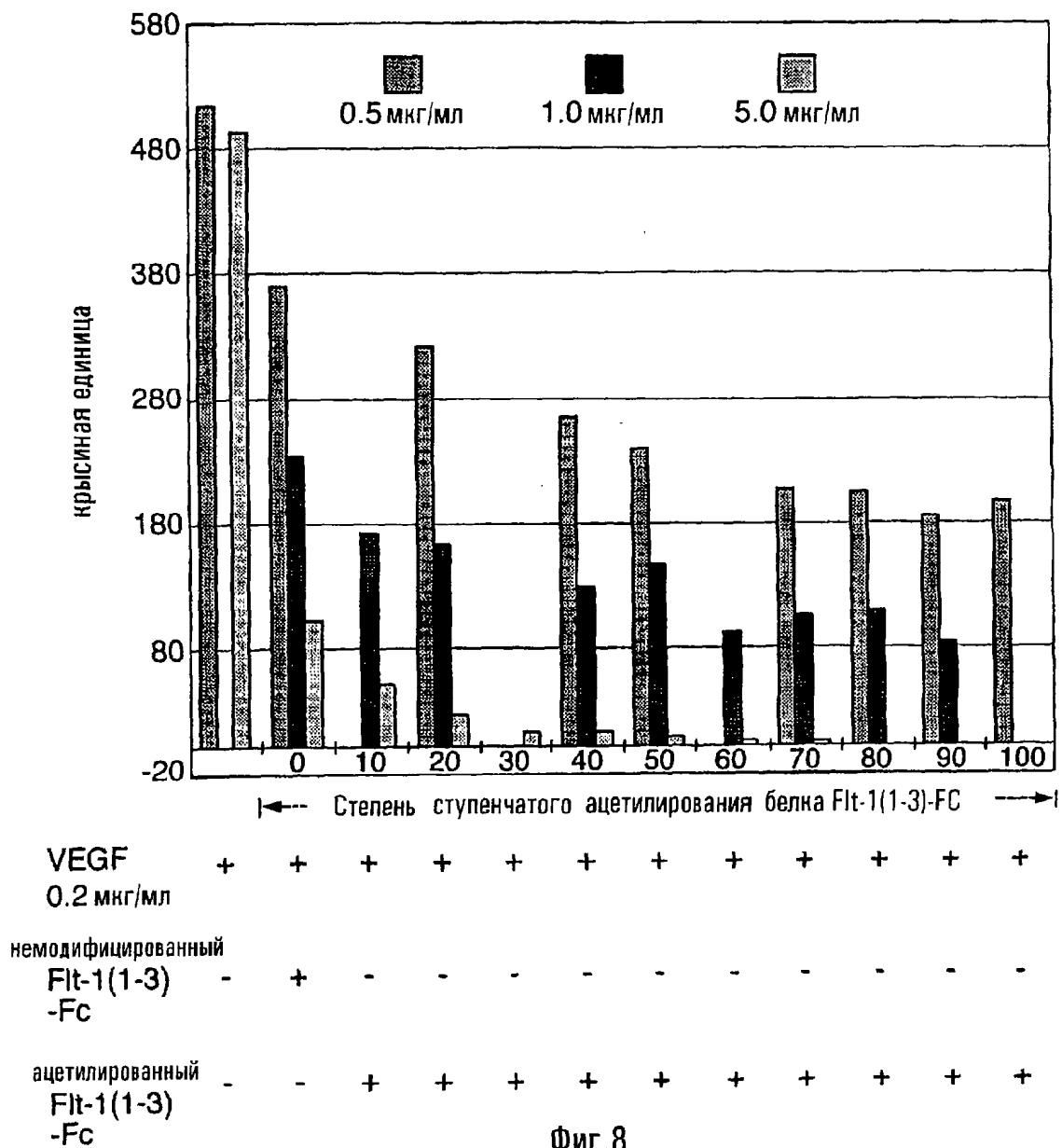


Фиг.6В

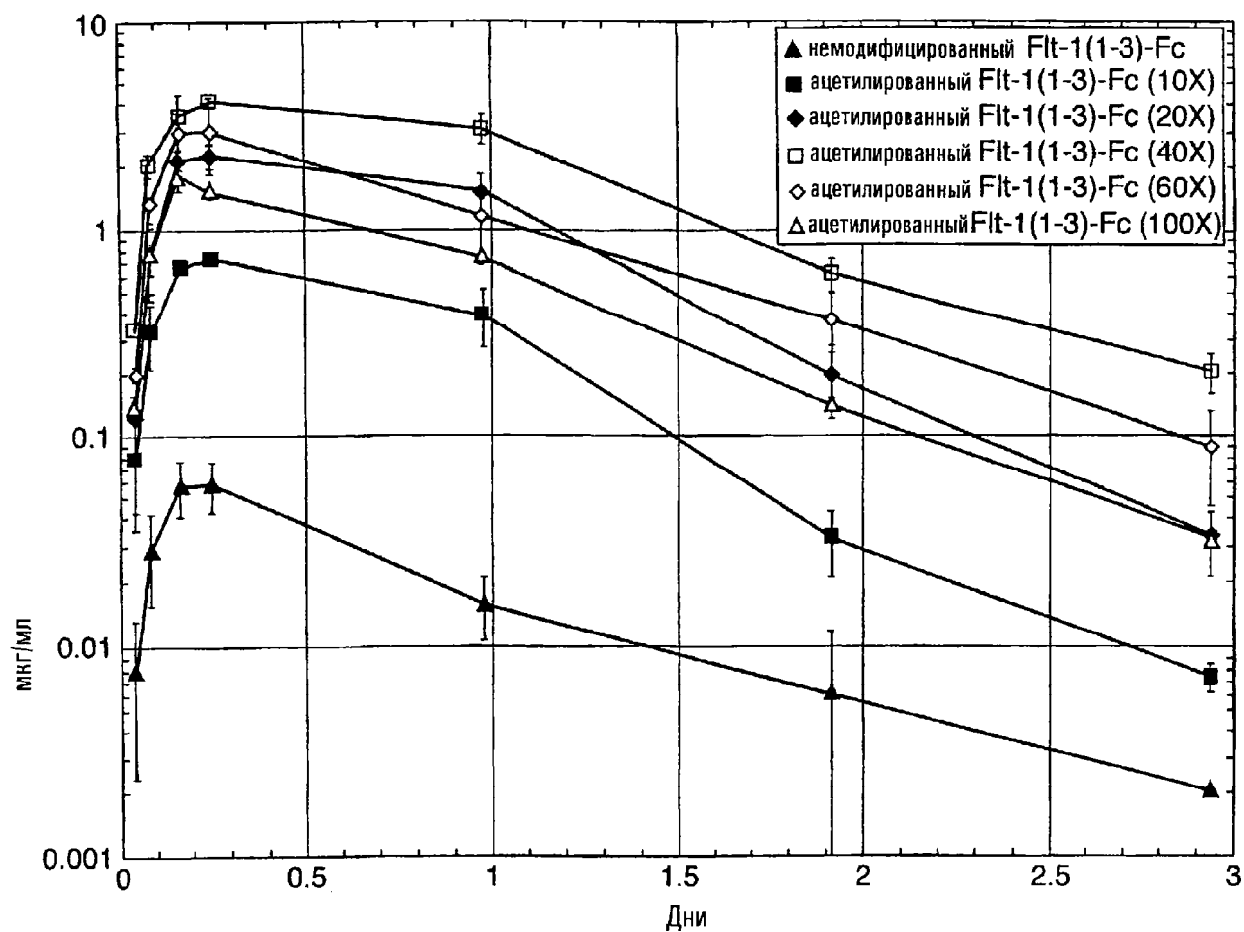


- rTIE-2-Fc
◇..... немодифицированный Flt-1(1-3)-Fc
 ----○---- ацетилированный Flt-1(1-3)-Fc (10X)
 ----△---- ацетилированный Flt-1(1-3)-Fc (20X)
 ----⊠---- ацетилированный Flt-1(1-3)-Fc (30X)

Фиг.7



Фиг.8



Фиг.9

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90     100     110     120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG
TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>

     130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA
GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CGG GTA TTT
His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys>

     190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
TGG TCT TTG CCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC
ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TCG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CCG
Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>

     250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC
ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG ACG TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG
Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn>

     310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTA CCT ACT TCA AAG AAG AAG GAA ACA
GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC TTC CTT TGT
His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr>

     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT
CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA
Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>

     430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CCG GTT
CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT OCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>

     490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT
TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>

```

Фиг.10А

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AGA GCT TCC GTA AGG CGA
TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TCT CGA AGG CAT TCC GCT
Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
CGA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA
GCT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CCG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT
Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *
ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA
TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT
Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *
TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT
AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA
Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *
GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC
CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val>

```

Фиг.10В

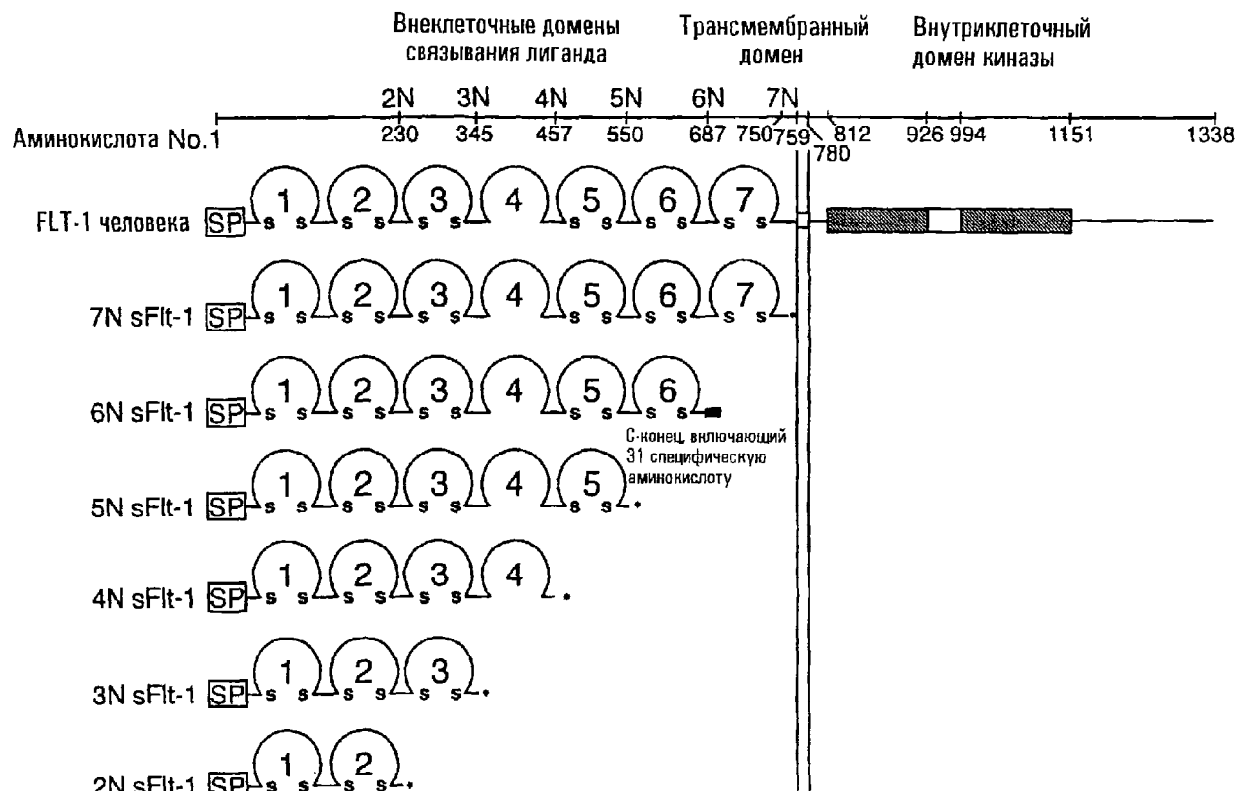
1090			1100			1110			1120			1130			1140		
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
TTC	CTC	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	
AAG	GAG	AAG	GGG	GGT	TTT	GGG	TTC	CTG	TGG	GAG	TAC	TAG	AGG	GCC	TGG	GGA	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
1150			1160			1170			1180			1190			1200		
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	
ACG	CAC	CAC	CAC	CTG	CAC	TCG	GTG	CTT	CTG	GGA	CTC	CAG	TTC	AAG	TTG	ACC	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
1210			1220			1230			1240			1250			1260		
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
GGC	GTG	GAG	GTG	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TAC	AAC	
CCG	CAC	CTC	CAC	GTA	TTA	CGG	TTC	TGT	TTC	GGC	GCC	CTC	CTC	GTC	ATG	TTG	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
1270			1280			1290			1300			1310			1320		
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	
GCA	CAC	CAG	TCG	CAG	GAG	TGG	CAG	GAC	GTG	GTC	CTG	ACC	GAC	TTA	CCG	TTC	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
1330			1340			1350			1360			1370			1380		
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GCC	CTC	CCA	GCC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	
ACG	TTC	CAG	AGG	TTG	TTT	CGG	GAG	GGT	CGG	GGG	TAG	CTC	TTT	TGG	TAG	AGG	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
1390			1400			1410			1420			1430			1440		
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
GGG	CAG	CCC	CGA	GAA	CCA	CAG	GTG	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAT	GAG	
CCC	GTC	GGG	GCT	CTT	GGT	GTC	CAC	ATG	TGG	GAC	GGG	GGT	AGG	GCC	CTA	CTC	
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
1450			1460			1470			1480			1490			1500		
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	
TTG	GTC	CAG	TCG	GAC	TGG	ACG	GAC	CAG	TTT	CCG	AAG	ATA	GGG	TCG	CTG	TAG	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
1510			1520			1530			1540			1550			1560		
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	
ACC	CTC	TCG	TTA	CCC	GTC	GGC	CTC	TTG	TTG	ATG	TTC	TGG	TGC	GGA	GGG	CAC	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
1570			1580			1590			1600			1610			1620		
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	
CTG	CCG	AGG	AAG	AAG	GAG	ATG	TCG	TTC	GAG	TGC	CAC	CTG	TTC	TCG	TCC	ACC	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	

Фиг.10С

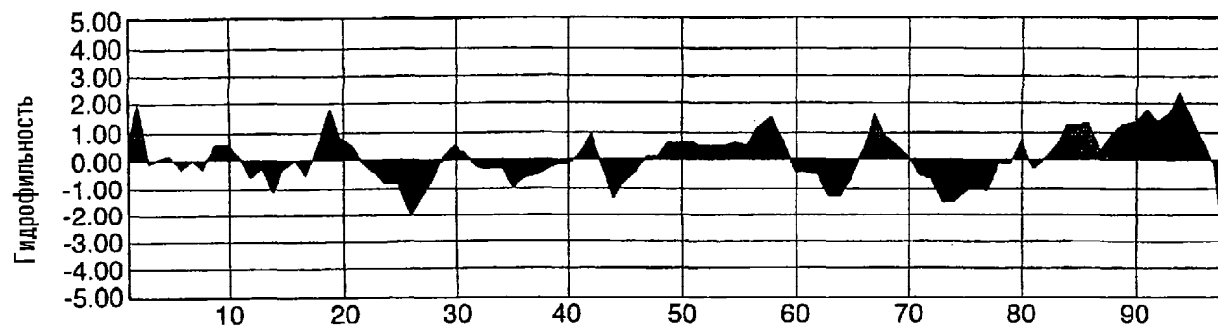
1630 1640 1650 1660 1670 1680
 * * * * * * *
 AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC
 TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser>

 1690 1700
 * * * *
 CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
 GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

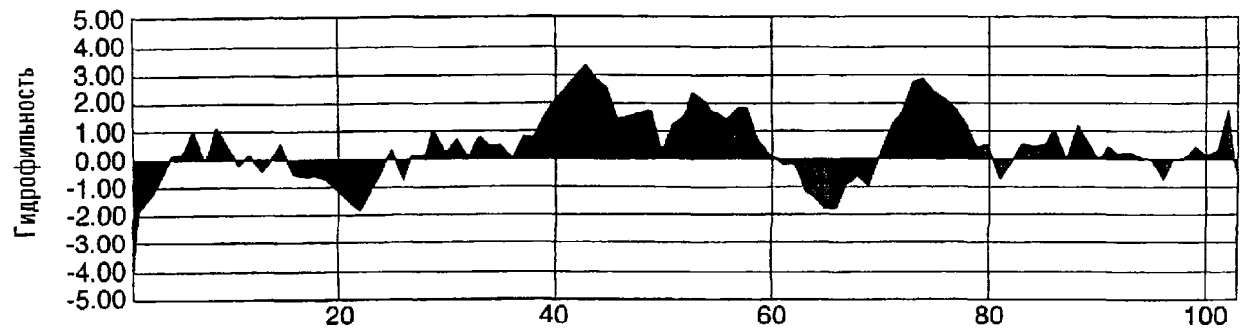
Фиг.10D



Фиг.11



Фиг.12A



Фиг.12В

		10		20		30		40		50		60							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
ATG	GTC	AGC	TAC	TGG	GAC	ACC	GGG	GTC	CTG	CTG	TGC	GCG	CTG	CTC	AGC	TGT	CTG	CTT	CTC
TAC	CAG	TCG	ATG	ACC	CTG	TGG	CCC	CAG	GAC	GAC	ACG	CGC	GAC	GAG	TCG	ACA	GAC	GAA	GAG
Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu>
		70		80		90		100		110		120							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
ACA	GGA	TCT	AGT	TCA	GGT	TCA	AAA	TTA	AAA	GAT	CCT	GAA	CTG	AGT	TTA	AAA	GGC	ACC	CAG
TGT	CCT	TGA	TCA	AGT	CCA	AGT	TTT	AAT	TTT	CTA	GGA	CTT	GAC	TCA	AAT	TTT	CCG	TGG	GTC
Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Lys	Leu	Lys	Asp	Pro	Glu	Leu	Ser	Leu	Lys	Gly	Thr	Gln>
		130		140		150		160		170		180							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
CAC	ATC	ATG	CAA	GCA	GGC	CAG	ACA	CTG	CAT	CTC	CAA	TGC	AGG	GGG	GAA	GCA	GCC	CAT	AAA
GTG	TAG	TAC	GTT	CGT	CCG	GTC	TGT	GAC	GTA	GAG	GTT	ACG	TCC	CCC	CTT	CGT	CGG	GTA	TTT
His	Ile	Met	Gln	Ala	Gly	Gln	Thr	Leu	His	Leu	Gln	Cys	Arg	Gly	Glu	Ala	Ala	His	Lys>
		190		200		210		220		230		240							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
TGG	TCT	TTG	CCT	GAA	ATG	GTG	AGT	AAG	GAA	AGC	GAA	AGG	CTG	AGC	ATA	ACT	AAA	TCT	GCC
ACC	AGA	AAC	GGA	CTT	TAC	CAC	TCA	TTC	CTT	TCG	CTT	TCC	GAC	TCG	TAT	TGA	TTT	AGA	CGG
Trp	Ser	Leu	Pro	Glu	Met	Val	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Lys	Ser	Ala>
		250		260		270		280		290		300							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
TGT	GGA	AGA	AAT	GGC	AAA	CAA	TTC	TGC	AGT	ACT	TTA	ACC	TTG	AAC	ACA	GCT	CAA	GCA	AAC
ACA	CCT	TCT	TTA	COG	TTT	GTT	AAG	ACG	TCA	TGA	AAT	TGG	AAC	TTG	TGT	CGA	GTT	CGT	TTG
Cys	Gly	Arg	Asn	Gly	Lys	Gln	Phe	Cys	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Asn	Thr	Ala	Gln	Ala	Asn>
		310		320		330		340		350		360							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
CAC	ACT	GGC	TTC	TAC	AGC	TGC	AAA	TAT	CTA	GCT	GTA	CCT	ACT	TCA	AAG	AAG	AAG	GAA	ACA
GTG	TGA	CCG	AAG	ATG	TCG	ACG	TTT	ATA	GAT	CGA	CAT	GGA	TGA	AGT	TTC	TTC	TTC	CTT	TGT
His	Thr	Gly	Phe	Tyr	Ser	Cys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Val	Pro	Thr	Ser	Lys	Lys	Lys	Glu	Thr>
		370		380		390		400		410		420							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
GAA	TCT	GCA	ATC	TAT	ATA	TTT	ATT	AGT	GAT	ACA	GGT	AGA	CCT	TTC	GTA	GAG	ATG	TAC	AGT
CTT	AGA	CGT	TAG	ATA	TAT	AAA	TAA	TCA	CTA	TGT	CCA	TCT	GGA	AAG	CAT	CTC	TAC	ATG	TCA
Glu	Ser	Ala	Ile	Tyr	Ile	Phe	Ile	Ser	Asp	Thr	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser>
		430		440		450		460		470		480							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
GAA	ATC	CCC	GAA	ATT	ATA	CAC	ATG	ACT	GAA	GGA	AGG	GAG	CTC	GTC	ATT	CCC	TGC	CGG	GTT
CTT	TAG	GGG	CTT	TAA	TAT	GTG	TAC	TGA	CTT	CCT	TCC	CTC	GAG	CAG	TAA	GGG	ACG	GCC	CAA
Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val>
		490		500		510		520		530		540							
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
ACG	TCA	CCT	AAC	ATC	ACT	GTT	ACT	TTA	AAA	AAG	TTT	CCA	CTT	GAC	ACT	TTG	ATC	CCT	GAT
TGC	AGT	GGA	TTG	TAG	TGA	CAA	TGA	AAT	TTT	TTC	AAA	GGT	GAA	CTG	TGA	AAC	TAG	GGA	CTA
Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp>

Фиг.13А

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC
TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CGG TTG
Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT
TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA
Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *
TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT
ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA
Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *
AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA
TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT
Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *
GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC
CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr>

```

Фиг.13В

1090	1100	1110	1120	1130	1140
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC					
GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG					
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp>					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG					
GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC					
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys>					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC					
GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG					
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His>					
1270	1280	1290	1300	1310	1320
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC					
GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGT CCG					
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala>					
1330	1340	1350	1360	1370	1380
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC					
GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG					
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr>					
1390	1400	1410	1420	1430	1440
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA					
GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT					
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys>					
1450	1460	1470	1480	1490	1500
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GGC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC					
CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CCG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG					
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn>					
1510	1520	1530	1540	1550	1560
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC					
ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG					
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu>					
1570	1580	1590	1600	1610	1620
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
ACC GTG GAC AAG AGC AAG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG					
TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC					
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu>					

Фиг.13С

1630	1640	1650	1660	1670
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA				
CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT				
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>				

Фиг.13D

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90     100     110     120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCC GGA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT
TGT CCT AGA TCA AGC CCT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile>

     130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC
TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG
Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile>

     190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC
TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG
Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile>

     250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG
ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu>

     310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA
TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT
Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln>

     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC AAA TTA CTT AGA GGC
TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG TTT AAT GAA TCT COG
Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val Lys Leu Leu Arg Gly>

     430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG AGA GTT CAA ATG ACC
GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC TCT CAA GTT TAC TGG
His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr>

     490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
TGG AGT TAC CCT GAT GAA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT
ACC TCA ATG GGA CTA CTT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CGG TTG TAT AAG ATG TCA CAA
Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val>

```

Фиг.14А

550	560	570	580	590	600
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT					
GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA					
Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser>					
610	620	630	640	650	660
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC					
CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG					
Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly>					
670	680	690	700	710	720
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG					
CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC					
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu>					
730	740	750	760	770	780
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CCG					
CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC					
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg>					
790	800	810	820	830	840
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC					
TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG					
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe>					
850	860	870	880	890	900
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CCG GAG GAG CAG					
TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CCG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC					
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln>					
910	920	930	940	950	960
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT					
ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAG TTA					
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn>					
970	980	990	1000	1010	1020
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC					
CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGT CCG GGG TAG CTC TTT TGG					
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr>					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CCG					
TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC					
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg>					

Фиг.14В

			1090				1100				1110				1120				1130				1140
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GAT	GAG	CTG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC				
CTA	CTC	GAC	TGG	TTC	TTG	GTC	CAG	TCG	GAC	TGG	ACG	GAC	CAG	TTT	CCG	AAG	ATA	GGG	TCG				
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	>			
			1150				1160				1170				1180				1190				1200
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT				
CTG	TAG	CGG	CAC	CTC	ACC	CTC	TCG	TTA	CCC	GTC	GGC	CTC	TTG	TTG	ATG	TTC	TGG	TGC	GGA				
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	>			
			1210				1220				1230				1240				1250				1260
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CCC	GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC				
GGG	CAC	GAC	CTG	AGG	CTG	CCG	AGG	AAG	AAG	GAG	ATG	TCG	TTC	GAG	TGG	CAC	CTG	TTC	TCG				
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	>			
			1270				1280				1290				1300				1310				1320
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC				
TCC	ACC	GTC	GTC	CCC	TTG	CAG	AAG	AGT	ACG	AGG	CAC	TAC	GTA	CTC	CGA	GAC	GTG	TTG	GTG				
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	>			
			1330				1340				1350												
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TAC	ACG	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	TGA											
ATG	TGC	GTC	TTC	TCG	GAG	AGG	GAC	AGA	GGC	CCA	TTT	ACT											
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***>											

Фиг.14С

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90     100     110     120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCC GGA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT
TGT CCT AGA TCA AGG CCT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile>

     130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC
TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG
Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile>

     190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC
TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG
Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile>

     250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG
ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu>

     310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA
TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT
Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln>

     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC AAA TTA CTT AGA GGC
TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG TTT AAT GAA TCT CCG
Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val Lys Leu Leu Arg Gly>

     430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG AGA GTT CAA ATG ACC
GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC TCT CAA GTT TAC TGG
His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr>

     490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AGA GCT TCC GTA AGG CGA CGA ATT GAC CAA AGC
ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TCT CGA AGG CAT TCC GCT GCT TAA CTG GTT TCG
Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser>

```

Фиг.15А

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC
TTA AGG GTA CGG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG
Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA
TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT
Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA
CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT
Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA
ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CCG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC
TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT
CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *
AAT GCC AAG ACA AAG CCG CCG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC
TTA CCG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *
CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC
GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *
AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGC CAG CCC CGA GAA
TTT CCG GAG GGT CCG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu>

```

Фиг.15В

1090	1100	1110	1120	1130	1140
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CCA CAG GTG TAC ACC	CTG CCC CCA TCC CGG	GAT GAG CTG ACC AAG	AAC CAG GTC AGC CTG		
GGT GTC CAC ATG TGG	GAC GGG GGT AGG GCC	CTA CTC GAC TGG TTC	TTG GTC CAG TCG GAC		
Pro Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Ser Arg	Asp Glu Leu Thr Lys	Asn Gln Val Ser Leu>		

1150	1160	1170	1180	1190	1200
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
ACC TGC CTG GTC AAA	GGC TTC TAT CCC	AGC GAC ATC GCC	GTG GAG TGG GAG	AGC AAT GGG	
TGG ACG GAC CAG TTT	CCG AAG ATA GGG	TCG CTG TAG CCG	CAC CTC ACC CTC	TCG TTA CCC	
Thr Cys Leu Val Lys	Gly Phe Tyr Pro	Ser Asp Ile Ala	Val Glu Trp Glu	Ser Asn Gly>	

1210	1220	1230	1240	1250	1260
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CAG CCG GAG AAC AAC	TAC AAG ACC ACG	CCT CCC GTG CTG	GAC TCC GAC GGC	TCC TTC TTC	
GTC GGC CTC TTG TTG	ATG TTC TGG TGC	GGA GGG CAC GAC	CTG AGG CTG CCG	AGG AAG AAG	
Gln Pro Glu Asn Asn	Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu	Asp Ser Asp Gly	Ser Phe Phe>	

1270	1280	1290	1300	1310	1320
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CTC TAC AGC AAG CTC	ACC GTG GAC AAG	AGC AGG TGG CAG	CAG GGG AAC GTC	TTC TCA TGC	
GAG ATG TCG TTC GAG	TGG CAC CTG TTC	TOG TCC ACC GTC	GTC CCC TTG CAG	AAG AGT ACG	
Leu Tyr Ser Lys Leu	Thr Val Asp Lys	Ser Arg Trp Gln	Gln Gly Asn Val	Phe Ser Cys>	

1330	1340	1350	1360	1370	1380
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
TCC GTG ATG CAT GAG	GCT CTG CAC AAC	CAC TAC ACG CAG	AAG AGC CTC TCC	CTG TCT CCG	
AGG CAC TAC GTA CTC	CGA GAC GTG TTG	GTG ATG TGC GTC	TTC TCG GAG AGG	GAC AGA GGC	
Ser Val Met His Glu	Ala Leu His Asn	His Tyr Thr Gln	Lys Ser Leu Ser	Leu Ser Pro>	

*
GGT AAA TGA
CCA TTT ACT
Gly Lys ***>

Фиг.15С

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90      100      110      120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG
TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>

      130      140      150      160      170      180
      *      *      *      *      *      *
CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA
GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CCG GTA TTT
His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys>

      190      200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *      *
TGG TCT TTG CCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC
ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TCG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CCG
Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>

      250      260      270      280      290      300
      *      *      *      *      *      *
TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC
ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG ACG TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG
Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn>

      310      320      330      340      350      360
      *      *      *      *      *      *
CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTA CCT ACT TCA AAG AAG AAG GAA ACA
GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC TTC CTT TGT
His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr>

      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *
GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT
CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA
Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>

      430      440      450      460      470      480
      *      *      *      *      *      *
GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT
CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>

      490      500      510      520      530      540
      *      *      *      *      *      *
ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT
TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>

```

Фиг.16А

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AAC GCT TCC GTA AGG CGA
TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TTG CGA AGG CAT TCC GCT
Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Asn Ala Ser Val Arg Arg>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
CGA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA
GCT TAA CTG GGT TCG TTA AGG GTA CCG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT
Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *
ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA
TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT
Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *
TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT
AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA
Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *
GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC
CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val>

```

Фиг.16В

1090	1100	1110	1120	1130	1140
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA	AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr>			
1150	1160	1170	1180	1190	1200
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC	ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp>			
1210	1220	1230	1240	1250	1260
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC	CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr>			
1270	1280	1290	1300	1310	1320
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG	GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys>			
1330	1340	1350	1360	1370	1380
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA	ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Phe Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys>			
1390	1400	1410	1420	1430	1440
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG	CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys>			
1450	1460	1470	1480	1490	1500
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG	TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu>			
1510	1520	1530	1540	1550	1560
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC	ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser>			
1570	1580	1590	1600	1610	1620
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG	CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly>			

Фиг.16С

1630 1640 1650 1660 1670 1680

* * * * *

AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC

TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser>

1690 1700

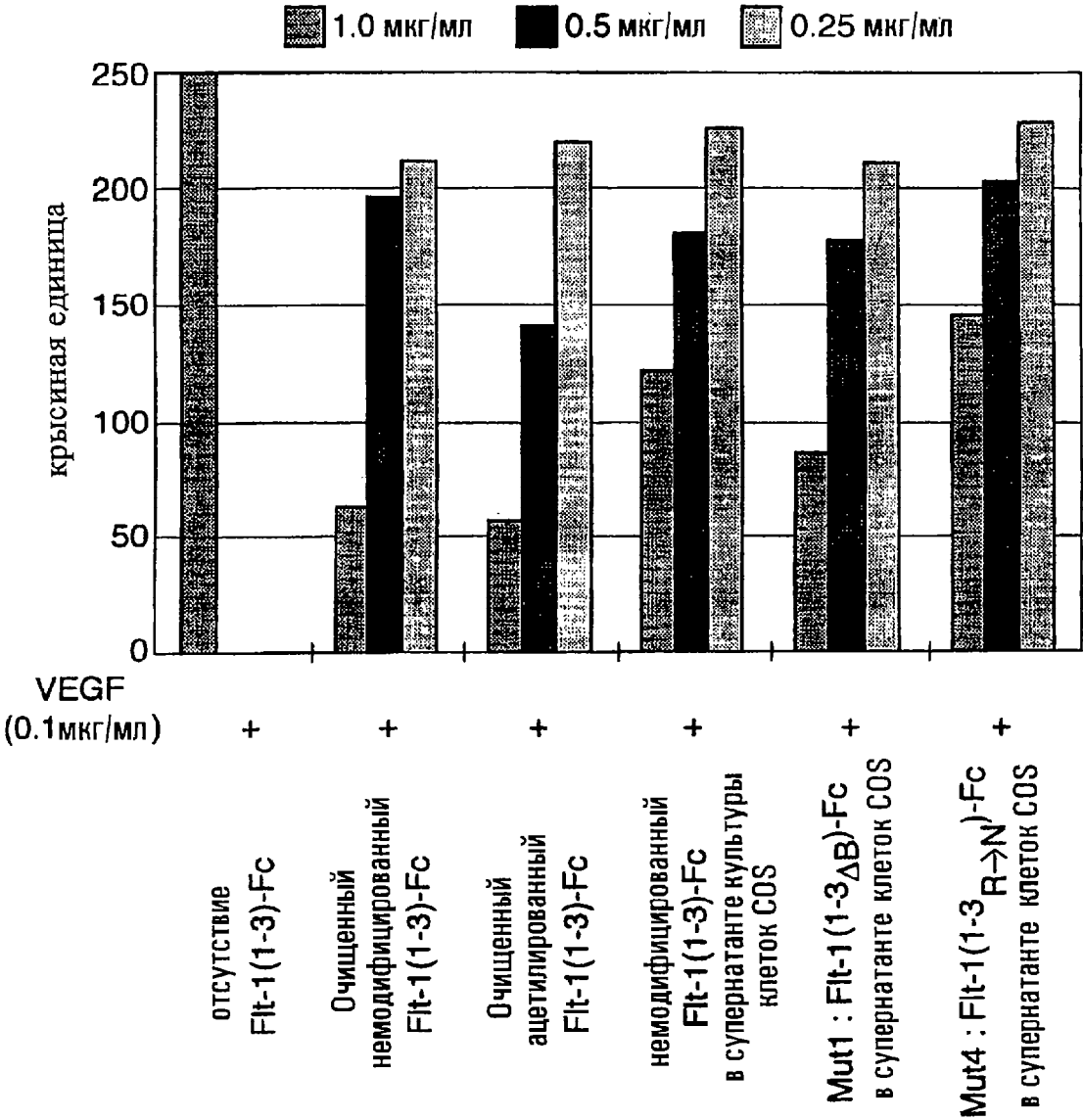
* * * *

CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA

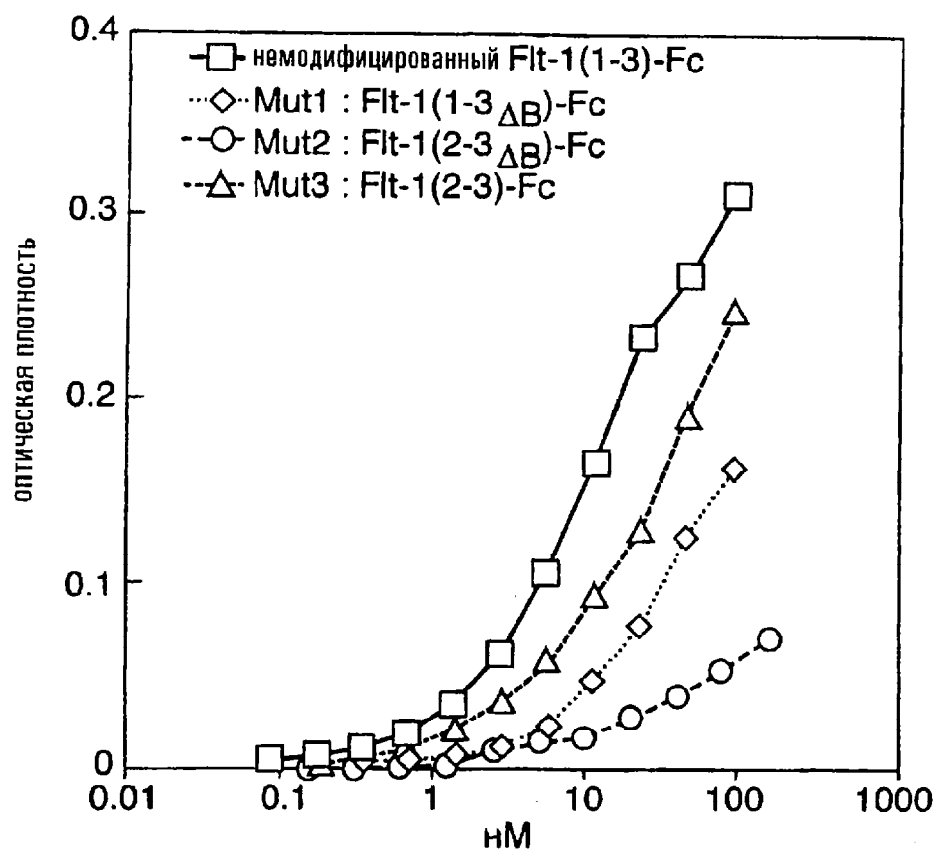
GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

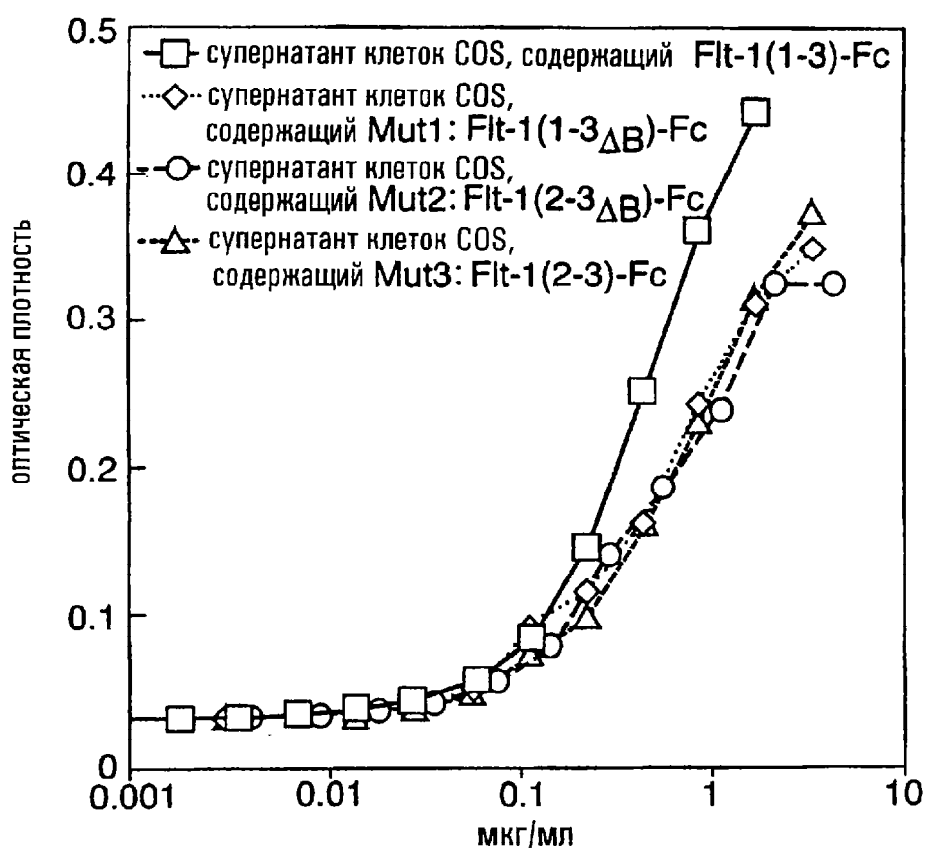
Фиг.16D



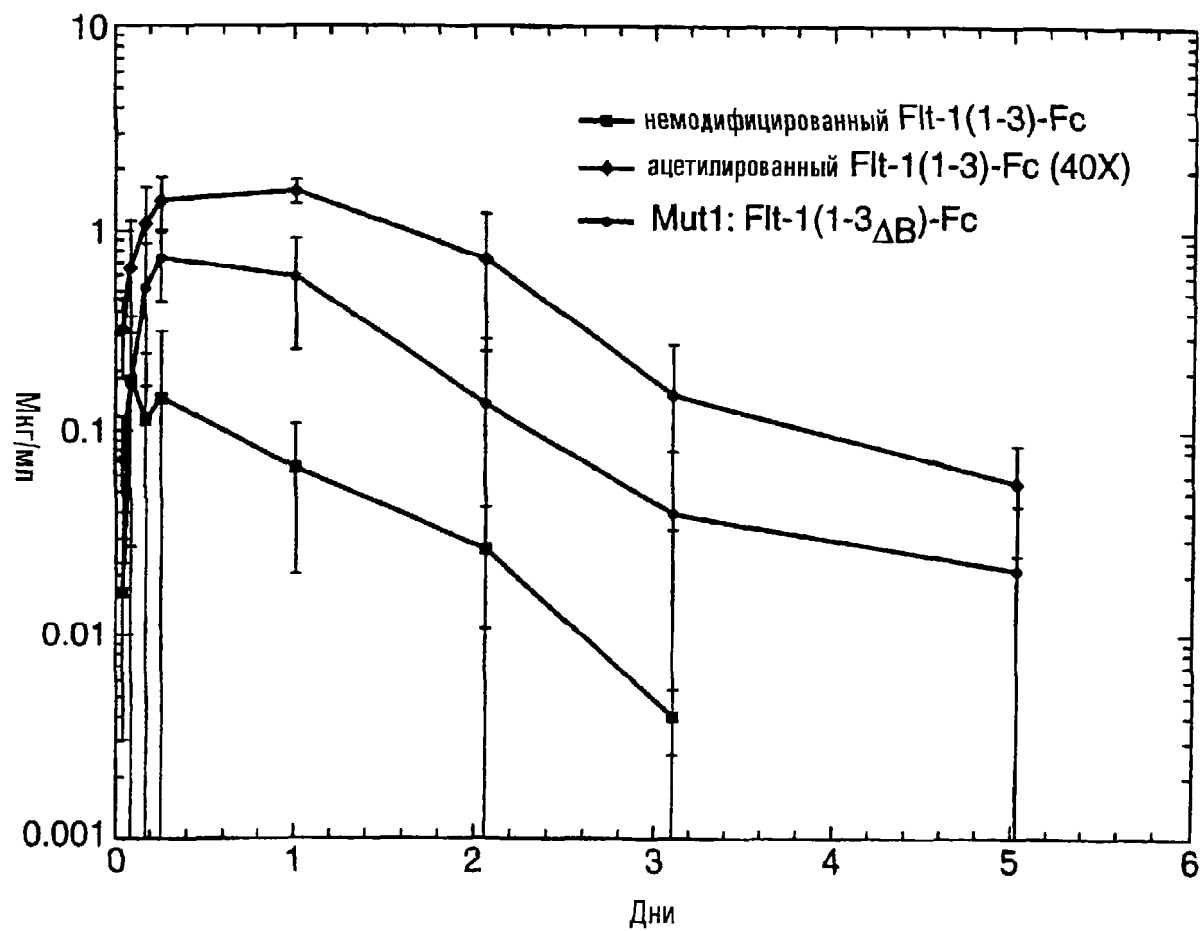
Фиг.17



Фиг.18



Фиг.19



Фиг.20

>EcoRI_сайт

|

10 20 30 40 50 60 70 80

AAGCTTGGGCTGCAGGTCGATCGACTCTAGAGGATCGATCCCGGGCGAGCTCGAATTCGCAACCACCATGGTCAGCTAC

TTCGAACCGACGTCAGCTAGCTGAGATCTCTAGCTAGGGGCCGCTCGAGCTTAAGCGTTGGTGGTACCAGTCGATG

M V S Y>

1 4

>

>BspEI_МОСТИК

|

90 100 110 120 130 140 150 160

TGGGACACCGGGTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCGGGAGGTAGACCTTTCGT

ACCCTGTGGCCCCAGGACGACACGCGGACGAGTTCGACAGACGAAGAGTGTCTAGATCAAGGCCTCCATCTGGAAAGCA

W D T G V L L C A L L S C L L L T G S S>

FLTL1 SS

S G>

>

G R P F V>

31

>

170 180 190 200 210 220 230 240

AGAGATGTACAGTGAAATCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAGGGAGCTGTGTCATTCCCTGCCGGGTACGTAC

TCTCTACATGTCACTTTAGGGGCTTAAATATGTGTACTGACTTCCTTCCTCGAGCAGTAAGGGACGGCCCAATGCAGTG

E M Y S E I P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S>

57

HFLT1 D2

>

250 260 270 280 290 300 310 320

CTAACATCACTGTTACTTTAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTTGATCCCTGATGGAAACGCATAATCTGGGACAGTAGA

GATTGTAGTGACAATGAAATTTTTCAAAGGTGAAGTGTGAAACTAGGGACTACCTTTTGGGTATTAGACCTGTGATCT

P N I T V T L K K F P L D T L I P D G K R I I W D S R>

84

HFLT1 D2

>

330 340 350 360 370 380 390 400

AAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTGTGTA

TTCCCGAAGTAGTATAGTTTACGTTGCATGTTTCTTTATCCCGAAGACTGGACACTTCGTTGTGTCAGTTACCCGTAAACAT

K G F I I S N A T Y K E I G L L T C E A T V N G H L Y>

111

HFLT1 D2

>

410 420 430 440 450 460 470 480

TAAGACAACTATCTCACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATGGAATTGAACTAT

ATCTGTGTTGATAGAGTGTGTAGCTGTTTGGTTATGTTAGTATCTACACCAAGACTCAGGCAGAGTACCTTAACCTTGATA

K T N Y L T H R Q T N T I I D>

HFLT1 D2

>

V V L S P S H G I E L>

137

HFLK1 D3

>

Фиг.21А

```

      490      500      510      520      530      540      550      560
CTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATTGTACAGCAAGAACTGAACATAATGTGGGGATTGACTTCAACTGGGAATACCCCT
GACAACCTCTTTTCGAACAGAATTAAACATGTCGTTCTTGACTTGATTTACACCCCTAACTGAAGTTGACCCCTTATGGGA
S V G E K L V L N C T A R T E L N V G I D F N W E Y P>
                                                                164
_____HFLK1 D3_____>

      570      580      590      600      610      620      630      640
TCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTTGTAAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTGTAG
AGAAGCTTCGTAGTCGTATTCTTTGAACATTTGGCTCTGGATTTTGGGTCAGACCCCTCACTCTACTTCTTTAAAAACTC
S S K H Q H K K L V N R D L K T Q S G S E M K K F L S>
                                                                191
_____HFLK1 D3_____>

      650      660      670      680      690      700      710      720
CACCTTAACATATAGATGGTGTAAACCGGAGTGACCAAGGATGTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAAGA
GTGGAATTGATATCTACCACATTTGGGCTCACTGGTTCTTAACATGTGGACACGTCGTAGGTCACCGACTACTGGTTCT
T L T I D G V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K>
                                                                217
_____HFLK1 D3_____>

      >Srf_МОСТНН_
      730      740      750      760      770      780      790      800
AGAACAGCACATTTGTGAGGGTCCATGAAAAGGGCCCGGGCGACAAACTCACACATGCCCAACCGTGCCACAGCACTGAA
TCTGTGCGTGTAAACAGTCCAGGTACTTTTCCCGGGCCCGCTGTTTGTAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTCTGTTGACTT
K N S T F V R V H E K>
_____HFLK1 D3_____>
      G P G>
      _____>
      D K T H T C P P C P A P E>
                                                                244
_____FCΔC1 (A)_____>

      810      820      830      840      850      860      870      880
CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
GAGGACCCCTTGGCAGTCAGAAGGAGAAGGGGGTTTGGGTTCCCTGTGGGAGTACTAGAGGGCTGGGGACTCCAGTG
L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T>
                                                                271
_____FCΔC1 (A)_____>

      890      900      910      920      930      940      950      960
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
TACGCACCCACCTGCCTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCGCACCTCCACGTATTAC
C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N>
                                                                297
_____FCΔC1 (A)_____>

      970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
CCAAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCTCCACCCAGGACTGG
GGTTCTGTTCGGCGCCCTCCTCGTCATGTTGTGTCATGSCACACCAAGTCCGAGGAGTGGCAGGACGTGGTCTCTGACC
A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W>
                                                                324
_____FCΔC1 (A)_____>

```

Фиг.21В

```

1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
GACTTACCGTTCCCTCATGTTCACGTTCCAGAGGTTGTTTCGGGAGGGTCGGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTT
L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K>
                                         351
_____FCΔC1 (A)_____>

                                     >A>C_A_аллотип
                                     |
                                     >G>T_A_аллотип
                                     |
1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
TCCCGTCGGGGCTCTTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGGTTCTTGGTCCAGTCGGACTGGA
G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T>
                                         377
_____FCΔC1 (A)_____>

1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC
CGGACCAGTTTCCGAAGATAGGGTCGCTGTAGCGGCACCTCACCCCTCTCGTTACCCGTCGGCCCTCTTGTGTGATGTTCTGG
C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T>
                                         404
_____FCΔC1 (A)_____>

                                     >T>C
                                     |
1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360
ACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
TGCGGAGGGGACGACCTGAGGCTGCCGAGGAAGAAGGAGATATCGTTTCGAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCGTCCC
T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G>
                                         431
_____FCΔC1 (A)_____>

1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
GAACGTTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCGGGTA
CTTGACAGAAGAGTACGAGGCACTACGTACTCCGAGACGTTGTTGGTGTATGTGCGTCTTCTCGGAGAGGGACAGAGGCCCAT
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G>
                                         457
_____FCΔC1 (A)_____>

>NotI_εCMT
|
|1450
AATGAGCGGCCGC
TTACTCGCCGGCG
K *>
458
_____>

```

Фиг.21C

>EcoRI_сайт

10 20 30 40 50 60 70 80

AAGCTTGGGCTGCAGGTCGATCGACTCTAGAGGATCGATCCCGGGCGAGCTCGAATTCGCAACCACCATGGTCAGCTAC
 TTCGAACCCGACGTCCAGCTAGCTGAGATCTCCTAGCTAGGGGCCCGCTCGAGCTTAAGCGTTGGTGGTACCAGTCCGATG

M V S Y>
1 4

>BspEI_МОСТИК

90 100 110 120 130 140 150 160

TGGGACACCGGGTCCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCAGGATCTAGTTCCGGAGGTAGACCTTTCGT
 ACCCTGTGGCCCCAGGACGACACGCGCGAGTCGACAGACGAAGAGTGTCTAGATCAAGGCCCTCCATCTGGAAGCA
 W D T G V L L C A L L S C L L L T G S S>

FLT1 сигнальная
последовательность

S G>
G R P F V>
31

170 180 190 200 210 220 230 240

AGAGATGTACAGTGAAATCCCGAAATATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCGGGTTACGTAC
 TCTCTACATGTCACTTTAGGGGCTTTAATATGTGTAAGTCTCTTCCCTCGAGCAGTAAGGGACGGCCCAATGCAGTG
 E M Y S E I P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S>

57

FLT1 Домен 2 lg

250 260 270 280 290 300 310 320

CTAACATCACTGTTACTTTAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTTGATCCCTGATGGAACCGCATAATCTGGGACAGTAGA
 GATGTAGTGACAATGAAATTTTCAAAGGTGAAGTGTGAACTAGGGACTACCTTTTGCGTATTAGACCTGTCTATCT
 P N I T V T L K K F P L D T L I P D G K R I I W D S R>

84

FLT1 Домен 2 lg

330 340 350 360 370 380 390 400

AAGGGCTTCATCATATCAAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTGTGTA
 TTCCCGAAGTAGTATAGTTTACGTTGCATGTTCTTTATCCCGAAGACTGGACACTTCGTTGTCAAGTTACCCGTAAACAT
 K G F I I S N A T Y K E I G L L T C E A T V N G H L Y>

111

FLT1 Домен 2 lg

410 420 430 440 450 460 470 480

TAAGACAAACTATCTCAGACATCGACAAACCAATACAAATCATAGATATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCTGGAGCTGC
 ATTCTGTTTGATAGAGTGTGTAGCTGTTGGTTATGTTAGTATCTATAGGTCGACAAACGGGTCTTCAGCGACCTCGACG
 K T N Y L T H R Q T N T I I D>

FLT1 Домен 2 lg

I Q L L P R K S L E L>
137

VEGFR3 (FLT4) Домен 3 lg

Фиг.22А

490 500 510 520 530 540 550 560
 TGGTAGGGGAGAAGCTGGTCCCTCAACTGCACCGTGTGGGCTGAGTTTAACTCAGGTGTCACCTTTGACTGGGACTACCCA
 ACCATCCCCCTCTTCGACCAGGAGTTGACGTGGCACACCCGACTCAAATTGAGTCCACAGTGGAAACTGACCTGATGGGT
 L V G E K L V L N C T V W A E F N S G V T F D W D Y P>
 164
 _____VEGFR3 (FLT4) Домен 3 Ig _____>

570 580 590 600 610 620 630 640
 GGGAAGCAGGCAGAGCGGGTAAGTGGGTGCCCGAGCGCTCCCAACAGACCCACACAGAACTCTCCAGCATCTGAC
 CCTTCGTCCGTCTCGCCCATTCACCCACGGGCTCGCTGCGAGGGTGTCTGGGTGTGTCTTGAGAGGTCGTAGGACTG
 G K Q A E R G K W V P E R R S Q Q T H T E L S S I L T>
 191
 _____VEGFR3 (FLT4) Домен 3 Ig _____>

650 660 670 680 690 700 710 720
 CATCCACAACGTCAGCCAGCAGACCTGGGCTCGTATGTGTGCAAGGCCAACCGGCATCCAGCGATTTCGGGAGAGCA
 GTAGGTGTTCAGTCCGTCTGCTGGACCGAGCATACACACGTTCCGGTTGTTGCCGTAGGTCCGTAAGCCCTCTCGT
 I H N V S Q H D L G S Y V C K A N N G I Q R F R E S>
 217
 _____VEGFR3 (FLT4) Домен 3 Ig _____>

730 740 750 760 770 780 790 800
 CCGAGGTCATTGTGCATGAAATGGCCCGGCGACAAACTCACACATGCCCGTCCCGAGCACCTGAACTCCTGGGG
 GGCTCCAGTAACACGTACTTTACCGGGCCCGTGTTTGAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTCGTGGACTTGAGGACCCC
 T E V I V H E N>
 _____VEGFR3 (FLT4) IG_____>
 G P G>
 _____>
 D K T H T C P P C P A P E L L G>
 244
 _____FCΔC1 - A Аллотип _____>

810 820 830 840 850 860 870 880
 GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCGCCAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT
 CCTGGCAGTCAGAAGGAGAAGGGGGTTTGGGTTCCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCCTGGGGACTCCAGTGTACGCCA
 G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V>
 271
 _____FCΔC1 - A Аллотип _____>

890 900 910 920 930 940 950 960
 GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
 CCACCTGCACTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCGACCTCCACGTATTACGGTTCGT
 V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T>
 297
 _____FCΔC1 - A Аллотип _____>

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 TCGGCGCCCTCCTCGTCAATGTTGTGTGTCATGGCACACCACTCGCAGGAGTGGCAGGACGTGGTCTGACCGACTTACCG
 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G>
 324
 _____FCΔC1 - A Аллотип _____>

Фиг.22В

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC
 TTCTCATGTTTACGTTCCAGAGGTGTTTCGGGAGGGTCGGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTTTCCCGTCGG
 K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P>
 351

FCAC1 - A Аллотип

>A>C_A аллотип

>G>T_A аллотип

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCGTGGTCA
 GGCTCTTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGGTCTTGGTCCAGTCGGACTGACGGACCACT
 R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V>
 377

FCAC1 - A Аллотип

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 AAGGCTTCTATCCACGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCTCCC
 TTCCGAAGATAGGGTCCCTGTAGCGGCACCTCACCTCTCGTTACCCGTGCGCCTCTTGTGATGTTCTGGTGGGAGGG
 K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P>
 404

FCAC1 - A Аллотип

>T>C

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CACGACCTGAGGCTGCCGAGGAAGAAGGAGATATCGTTCGAGTGGCACCCTGTCTCGTCCACCGTCGTCCCCCTTCAGAA
 V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F>
 431

FCAC1 - A Аллотип

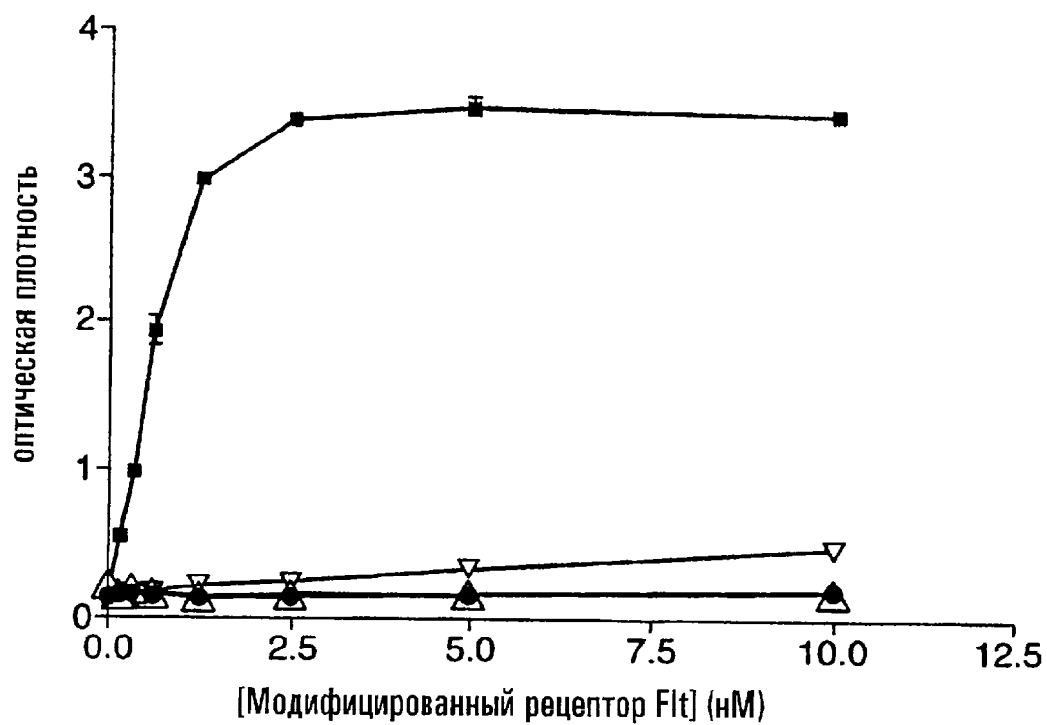
>NotI_catt

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGG
 GAGTACGAGGCACTACGTACTCCGAGACGTGTGGTGAATGTGCGTCTCTCGGAGAGGGACAGAGGCCCATTTACTCGCC
 S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *>
 455

FCAC1 - A Аллотип

CCGC
 GGCG

Фиг.22С



- Flt1D2Flk1D3.FcdeltaC1(a)
- △ Flt1D2VEGFR3D3.FcdeltaC1(a)
- ▽ TIE2-Fc
- Flt1(1-3)-Fc

Фиг.23

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACC GCG GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
M V S Y W D T G V L L C A L L S C L L L>
_1_____5_____hFLT1 Сигнальная_____15_____20>
                        последовательность

      70      80      90      100      110      120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCC GGA AGT GAT ACC GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC
TGT CCT AGA TCA ACC OCT TCA CTA TGG CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG
T G S S S G>
21_hFLT1 SIGNAL SEQ_26>

      S D T G R P F V E M Y S E I>
      _27_____30_____hFLT1 Домен 2 lg_____40>

      130      140      150      160      170      180
      *      *      *      *      *      *
CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CCG GTT ACG TCA
GGG CTT TAA TAT GTG TAC CTT CCT TOC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT
P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S>
41_____45_____hFLT1 Домен 2 lg_____55_____60>

      190      200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *      *
CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA
GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA OCT TTT
P N I T V T L K K F P L D T L I P D G K>
61_____65_____hFLT1 Домен 2 lg_____75_____80>

      250      260      270      280      290      300
      *      *      *      *      *      *
CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA
GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT
R I I W D S R K G F I I S N A T Y K E I>
81_____85_____hFLT1 Домен 2 lg_____95_____100>

      310      320      330      340      350      360
      *      *      *      *      *      *
GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA
CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT
G L L T C E A T V N G H L Y K T N Y L T>
101_____105_____hFLT1 Домен 2 lg_____115_____120>

      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *
CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTG GTT CTG AGT CCG TCT CAT GGA ATT GAA CTA
GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAC CAA GAC TCA GGC AGA GTA OCT TAA CTT GAT
H R Q T N T I I D>
121_____hFLT1 Домен 2 lg_____129>

      V V L S P S H G I E L>
      130_____hFLK1 Домен 3 lg_____140>

```

Фиг.24А

```

      430      440      450      460      470      480
      *      *      *      *      *      *
TCT GTT GGA GAA AAG CTT GTC TTA AAT TGT ACA GCA AGA ACT GAA CTA AAT GTG GGG ATT
AGA CAA CCT CIT TTC GAA CAG AAT TTA ACA TGT CGT TCT TGA CTT GAT TTA CAC CCC TAA
S V G E K L V L N C T A R T E L N V G I>
141_____145_____hFLK1 Домен 3 lg _____155_____160>

      490      500      510      520      530      540
      *      *      *      *      *      *
GAC TTC AAC TGG GAA TAC CCT TCT TCG AAG CAT CAG CAT AAG AAA CTT GTA AAC CGA GAC
CTG AAG TTG ACC CTT ATG GGA AGA AGC TTC GTA GTC GTA TTC TTT GAA CAT TTG GCT CTG
D F N W E Y P S S K H Q H K K L V N R D>
161_____165_____hFLK1 Домен 3 lg _____175_____180>

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
CTA AAA ACC CAG TCT GGG AGT GAG ATG AAG AAA TTT TTG AGC ACC TTA ACT ATA GAT GGT
GAT TTT TGG GTC AGA CCC TCA CTC TAC TTC TTT AAA AAC TCG TGG AAT TGA TAT CTA CCA
L K T Q S G S E M K K F L S T L T I D G>
181_____185_____hFLK1 Домен 3 lg _____195_____200>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
GTA ACC CGG AGT GAC CAA GGA TTG TAC ACC TGT GCA GCA TCC AGT GGG CTG ATG ACC AAG
CAT TGG GCC TCA CTG GTT CCT AAC ATG TGG ACA CGT CGT AGG TCA CCC GAC TAC TGG TTC
V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K>
201_____205_____hFLK1 Домен 3 lg _____215_____220>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
AAG AAC AGC ACA TTT GTC AGG GTC CAT GAA AAG GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC
TTC TTG TCG TGT AAA CAG TCC CAG GTA CTT TTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG
K N S T F V R V H E K>
221_____hFLK1 Домен 3 lg _____231>
      D K T H T C P P C>
      232_____hFCAC1 A _____240>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA COG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
GGT OGT GGA CTT GAG GAC CCC OCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG
P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D>
241_____245_____hFCAC1 A _____255_____260>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC OCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT
T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E>
261_____265_____hFCAC1 A _____275_____280>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA
CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT
D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T>
281_____285_____hFCAC1 A _____295_____300>

```

Фиг.24В

```

          910          920          930          940          950          960
          *          *          *          *          *          *
AAG CCG CCG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG
TTC GGC GGC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC
K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L>
301_____305_____hFCAC1 A _____315_____320>

          970          980          990          1000          1010          1020
          *          *          *          *          *          *
CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA
GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGT
H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P>
321_____325_____hFCAC1 A _____335_____340>

          1030          1040          1050          1060          1070          1080
          *          *          *          *          *          *
GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GGC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC
CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG
A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y>
341_____345_____hFCAC1 A _____355_____360>

          1090          1100          1110          1120          1130          1140
          *          *          *          *          *          *
ACC CTG CCC CCA TCC CCG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG
T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V>
361_____365_____hFCAC1 A _____375_____380>

          1150          1160          1170          1180          1190          1200
          *          *          *          *          *          *
AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC
TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CCG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG
K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N>
381_____385_____hFCAC1 A _____395_____400>

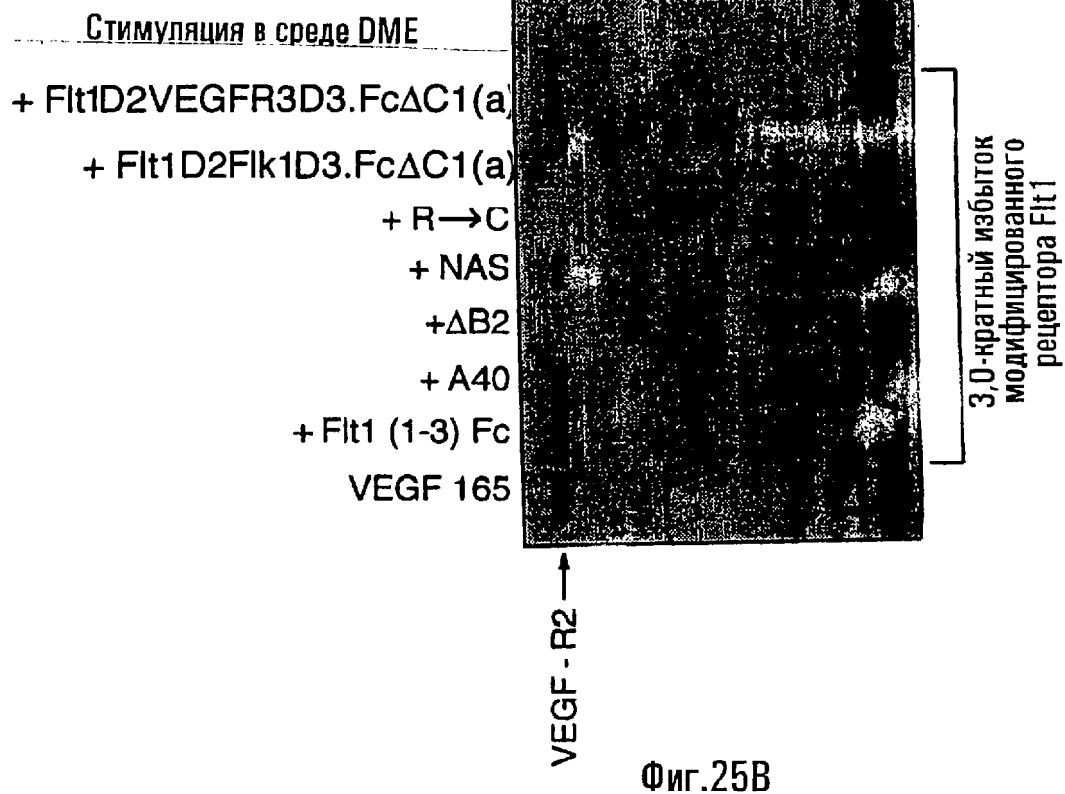
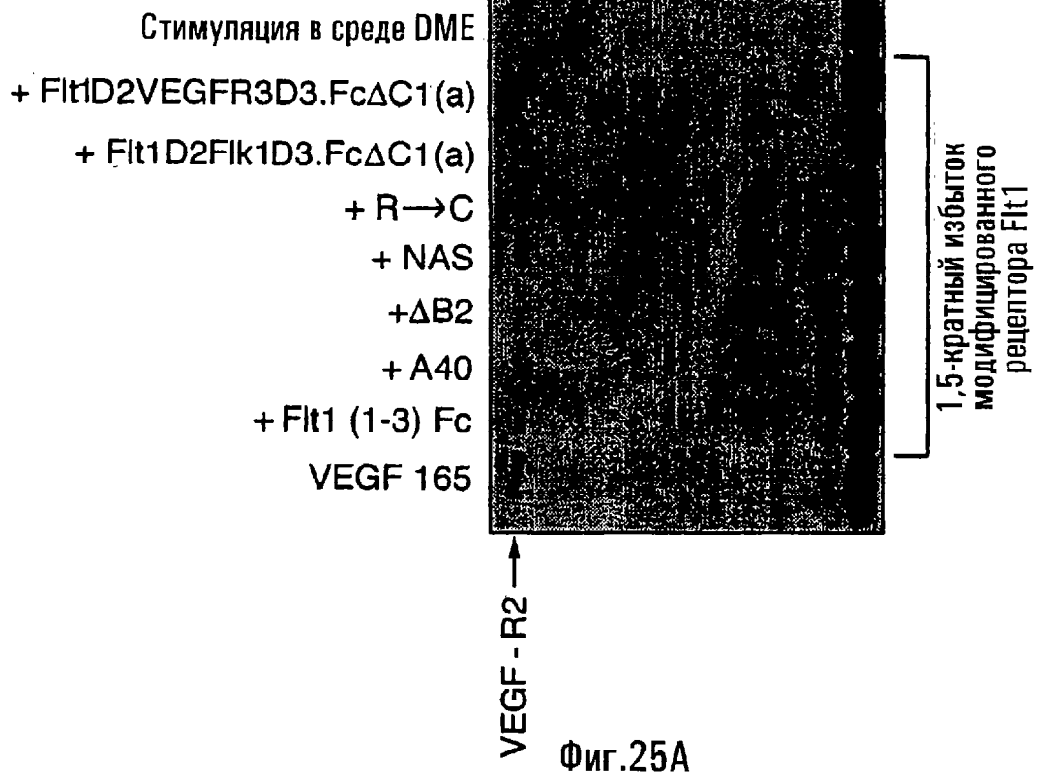
          1210          1220          1230          1240          1250          1260
          *          *          *          *          *          *
AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG
TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K>
401_____405_____hFCAC1 A _____415_____420>

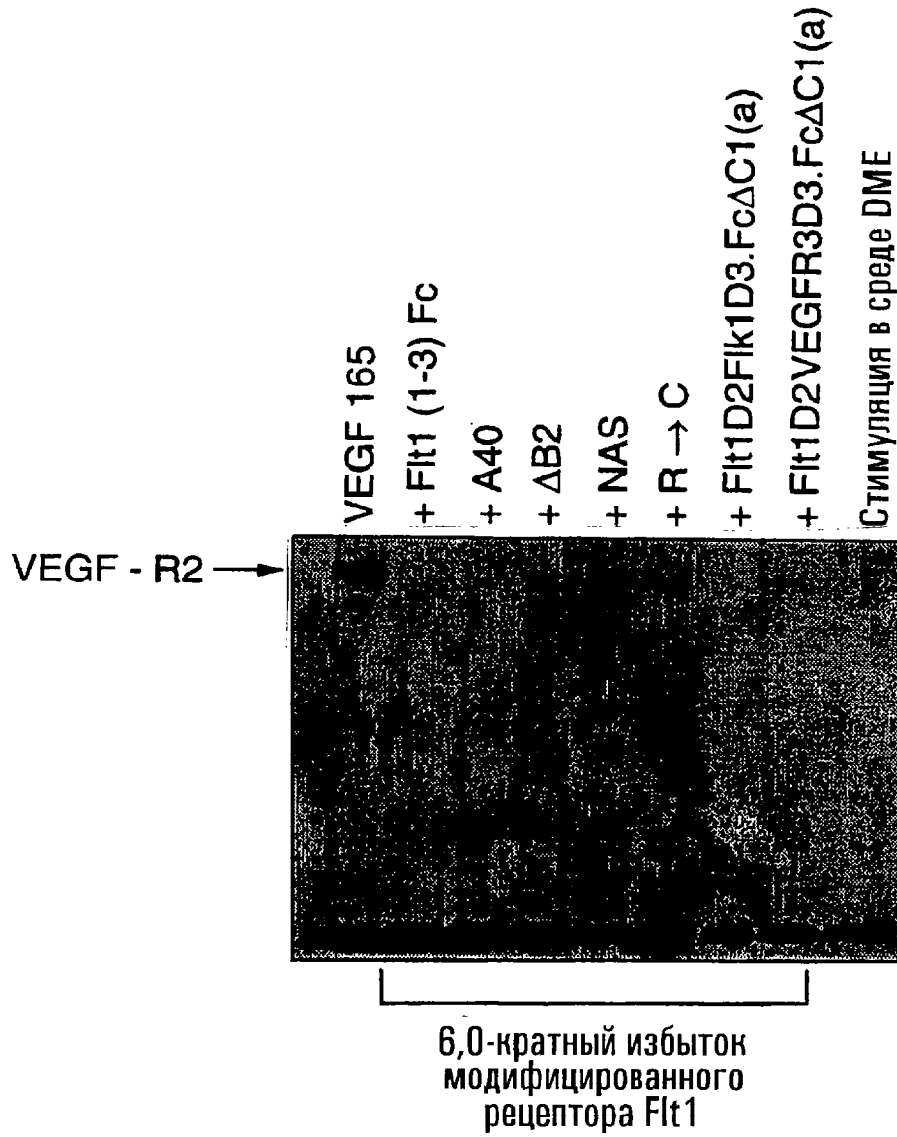
          1270          1280          1290          1300          1310          1320
          *          *          *          *          *          *
CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT
GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA
L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H>
421_____425_____hFCAC1 A _____435_____440>

          1330          1340          1350          1360          1370
          *          *          *          *          *
GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *>
441_____445_____hFCAC1 A _____455_____458>

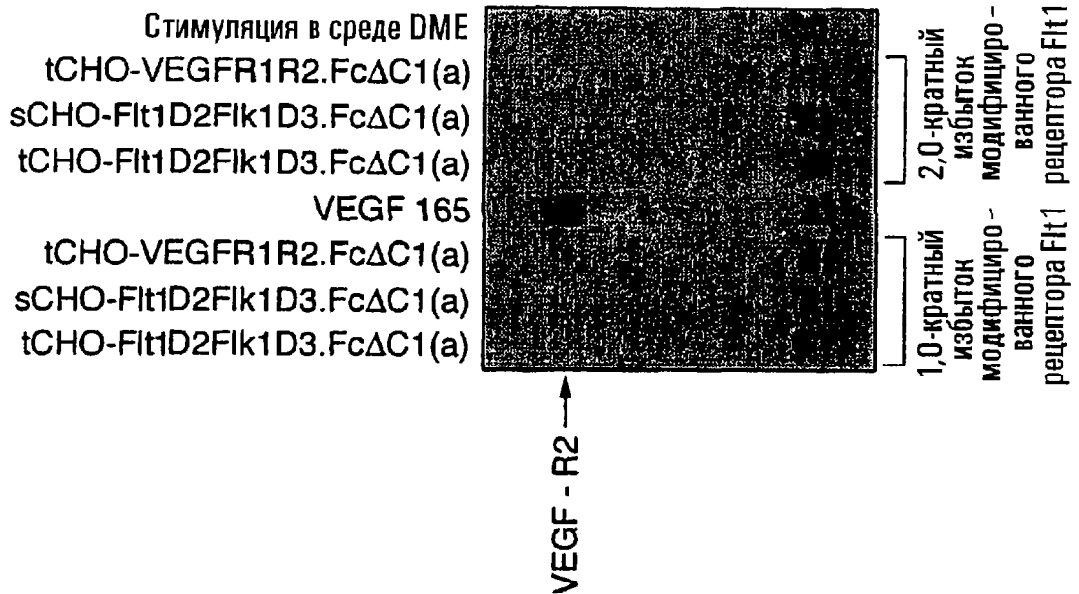
```

Фиг.24С

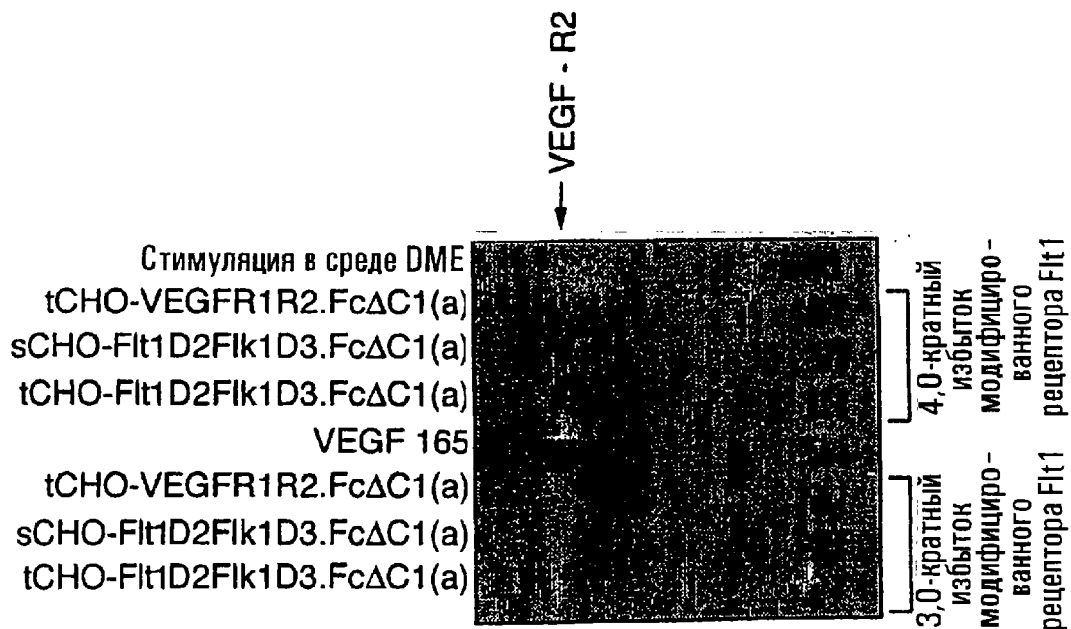




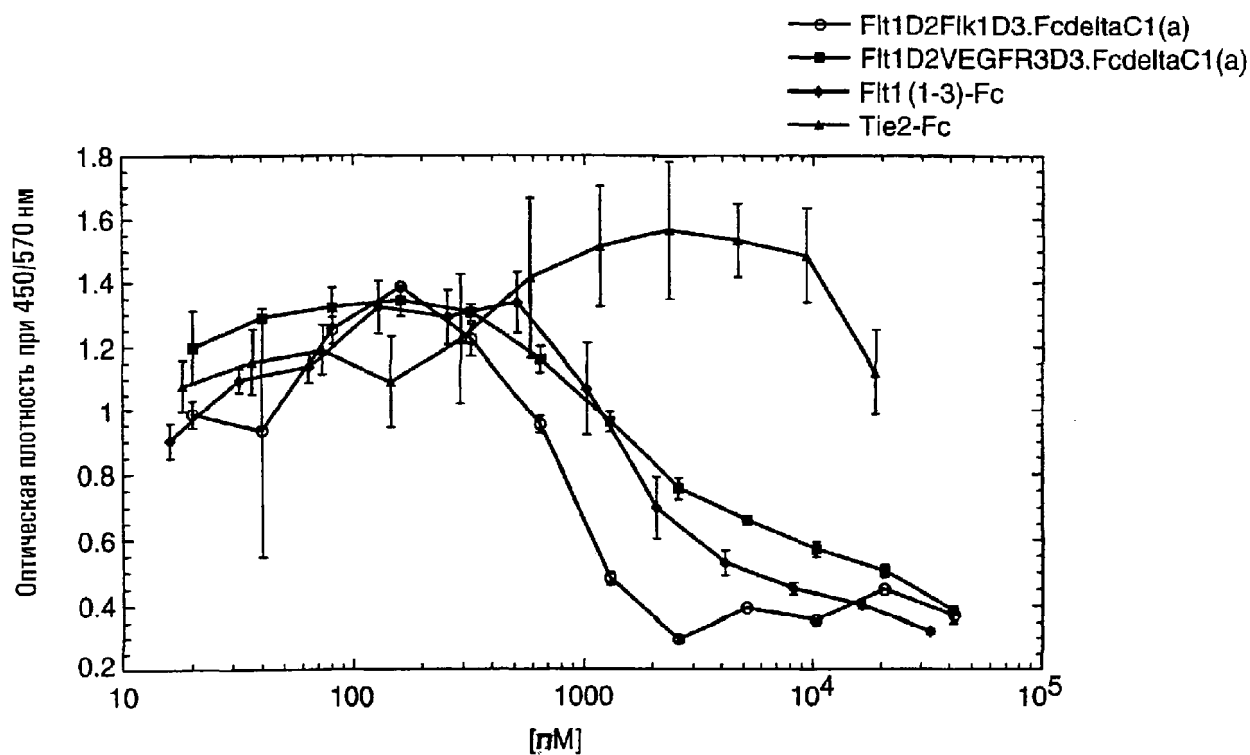
Фиг.25С



Фиг.26А



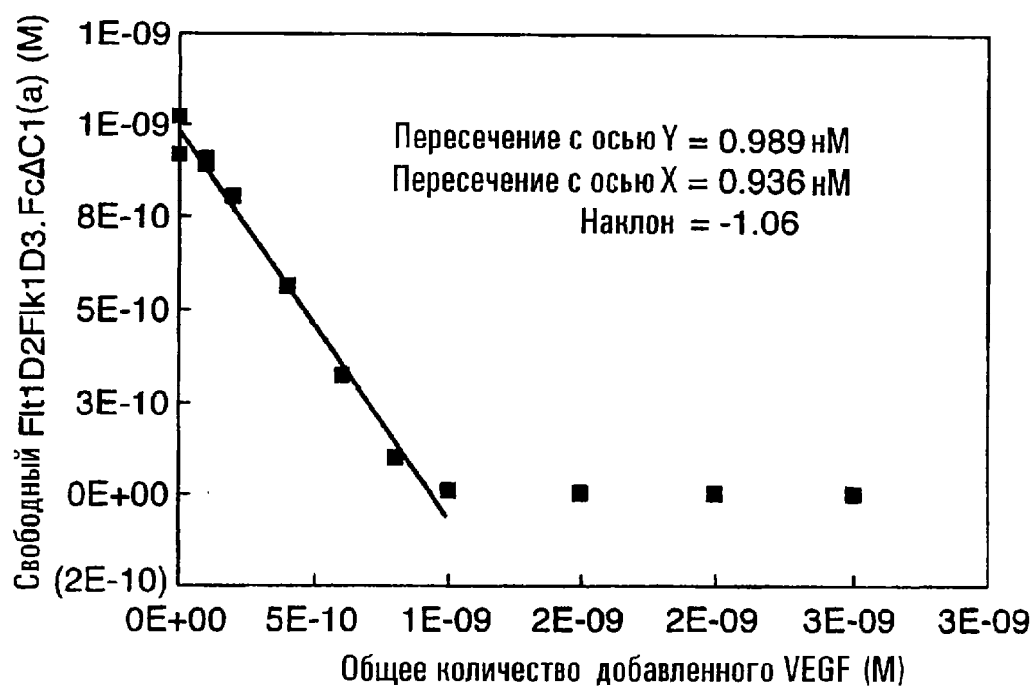
Фиг.26В



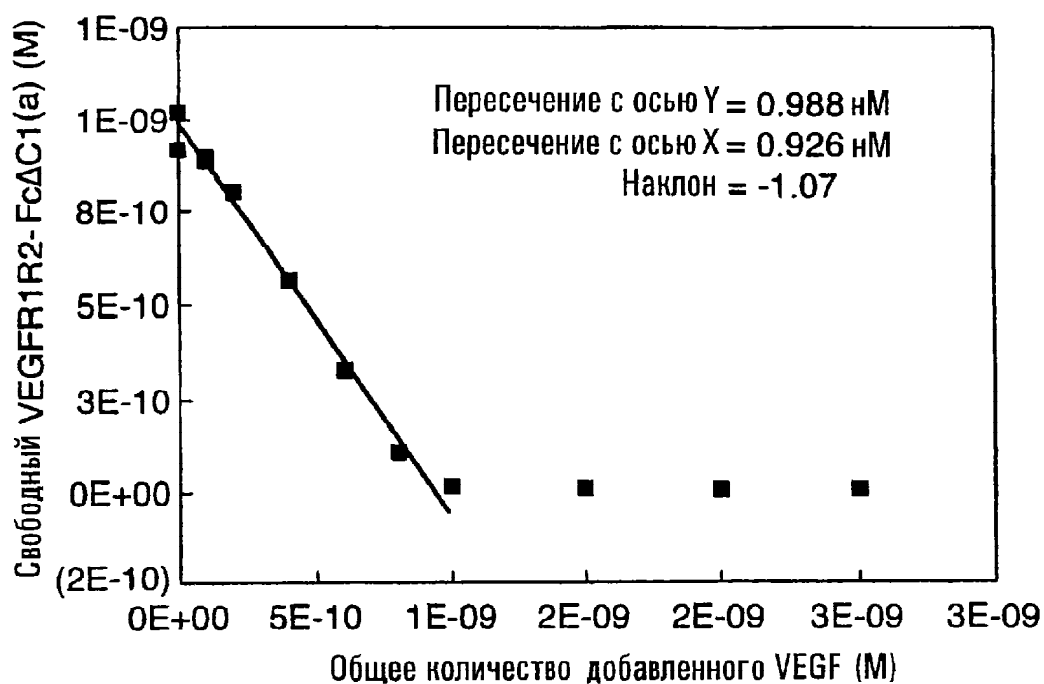
Фиг.27

Стехиометрия связывания hVEGF165 с Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) и VEGFR1R2-FcΔC1(a)		
hVEGF165 (nM)	VEGF/Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)	VEGF/VEGFR1R2-FcΔC1(a)
1	0.93	0.98
10	0.97	0.94
50	1	0.99
Среднее ± значение стандартное отклонение	0.96 ± 0.03	0.97 ± 0.02

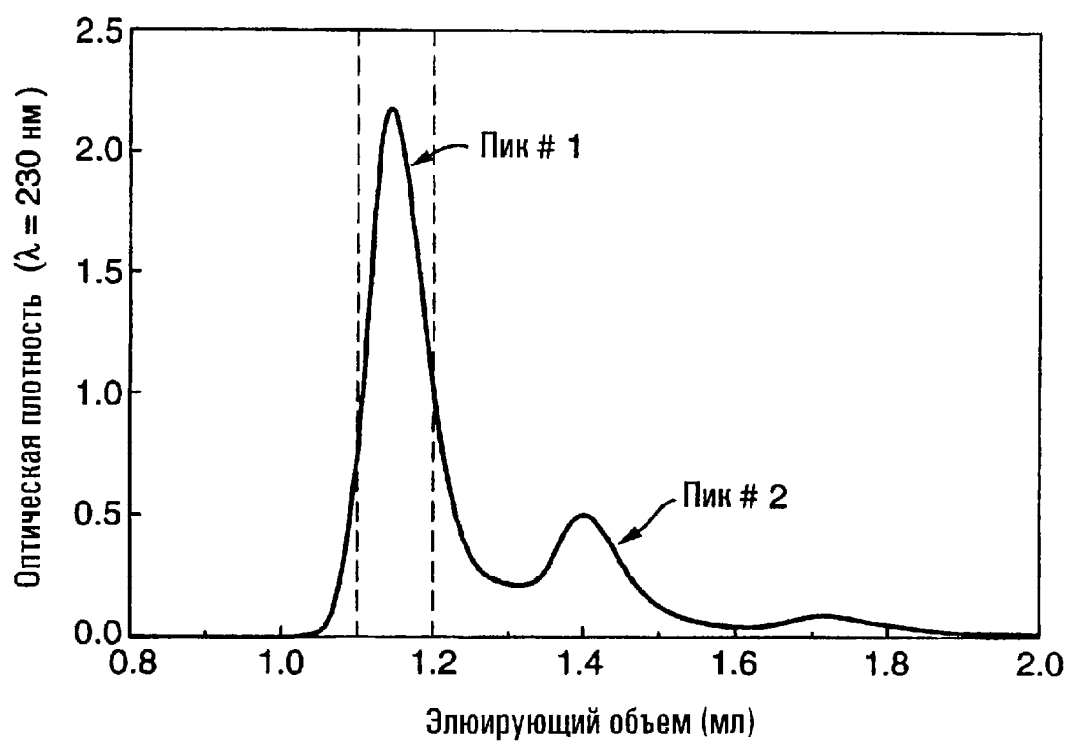
Фиг.28



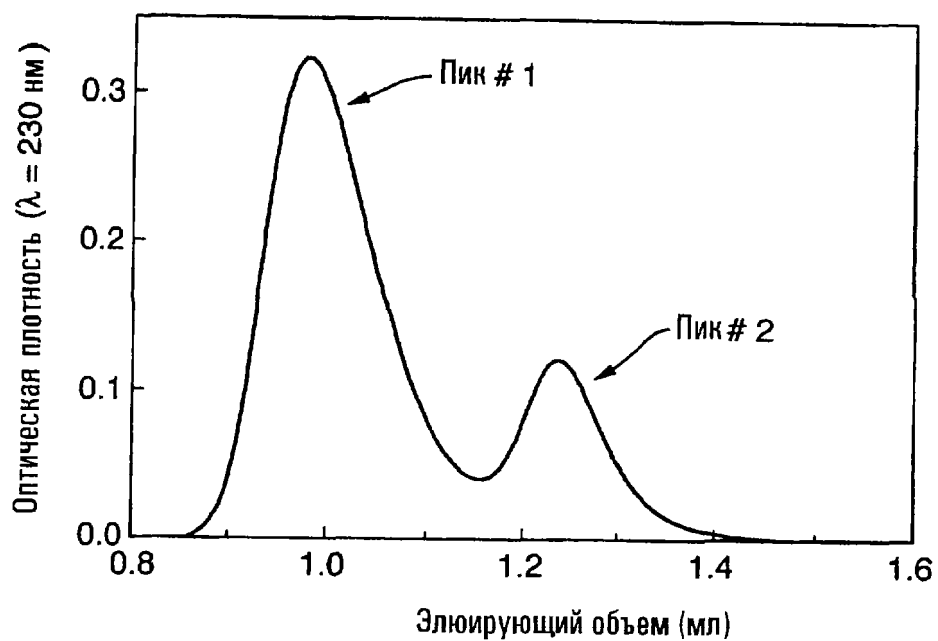
Фиг.29



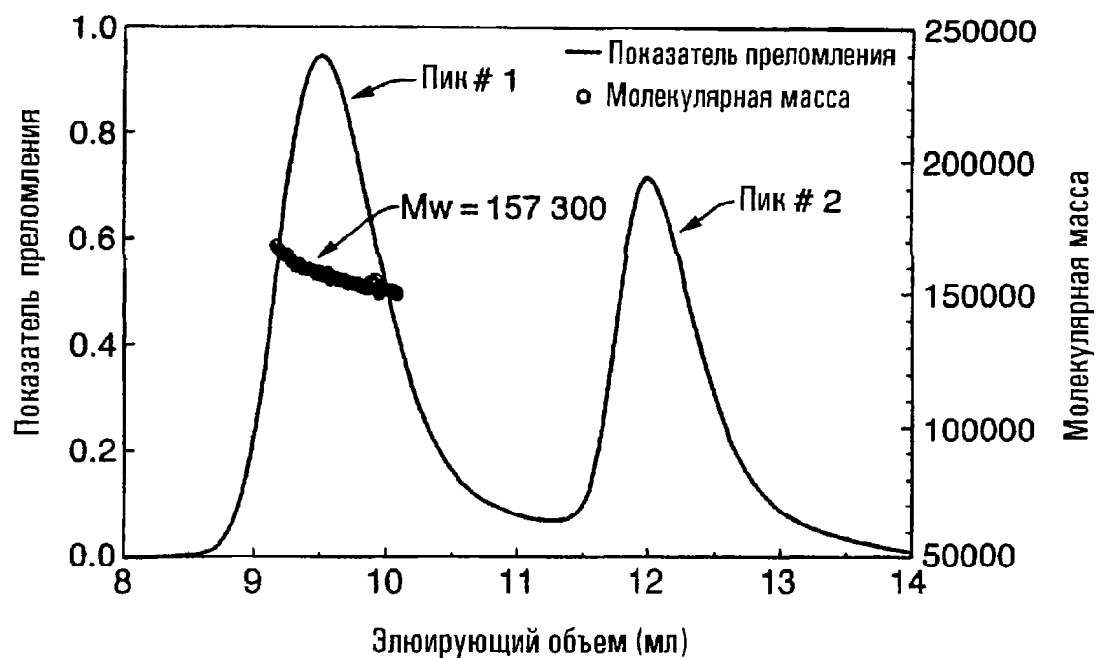
Фиг.30



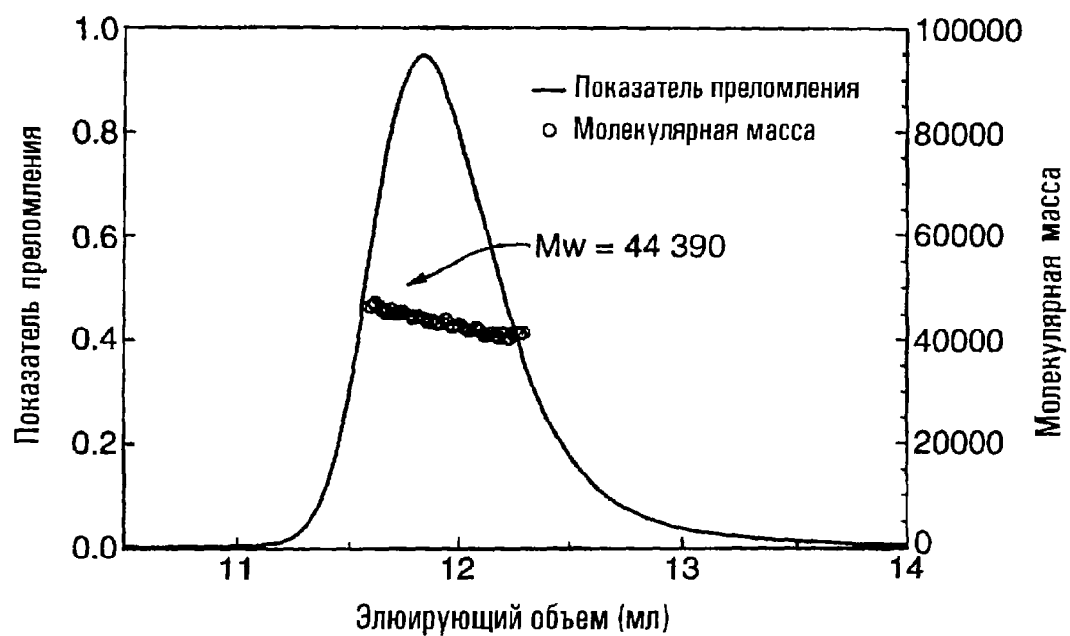
Фиг.31



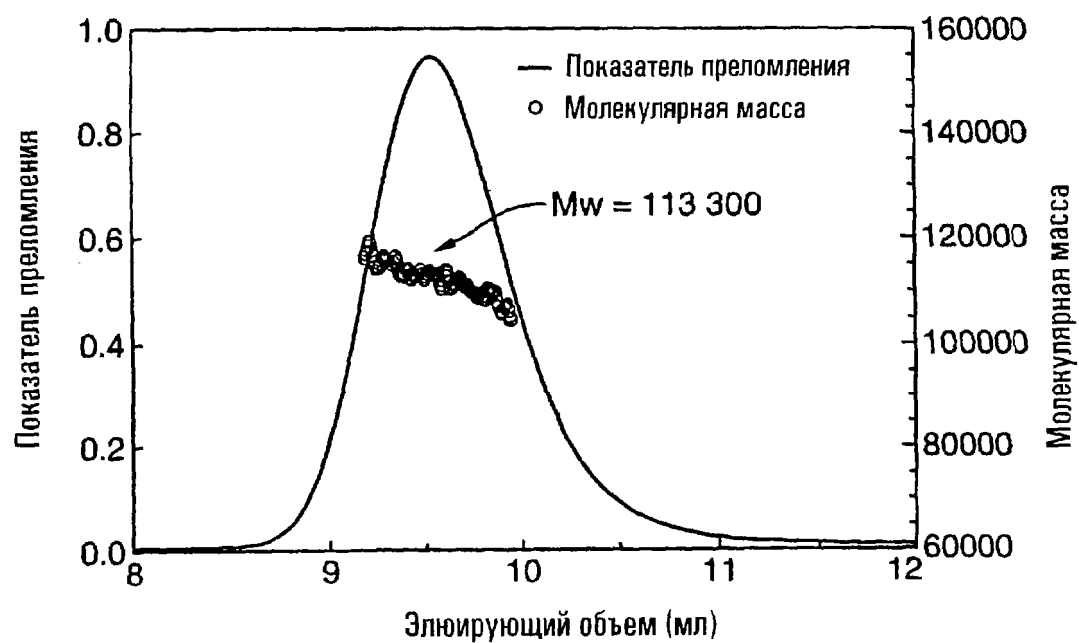
Фиг.32



Фиг.33



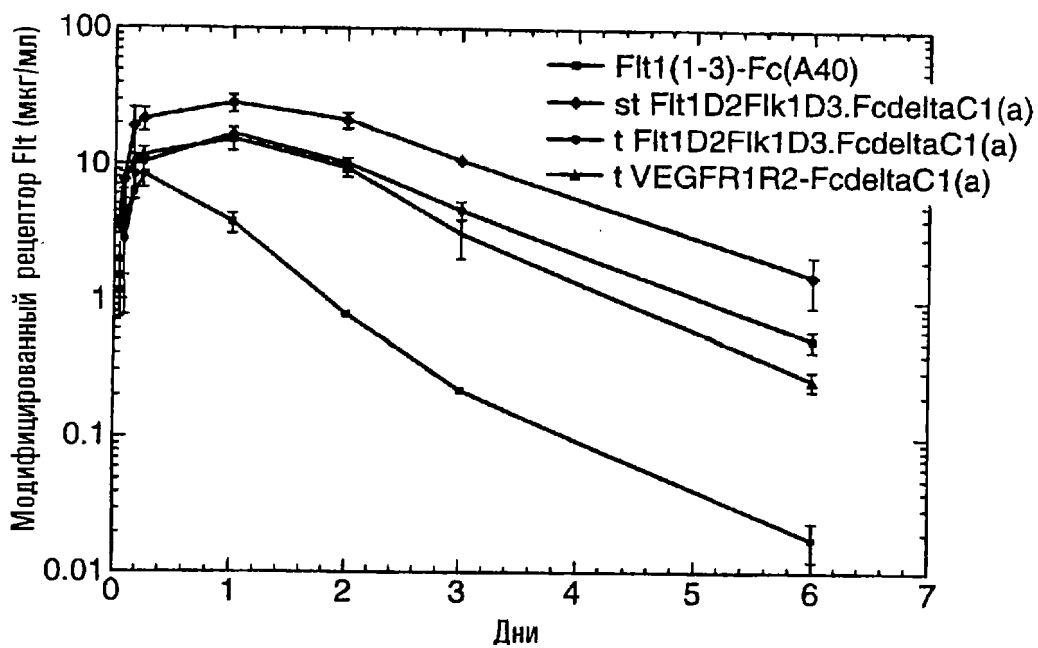
Фиг.34



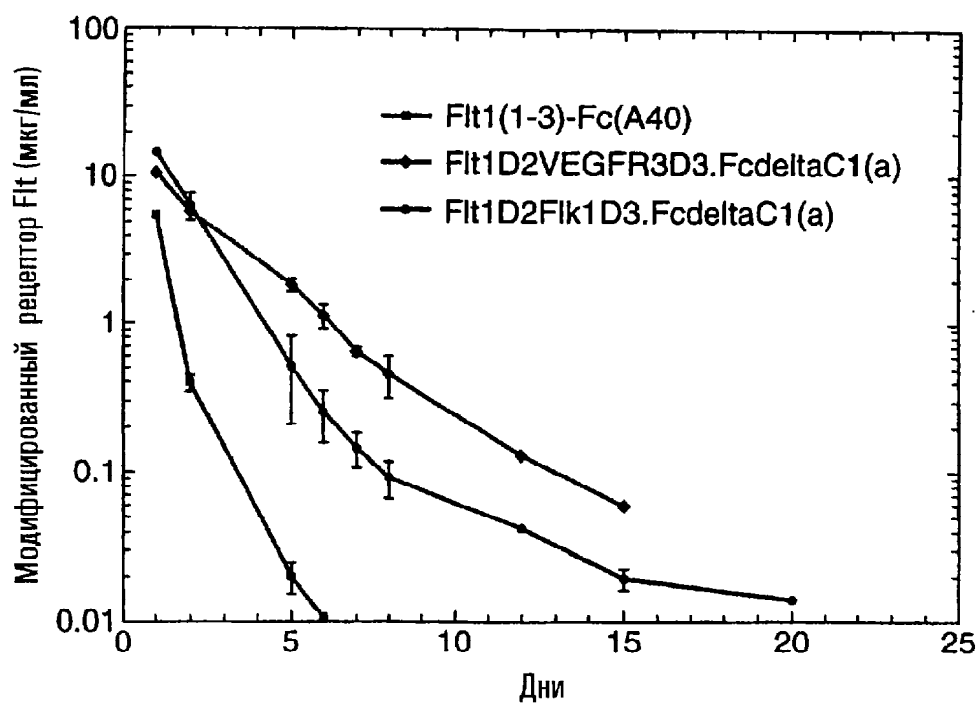
Фиг.35

GRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDG
 KRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIID
 VVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGIDFNWEYPSSKHQHKKL VNR
 DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH
 EKGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

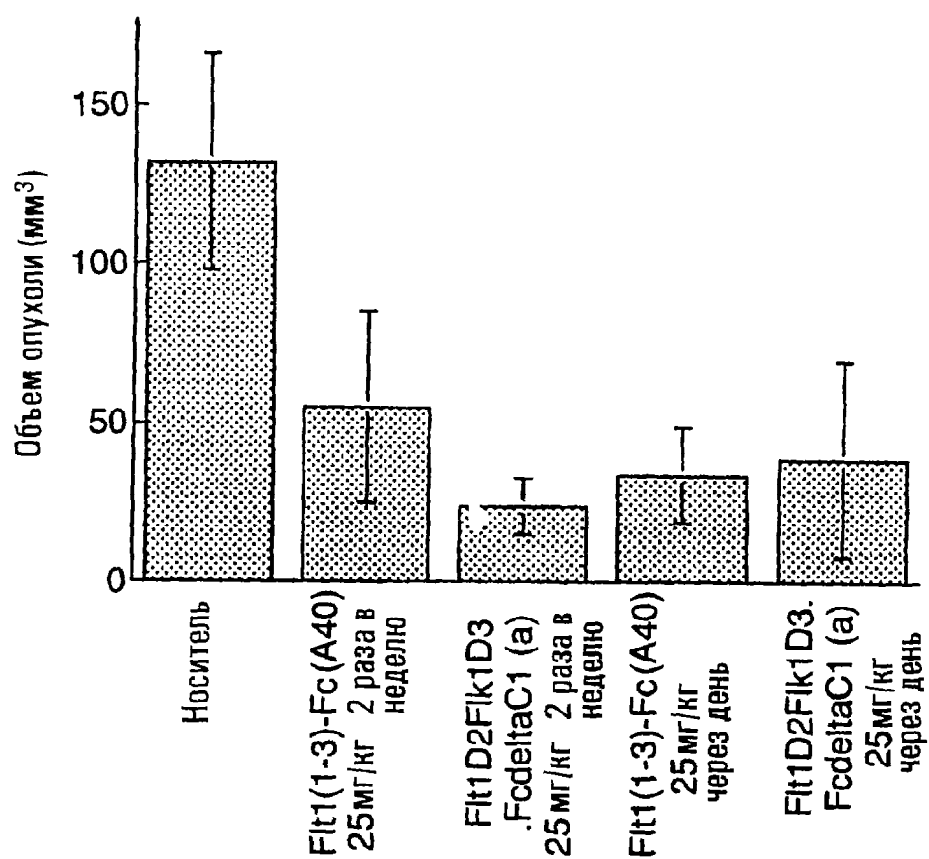
Фиг. 36



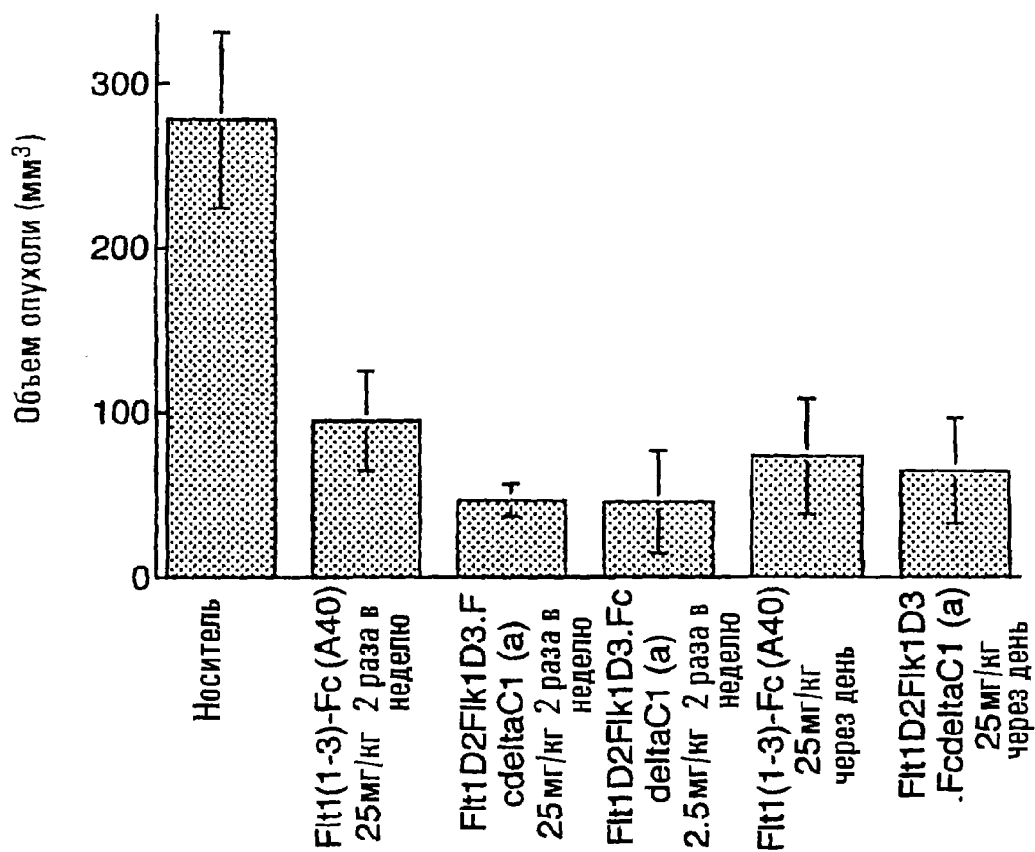
Фиг.37



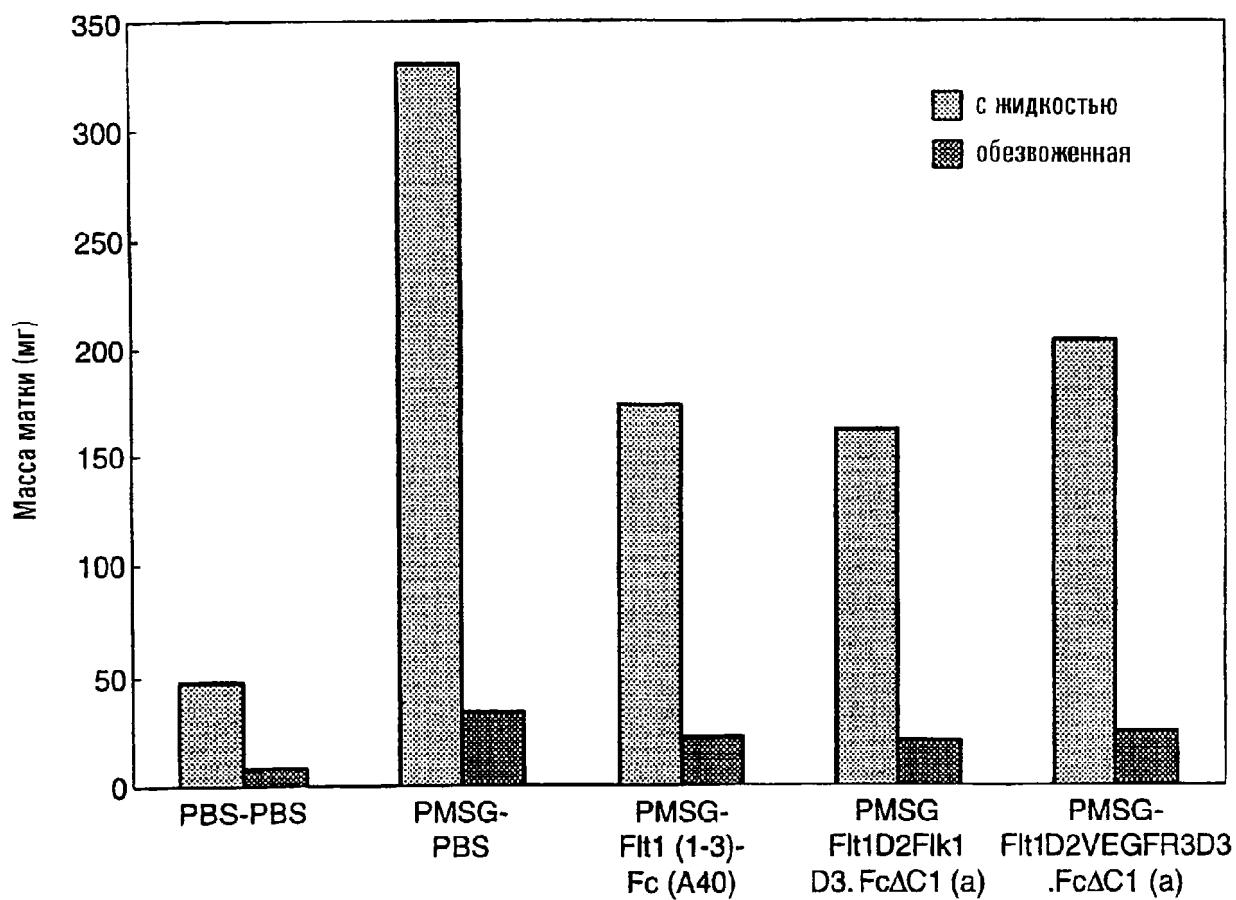
Фиг.38



Фиг.39



Фиг.40



Фиг.41

