Область изобретения

Данное изобретение, в целом, относится к усовершенствованным слитым белкам, содержащим фрагмент рецептора фактора некроза опухоли и фрагмент иммуноглобулина. В частности, данное изобретение относится к усовершенствованным TACI-иммуноглобулиновым слитым белкам.

Предпосылки изобретения

Цитокины являются растворимыми небольшими белками, которые опосредуют ряд биологических эффектов, включая регуляцию роста и дифференциации многих типов клеток (см., например, Arai et al, Annu. Rev. Biochem. 59:783 (1990); Mosmann, Curr. Opin. Immunol. 3:311 (1991); Paul and Seder, Cell 76:241 (1994)). Белки, которые составляют группу цитокинов, включают интерлейкины, интерфероны, колониестимулирующие факторы, факторы некроза опухоли и другие регуляторные молекулы. Например, интерлейкин-17 человека является цитокином, который стимулирует экспрессию интерлейкина-6, внутриклеточной адгезионной молекулы 1, интерлейкина-8, колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов и экспрессию простагландина Е2 и играет роль в избирательном созревании гемопоэтических предшественников CD34+ в нейтрофилы (Yao.et al., Immunol. 755:5483 (1995); Fossiez et.al, J. Exp. Med. 183:2593 (1996)).

Рецепторы, которые связывают цитокины, являются типично состоящими из одного или нескольких интегральных мембранных белков, которые связывают цитокины с высокой аффинностью и передают этот результат связывания в клетку через цитоплазматические участки определенных субъединиц рецептора. Рецепторы цитокинов сгруппированы в несколько классов на основе сходств в их внеклеточных лиганд-связывающих доменах. Например, рецепторные цепи, ответственные за связывание и/или трансдукцию действия интерферонов, являются членами рецепторного семейства цитокинов II типа, основанного на характеристике внеклеточного домена из 200 остатков.

Клеточные взаимодействия, которые происходят во время иммунного ответа, регулируются членами нескольких семейств поверхностных клеточных рецепторов, включая рецепторное семейство фактора некроза опухоли (TNFR). Семейство TNFR состоит из ряда интегральных мембранных гликопротеиновых рецепторов, многие из которых, связываясь с их соответствующими лигандами, регулируют взаимодействия между различными гемопоэтическими клеточными линиями (см., например, Cosman, Stem Cells 12:440 (1994); Wajant et al., Cytokine Growth Factor Rev. 70:15 (1999); Yeh et al., Immunol. Rev. 769:283 (1999); Idriss and Naismith, Microsc. Res. Tech. 50:184 (2000)).

Одним таким рецептором является TACI, трансмембранный активатор, и взаимодействующий с CAML (von Bulow and Bram, Science 228:138 (1997); Bram and von Bulow, патент США N 5969102 (1999)). TACI является мембранно-связанным рецептором, который имеет внеклеточный домен, имеющий в своем составе две обогащенные цистеином псевдоповторности, трансмембранный домен и цитоплазматический домен, который взаимодействует с CAML (кальциевым модулятором и циклофилиновым лигандом), интегральный мембранный белок, локализованный во внутриклеточных везикулах, который является коиндуктором активации NF-AT при сверхэкспрессии в клетках Журката. TACI ассоциированы с В-клетками и субпопуляцией Т-клеток. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют TACI, и соответствующую ему аминокислотную последовательность, даны здесь как SEQ ID, номера 1 и 2 соответственно.

Рецептор TACI связывает два члена семейства лигандов фактора некроза опухоли (TNF). Один лиганд, по-разному определяемый, как ZTNF4, "BAFF", "нейтрокин-α", "BlyS", "TALL-1" и "THANK" (Yu et al., международная публикация № WO98/18921 (1998), Moore et al., Science 285:269 (1999); Mukhopadhyay et al., J. Biol. Chem. 274:15978 (1999); Schneider et al., J. Exp. Med. 189:1747 (1999); Shu et al., J. Leukoc. Biol. 65:680 (1999)). Аминокислотную последовательность ZTNF4 представляют как SEQ ID NO:3. Другой лиганд назвали как "ZTNF2", "APRIL" и "лиганд гибели-1 TNRF" (Hahne et al., J. Exp. Med. 788:1185 (1998); Kelly et al., Cancer Res. 60:1021 (2000)). Аминокислотную последовательность ZTNF2 представляют как SEQ ID NO:4. Оба лиганда также связываются рецептором созревания В-клеток (BCMA) (Gross et al., Nature 404:995 (2000)). Нуклеотидную и аминокислотную последовательность BCMA представляют как SEQ ID NO:26 и SEQ ID NO:27 соответственно.

Показанная in vivo активность рецепторов фактора некроза опухоли иллюстрирует клинические возможности растворимых форм рецептора. Растворимые формы рецептора TACI были синтезированы в виде иммуноглобулиновых слитых белков. Первоначальные варианты давали в результате слабо экспрессируемый гетерогенный белок. Гетерогенность наблюдали в амино-конце TACI, в карбоксильном конце Fc и в стволовой области TACI. Следовательно, существует необходимость в фармацевтически пригодных композициях рецептора TACI.

Сущность изобретения

Данное изобретение предусматривает усовершенствованные слитые TACI-иммуноглобулиновые белки, пригодные в качестве терапевтических композиций.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 демонстрирует аминокислотную последовательность TACI человека. Положения богатых цистеином псевдо-повторностей заштрихованы, трансмембранный домен помещен в рамку и стволовой участок показан мелкими черточками.

Фиг. 2 представляет собой схематический чертеж иммуноглобулина подкласса lgG1. C_L: константная область легкой цепи; C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}: константные области тяжелой цепи; V_L: вариабельная область легкой цепи; V_H: вариабельная область тяжелой цепи; CHO: углевод; N: амино-конец; C: карбоксильный конец.

Фиг. 3A, 3B, 3C и 3D показывают сравнение аминокислотной последовательности константной области Fc γ1 дикого типа человека с вариантами Fc-488, Fc4, Fc5, Fc6, Fc7 и Fc8. C_{H1}-домен константной области γ1 человека не является частью Fc и поэтому не показан. Показана локализация шарнирного участка, C_{H2}- и C_{H3}-доменов. Отмечены остатки Cys, которые обычно вовлечены в дисульфидные связи константной области легкой цепи (LC) и константной области тяжелой цепи (HC). Обозначение «.» показывает идентичность с диким типом в этом положении, тогда как «***» обозначает локализацию карбоксильного конца и иллюстрирует различия в карбоксильном конце Fc6 относительно других вариантов Fc. Положения аминокислот обозначены по индексной позиции Европейского сообщества.

Фиг. 4 показывает специфическое связывание ^{125}I-ZTNF4 с различными конструкциями TACI-Fc. Слитые белки TACI-Fc содержат фрагменты TACI, у которых отсутствуют первые 29 аминокислотных остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2. Один из слитых белков содержит фрагмент TACI с интактной стволовой областью (TACI(d1-29)-Fc5), тогда как три из слитых белков TACI-Fc содержат фрагменты TACI с различными делециями в стволовой области TACI(d1-29,d107-154)-Fc5; TACI(d1-29,d111-154)-Fc5; TACI(d1-29,d120-154)-Fc5. Экспериментальные подробности описывают в примере 4.

Подробное описание изобретения

1. Обзор

Как описано ниже, данное изобретение предусматривает слитые белки трансмембранного активатора и кальциевого модулятора, взаимодействующие с циклофилиновым лигандом (TACI) с иммуноглобулинами, и способы применения TACI-иммуноглобулиновых слитых белков. Например, настоящее изобретение предоставляет способы ингибирования пролиферации опухолевых клеток, предусматривающие введение в опухолевые клетки композиции, которая содержит слитый белок TACI-иммуноглубулина. Такая композиция может быть введена в клетки, культивируемые in vitro. Альтернативно, композиция может быть фармацевтической композицией, которая состоит из фармацевтически приемлемого носителя и слитого белка TACI-иммуноглобулина, и фармацевтическая композиция может быть введена субъекту, который имеет опухоль. Субъект может быть млекопитающим субъектом. Введение фармацевтической композиции может ингибировать, например, пролиферацию B-лимфоцитов у млекопитающего субъекта.

Данное изобретение также предоставляет способы ингибирования активности ZTNF4 у млекопитающего, предусматривающие введение млекопитающему композиции, которая содержит TACI-иммуноглобулин. Активность ZTNF4 может быть ассоциирована с различными болезнями и нарушениями. Например, фармацевтическая композиция, которая содержит слитый белок TACI-иммуноглобулина, может быть использована для лечения аутоиммунных болезней, таких как системная красная волчанка, астенический бульбарный паралич, рассеянный склероз, инсулинзависимый сахарный диабет, болезнь Крона, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоиднный полиартрит и псориатический артрит. Альтернативно, фармацевтическая композиция, которая содержит TACI-иммуноглобулин, может быть использована для лечения расстройства, такого как астма, бронхит, эмфизема и последняя стадия почечной недостаточности. Фармацевтическая композиция, предусматривающая TACI-иммуноглобулин, может быть также использована для лечения почечного заболевания, такого как гломерулонефрит, васкулит, нефрит, амилоидоз и пиелонефрит, или расстройства, такого как неоплазма, хроническая лимфоцитарная лейкемия, множественная миелома, неходчкинкская лимфома, пост-трансплантационное лимфопролиферативное нарушение и легкая цепь гаммопатии. В определенных случаях активность ZTNF4 может быть ассоциирована с Т-клетками. Фармацевтическая композиция, которая содержит TACI-иммуноглобулин, может быть также использована для лечения заболевания или нарушения, связанного с иммуносупрессией, отторжением трансплантата, реакцией «трансплантат против хозяина» и воспаления. Например, фармацевтическая композиция, которая содержит TACI-иммуноглобулин, может быть использована для уменьшения воспаления и для лечения нарушений, таких как суставная боль, опухоль, анемия и септический шок.

Данное изобретение также предоставляет способы снижения циркулирующих уровней ZTNF4 в крови у млекопитающих субъектов, предусматривающие введение млекопитающему субъекту фармацевтической композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и слитый белок TACI-иммуноглобулина, причем введение фармацевтической композиции снижает циркулирующий уровень ZTNF4 в крови млекопитающего субъекта. В качестве иллюстрации, введение такой фармацевтической композиции может снизить циркулирующий уровень ZTNF4 в крови, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на от 10 до 60%, по меньшей мере на от 20 до 50% или по меньшей мере на от 30 до 40%, по сравнению с уровнем ZTNF4 в крови перед введением фармацевтиче-

ской композиции. Специалисты в данной области могут измерить циркулирующие уровни ZTNF4. Иллюстративные способы описывают в примере 4 и в примере 5.

Как описано ниже, иллюстративные слитые белки TACI-иммуноглобулина содержат:

(a) фрагмент рецептора TACI, который состоит из фрагмента полипептида, который имеет аминокислотную последовательность аминокислотных остатков с 30 по 154 последовательности SEQ ID NO:2, причем фрагмент рецептора TACI содержит, по меньшей мере, один из (i) аминокислотных остатков с 34 по 66 последовательности SEQ ID NO:2, и

(ii) аминокислотные остатки с 71 по 104 последовательности SEQ ID NO:2, и причем компонент рецептора TACI связывает, по меньшей мере, один из ZTNF2 или ZTNF4, и

(b) фрагмент иммуноглобулина, содержащий константную область иммуноглобулина.

Подходящие фрагменты рецептора TACI включают полипептиды, которые содержат аминокислотные остатки с 34 по 66 последовательности SEQ ID NO:2 и аминокислотные остатки с 71 до 104 SEQ ID NO:2; полипептиды, которые содержат аминокислотные остатки с 34 по 104 SEQ ID NO:2; полипептиды, которые содержат аминокислотную последовательность аминокислотных остатков с 30 по 110 SEQ ID NO:2, и полипептиды, которые имеют аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотных остатков с 30 по 110 SEQ ID NO:2.

Иммуноглобулиновый фрагмент слитого белка TACI-иммуноглобулина может содержать константную область тяжелой цепи, например, константную область тяжелой цепи человека. Константная область тяжелой цепи IgG1 представляет один пример пригодной константной области тяжелой цепи. Иллюстративной константной областью тяжелой цепи IgG1 является Fc-фрагмент IgG1, который содержит домены C_{H2} и C_{H3}. Fc-фрагмент IgG1 может быть Fc-фрагментом дикого типа IgGl или видоизмененным Fc-фрагментом IgG1, таким как фрагмент Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33. Одним типичным слитым белком TACI-иммуноглобулина является белок, который содержит аминокислотную последовательность, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54.

Слитые белки TACI-иммуноглобулина, описанные здесь, могут быть мультимерами, например, димерами.

Данное изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют слитый белок TACI-иммуноглобулина. Иллюстративная нуклеотидная последовательность, которая кодирует слитый белок TACI-иммуноглобулина, представлена последовательностью SEQ ID NO:53.

Данное изобретение также включает в себя растворимые рецепторы TACI, которые состоят из фрагмента полипептида, который имеет аминокислотную последовательность аминокислотных остатков с 30 по 154 SEQ ID NO:2, причем растворимый рецептор TACI содержит по меньшей мере один из (i) аминокислотных остатков с 34 по 66 SEQ ID NO:2 и (ii) аминокислотные остатки с 71 по 104 SEQ ID NO:2, и причем растворимый рецептор TACI связывает по меньшей мере один из ZTNF2 или ZTNF4. Дополнительные растворимые рецепторы TACI описывают здесь в виде подходящих фрагментов рецептора TACI для слитых белков TACI-иммуноглобулинов. Кроме того, растворимые рецепторы TACI могут быть использованы в способах, описанных для слитых белков TACI-иммуноглобулинов.

Эти и другие аспекты изобретения станут очевидными из ссылки к следующему детальному описанию и рисункам. Кроме того, различные ссылки представляют ниже.

2. Определения

В последующем описании широко используют ряд терминов. Нижеследующие определения представлены для облегчения понимания изобретения.

Как используется здесь, «нуклеиновая кислота» или «молекула нуклеиновой кислоты» относится к полинуклеотидам, таким как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) или рибонуклеиновая кислота (РНК), олигонуклеотидам, фрагментам, синтезированным полимеразной цепной реакцией (ПЦР), и фрагментам, произведенным любым из эндонуклеазных действий и экзонуклеазных действий - лигирования, разрезания. Молекулы нуклеиновых кислот могут быть составлены из мономеров, которые являются природными нуклеотидами (таких как ДНК и РНК), или аналогов природных нуклеотидов (например, α-энантиомерных форм природных нуклеотидов), или сочетания обоих. Модифицированные нуклеотиды могут иметь перестройки в сахарных остатках и/или в остатках пиримидиновых или пуриновых оснований. Модифицирование сахаров включает, например, замещение одной или нескольких гидроксильных групп галогенами, щелочными группами, аминами и азидными группами, или сахара могут быть функционализированы в виде простых или сложных эфиров. Кроме того, целый сахарный остаток может быть замещен пространственно и электронно сходными структурами, такими как азасахара и карбоциклические аналоги сахаров. Примеры модификаций в основе остатка включают алкилированные пурины и пиримидины, ацилированные пурины или пиримидины, или другие хорошо известные гетероциклические замещения. Мономеры нуклеиновых кислот могут быть связаны фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирных связей включают фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфоранилитад, фосфороамидат и т.п. Термин "молекула нуклеиновой кислоты» также включает так называемые «пептидные нуклеиновые кислоты», которые состоят из природных или модифицированных оснований нуклеиновых кислот, при-

соединенных к полиамидной основе. Нуклеиновые кислоты могут быть или одноцепочечными, или двухцепочечными.

Термин «комплементарная молекула нуклеиновой кислоты» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, имеющей комплементарную нуклеотидную последовательность и противоположное направление по сравнению с эталонной нуклеотидной последовательностью. Например, последовательность 5'ATGCACGGG 3'(SEQ ID NO:57) является комплиментарной последовательности 5'CCCGTGCAT 3' (SEQ ID NO:58).

Термин «контиг» означает молекулу нуклеиновой кислоты, которая имеет прилегающий отрезок идентичной или комплементарной последовательности другой молекуле нуклеиновой кислоты. Прилегающие последовательности, говорят, «перекрывают» данный отрезок молекулы нуклеиновой кислотой или полностью, или на частичном протяжении молекулы нуклеиновой кислоты.

Термин «вырожденная нуклеотидная последовательность» означает последовательность нуклеотидов, которая включает один или несколько вырожденных кодонов по сравнению с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид. Вырожденные кодоны содержат различные триплеты нуклеотидов, но кодируют тот же аминокислотный остаток (например, триплеты GAU и GAC каждый кодирует Asp).

Термин «структурный ген» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется в матричную РНК (мРНК), которая затем транслируется в аминокислотную последовательность, характерную для конкретного полипептида.

«Изолированная молекула нуклеиновой кислоты» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая не является интегрированной (пер., встроенной) в геномную ДНК организма. Например, молекула ДНК, которая кодирует фактор роста, которая была отделена от геномной ДНК клетки, является изолированной молекулой ДНК. Другим примером изолированной молекулы ДНК является молекула химически синтезированной нуклеиновой кислоты, которая не интегрирована в геном организма. Молекула нуклеиновой кислоты, которая выделена из отдельных видов, является меньшей, чем целая молекула ДНК хромосомы тех же видов.

«Молекулярная конструкция нуклеиновой кислоты» означает молекулу нуклеиновой кислоты, или одно- или двухцепочечной, которая была модифицирована посредством человеческого вмешательства таким образом, что она содержит в себе участки нуклеиновой кислоты, скомбинированные и соединенные в расположении, не существующем в природе.

«Линейная ДНК» означает некольцевые молекулы ДНК, имеющие свободные 5' и 3' концы. Линейная ДНК может быть получена из замкнутых кольцевых молекул ДНК, таких как плазмидные, путем энзиматического переваривания или физического разрыва.

«Комплементарная ДНК (кДНК)» означает одноцепочечную молекулу ДНК, которая образована из матричной мРНК ферментом обратной транскриптазой. Типично, затравка, комплементарная участку мРНК, используется для инициации обратной транскрипции. Специалисты в данной области также используют термин кДНК, который относится к двухцепочечной молекуле ДНК, состоящей из такой одноцепочечной молекулы ДНК и ей комплементарной нити ДНК. Термин «кДНК» также относится к клону молекулы кДНК, синтезированному из РНК-матрицы.

«Промотор» означает нуклеотидную последовательность, которая направляет транскрипцию структурного гена. Типично, промотор локализован на 5' некодирующем участке гена, ближайшем к сайту начала транскрипции структурного гена. Последовательность элементов внутри промоторов, функция которых в инициации транскрипции, часто отличается консенсусными нуклеотидными последовательностями. Такие промоторные элементы включают РНК-полимеразные связывающие сайты, TATA-последовательности, CAAT-последовательности, специфические для дифференциации элементы (DSEs; McGehee et al, Mol.Endocrinol. 7:551 (1993)), элементы ответа на циклический АМФ (CREs), сывороточные элементы ответа (SREs; Treisman, Seminars in Cancer Biol. 1:47 (1990)), элементы ответа на глюкокорикоид (GREs), и связывающие сайты других факторов транскрипции, таких как CRE/ATF (O'Reilly et al., J. Biol. Chem. 267:19938 (1992)), AP2 (Ye et al, J. Biol. Chem. 269:25728 (1994)), SP1, белок, связывающий цАМФ-элемент ответа (CREB; Loeken, Gene Expr. 3:253 (1993)) и октамерные факторы (см. вообще, Watson et al., eds., Molecular Biology of the Gene, 4th ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987) и Lemaigre and Rousseau, Biochem. J. 303:1 (1994)). Если промотор является индуцибельным промотором, тогда скорость траскрипции возрастает в ответ на индуцирующий агент. Наоборот, скорость траскрипции не регулируется индуцирующим агентом, если промотор является конститутивным промотором. Репрессируемые промоторы также известны.

«Коровый промотор» содержит нуклеотидные последовательности существенные для функции промотора, включая TATA-бокс и последовательность начала транскрипции. Согласно этому определению, коровый промотор может или не может иметь обнаруживаемую активность в отсутствие специфических последовательностей, которые могут усиливать активность или придавать тканеспецифическую активность.

«Регуляторный элемент» означает нуклеотидную последовательность, которая изменяет активность корового промотора. Например, регуляторный элемент может содержать нуклеотидную последователь-

ность, которая связывается с клеточными факторами, разрешающими исключительно транскрипцию, или предпочтительно в отдельных клетках, тканях или органеллах. Такие типы регуляторных элементов обычно ассоциированы с генами, которые экспрессируются в «клеточно-специфичной», «тканеспецифичной» или «органельно-специфичной» манере.

«Энхансер» означает тип регуляторного элемента, который может усиливать эффективность транскрипции, независимо от расстояния или ориентации энхансера относительно сайта начала транскрипции.

«Гетерологичная ДНК» относится к молекуле ДНК или популяции молекул ДНК, которые не существуют естественным образом внутри данной хозяйской клетки. Молекулы ДНК, гетерологичные по отношению к конкретной клетке-хозяину, могут содержать ДНК, полученную из разновидностей клетки-хозяина (например, эндогенная ДНК), при условии, что хозяйская ДНК скомбинирована с нехозяйской ДНК (например, экзогенной ДНК). Например, молекула ДНК, содержащая отрезок нехозяйской ДНК, кодирующей полипептид, пришита в результате манипуляций к отрезку хозяйской ДНК, содержащему транскрипционный промотор, и считается, должна быть гетерологичной молекулой ДНК. Наоборот, гетерологичная молекула ДНК может содержать эндогенный ген, связанный в результате манипуляций с экзогенным промотором. В качестве другой иллюстрации молекула ДНК, содержащая ген, полученный из клетки дикого типа, считается, должна быть гетерологичной ДНК, если такую молекулу ДНК внедряют в мутантную клетку, в которой отсутствует ген дикого типа.

«Полипептид» означает полимер аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями, созданный или природным путем, или икусственно. Полипептиды меньше, чем около 10 аминокислотных остатков обычно относят к «пептидам».

«Белок» означает макромолекулу, содержащую один или несколько полипептидных цепей. Белок может также содержать непептидные компоненты, такие как углеводные группы. Углеводы и другие непептидные заместители могут быть добавлены к белку клеткой, в которой белок синтезируется, и будут изменяться вместе с типом клетки. В этом патенте белки определяют на основе их аминокислотной структуры основной цепи; заместители, такие как углеводные группы, вообще не указывают, но тем не менее, заместители могут присутствовать.

Пептид или полипептид, кодируемый нехозяйской молекулой ДНК, является «гетерологичным» пептидом или полипептидом.

«Интегрированный генетический элемент» означает отрезок ДНК, который внедрили в хромосому хозяйской клетки, после чего этот элемент вводили в клетку посредством манипуляций человека. В рамках настоящего изобретения, интегрированные генетические элементы чаще всего получают из линеаризованных плазмид, которые вводят внутрь клетки электропорацией, или другими способами. Интегрированные генетические элементы передаются из исходной клетки-хозяина ее потомству.

«Клонирующий вектор» означает молекулу нуклеиновой кислоты, например, плазмидной, космидной или бактериофага, которая обладает способностью реплицироваться автономно в хозяйской клетке. Клонирующие векторы типично содержат в себе один сайт, или небольшое число сайтов узнавания рестрикционными эндонуклеазами (пер., рестриктазами), которые делают возможной инсерцию (пер., вставку) молекулы нуклеиновой кислоты в устанавливаемой манере без потери существенной биологической функции вектора, также как и нуклеотидной последовательности, кодирующей маркерный ген, который является подходящим для использования в идентификации и селекции клеток, трансформированных клонирующим вектором. Маркерные гены типично включают в себя гены, которые придают устойчивость к тетрациклину и устойчивость к ампициллину.

«Экспрессионный вектор» означает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей ген, который экспрессируется в хозяйской клетке. Типично, экспрессионный вектор содержит транскрипционный промотор, ген и терминатор транскрипции. Экспрессию гена обычно ставят под контроль промотора и такой ген, указывают, должен быть «операбельно связан с» промотором. Аналогично, регуляторный элемент и коровый промотор являются операбельно связанными, если регуляторный элемент регулирует активность корового промотора.

«Рекомбинантный хозяин» означает клетку, которая содержит в себе гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты, например клонирующий вектор или экспрессионный вектор. В настоящем контексте, примером рекомбинантного хозяина является клетка, которая синтезирует слитый белок TACI-Fc из экспрессионного вектора.

«Интегративные трансформанты» означает рекомбинантные хозяйские клетки, в которых гетерологичная ДНК становится интегрированной в геномную ДНК клеток.

«Слитый белок (прим. пер., составной, гибридный, химерный белок)» означает гибридный белок, экспрессированный молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидные последовательности по меньшей мере, двух генов. Например, слитый белок TACI-иммуноглобулина содержит фрагмент рецептора TACI и фрагмент иммуноглобулина. Как используют здесь, «фрагмент (прим. пер., компонент) рецептора TACI» является участком внеклеточного домена рецептора TACI, который связывает, по меньшей мере, один из ZTNF 2 или ZTNF4. Фраза «иммуноглобулиновый фрагмент» имеет отношение к полипептиду, который содержит константную область иммуноглобулина. Например, иммуноглобулиновый фрагмент может содержать константную область тяжелой цепи. Термин слитый белок «TACI-Fc» отно-

сится к слитому белку TACI-иммуноглобулина, в котором иммуноглобулиновый фрагмент содержит константные области иммуноглобулиновой тяжелой цепи, C_{H2} и C_{H3}.

Термин «рецептор» означает ассоциированный с клеткой белок, который связывается с биологически активной молекулой, называемой «лиганд». Это взаимодействие опосредует эффект лиганда на клетку. В контексте связывание рецептора TACI, фраза «специфично связывает» или «специфичное связывание» относится к способности лиганда к конкурентному связыванию с рецептором. Например, ZTNF4 специфически связывается с рецептором TACI и это может быть показано путем наблюдения за конкуренцией за рецептор TACI между меченым, для обнаружения, ZTNF4 и немеченым ZTNF4.

Рецепторы могут быть мембранно-связанными, цитоплазматическими или ядерными; мономерными (например, рецептор тиреотропина, бета-адренергический рецептор), или мультимерными (например, PDGF-рецептор (рецептор фактора роста тромбоцитов), рецептор гормона роста, рецептор IL-3 (рецептор интерлейкина-3), рецептор GM-CSF, рецептор G-CSF, рецептор эритропоэтина и рецептор IL-6). Мембранно-связанные рецепторы характеризуются мультидоменной структурой, содержащей внеклеточный лиганд-связывающий домен и внутриклеточный эффекторный домен, который типично вовлечен в передачу сигнала. У некоторых мембранно-связанных рецепторов внеклеточный лиганд-связывающий домен и внутриклеточный эффекторный домен расположены в изолированных полипептидах, которые составляют полный функциональный рецептор.

Вообще, связывание лиганда с рецептором приводит в результате к конформационному изменению в рецепторе, которое вызывает взаимодействие между эффекторным доменом и другими молекулами (другой молекулой) в клетке, которое, в свою очередь, ведет к изменению клеточного метаболизма. Метаболические события, которые часто связаны с лиганд-рецепторными взаимодействиями, включают: транскрипцию гена, фосфорилирование, дефосфорилирование, увеличение синтеза циклического АМФ, мобилизацию клеточного кальция, мобилизацию мембранных липидов, клеточную адгезию, гидролиз инозитольных липидов и гидролиз фосфолипидов.

Термин «секреторная сигнальная последовательность» означает последовательность ДНК, которая кодирует пептид («секреторный пептид»), который в качестве компонента большего полипептида, направляет больший полипептид по секреторному пути клетки, в которой он синтезируется. Больший полипептид, как правило, расщепляется для удаления секреторного пептида во время прохождения по секреторному пути.

«Изолированный полипептид» означает полипептид, который является существенно свободным от примесных клеточных компонентов, таких как углеводы, липиды или другие белковые примеси, ассоциированные с полипептидом в природе. Типично получение изолированного полипептида включает в себя полипептид в высокоочищенном виде, т.е. по меньшей мере около 80%-ной чистоты, по меньшей мере около 90% чистоты, по меньшей мере около 95% чистоты, больше чем 95% чистоты или больше чем 99% чистоты. Одним из способов показать, что конкретное получение белка содержит изолированный полипептид, является появление одиночной полосы после электрофореза белкового препарата в полиакриламидном геле в додецилсульфате натрия (SDS) и окрашивания геля Кумасси бриллиантовым синим (Coomassie Brilliant Blue). Однако, термин «изолированный» не исключает присутствия такого же полипептида в альтернативных физических формах, таких как димеры, или альтернативно гликозилированные или производные формы.

Термин «аминоконцевой», «карбоксиконцевой» используют здесь для обозначения положений внутри полипептидов. Где позволяет контекст, эти термины используют со ссылкой на конкретную последовательность или часть полипептида для обозначения пространственной близости или относительного положения. Например, определенная последовательность, расположенная на карбоксильном конце по отношению к исходной последовательности, внутри полипептида является близлежащей к карбоксильному концу эталонной последовательности, но не обязательно находится в карбоксильном конце полного полипептида.

Термин «экспрессия» относится к биосинтезу продукта гена. Например, в случае структурного гена, экспрессия включает в себя транскрипцию структурного гена в мРНК и трансляцию мРНК в один или несколько полипептидов.

Термин «вариант сплайсинга» используют здесь для обозначения альтернативных форм РНК, транскрибированных с гена. Варьирование сплайсинга происходит естественно вследствие использования альтернативных сайтов сплайсинга в транскрибированной молекуле РНК, или реже, между отдельно транскрибированными РНК молекулами и могут давать в результате несколько матричных РНК, транскрибированных из того же гена. Варианты сплайсинга могут кодировать полипептиды, имеющие измененную аминокислотную последовательность. Термин вариант сплайсинга также используют здесь для обозначения полипептида, кодируемого вариантом сплайсинга мРНК, транскрибированной с гена.

Как используют здесь, термин «иммуномодулятор» включает в себя цитокины, факторы роста стволовых клеток, лимфотоксины, костимуляторные молекулы, гематопоэтические факторы и синтетические аналоги этих молекул.

Термин «пара комплемент/антикомплемент» означает неидентичные фрагменты, которые образуют нековалентносвязанную, стабильную пару при соответствующих условиях. Например, авидин и биотин

(или стрептавидин) являются прототипичными представителями пары комплемент/антикомплемент. Другой пример пары комплемент/антикомплемент включает пары рецептор/лиганд, пары антитело/антиген (или гаптен, или эпитоп), смысловые/антисмысловые полинуклеотидные пары и тому подобное. В тех случаях, когда желательна последующая диссоциация пары комплемент/антикомплемент, пара комплемент/антикомплемент предпочтительно имеет аффинность связывания, меньшую чем 10^9 M^{-1}.

«Фрагмент антитела» представляет собой фрагмент антитела, например $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab', Fab и тому подобное. Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с тем же самым антигеном, который узнается интактным антителом.

Термин «фрагмент антитела» также включает искусственный или генноинженерный полипептид, который связывается со специфическим антигеном, например полипептидами, состоящими из легкой цепи вариабельного участка, "Fv"-фрагментами, состоящими из вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, рекомбинантными одноцепочечными полипептидными молекулами, в которых легкие и тяжелые вариабельные участки связаны пептидным линкером ("scFv-белками") и минимальными единицами узнавания, состоящими из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельный участок.

«Химерное антитело» означает рекомбинантный белок, который содержит в себе вариабельные домены и участки, определяющие комплементарность, полученные от антитела грызуна, тогда как остаток молекулы антитела получен от антитела человека.

«Гуманизированные антитела» представляют собой рекомбинантные белки, в которых мышиные участки, определяющие комплементарность моноклонального антитела, перенесли из тяжелой и легкой вариабельных цепей мышиного иммуноглобулина в вариабельный домен человека.

Как используют здесь, «терапевтический агент» означает собой молекулу или атом, который конъюгирован с фрагментом антитела для получения конъюгата, который является полезным для терапии. Примеры терапевтических агентов включают лекарственные препараты, токсины, иммуномодуляторы, хелатирующие агенты, соединения бора, фотоактивные агенты или красители и радиоизотопы.

«Детектируемая метка» представляет собой молекулу или атом, которые могут быть конъюгированы с участком антитела для получения молекулы, пригодной для обнаружения. Примеры детектируемых меток включают комплексоны, фотоактивные агенты, радиоизотопы, флуоресцентные агенты, парамагнитные ионы, или другие маркерные агенты.

Термин «аффинная метка» используют здесь для обозначения отрезка полипептида, который может быть прикреплен ко второму полипептиду для обеспечения очистки или обнаружения второго полипептида или предоставления сайтов прикрепления второго полипептида к субстрату. В принципе, любой пептид или белок, для которого антитело, или другой специфический связывающий агент является доступным, может быть использован в качестве аффинной метки. Аффинные метки включают полигистидиновый участок, протеинА (Nilsson et al., EMBO J. 4:1075 (1985); Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:2 (1991)), глутатион-S-трансферазу (Smith and Johnson, Gene 67:31 (1988)), Glu-Glu-аффинную метку (Grussemeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952 (1985)), P-вещество, FLAG-пептид (Hopp et al., Biotechnology 6:1204 (1998)), стрептавидин-связывающий пептид или другие антигенные эпитопы, или связывающие домены. Вообще, см. Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95 (1991). Молекулы ДНК, кодирующие аффинные метки, являются доступными от коммерческих поставщиков (например, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

«Оголенное антитело» означает целое антитело, в противоположность фрагменту антитела, которое не конъюгировано с терапевтическим агентом. Оголенные антитела включают как поликлональные, так и моноклональные антитела, а также определенные рекомбинантные антитела, например, химерные и гуманизированные антитела.

Как используют здесь «антительный компонент» включает в себя как целое антитело, так и антительный фрагмент.

«Иммуноконъюгат» означает конъюгат антительного компонента с терапевтическим агентом или детектируемой меткой.

«Полипептид-мишень» или «пептид-мишень» означает аминокислотную последовательность, которая содержит, по меньшей мере, один эпитоп, и которая экспрессируется в клетке-мишени, такой как опухолевая клетка, или клетка, которая переносит антиген инфекционного агента. Т-клетки узнают пептидные эпитопы, представленные молекулой главного комплекса гистосовместимости на полипептиде-мишени или пептиде-мишени и типично лизируют клетку-мишень или призывают другие иммунные клетки к местонахождению клетки-мишени, таким образом, убивая клетку-мишень.

«Антигенный пептид» означает пептид, который свяжет молекулу главного комплекса гистосовместимости с образованием MHC-пептидного комплекса, который узнается Т-клеткой, таким образом, индуцируя цитотоксический ответ лимфоцитов при представлении Т-клетке. Таким образом, антигенные пептиды способны связываться с соответствующей молекулой главного комплекса гистосовместимости и индуцировать цитотоксический ответ Т-клеток, например клеточный лизис, или выброс специфического цитокина, против клетки-мишени, которая связывает или экспрессирует антиген. Антигенный пептид может быть связан в контексте с молекулой главного комплекса гистосовместимости I класса или II класса на клетке, представляющей антиген, или на клетке-мишени.

У эукариот, РНК-полимераза II катализирует транскрипцию структурного гена для получения мРНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть сконструирована таким образом, чтобы содержать матрицу РНК-полимеразы II, в которой РНК-транскрипт имеет последовательность, которая комплементарна последовательности специфической мРНК. РНК-транскрипт называют «антисмысловой РНК» и молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует антисмысловую РНК, называют «антисмысловой ген». Молекулы антисмысловой РНК способны связываться с мРНК, приводя в результате к ингибированию трансляции мРНК.

Вследствие погрешностей стандартных аналитических методов, понятно, что молекулярные массы и длины полимеров являются приблизительными. Если такие значения выражают как «около» X, или «приблизительно» X, то указанная величина X, будет понятным, является с точностью до ±10%.

3. Получение молекул нуклеиновых кислот, кодирующих белки TACI-иммуноглобулин

Фиг. 1 предоставляет прогнозируемую аминокислотную последовательность TACI человека (von Bulow and Bram, Science 278:138 (1997)). Полипептид TACI содержит в себе следующие прогнозируемые элементы: (a) две богатых цистеином псевдо-повторяющихся структуры, характерные для лиганд-связывающих доменов фактора некроза опухоли, (b) 62-аминокислотную «стволовую область», которая находится между лиганд-связывающими доменами и трансмембранным доменом, (c) 20-тиаминокислотный трансмембранный домен и (d) 127-аминокислотный внутриклеточный домен. Аминокислотная последовательность не содержит прогнозированную гидрофобную аминоконцевую сигнальную последовательность.

Для того, чтобы создать растворимую форму TACI человека для использования в качестве ингибитора взаимодействия лиганд:нативный рецептор, создали слитый белок: внеклеточный домен TACI-Fc иммуноглобулин человека. Доступную последовательность TACI человека использовали в качестве начальной точки конструирования молекулы слитого белка (von Bulow and Bram, Science 278:138 (1997)). Эта исходная конструкция, обозначенная как «TACI-Fc4», включающая аминокислотные остатки с 1 по 154 полипептида TACI, и модифицированный участок Fc человека описана ниже. Точку слияния 154-го остатка выбрали для присоединения как можно большего стволового участка TACI, при этом, не включая любую возможную часть прогнозированного трансмембранного домена.

Поскольку нативный полипептид TACI не содержит аминоконцевую сигнальную последовательность, то аминоконцевую сигнальную последовательность присоединяли к TACI для создания секретируемой формы слитого белка TACI-Fc. Сигнальной последовательностью была модифицированная препоследовательность-пропоследовательность активатора плазминогена ткани человека. Модификации были включены для усиления расщепления сигнальной пептидазой и процессинга протеазоспецифичного фурина и, по этой причине, эта последовательность была названа как «оптимизированная лидирующая последовательность tPA (otPA)». Последовательность otPA (SEQ ID NO:25) представлена ниже; модифицированные аминокислотные остатки заштрихованы.

Последовательность, кодирующая рекомбинантный слитый белок TACI-иммуноглобулина, встроили в экспрессионный вектор, который искусственно вводили в клетки яичника китайского хомячка.

-35 -30

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys

сайт разрезания
сигнальной пептидазы

-20 | -10

Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu

фуриновый
сайт разрезания

|

Arg Arg Phe Arg Arg

Трансфецированные клетки яичника китайского хомячка производили белок TACI-Fc4 на низком уровне от около 0,3 пкг/клетку/день. Вестерн-блот анализ белка TACI-Fc с козьей антисывороткой против Fc IgG человека выявил две полосы, одна полоса была меньше, чем ожидаемый размер, приблизительно 48 кДа. Анализ аминокислотной последовательности очищенных белков выявил, что меньшая полоса отображала расщепление слитых белков по разным сайтам внутри корового участка TACI. Обращаясь к последовательности SEQ ID NO:2, мажорный конец обнаружили на аминокислотных остатках 118 и 123, хотя белки также расщеплялись по аминокислотным остаткам в положениях 110, 139 и 141.

В дополнение к гетерогенности, вызванной расщеплением в стволовой области, наблюдали также гетерогенность в аминоконце (N-конце) и карбоксильном конце (C-конце). Со ссылкой на SEQ ID NO:2, мажорный аминоконец обнаружили в положениях аминокислотных остатков 1, 10 и 13. Различия в карбоксильных концах отражают естественную гетерогенность рекомбинантных иммуноглобулинов и слитых иммуноглобулиновых белков, которые включают неполное удаление лизинового остатка, кодированного с карбоксиконца. Другую причину гетерогенности обнаружили в вариабельной природе углеводной структуры, прикрепленной к кодированному иммуноглобулиновому C_{H2}-домену фрагмента Fc.

Новые варианты TACI-Fc были синтезированы в ответ на наблюдаемую гетерогенность. Были созданы конструкции, которые включали по меньшей мере одно из следующих изменений во фрагменте TACI: (1) части стволовой области TACI удалили, (2) часть стволовой области TACI заменили частью стволовой области BCMA, (3) остаток аргинина в положении 119 изменили для элиминирования потенциального фуринового сайта расщепления, (4) остаток глутамина в положении 121 изменили для элиминирования (удаления) потенциального фуринового сайта расщепления, (5) остаток аргинина в положении 122 изменили для элиминирования потенциального фуринового сайта расщепления, (6) аминокислотный остаток в положениях 123 и 142 изменили на аминокислотные остатки, обнаруженные в соответствующих положениях TACI мышей, (7) сигнальную последовательность otPA человека заменили сигнальной последовательностью вариабельного участка тяжелой цепи человека, (8) остаток валина в положении 29 был изменен на метионин, и сигнальная последовательность otPA была присоединена в аминоконцевом положении к этому остатку и (9) сигнальная последовательность otPA была присоединена в аминоконцевом положении к остатку аланина в положении 30.

Модификации были также внесены в иммуноглобулиновую часть. Пять классов иммуноглобулинов идентифицировано у высших позвоночных: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Белки IgG, IgD и IgE являются характерно дисульфидно-связанными гетеротетрамерами, состоящими из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей. Типично IgM находится в виде пентамера тетрамера, несмотря на то, что IgA существует в виде димера тетрамера.

IgG составляют большой класс, который существует в норме как второй наиболее обильный белок, обнаруженный в плазме. У человека IgG состоит из четырех подклассов, обозначенных IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Как показано на фиг. 2, каждая тяжелая цепь иммуноглобулина имеет константную область, которая состоит из константных участков белковых доменов (C_{H1} шарнирного участка, C_{H2} и C_{H3}), которые являются неизменными для данного подкласса. Константные области тяжелой цепи класса IgG отождествляют греческой буквой γ. Например, иммуноглобулины подкласса IgG1 содержат константный участок тяжелой цепи γ1.

Фрагмент Fc, или Fc-домен, состоит из петлевых (глобулярных) участков, C_{H2} и C_{H3}-доменов тяжелой цепи, связанных дисульфидными мостиками. В иммуноглобулиновых слитых белках, Fc-домены подкласса IgG1 часто используют в качестве иммуноглобулиновой части, поскольку IgG1 имеет самый продолжительный период полураспада сыворотки, чем любой из сывороточных белков. Протяженный период полужизни сыворотки может быть желательной характеристикой белка при изучении животных и при потенциальном терапевтическом использовании для человека. Кроме того, подкласс IgG1 обладает очень сильной способностью выполнять эффекторные функции, опосредованные антителом. Первичная эффекторная функция, которая может быть наиболее полезной у иммуноглобулинового слитого белка, является способность IgG1-антител опосредовать связанную с антителом клеточную цитотоксичность. С другой стороны, это может быть нежелательной функцией слитого белка, который функционирует первично как антагонист. Идентифицировали несколько из специфичных аминокислотных остатков, которые являются важными для постоянной активности антител подкласса IgG1. Включение или исключение таких специфических аминокислот, следовательно, предусматривает включение или выключение специфической пространственно-опосредованной иммуноглобулиновой активности.

Было получено шесть вариантов модифицированных Fc IgG1 человека для создания слитых белков Fc. Fc-488 сконструировали для удобного клонирования слитого белка, содержащего Fc-участок γ1 человека, и он был сконструирован с использованием, в качестве затравки, константной области иммуноглобулина дикого типа γ1 человека. Беспокойство о потенциально вредных эффектах вследствие непарного цистеинового остатка привело к решению замены цистеина (аминокислотный остаток 24 последовательности SEQ ID NO:6), который обычно связан дисульфидными связями с константной областью легкой цепи иммуноглобулина, на сериновый остаток. Дополнительное изменение было внедрено в кодирующий кодон, в 218 индексной EU-позиции (аминокислотный остаток 22 последовательности SEQ ID NO:6) для внедрения сайта узнавания фермента рестрикции Bg/II для облегчения последующих манипуляций с ДНК. Эти изменения были внесены в продукт полимеразной цепной реакции (ПЦР), кодированный ПЦР-праймерами. Благодаря локализации сайта Bg/II и для того, чтобы достроить шарнирный участок Fc, кодоны 216 и 217 по индексной EU-позиции (аминокислотные остатки 20 и 21 последовательности SEQ ID NO:6) внедряли в партнерные последовательности слитого белка.

Fc4, Fc5 и Fc6 содержат в себе мутации для снижения эффекторных функций, опосредованных Fc, снижением связывания FcγRI и связывания комплемента C1q. Fc4 содержит те же самые аминокислотные замещения, что были введены в Fc-488. Дополнительные аминокислотные замещения вводили для снижения потенциальных эффекторных функций, опосредованных Fc. В частности, замещения трех аминокислот вводили для снижения связывания FcγRI. Эти замещения 234, 235 и 237 по индексной EU-позиции (аминокислотные остатки 38, 39 и 41 последовательности SEQ ID NO:6). Показали, что замещения в этих положениях снижает связывание с FcγRI (Duncan at al., Nature 332:563 (1988)). Такие аминокислотные замещения могут также снижать связывание FcγRIIa, также как и связывание FcγRIII (Sondermann et al, Nature 406:267 (2000); Wines et al., J. Immunol. 764:5313 (2000)).

Несколько групп описали важность положений 330 и 331 по индексной позиции Европейского сообщества (аминокислотные остатки 134 и 135 в SEQ ID NO:6) в связывании комплемента C1q и последующей фиксации комплемента (Canfield and Morrison, J.Exp.Med. 773:1483 (1991); Tao et al., J.Exp.Med. 778:661 (1993)). Аминокислотные замещения в этих положениях вводили в Fc4 для снижения связывания комплемента. C_{H3}-домен Fc4 является идентичным таковому, который нашли в соответствующем полипептиде дикого типа, за исключением стоп-кодона, который изменили с TGA на TAA для элиминирования потенциального сайта метилирования dam, если клонированную ДНК наращивают в dam-плюс штамме E.coli.

В Fc5 аргининовый остаток 218 по индексной позиции Европейского сообщества изменяли обратно на лизин, поскольку схему клонирования Bg/II не использовали при слиянии белков, содержащих этот конкретный Fc. Остаток последовательности Fc5 соответствует выше описанному для Fc4.

Fc6 является идентичным Fc5 за исключением того, что C-концевой лизиновый кодон элиминировали. C-концевой лизин зрелых иммуноглобулинов часто удаляют из зрелых иммуноглобулинов на посттрансляционной стадии перед секрецией из B-клеток, или удаляют во время циркуляции сыворотки. Следовательно, C-концевой лизиновый остаток типично не обнаруживают в циркулирующих антителах. Как в выше упомянутых Fc4 и Fc5, стоп-кодон в последовательности Fc6 заменили на TAA.

Fc7 является идентичным Fc γ1 дикого типа за исключением аминокислотного замещения в положении 297 по индексной позиции Европейского сообщества, локализованного в C_{H2}-домене. По индексной позиции Европейского сообщества Asn-297 (аминокислотный остаток 101, SEQ ID NO:6) является сайтом присоединения углевода, связанного с N-концом. Связанный с N-концом углевод вносит потенциальный источник вариабельности в рекомбинантно экспрессированный белок благодаря потенциальному ваьированию между группами в углеводной структуре. В попытке элиминирования этой потенциальной вириабельности изменяли Asn-297 на остаток глутамина для предотвращения присоединения N-концевого углевода по этому положению остатка. Углевод при 297 остатке также вовлечен в связывание Fc с FcγRIII (Sondermann et al., Nature 406:267 (2000)). Однако удаление углевода должно вообще снизить связывание рекомбинантного Fc7, содержащего слитые белки, с FcγRs. Так же, как и выше, стоп-кодон в последовательности Fc7 изменили на TAA.

Fc8 является идентичным участку γ1 иммуноглобулина дикого типа, показанного в SEQ ID NO:6, за исключением того, что цистеиновый остаток в положении 220 по индексной позиции Европейского сообщества (аминокислотный остаток 24 последовательности SEQ ID NO:6) заменили сериновым остатком. Это изменение элиминировало цистеиновый остаток, который обычно связан дисульфидными связями с константным участком легкой цепи иммуноглобулина.

Иллюстративные конструкции TACI-Fc описывают в табл. 1.

Таблица 1. Иллюстративные конструкции слитого белка TACI-Fc

Последовательность[a] TACI	Вариант Fc
TACI [b]	Fc4
TACI [b]	Fc5
TACI [b]	Fcγ1
TACI(d107-154)	Fc5
TACI(R119Q)	Fc4
TACI(1-104)-BCMA(42-54)[c]	Fc5
TACI(d143-150)	Fc5
TACI(R142G,d143-150)	Fc5
TACI(R119G,Q121P,R122Q,S123A)	Fc5
TACI(R119G,R122Q)	Fc5
TACI(d1-28,V29M)	Fc6
TACI(d1-29)	Fc6
TACI(d1-29)	Fc5
TACI(d1-29,d107-154)	Fc5
TACI(d1-29,d111-154)	Fc5
TACI(d1-29,d120-154)	Fc5

[a] Информацию о локализации, мутациях и делециях аминокислотных последовательностей представляют в круглых скобках относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2.

[b] Включает аминокислотные остатки с 1 по 154 SEQ ID NO:2.

[c] Эта конструкция включает аминокислотные остатки с 1 по 104 SEQ ID NO:2 (TACI) и аминокислотные остатки с 42 по 54 SEQ ID NO:27 (BCMA).

Белки TACI-Fc синтезировали рекомбинантными клетками яичника китайского хомячка, изолировали и анализировали с использованием Вестерн-блот анализа и анализа аминокислотной последовательности. Удивительно, что делеция первых 29-и аминокислот с N-конца полипептида TACI дала в результате десятикратное усиление синтеза слитых белков TACI-Fc клетками яичника китайского хомячка. Эта делеция также уменьшает расщепление полноразмерной стволовой области. Кроме того, расщепление внутри стволовой области подавлено или укорачиванием стволовой области TACI, или замещением стволовой области TACI частью другой аминокислотной последовательностью (например, аминокислотной последовательностью стволовой области BCMA).

Как описано в примере 4, функциональный анализ конструкций TACI-Fc показывает, что слитые белки TACI(d1-29)-Fc5, TACI(d1-29,d107-154)-Fc5, TACI(d1-29,d111-154)-Fc5 и TACI(d1-29,d120-154)-Fc5 имеют сходные аффиности связывания ZTNF4. Однако конструкции TACI(d1-29)-Fc5, TACI(d1-29,d111-154)-Fc5 и TACI(d1-29,d120-154)-Fc5, по-видимому, связывают больше ZTNF4 на моль TACI-Fc, чем конструкция TACI(d1-29,d107-154)-Fc5. В зависимости от использования по назначению (т.е. терапевтическое, диагностическое или научное), могут быть использованы слитые белки TACI-Fc или с высокой, или с низкой емкостью. Кроме того, комбинация слитых белков TACI-Fc с высокой емкостью и с низкой емкостью делает возможным титрование ZTNF2 или ZTNF4.

Настоящее изобретение рассматривает слитые белки TACI-иммуноглобулина, которые включают в себя фрагмент рецептора TACI, состоящий из аминокислотных остатков с 30 по 106 SEQ ID NO:2, с 30 по 110 SEQ ID NO:2, с 30 по 119 SEQ ID NO:2 или с 30 по 154 SEQ ID NO:2. Настоящее изобретение также включает в себя слитые белки TACI-иммуноглобулина, которые включают в себя фрагмент рецептора TACI, состоящий из аминокислотных остатков с 31 по 106 SEQ ID NO:2, с 31 по 110 SEQ ID NO:2, с 31 по 119 SEQ ID NO:2 или с 31 по 154 SEQ ID NO:2.

В более общем смысле, настоящее изобретение включает слитые белки TACI-иммуноглобулина, причем фрагмент рецептора TACI состоит из фрагмента аминокислотных остатков с 30 по 154 SEQ ID NO:2 и причем фрагмент рецептора TACI связывает, по меньшей мере, один из ZTNF2 или ZTNF4. Такие фрагменты содержат богатую цистеином псевдоповторяющуюся область и произвольно могут включать, по меньшей мере, один из N-концевых отрезков, которому свойственно положение аминоконца в богатой цистеином псевдоповторяющейся области, и стволовой отрезок, которому свойственно положение С-конца в богатой цистеином псевдоповторяющейся области. Подходящие богатые цистеином псевдоповторяющиеся области включают полипептиды, которые: (a) содержат по меньшей мере один из аминокислотных остатков с 34 по 66 SEQ ID NO:2 и аминокислотные остатки с 71 по 104 SEQ ID NO:2, (b) содержат как аминокислотные остатки с 34 по 66 SEQ ID NO:2, так и аминокислотные остатки с 71 по 104 SEQ ID NO:2 или (c) содержат аминокислотные остатки с 34 по 104 SEQ ID NO:2.

Подходящие N-концевые отрезки включают следующие с обращением к SEQ ID NO:2: аминокислотный остаток 33, аминокислотные остатки с 32 по 33, аминокислотные остатки с 31 по 33 и аминокислотные остатки с 30 по 33. Подходящие стволовые отрезки включают одну или несколько аминокислот аминокислотных остатков со 105 по 154 SEQ ID NO:2. Например, стволовой отрезок может состоять из следующих с обращением к SEQ ID NO:2: аминокислотного остатка 105, аминокислотных остатков со 105 по аминокислотных остатков со 106, аминокислотных остатков со 105 по 107, аминокислотных остатков со 105 по 108, аминокислотных остатков со 105 по 109, аминокислотных остатки со 105 по 110, аминокислотные остатки со 105 по 111, аминокислотных остатков со 105 по 112, аминокислотных остатков со 105 по 113, аминокислотных остатков со 105 по 114, аминокислотных остатков со 105 по 115, аминокислотных остатков со 105 по 116, аминокислотных остатков со 105 по 117, аминокислотных остатков со 105 по 118, аминокислотных остатков со 105 по 119, аминокислотных остатков со 105 по 120, аминокислотных остатков со 105 по 121, аминокислотных остатков со 105 по 122, аминокислотных остатков со 105 по 123, 105 по 124, аминокислотных остатков со 105 по 125, аминокислотных остатков со 105 по 126, аминокислотных остатков со 105 по 127, аминокислотных остатков со 105 по 128, аминокислотных остатков со 105 по 129, аминокислотных остатков со 105 по 130, аминокислотных остатков со 105 по 131, аминокислотных остатков со 105 по 132, аминокислотных остатков со 105 по 133, аминокислотных остатков со 105 по 134, аминокислотных остатков со 105 по 135, аминокислотных остатков со 105 по 136, аминокислотных остатков со 105 по 137, аминокислотных остатков со 105 по 138, аминокислотных остатков со 105 по 139, аминокислотных остатков со 105 по 140, аминокислотных остатков со 105 по 141, аминокислотных остатков со 105 по 142, аминокислотных остатков со 105 по 143, аминокислотных остатков со 105 по 144, аминокислотных остатков со 105 по 145, аминокислотных остатков со 105 по 146, аминокислотных остатков со 105 по 147, аминокислотных остатков со 105 по 148, аминокислотных остатков со 105 по 149, аминокислотных остатков со 105 по 150, аминокислотных остатков со 105 по 151, аминокислотных остатков со 105 по 152, аминокислотных остатков со 105 по 153, аминокислотных остатков со 105 по 154.

Дополнительные подходящие стволовые отрезки включают один или несколько аминокислот стволового отрезка BCMA (т.е., аминокислотные остатки с 42 по 54 SEQ ID NO:27). Например, стволовой отрезок может состоять из следующих аминокислотных остатков с обращением к SEQ ID NO:27: аминокислотного остатка 42, аминокислотных остатков с 42 по 43, аминокислотных остатков с 42 по 44, ами-

нокислотных остатков с 42 по 45, аминокислотных остатков с 42 по 46, аминокислотных остатков с 42 по 47, аминокислотных остатков с 42 по 48, аминокислотных остатков с 42 по 49, аминокислотных остатков с 42 по 50, аминокислотных остатков с 42 по 51, аминокислотных остатков с 42 по 52, аминокислотных остатков с 42 по 53, аминокислотных остатков с 42 по 54.

В более общем смысле, стволовая область может состоять из от двух до 50 аминокислотных остатков.

Иммуноглобулиновый фрагмент слитого белка, описанного здесь, содержит по меньшей мере одну константную область иммуноглобулина. Предпочтительно, иммуноглобулиновый фрагмент представляет отрезок иммуноглобулина человека. Последовательность иммуноглобулина человека может быть аминокислотной последовательностью дикого типа, или модифицированной аминокислотной последовательностью дикого типа, которая имеет по меньшей мере одну из аминокислотных мутаций, обсужденных выше.

Аминокислотная последовательность иммуноглобулина человека может также варьировать от дикого типа, имея одну или несколько мутаций, характерных для известной аллотипической детерминанты. Табл. 2 показывает аллотипические детерминанты константной области IgGγl человека (Putman, The Plasma Proteins, Vol.V, стр. 49-140 (Academic Press, Inc. 1987)). Индексная позиция Европейского сообщества (EU) 214, 356, 358 и 431 определяет известные аллотипы IgGγ1. Положение 214 находится в домене C_{H1} константной области IgGγ1 и, следовательно, не находится внутри последовательности Fc. Последовательность Fc дикого типа последовательности SEQ ID NO:6 включает в себя аллотипы Glm(1) и Glm(2-). Однако часть Fc белка TACI-Fc может быть модифицирована для отображения всякой комбинации таких аллотипов.

Таблица 2. Аллотипические детерминанты константной области иммуноглобулина γ1 человека

Аллотип	Аминокислотный остаток	Положение аминокислоты	
		EU индекс	SEQ ID NO:6
Glm(1)	Asp, Leu	356,358	160,162
Glm(1-)	Glu,Met	356,358	160,162
Glm(2)	Gly	431	235
Glm(2-)	Ala	431	235
Glm(3)	Arg	214	--
Glm(3-)	Lys	214	--

Примеры белков TACI-Fc раскрытых здесь, содержат константные участки IgG1 человека. Тем не менее, подходящие иммуноглобулиновые фрагменты также включают полипептиды, содержащие по меньшей мере одну константную область, такую как константная область тяжелой цепи любого из следующих иммуноглобулинов: IgG2, IgG3, IgG4, IgGA1, IgGA2, IgD, IgE и IgM. Преимущественно, иммуноглобулиновые фрагменты, полученные из IgG2 дикого типа или IgG4 дикого типа, обеспечивают сниженную эффекторную функцию по сравнению с IgG1 дикого типа или IgG3 дикого типа. Настоящее изобретение также рассматривает слитые белки, которые содержат фрагмент рецептора TACI, как описано выше, и или альбумин, или β2-макроглобулин.

Другим типом рецепторного слитого белка, который связывает ZTNF2 или ZTNF4, является слитый белок BCMA-иммуноглобулин. Исследования выполнили со слитым белком BCMA-Fc4, в котором фрагмент BCMA состоит из аминокислотных остатков с 1 по 48 последовательности SEQ ID NO:27. Удивительно, что фармакокинетические исследования на мышах показали, что слитый белок BCMA-Fc4 имел период полужизни около 101 ч, тогда как белок TACI-Fc имел период полужизни 25 ч. Таким образом, введение слитого белка BCMA-иммуноглобулин может быть предпочтительным в некоторых клинических состояниях. Кроме того, комбинирование слитых белков TACI-иммуноглобулина и BCMA-иммуноглобулин может быть полезным для лечения некоторых состояний. Такая комбинационная терапия может быть достигнута введением слитых белков TACI-иммуноглобулина и BCMA-иммуноглобулин, или введением гетеродимеров слитых белков TACI-иммуноглобулина и BCMA-иммуноглобулин.

Другим типом рецепторного слитого белка, который связывает ZTNF4, является слитый белок, содержащий внеклеточных домен рецептора, обозначенный как "Ztnfr12". Аминокислотная и нуклеотидная последовательности Ztnfr12 представляют в виде SEQ ID NO:59 и SEQ ID NO:60 соответственно. Пригодные части рецептора Ztnfr12 включают полипептиды, содержащие аминокислотные остатки с 1 по 69 SEQ ID NO:60, или аминокислотные остатки с 19 по 35 SEQ ID NO:60.

Слитые белки настоящего изобретения могут иметь форму одноцепочечных полипептидов, димеров, тримеров или мультимеров, состоящих из димеров или тримеров. Димеры могут быть гомодимерами или гетеродимерами и тримеры могут быть гомотримерами или гетеротримерами. Примеры гетеродимеров включают полипептид TACI-иммуноглобулин с полипептидом BCMA-иммуноглобулин, поли-

пептид TACI-иммуноглобулин с полипептидом Ztnfr12-иммуноглобулин и полипептид BCMA-иммуноглобулин с полипептидом Ztnfr12-иммуноглобулин. Примеры гетеротримеров включают полипептид TACI-иммуноглобулин с двумя полипептидами BCMA-иммуноглобулин, полипептид TACI-иммуноглобулин с двумя полипептидами Ztnfr12-иммуноглобулин, полипептид BCMA-иммуноглобулин с двумя полипептидами Ztnfr12-иммуноглобулин, два полипептида TACI-иммуноглобулин с полипептидом BCMA-иммуноглобулин, два полипетида TACI-иммуноглобулин с полипептидом Ztnfr12-иммуноглобулин, два полипептида BCMA-иммуноглобулин с полипептидом Ztnfr12-иммуноглобулин и тример полипептида TACI-иммуноглобулин, BCMA-иммуноглобулин и полипетид Ztnfr12-иммуноглобулин.

В таких слитых белках фрагмент рецептора TACI может содержать по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:2: аминокислотные остатки с 30 по 154, аминокислотные остатки с 34 по 66, аминокислотные остатки с 71 по 104, аминокислотные остатки с 47 по 62 и аминокислотные остатки с 86 по 100. Фрагмент рецептора BCMA может содержать по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:27: аминокислотные остатки с 1 по 48, аминокислотные остатки с 8 по 41 и аминокислотные остатки с 21 по 37.

Фрагмент рецептора Ztnfr12 может содержать по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:60: аминокислотные остатки с 1 по 69 и аминокислотные остатки с 19 по 35.

Слитые белки могут быть синтезированы с использованием методов ПЦР, использованных для конструирования иллюстративных молекул TACI-Fc, которые описаны в примерах. Однако специалисты в данной области могут использовать другие стандартные подходы. Например, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды TACI, BCMA, Ztnfr12 или иммуноглобулин, могут быть получены скринингом кДНК или геномной библиотек человека с использованием полинуклеотидных проб, основанных на последовательностях, раскрытых здесь. Эти способы являются стандартными и хорошо известными (см., например, Ausubel et al. (eds.),Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition, стр. 4-1 по 4-6 (John Wiley & Sons 1995) ("Ausubel (1995)"); Wu et al., Methods in Gene Biotechnology, стр. 33-41 (CRC Press, Inc. 1997)("Wu(1997)"); Ausubel (1995) стр. 5-1 по 5-6; Wu(1997) стр. 307-327)).

Альтернативно, молекулы для конструирования иммуноглобулиновых слитых белков могут быть получены путем синтезирования молекул нуклеиновых кислот с использованием взаимных длинных олигонуклеотидов в качестве затравки и нуклеотидных последовательностей, описанных здесь (см., например, Ausubel (1995) стр. 8-8 по 8-9). Принятые способы с использованием полимеразной цепной реакции предоставляют возможность синтеза молекул ДНК длиной, по меньшей мере, две тысячи нуклеотидов (Adang et al, Plant Molec. Biol. 27:1131 (1993), Bambot et al., PCR Methods and Applications 2:266(1993), Dillon et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes," in Methods in Molecular Biology, Vol. 15:PCR Protocols: Current Methods and Applications, White(ed.), стр. 263-268, (Humana Press, Inc. 1993), и Holowachuk et al., PCR Methods Appl. 4:299(1995)).

Молекулы нуклеиновой кислоты данного изобретения могут также быть синтезированы «генной машиной» с использованием протоколов, таких как фосфоамидит-метод. Если для применения необходима химически синтезированная двухцепочечная ДНК, например, для синтеза гена или фрагмента гена, то каждую комплементарную цепь делают отдельно. Получение коротких генов (от 60 до 80 пар оснований) является технически простым и может быть выполнено синтезом комплементарных цепей и затем их отжига. Однако для получения более длинных генов (>300 пар оснований) могут понадобиться специальные стратегии поскольку эффективность сопряжения каждого цикла во время синтеза ДНК редко составляет 100%. Для преодоления этой проблемы искусственные гены (двухцепочечные) собирают в модулярной форме из одноцепочечных фрагментов, которые являются длиной от 20 до 100 нуклеотидов. В качестве обзоров по синтезу полинуклеотидов см., например, Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press 1994), Itakura et al.,Annu.Rev.Biochem.53:323(1984), и Climie et al., Proc.Natl Acad. Sci. USA 87:633 (1990).

4. Получение TACI-иммуноглобулиновых полипептидов

Полипептиды данного изобретения могут быть получены в рекомбинантных клетках-хозяевах, следуя общепринятым способам. Для экспрессирования последовательности, кодирующей TACI-иммуноглобулин, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, должна быть исправно связана с регуляторными последовательностями, которые контролируют транскрипционную экпрессию в экспрессионном векторе и затем введена внутрь клетки-хозяина. В добавление к транскрипционным регуляторным последовательностям, таким как промоторы, энхансеры, экспрессионные векторы могут включать трансляционные регуляторные последовательности и маркерные гены, которые являются пригодными для селекции клеток, которые несут экспрессионный вектор.

Экспрессионные векторы, которые являются подходящими для получения чужеродного белка в эукариотических клетках, типично содержат (1) элементы прокариотической ДНК, кодирующей бактериальную точку начала репликации и маркер устойчивости к антибиотику для обеспечения роста и отбора экспрессионного вектора в бактерии-хозяине; (2) элементы эукариотической ДНК, которые контролиру-

ют инициацию транскрипции, например, промотор; и (3) ДНК-элементы, которые контролируют процессинг транскриптов, таких как транскрипционная последовательность терминации/полиаденилирования.

Экспрессионные векторы могут также включать нуклеотидные последовательности, кодирующие секреторную последовательность, которая направляет гетерологичный полипептид по секреторному пути клетки-хозяина. Например, экспрессионный вектор может содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует TACI-иммуноглобулин и секреторную последовательность, полученную от любого секреторного гена. Как обсуждают выше, одной подходящей сигнальной последовательностью является сигнальная последовательность tPA. Пример сигнальной последовательности tPA представляют последовательностью SEQ ID NO:25. Другой пригодной сигнальной последовательностью является V_H 26-10 сигнальная последовательность мыши. Мышиные антитела 26-10 описывает, например, Near et al, Mol.Immunol. 27:901 (1990). Иллюстративные аминокислотные и нуклеотидные последовательности мышиной 26-10 V_H сигнальной последовательности представляют последовательностями SEQ ID NO:61 и SEQ ID NO:65 соответственно. SEQ ID NO:62 раскрывает аминокислотную последовательность слитого белка TACI-Fc5, которая содержит мышиную 26-10 V_H сигнальную последовательность.

Белки TACI-иммуноглобулин данного изобретения могут быть экспрессированы в клетках млекопитающих. Примеры пригодных клеток-хозяев млекопитающих включают почечные клетки африканской зеленой обезьяны (Vera; ATCC CRL 1587), почечные клетки человеческого эмбриона (293-HEK; ATCC CRL 1573), клетки почек детенышей хомячка (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), почечные клетки собаки (MDCK; ATCC CCL 34), клетки яичника китайского хомячка (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44(Chasin et al., Som.Cell.Molec.Genet. 12:555, 1986)), клетки гипофиза крысы (GH1; ATCC CCL82), S3-клетки HeLa (ATCC CCL2.2), клетки гепатомы крысы (H-4-II-E; ATCC CRL 1548) почечные клетки обезьяны, трансформированные SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) мышиные эмбриональные клетки (NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

Для млекопитающего хозяина регуляторные сигналы транскрипции и трансляции могут быть получены из вирусных источников, таких как аденовирусы, вирусы папилломы быка, вируса обезьяны или подобных, в которых регуляторные сигналы ассоциированы с конкретным геном, который имеет высокий уровень экспрессии. Пригодные транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности также могут быть получены из генов млекопитающих, таких как гены актина, коллагена, миозина и металлотионеина.

Регуляторные последовательности транскрипции включают промоторный участок, достаточный для прямой инициации синтеза РНК. Подходящие эукариотические промоторы включают промотор гена металлотионеина I мыши (Hamer et al., J. Molec. Appl. Genet. 1:273 (1982)), TK-промотор вируса герпеса (McKnight, Cell 31:355 (1982)), ранний промотор SV40 (Benoist et al., Nature 290:304 (1981)), промотор вируса саркомы Rous (Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777 (1982)), промотор цитомегаловируса (Foecking et al., Gene 45:101 (1980)) и промотор вируса опухоли молочных желез мыши (см. вообще, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell culture", в Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al. (eds), стр. 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)). Одну полезную комбинацию промотора и энхансера обеспечили посредством миелопролиферативного промотора вируса саркомы и энхансера цитомегаловируса человека.

Альтернативно, прокариотический промотор, такой как РНК-полимеразный промотор бактериофага T3, может быть использован для контроля синтеза белков TACI-иммуноглобулин в клетках млекопитающих, если прокариотический промотор регулируется эукариотическим промотором (Zhou et al., Moll. Cell. Biol. 70:4529 (1990), и Kaufman et al., Nucl. Acids Res. 79:4485 (1991)).

Экспрессионный вектор может быть введен внутрь клеток хозяина с использованием множества стандартных способов, включающих трансфекцию с фосфатом кальция, трансфекцию с помощью липосом, доставку с помощью микропроекции, электропорацию и т.п. Трансфецированные клетки могут быть отобраны и размножены для получения рекомбинантных клеток хозяина, которые содержат экспрессирующий вектор, устойчиво интегрированный в геном клетки-хозяина. Способы внедрения векторов в эукариотические клетки и методы отбора таких устойчивых трансформантов с использованием селективных маркеров описаны, например, Ausubel (1995) and Murray (ed.), Gene Transfer and Expression Protocols (Humana Press 1991).

Например, одним подходящим селективным маркером является ген, который предоставляет устойчивость к антибиотику неомицину. В этом случае, отбор проводят в присутствии лекарственного препарата неомицинового типа, например, G-418, или ему подобным. Системы отбора могут также быть использованы для усиления уровня экспрессии интересующего гена, процесс, называемый «амплификацией». Амплификацию осуществляют культивированием трансфектантов в присутствии низкого количества селективного агента, и затем увеличения количества селективного агента для отбора клеток, которые производят высокие уровни продуктов внедренных генов. Подходящим амплифицируемым селективным маркером является дигидрофолатредуктаза, которая придает устойчивость к метотрексату. Также могут быть использованы другие гены устойчивости к лекарственным препаратам (например, устойчивости к гигромицину, устойчивости ко многим лекарственным препаратам, к пуромицин-ацетилтрансферазе). Альтернативно маркеры, которые вводят в измененный фенотип, такие как зеленый флуоресцентный

белок или поверхностные клеточные белки, такие как CD4, CD8, Class I MHC, плацентарная щелочная фосфатаза, могут быть использованы для отделения трансфецированных клеток от нетрансфецированных клеток путем так называемой FACS-сортировки, или технологии разделения на намагниченных шариках.

Полипептиды TACI-иммуноглобулин могут также быть произведены культивированными клетками млекопитающих с использованием вирусной системы доставки. Примеры вирусов для этой цели включают аденовирусы, вирусы герпеса, вакцинные вирусы и адено-ассоциированные вирусы (AAV). Аденовирус, вирус с двухцепочечной ДНК, является наиболее изученным вектором переноса генов для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты (см. обзор Becker et al., Meth. Cell Biol. 43:161 (1994), и Douglas and Curiel, Science & Medicine 4:44 (1997)). Преимущества аденовирусной системы включают размещение относительно крупных вставок ДНК, способность расти до высоких титров, способность инфецирования широкого ряда типов клеток млекопитающих и гибкость, которая позволяет использование с большим числом доступных векторов, содержащих различные промоторы.

Путем делеций частей аденовирусного генома могут быть помещены крупные вставки гетерологичной ДНК (вплоть до 7 т.п.). Такие вставки могут быть внедрены в вирусную ДНК прямым лигированием, или гомологичной рекомбинацией с котрансфецированными плазмидами. Альтернативой является удаление существенного гена E1 из вирусного вектора, что в результате дает неспособность к репликации, если ген E1 не предоставлен клеткой-хозяином. 293 клетки человека, инфицированные аденовирусным вектором, (ATCC, NN. CRL-1573, 45504, 45505), например, могут быть выращены в виде адгерентных клеток, или в суспензионной культуре при относительно высокой плотности клеток для получения существенного количества белка (см. Garnier et al., Cytotechnol. 75:145(1994)).

Специалисты в данной области могут изобрести пригодные экспрессионные векторы для получения слитых белков, описанных здесь, с клетками млекопитающих. Пример 4 описывает особенности одного из экспрессионных векторов. Другой пример экспрессионного вектора может содержать бицистронную экспрессионную кассету, которая включает часть энхансера цитомегаловируса человека, миелопролиферативный промотор вируса саркомы, нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, полиовирусные внутренние рибосомальные сайты входа, нуклеотидную последовательность, кодирующую дигидрофолатредуктазу мыши, за которой следует дополнительная поли-A поледовательность SV40. Нуклеотидная последовательность SEQ ID NO:69 показывает конструкцию энхансер цитомегаловируса/миелопролиферативный LTR-промотор (содержащий длинные концевые повторы) вируса саркомы, в которой энхансер цитомегаловируса простирается от 1-го нуклеотида до 407. Миелопролиферативный LTR-промотор вируса саркомы в отсутствие участка негативного контроля простирается от 408 нуклеотида до 884 нуклеотида SEQ ID NO:69. Нуклеотидную последовательность миелопролиферативного LTR-промотора вируса саркомы без участка негативного контроля представляют в SEQ ID NO:70.

Пример 1 описывает экспрессионный вектор, который содержит промотор цитомегаловируса для прямой экспресси трансгена рекомбинантного белка, иммуноглобулиновый интрон и сигнальную последовательность тканевого активатора плазминогена. Одним подходящим иммуноглобулиновым интроном является интрон V_H 26-10. SEQ ID NO:66 представляет иллюстративную нуклеотидную последовательность интрона V_H 26-10 мыши. Экспрессионный вектор может также включать 5'-нетранслируемую область (UTR), локализованную выше нуклеотидной последовательности, которая кодирует белок TACI-иммуноглобулин. Подходящая 5'-UTR может быть произведена из гена V_H 26-10 мыши. SEQ ID NO:63 раскрывает нуклеотидную последовательность полезной нативной 5'-UTR V_H 26-10 мыши, в то время как SEQ ID NO:64 показывает нуклеотидную последовательность 5'-UTR V_H 26-10 мыши, которую оптимизировали на 3'-конце.

В качестве иллюстрации, последовательность SEQ ID NO:67 предоставляет нуклеотидную последовательность, которая включает следующие элементы: нативную 5'-UTR V_H 26-10 мыши (нуклеотиды с 1 по 51), сигнальную последовательность V_H 26-10 мыши (нуклеотиды с 52 по 97 и со 182 по 192), интрон V_H 26-10 мыши (нуклеотиды с 98 по 181), нуклеотидную последовательность, которая кодирует часть TACI (нуклеотиды со 193 по 435) и нуклеотидную последовательность, которая кодирует часть Fc5 (нуклеотиды с 436 по 1131). Нуклеотидная последовательность SEQ ID NO:68 отличается от SEQ ID NO:67 вследствие замещения 5'-UTR V_H 26-10 (нуклеотиды с 1 по 51) нативной последовательности мыши оптимизированной последовательностью.

Белки TACI-иммуноглобулин могут также быть экспрессированы в других эукариотических клетках высших, таких как клетки птиц, грибов, насекомых, грибов или растений. Бакуловирусная система предоставляет эффективные способы внедрения клонированных генов внутрь клеток насекомых. Подходящие экспрессионные векторы основаны на вирусе ядерного полиэдроза Autographa californica (AcMNPV) и содержат хорошо известные промоторы, такие как промотор белка теплового шока 70 (hsp) Drosophila, предранний генный промотор (ie-1) вируса ядерного полиэдроза Autographa californica и задержанно ранний промотор 39K, бакуловирусный промотор p10 и металлотионеиновый промотор Drosophila. Второй способ создания рекомбинантных бакуловирусов использует систему, основанную на транспозонах, описанную Luckow (Luckow, et al., J. Virol. 67:4566 (1993)). Эта система, которая использует вектор для переноса, продается в наборе BAC-to-BAC (Life Technologies, Rockville, MD). Эта систе-

ма использует сектор для переноса PFASTBAC (Life Technologies), содержащий транспозон Tn7 для перемещения ДНК, кодирующей полипептид TACI-иммуноглобулин, в бакуловирусный геном, поддерживающийся в E.coli в виде большой плазмиды, называемой "bacmid". См. Hill-Perkins and Possee, J. Gen. Virol. 71:971 (1990), Bonning., et al., J. Gen. Virol. 75:1551 (1994), и Chazenbalk and Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543 (1995). Кроме того, векторы для переноса могут включать слияние внутри рамки с ДНК, кодирующей эпитопную метку на С-конце, или на N-конце экспрессированного полипептида TACI-иммуноглобулин, например, эпитопная метка Glu-Glu (Grussenmeyer et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 82:7952 (1985)). Используя способ, известный в данной области, вектор для переноса, содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок TACI-иммуноглобулин, переносят внутрь E.coli и отбирают бактериальные плазмиды, которые содержат прерывающийся IacZ-ген, указывающий на рекомбинантные бакуловирусы. ДНК бактериальных плазмид, содержащую рекомбинантный бакуловирусный геном, затем выделяют, используя общепринятые способы.

Иллюстративный вектор PFASTBAC может быть модифицирован до существенной степени. Например, полиэдриновый промотор может быть удален и замещен бакуловирусным основным белковым промотором (также известным как промотор Pcor, p6.9 или MP-промотор), который является раннеэкспрессируемым при бакуловирусной инфекции, и было показано, что он должен быть полезным для экспрессии секретируемых белков (см., например, Hill-Perkins and Possee, J. Gen. Virol. 77:971 (1990), Bonning., et al., J. Gen. Virol. 75:1551 (1994), и Chazenbalk and Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543 (1995)). В таких конструкциях векторов для переноса может быть использован короткий или длинный вариант основного белкового промотора. Кроме того, векторы для переноса могут быть сконструированы с секреторными сигнальными последовательностями, полученными из белков насекомых. Например, в таких конструкциях может быть использована секреторная сигнальная последовательность экдистероидных глюкозилтрансфераз (EGT), или меллитина медоносных пчел (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) или бакуловирусного gp67 (PharMingen: San Diego, Ca).

Рекомбинантные вирусы или бактериальные плазмиды используют для трансфекции клеток-хозяина. Подходящие клетки-хозяина насекомых включают клеточные линии, полученные из IPLB-Sf-21, клеточной линии яичников куколки Spodoptera frugiperda, таких как Sf9 (ATCC CRL 1711), Sf21AE и Sf21 (Invitrogen Corporation; San Diego, Ca), также как и клеток Schneider-2 Drosophyila и клеточной линии HIGH FIVEO (Invitrogen), полученной из Trichoplusia ni (патент США N 5300435). Коммерчески доступная среда, не содержащая сыворотку, может быть использована для наращивания и для поддержания клеток. Подходящими средами являются Sf900 II™ (Life Technologies), или ESF 921™ (Expression Systems) для клеток Sf9; и Ex-cellO405™ (JRH Biosciences, Lenexa, KS) или Express FiveO™ (Life Technologies) для клеток T.ni. При использовании рекомбинантного вируса клетки типично выращивают от плотности инокулята приблизительно 2-5 x 10^5 клеток до плотности 1-2 x 10^6 клеток, во время которой добавляют рекомбинантный вирусный маточный раствор при множественности заражения (MOI) от 0,1 до 10, более типично около 3.

Установленные способы производства рекомбинантных белков в бакуловирусных системах представлены Bailey et al., "Manipulation of Baculovirus Vectors," в Methods in Molecular Biology, Volume7: Gene Transfer and Expression Protocols, Murray (ed), стр. 147-168 (The Humana Press, Inc. 1991), Patel et al., "The baculovirus expression system," в DNA Cloning 2:Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al.(eds.), стр.205-244 (Oxford University Press 1995), Ausubel (1995) на стр. с 16-37 по 16-57, Richardson (ed.), Baculovirus Expression Protocols (The Humana Press, Inc. 1995), и Lucknow," Insect Cell Expression Technology," в Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al.(eds.), стр. 183-218 (John Wiley & Sons,lnc.1996).

Клетки грибов, в том числе дрожжевые клетки, также могут быть использованы для экспрессии генов, описанных здесь. Особенно интересные в этом отношении представители дрожжей включают Saccaromyces cerevisiae, Pichia pastoris и Pichia methanolica. Подходящие промоторы для экспрессии в дрожжах включают промоторы от GAL1 (галактозы), PGK (фосфоглицеринкиназы), ADH (алкогольдегидрогеназы), AOX1 (алкогольоксидазы), HIS4 (гистидиндигидрогеназы) и прочие. Созданы многие дрожжевые клонирующие векторы и являются легко доступными. Вектор может быть сконструирован для создания конструкций, использующих необходимые элементы для осуществления гомологичной рекомбинации в дрожжах (см. например, Raymond et al., BioTechniques 26:134 (1999)). Например, такой экспрессионный вектор может включать последовательности URA3 и CEN-ARS (автономно реплицирующуюся последовательность), требуемые для отбора и репликации в S. cerevisiae. Другие пригодные векторы включают векторы на основе YIp, такие как YIp5, векторы YRp, такие как YRp17, векторы YEp, такие как YEp13 и векторы YCp, такие как YCp19. Способы трансформирования клеток S.cerevisiae экзогенной ДНК и получения рекомбинантных полипептидов из этих клеток раскрыты, например, Kawasaki, патент США N 4599311, Kawasaki et al., патент США N 4931373, Brake, патент США N 4870008, Welch et al., патент США N 5037743 и Murray et al., патент США N 4845075. Трансформированные клетки отбирают по фенотипу, определяемому селективным маркером, обычно устойчивостью к препарату, или способностью расти в отсутствие специфического питательного вещества (например, лейцина). Пригодной векторной системой для использования в Saccaromyces cerevisiae является векторная система POT1, раскры-

тая Kawasaki et al.(патент США N 4931373), которая позволяет трансформированным клеткам быть отобранными путем роста в глюкозосодержащей среде. Дополнительные подходящие промоторы и терминаторы для использования в дрожжах включают таковые из генов гликолитических ферментов (см. например, Kawasaki, патент США N 4599311, Kingsmann et al., патент США N 4615974 и Bitter патент США N 4977092) и генов алкогольдегидрогеназы. См. также патенты США NN 4990446, 5063154, 5139936 и 4661454.

В данной области известны системы трансформации на основе других дрожжей, включая Hansenula polymorpha, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces fragilis, Ustilago maydis, Pichia pastoris, Pichia methanolica, Pichia guillermondii и Candida maltosa. См. например, Glesson et al., J. Gen. Microbiol. 132:3459 (1986) и Cregg, патент США N 4882279. Клетки Aspergillus могут быть использованы в соответствии со способом McKnight et al., патент США N 4935349. Способы трансформирования Acremonium chrysogenum раскрыты Sumino et al., патент США N 5162228. Способы трансформирования Neurospora раскрыты Lambowitz, патент США N 4486533.

Например, применение Pichia methanolica в качестве хозяина для получения рекомбинантных белков раскрыто Raymond в патенте США N 5716808, Raymond, патент США N 5736383, Raymond et al., Yeast 74:11-23 (1998) и в международной публикации NN WO 97/17450, WO 97/17410, WO 98/02536, и WO 98/02565. Молекулы ДНК для использования в трансформированных P. methanolica обычно будут подготовлены в виде двухцепочечных, кольцевых плазмид, которые предпочтительно линеаризируют перед трансформацией. Для наработки полипептидов в P. methanolica промотором и терминатором в плазмиде может быть промотор гена P. methanolica, например, ген утилизации спирта P. methanolica (AUG1 или AUG2). Другие пригодные промоторы включают в себя промоторы генов дигидроксиацетонсинтазы (DHAS), формиатдегидрогеназы (FMD) и каталазы (CAT). Для облегчения интегрирования ДНК внутрь хромосомы хозяина предпочтительно иметь цельный экспрессионный отрезок плазмиды, фланкированный с обоих концов последовательностями хозяйской ДНК. Пригодным селективным маркером для использования в Pichia methanolica является ген ADE2 P. methanolica, который кодирует фосфорибозил-5-аминоимидазолкарбоксилазу (AIRC; EC 4.1.1.21), и который позволяет клеткам хозяина ade2 расти в отсутствие аденина. Для крупномасштабных производственных процессов, где желательно минимизирование использования метанола, могут быть использованы клетки хозяина, в которых удалены оба гена, утилизирующих метанол (AUG1 и AUG2). Для наработки секретируемых белков в клетках хозяина могут отсутствовать гены вакуолярных протеаз (PEP4 и PRB1). Используют элктропорацию для способствования внедрения плазмиды, содержащей ДНК, кодирующей полипептид интереса, внутрь клеток P. methanolica. Клетки P. methanolica могут быть трансформированы электропорацией с использованием экспоненциально затухающего, пульсирующего электрического поля, имеющего мощность от 2,5 до 4,5 кВ/см и фиксированное время (t) от 1 до 40 мс, более предпочтительно около 20 мс.

Экспрессионные векторы могут также быть внедрены внутрь протопластов растений, интактных растительных тканей или внутрь изолированных растительных клеток. Способы внедрения экспрессионных векторов внутрь растительной ткани включают прямое инфицирование или совместное культивирование растительной ткани с Agrobacterium tumefaciens, микропроэкционную доставку, инъекцию ДНК, электропорацию и прочие. См., например, Horsch et al., Science 227:1229 (1985), Klein et al., Biotechnology 70:268 (1992) и Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" в Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick et al., (eds.), стр. 67-88 (CRC Press, 1993).

Альтернативно, белки TACI-иммуноглобулин могут быть произведены в прокариотических клетках хозяина. Подходящими промоторами, которые могут быть использованы для получения полипептидов TACI-иммуноглобулин в прокариотическом хозяине, являются промоторы, хорошо известные в данной области и включают промоторы, допускающие узнавание полимеразами T4, T3 Sp6 и T7, промоторы бактериофага ламбда P_R и P_L, промоторы E.coli trp, recA, теплового шока, lacUV5, tac, Ipp-IacSpr, phoA и IacZ, промоторы B.subtilis, промоторы бактериофагов Bacillus, промоторы Streptomyces, промотор int бактериофага ламбда, промотор bla pBR322 и промотор CAT гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы. Прокариотические промоторы рассмотрены Glick, J. Ind. Microbiol. 1:277 (1987), Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 4th Ed. (Benjamin Cummins 1987) и Ausubel et al., (1995).

Пригодные прокариотические организмы-хозяева включают E.coli и Bacillus subtilus. Пригодные штаммы E.coli включают BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF, DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451 и ER1647 (см. например, Brown (ed.) Molecular Biology Labfax (Academic Press 1991)). Пригодные штаммы Bacillus subtilus включают BR151, YB886, MI119, MI120 и B170 (см., например, Hardy, "Bacillus Cloning Methods", in DNA Cloning: A Practical Approach, Glover (ed.) (IRL Press 1985)).

При экспрессии белка TACI-иммуноглобулин в бактерии, например, в E.coli, полипептид может быть аккумулирован в цитоплазме, типично в виде нерастворимых гранул, или может быть направлен в периплазматическое пространство бактериальной секретирующей последовательностью. В ранее рассмотренном случае клетки лизируют, а гранулы выделяют и денатурируют с помощью, например, гуанидинизотиоцианата или мочевины. Денатурированный полипептид может затем быть повторно свернут и

димеризован растворением в денатурирующем агенте, например, диализом против раствора мочевины и сочетанием восстанавленного и окисленного глутатиона, с последущим диализом против буферно-солевого раствора. В последнем случае, полипептид может быть выделен из периплазматического пространства в растворимой и функциональной форме путем разрушения клеток (например, ультразвуком или осмотическим шоком) для высвобождения содержимого периплазматического пространства и выделения белка, таким образом, избегая необходимость денатурирования и повторного сворачивания.

Способы экспрессии белков в прокариотических «организмах» хозяина являются хорошо известными специалистам в данной области (см., например, Williams et al., "Expression of foreign proteins in E.coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies" , в DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al., (eds), стр. 15 (Oxford University Press 1995), Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies" в Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, стр. 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995), and Georgiou, "Expression of Proteins in Bacteria" в Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al., (eds.), стр. 101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Стандартные способы внедрения экспрессионных векторов в клетки бактерий, дрожжей, насекомых и растений представлены, например, Ausubel (1995).

Общие способы экспрессии и получения чужеродного белка, произведенного клеточной системой млекопитающих, представлены, например, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture" в Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al., (eds.), стр. 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996). Стандартные способы выделения белка, произведенного бактериальной системой, предоставлены, например, Grisshammer et al., "Purification of over-produced proteins from E.coli cells," in DNA Cloning2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al., (eds.) стр. 59-92 (Oxford University Press 1995). Принятые способы выделения рекомбинантных белков из бакуловирусной системы описаны Richardson (ed.) Baculovirus Expression Protocols (The Humana Press, Inc. 1995).

В качестве альтернативы, полипептиды настоящего изобретения могут быть синтезированы первоклассным твердофазным синтезом, частичными твердофазными методами, конденсацией фрагментов или традиционным жидкофазным синтезом. Эти методы синтеза хорошо известны в данной области (см. например, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963), Stewart et al., "Solid Phase Peptide Synthesis", (2nd Edition), Pierce Chemical Co. 1984), Bayer and Rapp, Chem. Pept. Prot. 3:3 (1986), Atherton et al., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press 1989), Fields and Colowick, "Solid-Phase Peptide Synthesis", Methods in Enzymology Volume 289 (Academic Press 1997), и Lloyd-Williams et al., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (CRC Press, Inc. 1977)). Изменения в стратегиях общего химического синтеза, например, «нативное химическое лигирование» и «лигирование экспрессированных белков», также являются стандартными (см. например, Dawson et al., Science 266:776 (1994), Hackeng et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94:7845 (1997), Dawson, Methods Enzymol. 287:34 (1997), Muir et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 95:6705 (1998) и Severinov and Muir, J. Biol. Chem. 273:16205 (1998)).

5. Анализ слитых белков TACI-иммуноглобулинов

Функция слитых белков TACI-иммуноглобулинов может быть оценена с использованием разнообразных подходов для оценки способности слитых белков связывать ZTNF4 или ZTNF2. В качестве иллюстрации пример 4 предоставляет способы измерения аффинности связывания и емкости связывания для ZTNF4.

Альтернативно, слитые белки TACI-иммуноглобулина могут быть охарактеризованы по способности ингибировать стимуляцию В-клеток человека растворимым ZTNF4, как описано Gross et al., International Publication No. WO00/40716. Кратко, В-клетки человека выделяют из периферических мононуклеарных клеток крови с использованием намагниченных шариков CD19 и магнитной системы для разделения VarioMacs (Miltenyi Biotec Auburn, CA) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Очищенные В-клетки смешивают с растворимым ZTNF4 (25 нг/мл) и рекомбинантным IL-4 человека (10 нг/мл, Pharmingen) и клетки вносят в лунки 96-луночныых круглодонных планшетов при $1x10^5$ клеток на лунку.

Растворимые белки TACI-иммуноглобулин могут быть растворены от около 5 мкг/мл до около 6 нг/мл и инкубированы с В-клетками в течение пяти дней, с подачей импульсов 1 мкКи меченого H^3-тимидина на лунку в течение ночи в четвертый день. В качестве контроля белок TACI-иммуноглобулин может также быть инкубирован с В-клетками и IL-4 без ZTNF4. Для наращивания планшеты помещали в прибор для наращивания Packard и просчитывали с использованием счетчика Packard.

Для оценки трех слитых белков TACI-Fc использовали общий подход. Хотя все слитые белки ингибировали пролиферацию В-клеток, конструкции TACI(d1-29,d111-154)-Fc5 и TACI(d1-29,d120-154)-Fc5 были более эффективными, чем TACI(d1-29,d107-154)-Fc5.

Твердо установившиеся экспериментальные модели на животных возможны для тестирования эффективности белков TACI-иммуноглобулин in vivo при определенных болезненных состояниях. Например, белки TACI-иммуноглобулин могут быть проанализированы в ряде экспериментальных моделей аутоиммунных заболеваний на животных, такими как родственные линии мышей MRL-Ipr/Ipr или F1 близкородственных линий мышей NZBxNZW, которые служат в качестве модели SLE (системной крас-

ной волчанки). Такие экспериментальные модели на животных известны в данной области (см, например, Cohen and Miller (eds.), Autoimmune Disease Models: A Guidebook (Academic Press, Inc. 1994).

Потомство от скрещивания между мышами новозелландской черной New Zealand Black (NZB) и новозелландской белой New Zealand White (NZW) обнаруживает спонтанную форму SLE, которая имеет близкое сходство с SLE человека. Потомство мышей, известное как NZBW, в возрасте одного месяца начинает нарабатывать антитела IgM против Т-клеток и в возрасте от пяти до семи месяцев аутоантитела против ДНК являются доминирующим иммуноглобулином. Вклад этих аутоантител, особенно тех, которые направлены против одноцепочечной ДНК, связан с развитием гломерулонефрита, который клинически проявляется как протеинурия, азотемия и смерть от почечной недостаточности.

Почечная недостаточность является главной причиной смертности у мышей, пораженных спонтанной SLE, а у линии NZBW этот процесс является хроническим и уничтожительным. Заболевание является более быстрым и тяжелым у женских особей, чем у мужских, со средней жизнеспособностью в течение только 245 дней по сравнению с 406 днями для мужских особей. Несмотря на то, что многие из мышей женских особей в пяти-семи месячном возрасте будут с клинически выраженной протоурением, некоторые особи могут быть гораздо моложе, или старше при проявлении у них симптомов. Смертельный иммунный нефрит, наблюдемый у мышей NZBW, является очень похожим на наблюдаемый гломерулонефрит SLE у человека, что делает эту спонтанную экспериментальную модель на мышах очень привлекательной для исследования лечений потенциальной SLE (Putterman and Naparstek, "Murine Models of Spontaneous Systemic Lupus Erythematosus", in Autoimmune Disease Models: A Guidebook, стр. 217-234 (Academic Press, Inc., 1994); Mohan et al., J. Immunol. 154:1470 (1995); и Daikh et al., J. Immunol. 759:3104 (1997)).

Как описано Gross et al., международная публикация No WO00/40716, белки TACI-иммуноглобулин могут быть введены мышам NZBW для выявления их подавляющего эффекта на В-клетки в течение пятинедельного периода в среднем, как полагают, что наработка антител к В-клеткам у мышей NZBW достигает высокого уровня. Кратко, 100 женских особей мышей 8-недельного возраста F_1 (NZB x NZW) могут быть разделены на шесть групп по 15 особей в каждой. Перед введением, мышей поверяют один раз в месяц на белок в моче и отбирают кровь для CBC и заготовки сыворотки. Сыворотка может быть проанализирована на наличие аутоантител. Поскольку протеинурия является выраженным признаком гломерулонефрита, то уровень белка в моче измеряют показателем уровня с регулярными интервалами в течение периода исследования. Введение можно начинать, когда мыши будут приблизительно в пятимесячном возрасте. Мыши получают внутрибрюшинные инъекции только носителя (фосфатно-солевого буферного раствора), или TACI-иммуноглобулина человека (контрольный белок), или TACI-иммуноглобулина (например, от 20 до 100 мкг испытуемого белка на дозу) три раза в неделю в течение пяти недель.

В течение лечения кровь собирают дважды и соберут, по меньшей мере, дважды после лечения. Значения показателей уровней в моче для протеинурии и значения масс тела определяют каждые две недели после начала лечения. Значения показаний для крови, мочи и массы тела собирали во время эвтаназии. Селезенку и тимус отделяли для анализа сортировки клеток, обработанных флуроесцентным агентом, и для гистологии. Субмандибулярные слюнные железы, цепь брыжеечных лимфатических узлов, печеночную долю с желчным пузырем, слепую кишку и толстую кишку, желудок, тонкий кишечник, поджелудочную железу, правую почку, надпочечник, язык с трахеей и пищеводом, сердце и легкие также собирали для гистологии.

Модели на мышах использовали для экспериментов по аллергическому энцефаломиелиту в качестве инструмента для исследования как механизмов заболеваний, связанных с иммунитетом, так и способов потенциального терапевтического вмешательства. Модель имеет сходство с рассеянным склерозом человека и приводит к демиелинизации как результату активации Т-клеток на нейробелки, такие как основной белок миелина или протеолипидный белок. Инокуляция антигеном приводит к индуцированию CD4+, Т-клеток II класса (Th1), заключенных в MHC. Изменения в процедуре экспериментального аллергического энцефаломиелита могут породить острые, хронически-рецидивные или пассивно-перенесенные варианты модели (Weinberg et al., J. Immunol. 762:1818(1999); Mijaba et al., Cell. Immunol. 186:94 (1999); и Glabinski, Meth. Enzym. 288:182 (1997)).

Gross et al., международная публикация No. WO 00/40716, описывает один подход к оценке эффективности белков TACI-иммуноглобулин в улучшении симптомов, связанных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом. Кратко, 25 женских особей мышей F1 PLxSJL (12-ти недельного возраста) подвергали подкожному инъецированию антигеном 125 мкг/мышь (антигеном является миелиновый протеолипидный белок, PLP, остатки 139-151), приготовленным в полном адъюванте Фрейнда. Мышей делят на пять групп по пять мышей в каждой. Внутрибрюшинные инъекции токсина коклюша (400 нг) производили в 0 день и во второй. Группам давали 1, 10 или 100-кратную дозу белка TACI-иммуноглобулин, одна группа получает только растворитель и одна группа не получает лечение. Профилактическая терапия начинается в 0 день, лечебное вмешательство начинается на 7 день или при появлении клинических признаков. Признаки заболевания, потеря веса и паралич, обнаруживаются приблизительно на 10-14 день и сохраняются в течение приблизительно одной недели. Животных оценивают еже-

дневно, посредством сбора массы тела и определения клинической оценки соответствия распространения их симптомов. Клинические признаки экспериментального аллергического энцефаломиелита появляются в течение 10-14 дней инокуляции и сохраняются приблизительно в течение одной недели. В конце исследования всех подвергают эвтаназии путем избыточной дозировки газа и вскрывают. Мозг и позвоночник собирают для гистологии или замораживают для анализа мРНК. Результаты массы тела и клинической оценки вносят на каждую особь или на группу.

В экспериментальной модели на животных по изучению индуцированного коллагеном артрита, у мышей развивался хронический воспалительный артрит, который имеет близкое сходство с ревматоидным артритом человека. Поскольку индуцированный коллагеном артрит обнаруживает сходные с ревматоидным артритом иммунологические и патологические признаки, то это делает его идеальной моделью для скрининга потенциальных противовоспалительных компонентов у человека. Другим преимуществом использования модели по изучению индуцированного коллагеном артрита является то, что механизмы его патогенеза известны. Идентифицированы Т- и В-клеточные эпитопы на коллаген II типа и определены различные иммунологические (замедленная гиперчувствительность и антитела против коллагена) и противовоспалительные (цитокины, хемокины, ферменты, разрушающие матрикс) параметры, относящиеся к иммуно-опосредованным артритам, и могут быть использованы для оценки эффективности тестируемых компонентов в моделях (Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3:407 (1999); Williams et al., Immunol. 89:9784 (1992); Myers et al., Life Sci. 67:1861 (1997); и Wang et al., Immunol. 92:8955 (1995)).

Gross et al., международная публикация No. WO00/40716, описывает способ оценки эффективности белков TACI-иммуноглобулин в улучшении симптомов, ассоциированных с артритом, индуцированным коллагеном. Кратко, восьминедельных мужских особей мышей DBA/1J (Jackson Labs) делят на группы по пять мышей в группе и производят две подкожные инъекции коллагена от 50 до 100 мкл в концентрации 1 мг/мл (коллаген цыпленка или бычий) с интервалами в три недели. Одна контрольная (группа) не получает инъекции коллагена. Первый инъекционный раствор приготовлен в полном адъюванте Фрейнда, а второй инъекционный раствор приготовлен в неполном адъюванте Фрейнда. Белок TACI-иммуноглобулин вводят с профилактической целью во время или перед вторым инъецированием, или после того, как животное обнаружит два или больше клинических показателей, которые сохраняются по меньшей мере 24 ч. Животные начинают демонстрировать симптомы артрита после второй инъекции коллагена, обычно в течение от двух до трех недель. Например, TACI-Fc, контрольный белок, IgFc или фосфатно-буферный раствор (растворитель) могут быть введены с профилактической целью, начиная с семи дней до начала второго инъецирования (день -7). Белки могут быть введены в (количестве) 100 мкг, даваемые три раза в неделю в виде 200 микролитровой внутрибрюшинной инъекции и продолжающейся в течение четырех недель.

В экспериментальной модели на животных по изучению индуцированного коллагеном артрита степень заболевания оценивают в каждой лапке с использованием циркуля для определения толщины лапки и задания клинической оценки каждой лапке. Например, клиническая отметка «0» означает нормальная мышь, отметка «1» означает, что один или больше пальцев являются воспаленными, отметка «2» означает слабое воспаление лапок, оценка «3» означает среднее воспаление лапок и оценка «4» означает тяжелое воспаление лапок. Животных подвергают эвтаназии после того, как устанавливают заболевание в течение установленного периода времени, обычно семи дней. Лапки собирают для гистологического анализа, или для анализа мРНК, а сыворотку собирают для анализа иммуноглобулинов и цитокинов.

Миастения гравис является другим аутоиммунным заболеванием, для которого экспериментальные модели на мышах являются пригодными. Миастения гравис является нарушением нервно-мышечной проводимости, затрагивающем выработку аутоантител, направленных против никотинового ацетилхолинового рецептора. Это заболевание является приобретенным или наследственным с клиническими признаками, включающими огромную слабость и утомляемость при напряжении.

Установлена экспериментальная модель на мышах миастении гравис. (Christadoss et al., "Establishment of a Mouse Model of Myasthenia gravis Which Mimics Human Myasthenia gravid Pathogenesis for Immune Intervention", in Immunobiology of Proteins and Peptides VIII, Atassi and Bixler (Eds.), стр. 195-199 (1995)). Экспериментальная аутоиммунная миастениа гравис является заболеванием опосредованным антителами, охарактеризованным наличием антител к ацетилхолиновому рецептору. Эти антитела разрушают рецептор, приводя к повреждению нейромускульных электрических импульсов, выражающееся в мышечной слабости. В эксперимeтальной модели для миастении гравис мышей иммунизировали никотиновым ацетилхолиновым рецептором. Клинические признаки миастении гравис становятся очевидными через неделю после второй иммунизации. Экспериментальную миастениа гравис оценивают несколькими способами, включая измерение уровней сыворотки антител к рецептору ацетилхолина, радиоиммунологический анализ (Christadoss and Dauphinee, J. Immunol. 136:2437 (1986); Lindstrom et al., Methods Enzymol. 74:432 (1981)), измерение мышечного рецептора ацетилхолина, или электромиографию (Coligan et al., (Eds.), Protocols in Immunology. Vol.3, стр 15.8.1 (John Wiley & Sons, 1997)).

Эффект TACI-иммуноглобулин на экспериментальную миастениа гравис может быть установлен введением слитых белков во время проводящейся клинической миастениа гравис на мышах B6. Например, 100 особей мышей B6 иммунизируют 20-ю микрограммами (20 мкг) ацетилхолинового рецептора в

полном адъюванте Фрейнда в дни 0 и 30-й. Приблизительно от 40 до 60% мышей проявят от умеренной (степень 2) до тяжелой (3-я степень) клинической миастении гравис после повышения уровня рецептора ацетилхолина. Мышей с клиническим заболеванием 2-й и 3-й степени делят на 3 группы (с одинаковыми степенями заболевания) и взвешивают (мыши вместе со слабостью также теряют в весе, так они испытывают затруднение в потреблении пищи и воды) и отбирают кровь для сыворотки (для предварительной очистки антител против рецептора ацетилхолина и уроня изотипов). Группу А инъецируют I.P в фосфатно-солевом буферном растворе, группу В инъецируют внутрибрюшинно IgG-Fc человека в качестве контрольного белка (100 мкг), и группу С инъецируют 100 мкг TACI-Fc три раза в неделю в течение четырех недель. Мышей просматривают на клиническую мышечную слабость дважды в неделю и взвешивают и отбирают кровь для сыворотки через 15 и 30 дней после начала введения. Цельную кровь собирают на 15-й день для определения соотношения клеток T/B с помощью анализа сортировки флуоресцентно-активированных клеток, с использованием маркеров B220 и CD5. Выживших мышей убивают после 30-45 дней после начала лечения и их тела замораживают для последующего выделения рецептора ацетилхолина для определения потери мышечного рецептора ацетилхолина, первичной патологии в миастениа гравис (см. например, Coligan et al., (Eds.), Protocols in Immunology. Vol. 3, стр. 15.8.1 (John Wiley & Sons, 1997)).

Сывороточные антитела к мышиному мышечному рецептору ацетилхолина могут быть определены установленным радиоиммунологическим анализом, а изотипы антител против рецептора ацетилхолина (IgM, IgG1, IgG2b и IgG2c) определяют методом ELISA. Такие методы известны. Определяют эффекты TACI-иммуноглобулина на текущую клиническую миастениа гравис, антитела против рецептора ацетилхолина и уровень изотипов, и на потерю мышечного ацетилхолинового рецептора.

Приблизительно 100 мышей может быть иммунизировано 20-тью микрограммами рецептора ацетилхолина в полном адъюванте Фрейнда на 0-й и 30-й день. Мышей с клинической миастениа гравис делят на четыре группы. Группу А инъецируют внутрибрюшинно 100 микрограммами конрольного Fc, группу В инъецируют 20 микрограммами конрольного Fc, группу С инъецируют 100 микрограммами TACI-Fc и группу D инъецируют 20 микрограммами TACI-Fc три раза в неделю в течение четырех недель. Мышей взвешивают, а кровь отбирают для сыворотки перед и после 15 и 30 дней после начала лечения. Сыворотку исследуют на антитела против рецептора ацетилхолина и изотипы как описано выше. Потеря мышечного рецептора ацетилхолина может также быть измеряна.

Другие анализы слитых белков TACI-иммуноглобулинов могут быть определены специалистами в данной области.

6. Получение конъюгатов TACI-иммуноглобулин

Настоящее изобретение включает в себя химически модифицированные TACI-иммуноглобулиновые композиции, в которых полипептид TACI-иммуноглобулин связан с полимером. Типично, полимер является водорастворимым, так что иммуноглобулиновый конъюгат не преципитируется в водной среде, такой как физиологическая среда. Примером пригодного полимера является полимер, который модифицировали, чтобы в его состав входила одна реакционноспособная группа, например, активный сложный эфир для ацилирования, или альдегид для алкилирования. Таким образом может быть проконтролирована степень полимеризации. Примером реакционноспособного альдегида является пропионовый альдегид полиэтиленгликоля, или моно-(C_1-C_{10})алкокси, или арилокси- производные от них (см., например, Harris, et al., патент США N 5252714). Полимер может быть разветвленным или неразветвленным. Кроме того, для получения TACI-иммуноглобулиновых конъюгатов могут быть использованы смеси полимеров.

TACI-иммуноглобулиновых конъюгаты, используемые для терапии, могут содержать фармацевтически приемлемые водорастворимые полимерные компоненты. Подходящие водорастворимые полимеры включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), монометокси-ПЭГ, моно-(C_1-C_{10})алкокси-ПЭГ, арилокси-ПЭГ, поли-(N-винилпирролидон)ПЭГ, трезилмонометокси-ПЭГ, ПЭГ-пропиональдегид, bis-сукцинимид-карбонат-ПЭГ, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропиленоксид/этиленоксид, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт, декстран, целлюлозу или другие полимеры на основе углеводов. Подходящий ПЭГ может иметь молекулярную массу от около 600 до около 60000, включая, например, 5000, 12000, 20000 и 25000. Конъюгат TACI-иммуноглобулина может также содержать смесь таких водорастворимых полимеров.

Один пример конъюгата TACI-иммуноглобулин содержит часть TACI-иммуноглобулина и часть полиалкилоксида, присоединенную к N-концу TACI-иммуноглобулина. ПЭГ является одним подходящим полиалкилоксидом. В качестве иллюстрации, TACI-иммуноглобулин может быть модифицирован ПЭГом, процесс известен как «ПЭГилирование». ПЭГилирование TACI-иммуноглобулина может быть достигнуто любой их реакций ПЭГилирования, известных в данной области (см., например, EP 0 154 316, Delgado et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9:249 (1992), Duncan and Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27:290 (1994), и Francis et al., IntJ Hematol 68:1 (1998)). Например, ПЭГилирование может быть произведено реакцией ацилирования, или реакцией алкилирования с реакционноспособной молекулой полиэтиленгликоля. В альтернативном подходе, конъюгаты TACI-иммуноглобулина образу-

ют конденсированием активированного ПЭГа, при котором концевую гидроксильную или аминогруппу ПЭГа замещают активированным линкером (см., например, Karasiewicz et al., патент США N 5382657).

ПЭГилирование ацилированием типично требует взаимодействия активного производного сложного эфира ПЭГа с полипептидом TACI-иммуноглобулин. Примером активированного сложного эфира ПЭГа является ПЭГ, этерифицированный до N-гидроксисукцинимида. Как используют здесь, термин «ацилирование» включает в себя следующие типы связей между TACI-иммуноглобулином и водорастворимым полимером: амидом, карбаматом, уретаном и т.п. Способы получения ПЭГилированного TACI-иммуноглобулина ацилированием будут типично содержать этапы (a) взаимодействия полипептида TACI-иммуноглобулин с ПЭГом (таким как реакционноспособный сложный эфир альдегидного производного ПЭГа) в условиях, при которых одна или несколько групп ПЭГа прикрепляются к TACI-иммуноглобулину, и (b) получения продукта (продуктов) реакции. Вообще, оптимальные условия взаимодействия реакций ацилирования будут определены на основе известных параметров и желаемых результатов. Например, чем больше соотношение ПЭГ:TACI-иммуноглобулин, тем выше процентное содержание поли-ПЭГилированного TACI-иммуноглобулинового продукта.

Продукт ПЭГилирования ацилированием является типично поли-ПЭГилированным продуктом TACI-иммуноглобулина, причем лизиновые ε-аминогруппы являются ПЭГилированными через ацильную связывающую группу. Примером соединительного звена является амид. Типично, образующийся в результате TACI-иммуноглобулин будет, по меньшей мере, на 95% моно-, ди- или три-пэгилированным, хотя могут быть образованы некоторые разновидности с более высокой степенью ПЭГилирования в зависимости от условий взаимодействия. ПЭГилированные разновидности могут быть отделены от неконъюгированных полипептидов TACI-иммуноглобулина с использованием стандартных способов очистки, например, диализа, ультрафильтрации, ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии и т.п.

ПЭГиляция алкилированием вообще включает в себя взаимодействие конечного производного альдегида ПЭГа с TACI-иммуноглобулином в присутствии редуцирующего агента. Группы ПЭГа могут быть присоединены к полипептиду через $-CH_2-NH$-группу.

Получение производных посредством редуктивного алкилирования для получения моно-ПЭГилированного продукта использует дифференциальную реакционную способность различных типов первичных аминогрупп, пригодных для получения производных. Типично, взаимодействие проводят при pH, которое позволяет взаимодействию использовать различия pKa между ε-аминогруппами остатков лизина и α-аминогруппой N-концевого остатка белка. Путем такого селективного получения производных контролируют присоединение водорастворимого полимера, который имеет в своем составе реакционную группу, например, альдегид, к белку. Конъюгирование с полимером происходит преимущественно на N-конце белка без существенной модификации реакционных групп, таких как аминогруппы лизинов боковой цепи. Настоящее изобретение предоставляет существенно гомогенное получение конъюгатов монополимера TACI-иммуноглобулина.

Восстановительное алкилирование для производства существенно гомогенной популяции молекул конъюгата TACI-иммуноглобулина с монополимером может предусматривать этапы: (a) взаимодействия полипептида TACI-иммуноглобулин с реакционноспособным ПЭГом в условиях восстановительного алкилирования при pH подходящем для позволения избирательной модификации α-аминогруппы на аминоконце TACI-иммуноглобулина, и (b) получения продукта (продуктов) взаимодействия. Редуцирующий агент, используемый для восстановительного алкилирования, должен быть стабильным в водном растворе и способным к восстановлению Шиффового основания, образованного на начальных этапах восстановительного алкилирования. Иллюстративные восстановители включают боргидрид натрия, цианборгидрид натрия, диметиламинборан и пиридинборан.

Для существенно гомогенной популяции конъюгатов TACI-иммуноглобулина с монополимерами, условия взаимодействия восстановительного алкилирования являются такими, что позволяют избирательное присоединение водорастворимой части полимера к N-концу TACI-иммуноглобулина. Такие условия взаимодействия вообще предусматривают различия pKa между аминогруппами лизина и α-аминогруппой на N-конце. pH также влияет на соотношение полимера к белку, что должно быть использовано. Вообще, если pH ниже, то будет желательно избыточное количество полимера по отношению к белку, поскольку меньшее количество реакционных N-концевых α-групп, больше полимера необходимо для достижения оптимальных условий. Если pH выше, то полимер:TACI-иммуноглобулин не должен быть большим, поскольку большее количество реакционных групп имеется в распоряжении. Типично pH будет находиться в диапазоне от 3 до 9, или от 3 до 6.

Другим фактором для рассмотрения является молекулярная масса водорастворимого полимера. Вообще, чем выше молекулярная масса полимера, тем меньше число полимерных молекул, которые могут быть присоединены к белку. Для взаимодействия с ПЭГом, типичная молекулярная масса составляет от около 2кДа до около 100 кДа, около 5 кДа до около 50 кДа, или около 12 кДа до около 25 кДа. Молярное соотношение водорастворимого полимера к TACI-иммуноглобулину будет вообще в области от 1:1 до 100:1. Типично, молярное соотношение водорастворимого полимера к TACI-иммуноглобулину будет от 1:1 до 20:1 для поли-ПЭГилирования и от 1:1 до 5:1 для моно-ПЭГилирования.

Общие способы получения конъюгатов, содержащих части полипептида и водорастворимых полимеров, известны в данной области. См, например, Karasiewicz et al., патент США N 5382657, Greenwald et al., патент США N 5738846, Nieforth et al., Clin. Pharmacol. Ther.59:636 (1996), Monkarsh et al., Anal. Biochem. 247:434(1997)).

Настоящее изобретение рассматривает композиции, содержащие пептид, или полипептид, описанные здесь. Такие композиции могут, кроме того, содержать носитель. Носителем может быть общепринятый органический или неорганический носитель. Примеры носителей включают воду, буферный раствор, спирт, пропиленгликоль, макрогол, кунжутное масло, кукурузное масло и т.п.

7. Выделение полипептидов TACI-иммуноглобулин

Полипетиды настоящего изобретения могут быть очищены, по меньшей мере, до 80%-ной чистоты, по меньшей мере, до около 90%-ной чистоты, по меньшей мере, до около 95%-ной чистоты или выше, чем 95% чистоты относительно примесных макромолекул, особенно относительно других белков и нуклеиновых кислот, и не содержать инфекционные и пирогенные агенты. Полипептиды настоящего изобретения могут также быть очищены до фармацевтически чистого состояния, которое является выше, чем 99,9% чистоты. В определенных препаратах очищенный полипептид является существенно освобожденным от других полипептидов, особенно от других полипептидов животного происхождения.

Способы фракционирования и/или общепринятой очистки могут быть использованы для получения препаратов полипептидов, искусственных полипептидов TACI-иммуноглобулин и рекомбинантных полипептидов TACI-иммуноглобулин, очищенных от рекомбинантных клеток хозяина. Вообще, осаждение сульфатом аммония и кислотная экстракция, или хаотропная экстракция могут быть использованы для фракционирования образцов. Примеры этапов очистки могут включать жидкостную хроматографию на гидроксиапатите, эксклюзивную хроматографию, FPLC (прим. пер., скоростная жидкостная хроматография белков) и обратно-фазовую жидкостную хроматографию с высоким разрешением. Пригодные хроматографические среды включают замещенные декстраны, агарозу, целлюлозу, полиакриламид, специальные селикагели и т.п. Производные PEI, DEAE, QAE и Q являются пригодными. Примеры хроматографических носителей включают такие носители, модифицированные фенильными, бутильными или октильными группами, например, Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA) Octyl-Sepharose (Pharmacia) и т.п.; или полиакриловые смолы, такие как Amberchrom CG 71 (Toso Haas) и т.п. Пригодные твердые носители включают стеклянные шарики, смолы на основе силикагеля, целлюлозные смолы, агарозные шарики, сшитые шарики агарозы, полисиреновые шарики, сшитые полиакриламидные смолы и т.п., которые являются нерастворимыми в условиях, при которых они должны использоваться. Эти носители могут быть модифицированы реакционными группами, что делает возможным присоединение белков аминогруппами, карбоксильными группами, сульфгидрильными группами, гидроксильными группами и/или углеводными остатками.

Примеры процессов химического связывания включают активирование циан-бромидом, активирование N-гидроксисукцинимидом, эпоксидное активирование, сульфгидрильное активирование, активирование гидразидом и карбокси- и апминопроизводными для процессов химической сшивки карбодиимидов. Эти и другие твердые носители являются хорошо известными и широко используются в данной области и являются доступными от коммерческих поставщиков. Выбор специфического способа выделения и очистки полипептида является рутинным делом и определяется, отчасти, свойствами выбранного носителя. Смотри, например, Affinity Chromatography: Principles & Methods (Pharmacia LKB Biotechnology 1988) и Doonan, Protein Purification Protocols (The Humana Press 1996).

Дополнительные варианты выделения и очистки TACI-иммуноглобулинов могут быть придуманы специалистами в данной области. Например, могут быть использованы антитела анти-TACI или анти-Fc для выделения больших количеств белка методом иммуноаффинной очистки.

Полипептиды настоящего изобретения также могут быть выделены с использованием индивидуальных свойств. Например, адсорбционная хроматография с иммобилизованными ионами металла (IMAC) может быть использована для очистки белков, богатых гистидином, включая белки, содержащие полигистидиновые метки. Кратко, сначала гель наполняют ионами металла для образования хелатов (Sulkowski, Trends in Biochem. 3:1 (1985)). Богатые гистидином белки будут адсорбироваться на этом матриксе с различной аффинностью, зависящей от использованного иона металла, будут сэлюированы конкурентной элюцией, понижением pH, или использованием сильных хелатирующих агентов. Другие способы очистки включают очистку гликозилированных белков аффинной хроматографией с иммобилизованным пектином, Protein A - хроматография, и ионообменную хроматографию (M.Deutscher, (ed.), Meth. Enzymol. 782:529 (1990)).

Полипептиды TACI-иммуноглобулин или их фрагменты могут также быть получены путем химического синтеза, как описано выше. Полипептиды TACI-иммуноглобулин могут быть мономерами или мультимерами; гликозилированными или негликозилированными; ПЭГилированными или не-ПЭГилированными и могут включать или могут не включать начальный аминокислотный остаток метионина. Слитый белок TACI-иммуноглобулина может быть негликозилированным, гликозилированным или гликозилированным только в части TACI или в части иммуноглобулина. Иммуноглобулиновая часть может быть получена из антител человека, химерных антител или антител человекообразных.

8. Терапевтическое применение полипептидов TACI-иммуноглобулин

Белки TACI-иммуноглобулин могут быть использованы для модуляции иммунной системы путем связывания ZTNF4 или ZTNF2, и таким образом, препятствуя связыванию этих лигандов с эндогенными рецепторами TACI или BCMA. Следовательно, настоящее изобретение включает использование белков TACI-иммуноглобулин субъекту, который испытывает недостаток в достаточном количестве рецепторов TACI или BCMA, или который производит избыток ZTNF4 и ZTNF2. Эти молекулы могут быть введены любому субъекту, который нуждается в лечении, и настоящее изобретение рассматривает как применение в ветеринарии, так и в терапии человека. Иллюстративные субъекты включают субъекты млекопитающих, таких как сельскохозяйственные животные, домашние животные и больные люди.

Полипептиды TACI-иммуноглобулин могут быть использованы для лечения аутоиммунных заболеваний, карциномы B-клеток, иммуномодуляции, IBD и любых патологий, опосредованных антителами (например, ITCP, миастениа гравис и т.п.), почечная недостаточность, косвенный Т-клеточный иммунный ответ и отторжение трансплантата и заболевания трансплантат против хозяина. Полипептиды настоящего изобретения могут быть мишенями к специфичным ответам, регулируемым B-клетками во время иммунного ответа. Кроме того, полипептиды настоящего изобретения могут быть использованы для модулирования развития B-клеток, развития других клеток, наработки антител и наработки цитокинов. Полипептиды настоящего изобретения также могут модулировать взаимодействие Т-клеток и B-клеток путем нейтрализации пролиферативных эффектов ZTNF4.

Полипептиды TACI-иммуноглобулин настоящего изобретения могут быть полезными для нейтрализации эффектов ZTNF4 для лечения пре-B- или B-клеточных лейкозов, таких как плазмоклеточный лейкоз, хронический или острый лимфоцитарный лейкоз, миеломы, такие как множественная миелома, плазмоклеточная миелома, омобластома и гигантоклеточная миелогенная опухоль и лимфомы, такие как неходжкинская лифома, которая ассоциирована с ростом полипептидов ZTNF4.

ZTNF4 экспрессируется в $CD8^+$-клетках, моноцитах, дендровидных клетках, активированных моноцитах, которые указывают, что, в определенных аутоиммунных заболеваниях, цитотоксические Т-клетки могут стимулировать наработку B-клеток посредством избыточной наработки ZTNF4. Иммунодепрессантные белки, которые избирательно блокируют действие B-лимфоцитов, могли бы использоваться при лечении заболевания. Наработка аутоантител является одинаковой для нескольких аутоиммунных заболеваний и вносит вклад в разрушение ткани и обострение заболевания. Аутоантитела могут также привести к появлению осложнений осаждения иммунного комплекса и привести ко многим симптомам системной красной волчанки, включая почечную недостаточность, невралгические симптомы и смерть. Модулирование наработки антител, не зависящее от клеточного ответа, также было бы выгодным во многих болезненных состояниях. Было показано также, что B-клетки играют роль в секреции артрогенных иммуноглобулинов при ревматоидных артритах. Как таковое, ингибирование наработки антител ZTNF4 было бы выгодным в лечении аутоиммунных заболеваний, таких как миастениа гравис, ревматоидный артирит, детский полиартрит и псориатический артрит. Иммунодепрессантная терапия, например, белками TACI-иммуноглобулин, которые избирательно блокируют или нейтрализуют действие B-лимфоцитов, была бы полезной для таких целей.

Изобретение предусматривает способы применения белков TACI-иммуноглобулин для селективного блокирования или нейтрализации действия B-клеток в связи с конечной стадией почечной недостаточности, которая может или не может быть ассоциирована с аутоиммунным заболеванием. Такие способы также были бы полезны для лечения иммунологических почечных заболеваний. Такие способы были бы полезными для лечения гломерулонефрита, связанного с заболеваниями, такими как мембранная нефропатия, IgA-нефропатия или болезнь Бергера, IgM нефропатия, болезнь Гудпасчура, постинфекционный гломерулонефрит, мезангиопролиферативное заболевание, хронический лимфоидный лейкоз, минимально измененный нефротический синдром. Такие способы также могли бы служить в качестве терапевтических применений для лечения вторичного гломерулонефрита или ангины, связанными с такими заболеваниями как волчанка, полиартрит, болезнь Шенлейна-Геноха, склеродерма, заболеваниями, связанными с ВИЧ, амилоидоз или гемолитико-уремический синдром. Способы настоящего изобретения также были бы полезными в качестве части (доли) терапевтического применения для лечения интерстициального нефрита или пиелонефрита, ассоциированного с хроническим пиелонефритом, злоупотребления болеутоляющими средствами, нефрокальциноза, нефропатии, вызванной другими агентами, почечнокаменной болезни или хронического или острого интерстициального нефрита.

Способы настоящего изобретения также включают применение белков TACI-иммуноглобулин для лечения гипертонических заболеваний или заболеваний крупных сосудов, включая стеноз почечной артерии, или окклюзию, или холестериновую эмболию, или почечную эмболию.

Настоящее изобретение также предоставляет способы лечения почечных или урологических истинных опухолей, множественных миелом, лимфом, легкой цепи невропатии или амилоидоза.

Изобретение также предоставляет способы блокирования или ингибирования активированных B-клеток с использованием белков TACI-иммуноглобулин для лечения астмы и других хронических забо-

леваний дыхательных путей, таких как бронхиты и эмфизема. Описанные здесь белки TACI-иммуноглобулин также могут быть использованы для лечения синдрома Шегрена.

Также предоставляют способы ингибирования или нейтрализации эффекторного ответа Т-клеток с использованием белков TACI-иммуноглобулин для использования при иммунодепрессии, в частности для такого терапевтического использования, как при реакции «трансплантат против хозяина», так и при отторжении трансплантата. Кроме того, белки TACI-иммуноглобулин будут полезными в терапевтических протоколах для лечения таких аутоиммунных заболеваний как инсулинзависимый сахарный диабет (IDDM) и болезнь Крона. Способы настоящего изобретения могут иметь дополнительную терапевтическую ценность для лечения хронических воспалительных заболеваний, в частности для уменьшения суставных болей, опухолей, анемии и других ассоциированных симптомов, также как и лечения септического шока.

Хорошо установленные модели на животных являются пригодными для анализа in vivo эффективности белков TACI-иммуноглобулин настоящего изобретения в точных болезненных состояниях. В частности, белки TACI-иммуноглобулин могут быть проанализированы in vivo в ряде экспериментальных моделей на животных на аутоиммунное заболевание, таких как MRL-Ipr/Ipr или F1 NZBxNZW родственных линий мышей, которые служат в качестве модели SLE (системной красной волчанки). Такие модели животных являются известными в данной области.

Потомство от скрещивания между мышами New Zealand Black (NZB) и New Zealand White (NZW) проявляет спонтанные формы SLE, которые имеют близкое сходство с SLE человека. Потомство мышей, известное как NZBW, начинает обнаруживать IgM-аутоантитела против Т-клеток в возрасте 1 месяца и в 5-7-месячном возрасте, Ig-аутоантитела против ДНК являются доминантным иммуноглобулином. Поликлональная гиперактивность В-клеток приводит к чрезмерной наработке аутоантител. Накопление этих аутоантител, особенно аутоантител направленных против однонитевой ДНК, связано с развитием гломерулонефрита, который проявляется клинически как протеинурия, азотемия и смертью от почечной недостаточности. Почечная недостаточность является главной причиной смерти мышей, пораженных спонтанной SLE, а у линии NZBW этот процесс является хроническим и уничтожающим. Заболевание является более быстрым и тяжелым у женских особей, чем у мужских со средним выживанием только 245 дней по сравнению с 406 днями для мужских особей. В то время как многие из женских особей мышей будут симптоматичными (протенуриа) в возрасте 7-9 месяцев, некоторые из них могут быть намного моложе или старше при проявлении симптомов. Смертельный иммунный нефрит, обнаруженный у мышей NZBW, является очень похожим на гломерулонефрит, обнаруженный у человека с SLE, делая эту спонтанную модель на мышах полезной для тестирования потенциальной терапии SLE.

Модели на мышах для экспериментального аллергического энцефаломиелита (EAE) использовали в качестве инструмента для исследования как механизмов иммунно-опосредованного заболевания, так и способов потенциального терапевтического вмешательства. Модель имеет сходство с рассеянным склерозом человека и дает демиелинизацию в качестве результата активации Т-клеток к нейробелкам, таким как основной белок миелина (MBP) или протеолипидный белок (PLP). Инокуляция антигеном приводит к индуцированию CD4+, Т-клеток II класса (Th1), рестриктированных по главному комплексу гистосовместимости (MHC). Изменения в протоколе по EAE могут породить острые, хронически-рецидивные или пассивно-перенесенные варианты модели.

В экспериментальной модели на животных по изучению индуцированного коллагеном артрита (CIA), у мышей развивался хронический воспалительный артрит, который имеет близкое сходство с ревматоидным артритом (RA) человека. Поскольку CIA обнаруживает сходные с RA иммунологические и патологические признаки, то это делает его идеальной моделью для скрининга потенциальных противовоспалительных компонентов у человека. Другим преимуществом использования модели по изучению CIA является то, что механизмы его патогенеза известны. Идентифицированы Т- и В-клеточные эпитопы на коллаген II типа и определены различные иммунологические параметры (замедленная гиперчувствительность и антитела против коллагена) и противовоспалительные (цитокины, хемокины, ферменты, разрушающие матрикс) параметры, относящиеся к иммунно-опосредованным артритам, и могут быть использованы для оценки эффективности тестируемых компонентов в моделях.

Миастения гравис (MG) является другим аутоиммунным заболеванием, для которого экспериментальные модели на мышах являются пригодными. MG является нарушением нервно-мышечной проводимости, затрагивающем выработку аутоантител, направленных против никотинового ацетилхолинового рецептора (AChR). MG является приобретенным или наследственным с клиническими признаками, включающими огромную слабость и утомляемость при напряжении. Установлена экспериментальная модель на мышах MG. Экспериментальная аутоиммунная миастениа гравис (EAMG) является заболеванием, опосредованным антителами, характеризующимся наличием антител к AChR. Эти антитела разрушают рецептор, приводя к повреждению нейромускульных электрических импульсов, выражающееся в мышечной слабости. В эксперимеатальной модели EAMG мышей иммунизировали никотиновым ацетилхолиновым рецептором. Клинические признаки MG становятся очевидными через неделю после второй иммунизации. EAMG оценивают несколькими способами, включая измерение уровней сыворотки

антител к AChR радиоиммунологическим анализом, измерение мышечного AchR, или электромиографией.

Вообще, доза введенного белка TACI-иммуноглобулин будет варьировать в зависимости от таких факторов как возраст субъекта, вес, пол общее медицинское состояние и предыдущая история болезни. Типично, является желательным обеспечение реципиента дозой белка TACI-иммуноглобулин, которая находится в диапазоне от около 1 пг/кг до 10 мг/кг (количество агента/массу тела субъекта), хотя более низкие, или более высокие дозы также могут быть введены как диктуют обстоятельства.

Введение белка TACI-иммуноглобулин субъекту может быть внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутриплевральным, интратекальным, перфузионным через региональный катетер или прямой внутриповреждающей инъекций. При введении терапевтических белков инъекцией введение может быть в виде непрерывной инфузии или простыми, или сложными болюсами.

Дополнительные пути введения включают оральный, мембранно-слизистый, пульмональный и чрескожный. Оральный прием является пригодным для полиэфирных микросфер, зеиновых микросфер, белковых микросфер, полицианакрилатных микросфер и систем на основе липидов (см., например, DiBase and Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins", in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), стр. 255-288 (Plenum Press 1997)). Удобоисполнимость интраназального введения иллюстрируют таким способом введения инсулина (см., например, Hinchcliffe and Illum, Adv. Drug Deliv. Rev. 35:199 (1999)). Сухие или жидкие частицы, содержащие TACI-иммуноглобулин, могут быть приготовлены и поглощены путем вдыхания с помощью диспергаторов для сухого порошка, аэрозольных генераторов для жидкостей, или распылителей (например, Pettit and Gombotz, TIBTECH 16:343 (1998); Patton et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 35:235 (1999)). Этот подход иллюстрируют системой управления диабетом AERX, которая представляет собой портативный электронный ингалятор, который доставляет аэрозольный инсулин в легкие. Исследования показывают, что белки до 48,000 кДа были доставлены через кожу в терапевтических концентрациях с помощью низкочастотного ультразвука, который иллюстрирует выполнимость чрескожного введения (Mitragotri et al., Science 269:850 (1995)). Чрескожная доставка с использованием электропорации предоставляет другие способы введения белков TACI-иммуноглобулин (Potts et al., Pharm. Biotechnol. 70:213 (1997)).

Фармацевтическая композиция, содержащая белок TACI-иммуноглобулин? может быть технологически произведена в соответствии с известными способами приготовления фармацевтически полезных композиций, в соответствии с чем терапевтические белки комбинируют в композицию с фармацевтически приемлемым носителем. Указывают, что композиция должна быть «фармацевтически пригодным носителем», если ее введение может быть толерантным для реципиентного пациента. Стерильный фосфатно-солевой буферный раствор является одним примером фармацевтически удовлетворяющего носителя. Другие подходящие носители являются хорошо известными в данной области. Смотри, например, Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995).

В терапевтических целях белки TACI-иммуноглобулин вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве. Указывают, что белки TACI-иммуноглобулин и фармацевтически приемлемый носитель должны быть введены в «терапевтически эффективном количестве», если вводимое количество является физиологически существенным. Агент является физиологически существенным, если его наличие дает в результате обнаруживаемое изменение в физиологии реципиентного пациента. Например, агент, используемый для лечения воспаления, является физиологически существенным, если его присутствие облегчает воспалительную реакцию. В качестве другого примера агент, используемый для ингибирования роста опухолевых клеток, является существенным, если введение агента приводит в результате к уменьшению количества опухолевых клеток, уменьшенным метастазам, уменьшенной в размере твердой опухоли, или увеличенному некрозу опухоли. Кроме того, агент, используемый для лечения системной красной волчанки, является физиологически значимым, если введение агента дает в результате снижение циркулирующих антител против двухцепочечной ДНК или уменьшения по меньшей мере одного из следующих симптомов: лихорадки, боли суставов, эритемного поражения кожи или других признаков системной красной волчанки. Одним примером общего признака что белок TACI-иммуноглобулин вводят в терапевтически эффективном количестве является то, что при последующем введении субъекту наблюдается снижение в циркулирующих уровнях ZTNF4 (BLyS).

Фармацевтическая композиция, содержащая белок TACI-иммуноглобулин, может быть предоставлена в жидкой форме, в аэрозольной форме или в твердой форме. Жидкие формы иллюстрируют инъекционными растворами и оральными суспензиями. Экземпляры твердых форм включают капсулы, таблетки и формы с контролируемым высвобождением. Последнюю форму иллюстрируют миниосмотическими насосами и имплантатами (Bremer et al., Pharm. Biotechnol. 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery," в Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger(eds.), стр. 95-123(CRC Press 1995); Bremer et al., "Protein Delivery with Infusion Pumps," in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), стр. 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey et al., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," в Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), стр.93-117 (Plenum Press 1997)).

Липосомы предоставляют один способ доставки терапевтических полипептидов субъекту: внутривенно, внутрибрюшинно, интратекально, внутримышечно, поверхностно или через оральное введение, ингаляцию или интраназальное введение. Липосомы являются микроскопическими везикулами, которые состоят из одного или нескольких липидных бислоев, окружающих водные компартменты (см., в целом, Bakker-Woudenbergr er al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Suppl.1):S61 (1993), Kim, Drugs 46:618 (1993), and Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers", в Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger (eds.), стр.3-24 (CRC Press 1995)).

Липосомы по составу сходны с клеточными мембранами и в результате, липосомы могут быть введены безопасно и являются биодеградируемыми. В зависимости от способа получения липосомы могут быть однослойными, или многослойными, и липосомы могут варьировать в размере с диапазоном диаметра от 0,02 мкм до больше чем 10 мкм. Множество агентов может быть инкапсулировано в липосомы: гидрофобные агенты, разделенные в бислоях, и гидрофильные агенты, распределенные во внутреннем (внутренних) водном пространстве (пространствах) (см., например, Machy et al., Liposomes In Cell Biology And Pharmacology (John Libbey 1987), и Ostro et al., American J. Hosp. Pharm. 46:1576 (1989)). Кроме того, существует возможность контроля терапевтической эффективности инкапсулированного агента посредством изменения размера липосомы, числа бислоев, липидного состава, так же как и заряда, и поверхностных свойств липосом.

Липосомы могут адсорбировать, практически, любые типы клеток и затем медленно высвобождать инкапсулированный агент. Альтернативно, абсорбированная липосома может быть подвергнута эндоцитозу клетками, которые являются фагоцитами. Эндоцитоз происходит с последующей деградацией липосомальных липидов внутри лизосом и высвобождением инкапсулированных агентов (Scherphof et al, Ann. N.Y. Acad. Sci 446:368 (1985)). После внутривенного введения, небольшие липосомы (от 0,1 до 1,0 мкм) поглощаются клетками ретикулоэндотелиального аппарата, локализованного, главным образом, в печени и селезенке, в то время как липосомы больше чем 3,0 мкм, депонируются в легких. Это преимущественное поглощение более мелких липосом клетками ретикулоэндотелиального аппарата было использовано для доставки хемотерапевтических агентов к макрофагам и к опухолям печени.

Ретикулоэндотелиальный аппарат может быть обманут несколькими способами, включая насыщение большими дозами липосомных частиц, или избирательной инактивацией макрофагов фармакологическими средствами (Claassen et al, Biochim. Biophys. Acta 802:428 (1984)). Кроме того, показано, что внедрение производных гликолипид-производных или полиэтиленгликоль-производных фосфолипидов внутрь липосомных мембран дает в результате существенно сниженное поглощение ретикулоэндотелиальный аппаратом (Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 7068:133 (1991); Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 7750:9(1993)).

Липосомы также могут быть подготовлены для специфических клеток-мишеней или органов варьированием фосфолипидной композиции или внедрением рецепторов, или лигандов внутрь липосом. Например, липосомы, очищенные с высоким содержанием неионного поверхностно-активного вещества, использовали для попадания в печень (Hayakawa et al., патент Японии N 04-244018; Kato et al., Biol. Pharm. Bull. 16:960 (1993)). Эти композиции были получены смешиванием соевого фосфатидилхолина, α-токоферола и этоксилированного гидрогенизированного касторового масла (HCO-60) в метаноле, концентрированием смеси в вакууме и затем разбавления смеси водой. Также было показано, что липосомная композиция дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) со смесью полученного из сои стерилгликозида (SG) и холестерина (Ch) попадает в печень (Shimizu et al., Biol. Pharm. Bull. 20:881 (1997)).

Альтернативно, различные лиганды-мишени могут быть пришиты к поверхности липосомы, такие как антитела, фрагменты антител, углеводы, витамины и транспортные белки. Например, липосомы могут быть модифицированы разветвленными галактозиллипидными производными для обнаружения рецепторами асиалогликопротеина (галактозы), которые являются исключительно экспрессированными на поверхности клеток печени (Kato and Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14:287 (1997); Murahashi et al., Biol. Pharm. Bull. 20:259 (1997)). Подобным образом, Wu et al., Hepatology 27:772 (1998), показали, что мечение липосом асиалофетуином приводило к сокращению полужизни липосомной плазмы и вообще усиливало поглощение гепатоцитами липосом, меченых асиалофетуином. С другой стороны, печеночная аккумуляция липосом, содержащих разветвленные производные галактозиллипида, может быть ингибирована предварительной инъекцией асиалофетуина (Murahashi et al., Biol. Pharm. Bull. 20:259 (1997)). Полиаконитилированные липосомы сывороточного альбумина человека предоставляют другой подход для попадания липосом в клетки печени (Kamps et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94:11681 (1997)). Кроме того, Geho, et al., патент США N 4603044, описывают систему доставки в гепатоциты на основе липосомных пузырьков, которая является специфичной для гепатобилиарных рецепторов, ассоциированных со специализированными метаболическими клетками печени.

В более общем подходе по попаданию в ткани клетки-мишени предварительно метят биотинилированными антителами специфичными для лиганда, экспрессированного клеткой-мишенью (Harasym et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 32:99 (1998)). После удаления плазмой свободного антитела, вводят стрептавидин-конъюгированные липосомы. В другом подходе, анитела, которые служат меткой, прикрепляют прямо к липосомам (Harasym et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 32:99(1998)).

Белки TACI-иммуноглобулин могут быть инкапсулированы внутрь липосом с использованием стандартных приемов микроинкапсулирования белков (см., например, Anderson et al., Infect. Immun. 31:1099 (1981), Anderson et al.,Cancer Res. 50:1853 (1990), и Cohen et al., Biochim. Biophys. Acta 1063:95 (1991), Alving et al.,"Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," в Liposome Technology, 2nd Edition, Vol. III, Gregoriadis (ed.), стр. 317 (CRC Press 1993), Wassef et al., Meth. Enzymol. 749:124 (1987)). Как подчеркивают выше, терапевтически пригодные липосомы могут иметь в своем составе различные компоненты. Например, липосомы могут содержать липидные производные полиэтиленгликоля (Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 1150:9 (1993)).

Для поддержания высоких системных уровней терапевтических белков были созданы распадающиеся полимерные микросферы. Микросферы получают из биодеградируемых полимеров, таких как поли(лактид-когликолид)(PLG), полиангидриды, полиортоэфиры, биологически неразложимые этилвинилацетатные полимеры, в которых белки инкапсулированы в полимер (Gombotz and Pettit, Bioconjugate Chem. 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," в Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger (eds.), стр. 51-93 (CRC Press 1995); Roskos and Maskiewicz,"Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," в Protein Delivery:Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), стр.45-92 (Plenum Press 1997); Bartus et al., Science 281:1161 (1998); Putney and Burke, Nature Biotechnology 16:153 (1998); Putney, Curr. Opin Chem. Biol. 2:548 (1998)). Наносферы, покрытые полиэтиленгликолем (ПЭГ), могут также предоставлять носители для внутривенного введения терапевтических белков (см., например, Gref et al., Pharm. Biotechnol. 10:167 (1997)).

Настоящее изобретение также рассматривает химически модифицированные белки TACI-иммуноглобулин, в которых полипептид связан с полимером, как обсуждают выше.

Другие лекарственные формы могут быть разработаны специалистами в данной области, как показано, например, Ansel and Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995), Ranade and Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996)).

В качестве иллюстрации, фармацевтические композиции могут быть поставлены в виде набора, содержащего контейнер, который содержит белок TACI-иммуноглобулин. Терапевтические полипептиды могут быть предоставлены в виде инъекционного раствора для одной или нескольких доз, или в виде стерильного порошка, который будет растворен перед инъецированием. Альтернативно, такой набор может включать в себя диспергатор для сухих порошков, жидкостно-аэрозольный генератор или распылитель для введения терапевтического полипептида. Такой набор, кроме того, может содержать написанную информацию по указанию и применению фармацевтической композиции. Кроме того, такая информация может включать утверждение, что белковая композиция TACI-иммуноглобулин противопоказана пациентам с известной гиперчувствительностью к любому из компонентов рецептора TACI или иммуноглобулиновому компоненту.

9.Терапевтическое использование нуклеотидных последовательностей TACI-иммуноглобулина

Настоящее изобретение включает в себя применение молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют слитые белки TACI-иммуноглобулина для предоставления этих слитых белков субъекту, который нуждается в таком лечении. Для ветеринарного терапевтического применения или терапевтического применения для человека такие молекулы нуклеиновых кислот могут быть введены субъекту, имеющему нарушение или заболевание, как обсуждено выше. В качестве одного примера, обсужденного ранее, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие слитый белок TACI-иммуноглобулина, могут быть использованы для продолжительного лечения системной красной волчанки.

Существует ряд подходов по внедрению гена TACI-иммуноглобулин субъекту, включающих использование рекомбинантных клеток хозяина, которые экспрессируют TACI-иммуноглобулин, доставку очищенной нуклеиновой кислоты, кодирующей TACI-иммуноглобулин, использование катионного липидного переносчика с молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует TACI-иммуноглобулин и использование вирусов, которые экспрессируют TACI-иммуноглобулин, таких как рекомбинантные ретровирусы, рекомбинантные адено-ассоциированные вирусы, рекомбинантные аденовирусы и рекомбинантные симплексные вирусы герпеса (см., например, Mulligan, Science 260:926 (1993), Rosenberg et al., Science 242:1575 (1988), LaSalle et al., Science 259:988 (1993), Wolff et al., Science 247:1465 (1990), Breakfield and Deluca, The New Biologist 3:203 (1991)). В подходе ex vivo, например, изолированные клетки субъекта заражают вектором, который экспрессирует ген TACI-иммуноглобулин, и затем пересаживают внутрь субъекта.

Для того чтобы произвести экспрессию гена TACI-иммуноглобулин, конструируют вектор, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая ген TACI-иммуноглобулин, пришита в результате манипуляций к коровому промотору и произвольно к регуляторному элементу для контроля транскрипции гена. Общие требования к экспрессионному вектору описывают выше.

Альтернативно, ген TACI-иммуноглобулин может быть доставлен с использованием рекомбинантных вирусных векторов, включающих, например, аденовирусные векторы (e.g.,Kass-Eisler et al, Proc.Nat'l Acad. Sci. USA 90:11498 (1993), Kolls et al, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:215 (1994), Li et al, Hum.Gene Ther. 4:403 (1993), Vincent et al, Nat. Genet. 5:130 (1993), and Zabner et al, Cell 75:207 (1993)), аденовирус-

ассоциированные вирусные векторы (Flotte et al, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:10613 (1993)), альфавирусы, такие как лесной вирус и Sindbis вирус (Hertz and Huang, J. Vir. 66:857 (1992), Raju and Huang, J. Vir. 65:2501 (1991), and Xiong et al, Science 243:1188 (1989)), вирусные векторы герпеса (e.g., патенты США №№: 4,769,331, 4,859,587, 5,288,641 и 5,328,688), векторы парвовирусов (Koering et al, Hum. Gene Therap. 5:457 (1994)), векторы вирусов оспы (Ozaki et al, Biochem. Biophys. Res. Comm. 193:653 (1993), Panicali and Paoletti, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 79:4927 (1982)), вирусы оспы, например, канареечный вирус оспы, или вирус коровьей оспы (Fisher-Hoch et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:317 (1989), и Flexner et al, Ann. N.Y.Acad. Sci. 569:86 (1989)), и ретровирусы (e.g., Baba et al, J. Neurosurg 79:729 (1993), Ram et al, Cancer Res. 53:83 (1993), Takamiya et al, J. Neurosci. Res 33:493 (1992), Vile and Hart, Cancer Res. 53:962 (1993), Vile and Hart, Cancer Res. 53:3860 (1993), и Anderson et al, патенты США NN 5399346). В рамках различных вариантов или сами вирусные векторы, или вирусные частицы, которые содержат вирусный вектор, могут быть использованы в способах и композициях, описанных ниже.

В качестве иллюстрации одной из систем аденовирус, вирус с двухцепочечной ДНК, является хорошо охарактеризованным ветором для генного переноса доставки гетерологичных молекул нуклеиновой кислоты (см. обзор, Becker et al, Meth. Cell Biol. 43:161 (1994); Douglas and Curiel, Science & Medicine 4:44 (1997)). Аденовирусная система дает несколько преимуществ, включающих: (i) способность к размещению относительно крупных вставок ДНК, (ii) способность быть нарощенными до высокого титра, (iii) способность к инфицированию широкого ряда типов клеток млекопитающих и (iv) способность быть использованными со многими различными промоторами, включая убиквитиновые, тканеспецифичные и регулируемые промоторы. Кроме того, аденовирусы могут быть введены путем внутривенной инъекции, поскольку вирусы являются устойчивыми в кровотоке.

Используя аденовирусные векторы, где части аденовирусного генома удалены, вставки внедряют в вирусную ДНК прямым лигированием или гомологичной рекомбинацией с плазмидой для котрансфекции. В иллюстративной системе важнейший ген E1 удаляют из вирусного вектора, и вирус не будет реплицироваться пока ген E1 не будет предоставлен клеткой-хозяином. При внутривенном введении интактным животным аденовирус сначала поражает печень. Хотя аденовирусная система доставки с делецией в гене E1 не может реплицироваться в клетке-хозяине, ткани хозяина будут экспрессировать и подвергать процессингу кодируемый гетерологичный белок. Клетки хозяина будут также секретировать гетерологичный белок, если соответствующий ген включает в себя секреторную сигнальную последовательность. Секретированные белки будут поступать в кругооборот из ткани, которая экспрессирует гетерологичный ген (например, высоковаскулизированная печень).

Кроме того, аденовирусные векторы, содержащие различные делеции вирусных генов, могут быть использованы для снижения или элиминирования иммунного ответа на вектор. Такие аденовирусы содержат делецию в E1 и, кроме того, содержат делеции E2A или E4 (Lusky et al., J. Virol. 72:2022 (1998); Raper et al., Human Gene Therapy 9:671 (1998)). Сообщалось также, что делеция E2b понижает иммунный ответ (Amalfitano et al., J. Virol. 72:926 (1998)). Делецией всего аденовирусного генома могут быть размещены очень крупные вставки гетерологичной ДНК. Получение так называемых «бесхарактерных» аденовирусов, где все вирусные гены удалены, является особенно выгодным для инсерции крупных вставок гетерологичной ДНК (см., обзор Yeh. and Perricaudet, FASEB J. 11:615 (1997)).

Матричные растворы с высокими титрами рекомбинантных вирусов, обеспечивающих экспрессию терапевтического гена, могут быть получены из инфицированных клеток млекопитающих с использованием стандартных методов. Например, рекомбинантный вирус герпеса simplex может быть приготовлен в клетках Vera, как описано Brandt et al., J. Gen. Virol. 72:2043 (1991), Herold et al., J. Gen. Virol. 75:1211 (1994), Visalli and Brandt, Virology 785:419 (1991), Grau et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 30:2474 (1989), Brandt et al., J. Virol. Meth. 36:209 (1992), и Brown and MacLean (eds.), HSV Virus Protocols (Humana Press 1997).

Альтернативно, экспрессионный вектор, содержащий ген TACI-иммуноглобулин, может быть внедрен в клетки субъекта липофекцией in vivo с использованием липосом. Искусственные катионные липиды могут быть использованы для получения липосом для трансфекции in vivo геном, кодирующим маркер (Felgner et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:7413 (1987); Mackey et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:8027 (1988)). Использование липофекции для внедрения экзогенных генов в специфические органы in vivo имеет определенные практические преимущества. Липосомы могут быть использованы для прямой трансфекции отдельных типов клеток, которые являются особенно полезными в ткани с клеточной гетерогенностью, таких как ткани поджелудочной железы, печени, почек и мозга. Липиды могут быть химически связаны с другими молекулами с целью мечения. Пептиды-мишени (например, гормоны или нейротрансмиттеры), белки, такие как антитела, или непептидные молекулы могут быть присоединены к липосомам химическим путем.

Электропорация является другим альтернативным способом введения. Например, Aihara and Miyazaki, Nature Biotechnology 76:867 (1998) демонстрировали использование электропорации in vivo для переноса генов в мышцу.

Вообще, доза композиции, содержащей терапевтический вектор, имеющий нуклеотидную последовательность TACI-иммуноглобулина, например рекомбинантный вирус, будет варьировать в зависимо-

сти от таких факторов, как возраст субъекта, вес, рост, пол, общее медицинское состояние и предыдущая история болезни. Пригодные пути введения терапевтических векторов включают внутривенную инъекцию, внутриартериальную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию, внутриопухолевую инъекцию и инъекцию внутрь каверны, которая содержит опухоль. В качестве иллюстрации, Horton et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 96:1553 (1999), показал, что внутримышечная инъекция плазмидной ДНК, кодирующей интерферон-α, вызывает сильные противоопухолевые эффекты на первичные и метастазирующие опухоли в модельных экспериментах на мышах.

Композиция, содержащая вирусные векторы, не вирусные векторы или сочетание вирусных и не вирусных векторов настоящего изобретения могут быть приготовлены в соответствии с известными способами получения фармацевтически пригодных композиций, тем самым векторы или вирусы комбинируют в композицию с фармацевтически приемлемым носителем. Как отмечалось выше, композиция, такая как фосфатно-солевой буферный раствор, указывается, должна быть «фармацевтически приемлемым носителем», если ее введение может быть выдержано субъектом-реципиентом. Другие пригодные носители хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), и Gilmans the Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)).

В терапевтических целях экспрессионный вектор терапевтического гена или рекомбинантный вирус, содержащий такой вектор, и фармацевтически приемлемый носитель вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве. Указывают, что комбинация экспрессионного вектора (или вируса) и фармацевтически приемлемого носителя должна быть введена в «терапевтически эффективном количестве», если вводимое количество является физиологически существенным. Агент является физиологически существенным, если его наличие дает в результате обнаруживаемое изменение в физиологии реципиентного субъекта. Например, агент, используемый для лечения воспаления, является физиологически существенным, если его наличие смягчает воспалительный ответ. В другом примере, агент, используемый для ингибирования роста клеток опухоли, является физиологически значимым, если введение агента приводит к уменьшению числа опухолевых клеток, уменьшению метастаз, уменьшению в размере твердой опухоли или усилению некроза опухоли.

Если субъектом, которого лечат экспрессионным вектором терапевтического гена или рекомбинантным вирусом, является человек, тогда терапией является предпочтительно генная терапия соматической клетки. Это означает, что предпочтительное лечение человека экспрессионным вектором терапевтического гена или рекомбинантным вирусом не влечет за собой внедрение внутрь клеток молекулы нуклеиновой кислоты, которая может образовывать часть зародышевой линии человека и быть передана следующим поколениям (т.е. исправление генетических дефектов методами генетической инженерии в зародышевой линии человека).

10. Получение трансгенных мышей

Трансгенные мыши могут быть созданы со сверхэкспрессируемыми последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими слитые белки TACI-иммуноглобулина во всех тканях, или под контролем тканеспецифичного или тканепредпочтительного регуляторного элемента. Это сверхпроизводство слитых белков TACI-иммуноглобулинов может быть использовано для отличия фенотипа, который получается в результате сверхэкспрессии, и трансгенные животные могут служить моделью для заболеваний человека, вызванных избытком рецепторного белка TACI. Трансгенные мыши, которые сверхэкспрессируют слитые белки TACI-иммуноглобулина, также предоставляют модель биореакторов по производству слитых белков TACI-иммуноглобулинов в молоке, или в крови высших животных. Способы получения трансгенных мышей являются хорошо известными специалистам в данной области (см., например, Jacob, "Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice," в Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice, Jacob (ed.), стр. 111-124 (Academic Press, Ltd. 1994), Monastersky and Robl (eds.), Strategies in Transgenic Animal Science (ASM Press 1995) и Abbud and Nilson, "Recombinant Protein Expression in Transgenic Mice," в Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression, Fernandez and Hoeffler (eds.), стр. 367-397 (Academic Press, Inc. 1999)).

Например, способ получения трансгенной мыши, которая экспрессирует нуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый белок TACI-иммуноглобулина, может начинаться с взрослых, фертильных мужских особей (производителей) (B6C3f1, в возрасте от 2 до 8 месяцев (Taconic Farms Germantown, NY)), самцов после вазектомии (поддельных) (B6D2f1, в возрасте от 2 до 8 месяцев (Taconic Farms)), препубертатных фертильных самок (доноры) (B6C3f1, от 4 до 5 недель (Taconic Farms)) и взрослых фертильных самок (реципиентов) (B6D2f1, от 2 до 4 месяцев, (Taconic Farms)). Доноров акклиматизируют в течение одной недели и затем инъецируют гонадотропином сыворотки жеребых кобыл в дозе приблизительно 8 МЕ/мышь (Sigma Chemical Company; St. Louis, MO), внутрибрюшинно, и через 46-47 ч хорионическим гонадотропным гормоном человека в дозе 8 МЕ/мышь (hCG (sigma)) внутрибрюшинно, для индуцирования суперовуляции. Доноров спаривали с производителями вслед за гормональными инъекциями. Овуляция вообще происходит в течение 13 ч инъекции hCG. Копуляцию подтверждают наличием вагинальной пробки утром после спаривания.

Оплодотворенные яйцеклетки собирают под хирургическим микроскопом. Яйцеводы собирают и яйцеклетки выпускают на пластинки для анализа мочи, содержащие гиалуронидазу (sigma). Яйцеклетки промывают один раз в гиалуронидазе и дважды в среде Виттена (Whitten's W640medium, описанной, например, Menino and O'Claray, Biol.Reprod. 77:159 (1986), и Dienhart and Downs, Zygote 4:129 (1996)), яйцеклетки инкубировали с 5% CO_2, 5% O_2 и 90% N_2 при 37°C. Яйцеклетки затем хранят в инкубаторе при 37°C/5% CO_2 вплоть до микроинъекции.

От десяти до двадцати микрограмм плазмидной ДНК, содержащей кодирующую последовательность слитого белка TACI-иммуноглобулина, линеаризируют, очищают в геле и ресуспендируют в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 0,25 мМ EDTA (pH 8,0) до конечной концентрации 5-10 нанограмм на микролитр для микроинъекции. Например, кодирующие последовательности слитого белка TACI-иммуноглобулина могут кодировать TACI-полипептид с делецией аминокислотных остатков с 1 до 29 и с 111 до 154 SEQ ID NO:2 и фрагмент Fc5 иммуноглобулина.

Плазмидную ДНК микроинъецируют в собранные яйцеклетки, заключенные в каплю среды W640, покрывают теплым, уравновешенным CO_2, минеральным маслом. ДНК втягивают внутрь инъекционной иглы (вытянутой из боросиликатного стеклянного капилляра с внутренним диаметром 0,75 мм, наружным диаметром 1 мм) и инъецируют внутрь отдельных яйцеклеток. Каждую яйцеклетку пронизывают инъекционной иглой внутрь одного или обоих гаплоидных пронуклеусов.

Пиколитры ДНК инъецируют внутрь пронуклеуса и инъекционную иглу удаляют без вступления в контакт с ядрышком. Процедуру повторяют до тех пор, пока все яйцеклетки будут инъецированы. Успешно микроинъецированные яйцеклетки переносят внутрь органной кюветы для клеточной культуры с предварительно газированной средой W640 для хранения в течение ночи в инкубаторе при 37°C/5% CO_2.

На следующий день двухклеточные эмбрионы переносят внутрь псевдобеременных реципиентов. Реципиентов идентифицируют по наличию копуляционных пробок после копуляции с вазектомированными подделками. Реципиентов подвергают анестезированию и выбривают левую сторону спины, переносят под хирургический микроскоп. Делают небольшой надрез в коже и через мышечную стенку в середине брюшной области очерчивают реберную клетку, таз и заднюю ногу, шириной между коленом и селезенкой. Репродуктивные органы временно выводят на поверхность тела внутрь небольшой хирургической складки. Жировое тело протягивают над хирургической складкой и маломощным сосудистым зажимом (Roboz, Rockville, MD) прикрепляют к жировому телу и оставляют, подвешивая над спинкой мыши, предохраняя органы от соскальзывания обратно внутрь.

Высококачественной пипеткой для переноса, содержащей минеральное масло, за которым следует чередование W640 с воздушными пузырьками, 12-17 здоровых двухклеточных эмбрионов от инъецирования в предыдущий день, переносят внутрь реципиента. Разбухший пузырек помещают и прикрепляют яйцевод между пузырьком и сумкой, разрез в яйцеводе делают 28-граммовой иглой рядом с сумкой, будучи уверенными, что пузырек или сумка не повреждены.

Пипетку переносят в разрез в яйцеводе и выдувают эмбрионы внутрь, допуская первый воздушный пузырек до вытекания из пипетки. Жировое тело осторожно вдавливают внутрь брюшины и репродуктивным органам позволяют соскользнуть внутрь. Стенку брюшины закрывают одним швом и шкурку закрывают раневым зажимом. Мышей восстанавливают на плавном нагревателе при 37°C в течение минимум 4 ч.

Реципиентов возвращают в клетки парами и допускают 19-21-дневный период беременности. После рождения допускают 19-21-дневный послеродовой период перед отнятием от груди. У отнятых от груди детенышей определяют пол и помещают в отдельные клетки по половому признаку и производят биопсию, отрезают чистыми ножницами 0,5 см хвоста (для определения генотипа).

Геномную ДНК получают из хвостовых отрезков, с использованием, например, набора QIAGEN DNEASY, следуя инструкциям фирмы-производителя. Геномную ДНК анализируют методом ПЦР с использованием праймеров, сконструированных для амплификации последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих слитый белок TACI-иммуноглобулина или селективный маркерный ген, который был внедрен в ту же самую плазмиду. После подтверждения того, что животные должны быть трансгенными, их подвергают возвратному скрещиванию внутри инбредной линии, путем помещения трансгенных самок вместе с самцами дикого типа, или трансгенных самцов с одной или двумя (самкой) самками дикого типа. По мере того как детеныши рождаются и их отнимают от груди, их разделяют по полу и отрезают их хвостики для генотипического различия.

Для проверки экспрессии трансгена в живом животном производят частичную гепатэктомию. Хирургическое начало готовят в верхней части живота непосредственно под мечевидным отростком грудины. Используя стерильные приемы, делают небольшой 1,5-2 см надрез ниже грудины и временно выводят на поверхность левую латеральную долю печени. С использованием шелковой нити 4-0, обвязывают вокруг нижней доли, закрепляя ее с внешней стороны разреза тела. Атравматический зажим используют для фиксации банта, в то время как вторую петлю рассасывающегося дексона (Dexon, American Cyanamid; Wayne, N.J.) помещают на ближайшем расстоянии к первому узлу. Дистальный надрез делают от дексонового узла и приблизительно 100 мг отсеченной ткани печени помещают в стерильную чашку Петри. Отсеченный сегмент печени переносят в 14-и миллилитровую пропиленовую круглодонную про-

бирку и кусочек замораживают в жидком азоте и затем хранят в сухом льду. Хирургический участок закрывают наложением швов и раневых скрепок и клетки животных после операции помещают на подушку с подогревом на 37°C в течение 24 ч. В послеоперационный период животных проверяют ежедневно и раневые скрепки удаляют через 7-10 дней после операции. Уровень экспрессии мРНК слитого белка TACI-иммуноглобулина проверяют для каждой трансгенной мыши с использованием метода РНК-гибридизации в растворе или полимеразной цепной реакции.

Используя общие подходы, описанные выше, получили трансгенных мышей, которые экспрессируют существенные уровни слитого белка TACI-иммуноглобулина в молоке. В этом конкретном случае, кодирующая последовательность слитого белка TACI-иммуноглобулина кодировала полипептид TACI с делецией аминокислотных остатков с 1 по 29 и с 111 по 154 SEQ ID NO:2 и иммуноглобулиновый Fc5-фрагмент.

Таким образом, настоящее изобретение вообще описывает, как будет понятно более легко из ссылок на следующие примеры, которые предоставляют в качестве иллюстрации и которые не предназначены ограничивать настоящее изобретение.

Пример 1. Конструирование молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют белки TACI-Fc.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие TACI человека, получали во время экспрессионного клонирования рецепторов ZTNF4, как описано Gross et al., Nature 404:995 (2000). Кодирующие последовательности, содержащие в себе экспрессионные конструкции TACI-Fc, создавали методом ПЦР с перекрытием, с использованием стандартных методов (см., например, Horton et al., Gene 77:61 (1989)). кДНК TACI человека и кДНК Fc использовали в качестве стартовых матриц для ПЦР-амплификации. ПЦР-праймеры сконструировали для получения желаемой кодирующей последовательности на 5' и 3'-концах и для внедрения сайтов узнавания ферментами рестрикции для облегчения встраивания этих кодирующих последовательностей в экспрессионные векторы. Кодирующие последовательности TACI-Fc встраивали внутрь экспрессионных векторов, которые содержали в себе функциональный ген дигидрофолатредуктазы мыши. Один экспрессионный вектор также содержал цитомегаловирусный промотор для направления экспрессии трансгенного рекомбинантного белка, иммуноглобулиновый интрон, сигнальную последовательность тканевого плазминогенного активатора, последовательность, определяющую место входа внутрь рибосом, удаленный цистрон CD8 для отбора зараженных клеток на поверхности и дрожжевые экспрессионные элементы для роста плазмид в дрожжевых клетках.

Один подход, который использовали для получения слитых белков TACI-Fc иммуноглобулин, иллюстрируют способом, используемым для конструирования TACI-Fc4. Другие слитые белки TACI-Fc получали инсерцией нуклеотидных последовательностей, которые кодируют слитый белок TACI-Fc иммуноглобулин, в экспрессионный вектор млекопитающих и внедрении этого экспрессионного вектора в клетки млекопитающих.

A. Конструирование фрагмента Fc4 Igγ1

Для приготовления слитого белка TACI-Fc4 модифицировали Fc-фрагмент IgG1 человека (шарнирный участок доменов CH_2 и CH_3) для удаления связывающих функций Fcγ1 с рецептором (FcγR1) и с комплементом (C1q). Этот модифицированный вариант Fc IgG1 человека обозначили «Fc4».

Fc-фрагмент изолировали из ПЦР-библиотеки печени человеческих эмбрионов (Clontech) с использованием олигопраймеров 5' ATCAGCGGAA TTCAGATCTT CAGACAAAAC TCACACATGC CCAC 3' (SEQ ID NO:7) и 5' GGCAGTCTCT AGATCATTTA CCCGGAGACA GGGAG 3' (SEQ ID NO:8). Мутации внутрь Fc-фрагмента вводили методом ПЦР для уменьшения связывания FcγR1. Связывающий сайт FcγR1 (Leu-Leu-Gly-Gly; аминокислотные остатки с 38 по 41 SEQ ID NO:6, что соответствует положениям с 234 по 237 по индексации Европейского сообщества) видоизменили на Ala-Glu-Gly-Ala для уменьшения связывания FcγR1 (см., например, Duncan et al., Nature 332:563 (1988); Baum et al., EMBO J. 73:3992 (1994)). Олигонуклеотидные праймеры 5' CCGTGCCCAG CACCTGAAGC CGAGGGGGCA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC C 3'(SEQ ID NO:9) и 5' GGATTCTAGA TTATTTACCC GGAGACAGGG A 3' (SEQ ID NO:10) использовали для внедрения изменений. К 50 мкл конечного объема добавляли 570 нг матрицы IgFc, 5 мкл 10-кратного буфера для реакции Pfu (Stratagene), 8 мкл 1,25 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTPs) 31 мкл дистиллированной воды, 2 мкл 20 мМ олигонуклеотидных праймеров. Добавляли равный объем минерального масла и реакционную смесь нагревали до 94°C в течение 1 мин. Добавляли Pfu-полимеразу (2,5 единиц, Stratagene), после чего следуют 25 циклов при 94°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с, 72°C в течение 1 мин, с последующим удлинением в течение 7 мин при 72°C. Продукты реакции фракционировали методом электрофореза, и обнаруживали полосу, соответствующую прогнозированному размеру около 676 пар нуклеотидов. Эту полосу вырезали из геля и ДНК выделяли с использованием набора QIAGEN QIAquickTM Gel Extraction Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

ПЦР также использовали для введения замены Ala на Ser (аминокислотный остаток 134 SEQ ID NO:6, который соответствует положению 330 по индексации Европейского сообщества) и Pro на Ser (аминокислотный остаток 135 SEQ ID NO:6, который соответствует положению 331 по индексации Европейского сообщества) для уменьшения связывания комплемента C1q или фиксирования комплемента

(Duncan and Winter, Nature 332:788 (1988)). Два первых цикла реакции выполняли с использованием в качестве матрицы, измененной в результате побочной мутации последовательности IgFc, связывающую FcγR1. К 50 мкл конечного объема добавляли 1 мкл измененной матрицы IgFc, связвающего сайта FcγR1, 5 мкл 10-кратного буфера для реакции Pfu (Stratagene), 8 мкл 1,25 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTPs), 31 мкл дистиллированной воды, 2 мкл 20 мМ 5' GGTGGCGGCT CCCAGATGGG TCCTGTCCGA GCCCAGATCT TCAGACAAAA CTCAC 3' (SEQ ID NO:11), 5'-начало праймера с нуклеотида 36 SEQ ID NO:5, и 2 мкл 20 мМ 5 TGGGAGGGCT TTGTTGGA 3' (SEQ ID NO:12), 3'-начало праймера с комплементарного нуклеотида 405 SEQ ID NO:5. Вторая реакционная смесь содержала по 2 мкл каждого из 20 мМ матричных олигонуклеотидных примеров 5' TCCAACAAAG CCCTCCCATC CTCCATCGAG AAAACCATCI CC 3' (SEQ ID NO:13), 5'-начало праймера с нуклеотида 388 SEQ ID NO:5 и 5' GGATGGATCC ATGAAGCACC TGTGGTTCTT CCTCCTGCTG GTGGCGGCTC CCAGATG 3' (SEQ ID NO:14), 3'-праймер для внедрения мутации Ala на Ser, Xbal сайт рестрикции и стоп-кодон. Добавляли равный объем минерального масла и реакционную смесь нагревали до 94°C в течение 1 мин. Добавляли Pfu-полимеразу (2,5 единиц, Stratagene), после чего следуют 25 циклов при 94°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с, 72°C в течение 2 мин, с последующим удлинением в течение 7 мин при 72°C. Продукты реакции фракционировали методом электрофореза и обнаруживали полосы, соответствующие прогнозированным размерам около 370 и около 395 пар нуклеотидов соответственно. Полосы вырезали из геля и экстрагировали с использованием набора QIAGEN QIAquickTM Gel Extraction Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Второй цикл реакции проводили для соединения вышеуказанных фрагментов и добавления сайта рестрикции 5' BamHI и сигнальной последовательности вариабельного домена тяжелой цепи 2'C_L иммуноглобулина человека JBL (Cogne et al., Eur. J. Immunol. 78:1485 (1988)). К 50 мкл конечного объема добавляли 30 мкл дистиллированной воды, 8 мкл 1,25 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTPs), 5 мкл 10-кратного полимеразного реакционного буфера-Pfu (Stratagene) и по 1 мкл каждого из двух первых двух продуктов ПЦР. Добавляли равный объем минерального масла и реакционную смесь нагревали до 94°C в течение 1 мин. Добавляли Pfu-полимеразу (2,5 единиц, Stratagene), после чего следуют 5 циклов при 94°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с и 72°C в течение 2 мин. Температуру опять поднимали до 94°C и добавляли по 2 мкл каждого из 20 мМ матричных растворов 5' GGATGGATCC ATGAAGCACC TGTGGTTCTT CCTCCTGCTG GTGGCGGCTC CCAGATG 3'(SEQ ID NO:14), 5'- начало праймера с нуклеотида 1 SEQ ID NO: 5, и 5' GGATTCTAGA TTATTTACCC GGAGACAGGG A 3' (SEQ ID NO:10) с последующими 25 циклами при 94°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с, 72°C в течение 2 мин и в конце с удлинением в течение 7 мин при 72°C. Продукты реакции обнаруживали с использованием гель-электрофореза. Обнаружили полосу, соответствующую прогнозированному размеру в 789 пар нуклеотидов.

B. Конструирование экспрессионного вектора TACI-Fc4

Экспрессионные плазмиды, содержащие кодирующую область слитого белка TACI-Fc4, конструировали с помощью гомологичной рекомбинации в дрожжах. Фрагмент кДНК TACI, который включал полинуклеотидную последовательность с 14 нуклеотида по 475 нуклеотид SEQ ID NO:1, изолировали с использованием ПЦР. Обоими праймерами, используемыми в наработке фрагмента TACI, были: (1) праймер, содержащий в себе 40 пар оснований 5'-векторной фланкирующей последовательности, и 17 пар оснований, соответствующих амино-концу фрагмента TACI (5'CTCAGCCAGG AAATCCATGC CGAGTTGAGA CGCTTCCGTA GAATGAGTGG CCTGGGCCG 3'; SEQ ID NO:15; (2) 40 пар оснований 3'-конца, соответствующих фланкирующей последовательности Fc4, и 17 пар оснований, соответствующих карбоксильному концу фрагмента TACI (5' GCATGTGTGA GTTTTGTCTG AAGATCTGGG CTCCTTCAGC CCCGGGAG 3'; SEQ ID NO:16). К 100 мкл конечного объема добавляли 10 нг матрицы TACI, 10 мкл 10-кратного буфера для Taq-полимеразы (10x Taq polymerase Reaction Buffer, Perkin Elmer), 8мкл 2,5нМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTPs), 78 мкл дистиллированной воды, по 2 мкл каждого из 20 мМ матричных растворов олигонуклеотидных праймеров и Taq-полимеразу (2,5 единиц, Life Technology). Добавляли равный объем минерального масла и реакционную смесь нагревали до 94°C в течение 2 мин, с последующими 25 циклами при 94°C в течение 30 с, 65°C в течение 30 с, 65°C в течение 30 с, 72°C в течение 1 мин, с последующим удлинением в течение 5 мин при 72°C.

Фрагмент, содержащий кДНК, кодирующую фрагмент Fc4, конструировали сходным образом. Обоими праймерами, использованными для получения фрагмента Fc4 (против хода и по ходу транскрипции), были олигонуклеотидные праймеры, содержащие в себе 40 пар оснований 5'TACI-фланкирующей последовательности и 17 пар оснований, соответствующих амино-концу фрагмента Fc4 (5' GCACAGAGGC TCAGAAGCAA GTCCAGCTCT CCCGGGGCTG AAGGAGCCCA GATCTTCAGA 3'; SEQ ID NO:17; и олигонуклеотидный праймер, содержащий в себе 40 пар оснований на 3'-конце, соответствующие фланкирующей векторной последовательности, и 17 пар оснований, соответствующих карбоксильному концу фрагмента Fc4 (5' GGGGTGGGTA CAACCCCAGA GCTGTTTTAA TCTAGATTAT TTACCCGGAG ACAGGG 3'; SEQ ID NO:18). К 100 мкл конечного объема добавляли 10 нг матрицы Fc4, описанной выше, 10 мкл 10-кратного буфера для Taq-полимеразы (10x Taq polymerase Reaction Buffer,Perkin Elmer), 8мкл 2,5нМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTPs), 78 мкл дистиллированной

воды, по 2 мкл каждого из 20 мМ матричных растворов олигонуклеотидов и Taq-полимеразу (2,5 единиц, Life Technology). Добавляли равный объем минерального масла и реакционную смесь нагревали до 94°C в течение 2 мин с последующими 25 циклами при 94°C в течение 30 с, 65°C в течение 30 с, 72°C в течение 1 мин, с последующим удлинением в течение 5 мин при 72°C.

По 10 мкл из каждой из 100 мкл реакционных смесей ПЦР, описанных выше, прогоняли в 0,8% LMP-агарозном геле (Seaplague) с 1-кратным буфером TBE для анализа. Оставшиеся 90 мкл реакционной смеси ПЦР осаждали добавлением 5 мкл 1М хлорида натрия и 250 мкл абсолютного этанола. Плазмиду pZMP6 расщепляли SmaI для линеаризации ее в полилинкере. Плазмиду pZMP6 получали из pCZR199 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, ATCC#98668) и она представляет собой экспрессионный вектор, содержащий экспрессионную кассету, имеющую предранний промотор цитомегаловируса, общий типичный интрон локуса вариабельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, множественные сайты рестрикции для внедрения кодирующих последовательностей, стоп-кодон и терминатор гормона роста человека. Плазмида также имеет точку начала репликации E.coli, экспрессионную единицу селективного маркера млекопитающих, имеющую промотор SV40, энхансер и точку начала репликации, ген дигидрофолатредуктазы и терминатор SV40. Вектор pZMP6 конструировали из pCZR199 замещением металлотионеинового промотора на цитомегаловирусный предранний промотор и последовательность Kozac на 5'-конце открытой рамки считывания.

100 мкл компетентных дрожжевых клеток (S.cerevisiae) смешивали с 10 мкл, содержащими приблизительно 1 мкг внеклеточного домена TACI и ПЦР-фрагменты Fc4, и со 100 нг вектора pZMP6, переваренного SmaI, и переносили в 0,2 сантиметровую кювету для электропорации. Смеси дрожжи/ДНК подвергали электропульсации при 0,75 кВ (5 кВ/см), ∞ Ом, 25 мкФ. В каждую кювету добавляли 600 мкл 1,2 М сорбита и две аликвоты дрожжей по 300 мкл распределяли в двух чашках с URA-D и инкубировали при 30°C.

После приблизительно 48 ч дрожжевые трансформанты Ura+ из одной чашки ресуспендировали в 1 мл воды и короткое время центрифугировали для получения осадка дрожжевых клеток. Клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл лизисного буфера (2% Triton X-100, 1% додецилсульфат натрия (SDS), 100 мМ NaCl, 10 мМ Tris, pH 8,0, 1мМ ЭДТА). 500 мкл смеси для лизиса добавляли в пробирки Эппендорф, содержащие 300 мкл отмытых кислотой стеклянных шариков, и 200 мкл смеси фенол-хлороформ, дрожжевые клетки разрушали в вортексе в течение 1 мин с интервалами, два или три раза с последующим центрифугировнием в течение 5 мин в центрифуге Эппендорф на максимальных оборотах. Триста микролитров водной фазы переносили в чистую пробирку и ДНК осаждали 600 мкл этанола с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4°C. Осадок ДНК ресуспендировали в 100 мкл воды.

Трансформацию электрокомпетентных клеток E.coli (DH10B, GibcoBRL) осуществляли с использованием 0,5-2 мл начальной ДНК дрожжей и 40 мкл клеток DH10B. Клетки подвергали электропульсации при 2,0 кВ 25 мФ и 400 Ом. Вслед за электропорацией, 1 мл SOC (2% Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, Ml), 0,5% дрожжевой экстракт (Difco), 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10мМ $MgCl_2$, 10 мМ $MgSO_4$, 20 мМ глюкоза) вносили в аликвотных объемах по 250 мкл в четыре чашки, содержащие LB AMP (LB broth (Lennox), 1,8% Bacto-Agar (Difco), 100 мг/л ампициллина).

Индивидуальные клоны, скрывающие правильную экспрессионную конструкцию TACI-Fc4, идентифицировали рестрикционным перевариванием для подтверждения наличия инсерции и для подтверждения, что различные последовательности ДНК правильно соединились одни с другими. Вставки позитивных клонов подвергали анализу последовательностей. Крупные плазмидные ДНК выделяли с использованием набора Qiagen Maxi kit (Qiagen) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

C. Конструирование Fc5, Fc6 и Fc7

В Fc5 остаток Arg 218 по индексной позиции Европейского сообщества, заменили обратно на остаток Lys. Ig γ1 дикого типа человека содержит лизин в этом положении. Кратко, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие Fc5, получали с использованием олигонуклеотидных праймеров 5' GAGCCCA AATCTTCAGACAAAACTCACACATGCCCA 3'(SEQ ID NO:19) и 5' TAATTGGCGCGCCTCTAGAT-TATTTACCCGGAGACA 3'(SEQ ID NO:20). Условия ПЦР-амплификации были следующими. К 50 мкл конечного объема добавляли 236 нг матрицы Fc4, 5 мкл 10-кратного буфера для реакции Pfu (Stratagene), 4 мкл 2,5 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTPs), по 1 мкл 20 мкМ каждого олигонуклеотида и 1 мкл Pfu-полимеразы (2,5 единиц, Stratagene). Температурный профиль амплификации состоял из: 94°C в течение 2 мин, 5 циклов при 94°C в течение 15 с, 42°C в течение 20 с, 72°C в течение 45 с, 20 циклов при 94°C в течение 15 с, 72°C в течение 1 мин 20 с, с последующим удлинением в течение 7 мин при 72°C. Продукты реакции фракционировали методом электрофореза в агарозном геле, и обнаружили полосу, соответствующую прогнозированнному размеру около 718 пар нуклеотидов. Полосу вырезали из геля и восстанавливали с использованием набора QIAGEN QIAquickTM Gel Extraction Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Fc6 является идентичным Fc5 за исключением того, что карбоксиконцевой лизиновый кодон удалили. Как у Fc4 и Fc5, как указано выше, стоп-кодон в последовательности Fc6 изменили на TAA. Fc6 получали из ДНК-матрицы, которая кодирует Fc5 с использованием праймеров 5' GAGCCCAAAT

CTTCAGACAA AACTCACACA TGCCCA 3'(SEQ ID NO:19) и 5' GGCGCGCCTC TAGATTAACC CGGAGACAGG GAGAGGC 3' (SEQ ID NO:21).

Fc7 является идентичным Fc γ1 дикого типа за исключением замещения аминокислоты Asn в 297 положении по индексации Европейского сообщества, локализованной в CH_2-домене. Asn 297 заменили на остаток Gln для предотвращения присоединения N-концевого углевода в этом положении остатка. Как сказано выше, стоп-кодон в последовательности Fc7 заменили на TAA. Fc7 получили перекрыванием ПЦР, с использованием кДНК Fc IgGγl дикого типа человека в качестве матрицы и олигонуклеотидных праймеров 5’ GAGCCCAAATCTTGCGACAAAACTCACA 3' (SEQ ID NO:22) и 5' GTACGTGCT TTGGTACTGCTCCTCCCGCGGCTT 3' (SEQ ID NO:23) для 5'-участка Fc7 и олигонуклеотидных праймеров 5’ CAGTACCAAAGCACGTACCGTGTGGTCA 3' (SEQ ID NO:24) и 5' TAATTGGCGCGCCTCTA-GATTATTTACCCGGAGACA 3' (SEQ ID NO:20) для создания 3'-участка Fc7. Два ПЦР-продукта объединяли и амплифицировали с использованием олигонуклеоидных праймеров 5’ GAGCCCAAA TCTTGCGACAAAACTCACA 3' (SEQ ID NO:22) и 5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGA-GACA 3' (SEQ ID NO:20).

Все получающиеся в результате ПЦР продукты очищали в геле, клонировали и подтверждали анализом последовательности ДНК.

D. Конструирование амино-укороченных слитых белков TACI-Fc

Создали четыре аминоконцевых укороченных варианта TACI-Fc. Все четыре имели модифицированную сигнальную последовательность (SEQ ID NO:25) активатора плазминогена тканей человека слитую с аминокислотным остатком номер 30 SEQ ID NO:2. Однако, четыре белка, отличающиеся по положению точки, в которой Fc5 был слит с аминокислотной последовательностью TACI SEQ ID NO:2. Табл. 3 обрисовывает структуры четырех слитых белков.

Таблица 3. Слитые белки TACI

Наименование TACI-Fc	Аминокислотные остатки TACI
TACI(d1-29)-Fc5	с 30 по 154 SEQ ID NO:2
TACI(d1-29,d107-154)-Fc5	с 30 по 106 SEQ ID NO:2
TACI(d1-29,d111-154)-Fc5	с 30 по 110 SEQ ID NO:2
TACI(d1-29,d120-154)-Fc5	с 30 по 119 SEQ ID NO:2

Экспрессионные кассеты, кодирующие белки, создали методом перекрывания ПЦР с использованием стандартных методов (см., например, Horton et al., Gene 77:61 (1989)). Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TACI, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую Fc5, использовали в качестве матриц ПЦР. Олигонуклеотидные праймеры идентифицированы в табл. 4 и 5.

Таблица 4. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для получения слитых белков TACI

Наименование TACI-Fc	Наименование олигонуклеотидов			
	5'TACI	3'TACI	5'Fc5	3'Fc5
TACI(d1-29)-Fc5	ZC24,903	ZC24,955	ZC24,952	ZC24,946
TACI(d1-29,d107-154)-Fc5	ZC24,903	ZC24,951	ZC24,949	ZC24,946
TACI(d1-29,d111-154)-Fc5	ZC24,903	ZC28,978	ZC28,979	ZC24,946
TACI(d1-29,d120-154)-Fc5	ZC24,903	ZC28,981	ZC28,980	ZC24,946

Таблица 5. Олигонуклеотидные последовательности

Праймер	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO
ZC24,903	5 TATTAGGCCGGCCACCATGGATGCAATGA 3	40
ZC24,955	5 TGAAGATTTGGGCTCCTTGAGACCTGGGA 3	41
ZC24,952	5 TCCCAGGTCTCAAGGAGCCCAAATCTTCA 3	42
ZC24,946	5TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3	20
ZC24,951	5 TGAAGATTTGGGCTCGTTCTCACAGAAGTA 3	43
ZC24,949	5 ATACTTCTGTGAGAACGAGCCCAAATCTTCA 3	44
ZC28,978	5 TTTGGGCTCGCTCCTGAGCTTGTTCTCACA 3	45
ZC28,979	5 CTCAGGAGCGAGCCCAAATCTTCAGACA 3	46
ZC28,981	5 TTTGGGCTCCCTGAGCTCTGGTGGAA 3	47
ZC28,980	5 GAGCTCAGGGAGCCCAAATCTTCAGACA 3	48

Первый цикл амплификации с использованием ПЦР состоит из двух реакций для каждого из четырех аминоконцевых укороченных вариантов. Две реакции выполняли отдельно с использованием в одной реакции 5' и 3' олигонуклеотидов TACI и 5' и 3' олигонуклеотидов Fc5 в другой реакции для каждого варианта. Условия первого цикла ПЦР-амплификации были следующими. К 25 мкл конечного объема добавляли приблизительно 200 нг ДНК-матрицы, 2,5 мкл 10-кратного буфера для реакции Pfu (Stratagene), 2мкл 2,5 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTPs), по 0,5 мкл 20 мкМ каждого 5' олигонуклеотида и 3' олигонуклеотида и 0,5мкл Pfu-полимеразы (2,5 единиц, Stratagene). Температурный профиль амплификации состоял из: 94°C в течение 3 мин, 35 циклов при 94°C в течение 15 с, 50°C в течение 15 с, 72°C в течение 2 мин, с последующим удлинением в течение 2 мин при 72°C. Продукты реакции фракционировали методом электрофореза в агарозном геле и полосы, соответствующие прогнозированным размерам, вырезали из геля и восстанавливали с использованием набора QIAGEN QIAQUICK Gel Extraction Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Второй цикл ПЦР-амплификации, или ПЦР-амплификация реакций с перекрытием, выполняли с использованием фрагментов, очищенных в геле, после первого цикла ПЦР в качестве ДНК-матрицы. Условия второго цикла ПЦР-амплификации были следующими. К 25 мкл конечного объема добавляли приблизительно 10 нг ДНК-матрицы каждого из фрагментов TACI и фрагментов Fc5, 2,5 мкл 10-кратного буфера для реакции Pfu (Stratagene), 2мкл 2,5 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTPs), 0,5 мкл 20 мкМ каждого ZC24,903 (SEQ ID NO:40) и ZC24,946 (SEQ ID NO:20) и 0,5мкл Pfu-полимеразы (2,5 единиц, Stratagene). Температурный профиль амплификации состоял из: 94°C в течение 1 мин, 35 циклов при 94°C в течение 15 с, 55°C в течение 15 с, 72°C в течение 2 мин, с последующим удлинением в течение 2 мин при 72°C. Продукты реакции фракционировали методом электрофореза в агарозном геле, и полосы, соответствующие прогнозированным размерам, вырезали из геля и восстанавливали с использованием набора QIAGEN QIAQUICK Gel Extraction Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Каждый из четырех вариантов ПЦР-продуктов TACI-Fc с укороченным аминоконцом отдельно клонировали с использованием набора Invitrogen's ZEROBLUNT TOPO PCR Cloning Kit, следуя рекомендательному протоколу фирмы-изготовителя. Таблица 6 идентифицирует нуклеотидные и аминокислотные последовательности конструкций TACI-Fc.

Таблица 6. Последовательности вариантов TACI-Fc

Наименование TACI-Fc	Номера SEQ ID	
	Нуклеотиды	Аминокислоты
TACI(d1-29)-Fc5	49	50
TACI(d1-29,d107-154)-Fc5	51	52
TACI(d1-29,d111-154)-Fc5	53	54
TACI(d1-29,d120-154)-Fc5	55	56

После проверки нуклеотидных последовательностей, плазмиды, содержащие каждый из четырех вариантов, слитые TACI-Fc с укороченными аминоконцами, переваривали Fsel и Ascl для высвобождения амнокислотных кодирующих участков. Фрагменты Fsel-Ascl лигировали внутрь экспрессионного вектора млекопитающих, содержащего промотор CMV и поли-А участок SV40. Экспрессионные векторы встраивали в клетки яичника китайского хомячка как описано ниже.

Пример 2. Производство белков TACI-Fc клетками яичника китайского хомячка.

Экспрессионные конструкции TACI-Fc использовали для трансфекции, посредством электропорации, суспензионно-адаптированных клеток яичников китайского хомячка (CHO) DG44, выращенных в среде для клеток животных, не содержащих белки (Urlaub et al., Som. Cell. Molec. Genet. 72:555 (1986)). В клетках CHO DG44 отсутствует функциональный ген дигидрофолатредуктазы вследствие делеций в обоих местах дигидрофолатредуктазы в хромосомах. Рост клеток в присутствии возрастающих концентраций метотрексата дает в результате амплификацию гена дигидрофолатредуктазы и связанный ген, кодирующий рекомбинантный белок, работающий в экспрессионной конструкции.

Клетки CHO DG44 переносили на среду PFCHO (JRH Biosciences, Lenexa, KS) с добавлением 4 мМ L-глутамина (JRH Biosciences) и 1x гипотанаксинтимидин (Life Technologies) и клетки инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в качалочных колбах Corning при 120 об./мин на ротационно-встряхивающей платформе. Клетки раздельно подвергали трансфекции линеаризированными экспрессионными плазмидами. Для обеспечения стерильности однократное осаждение этанолом проводили на льду в течение 25 мин соединением 200 мкг плазмидной ДНК в пробирке Эппендорф с 20 мкл изолированной спермы лосося, несущей ДНК (5' → 3' inc.Boulder, CO, 10 мг/мл), 22 мкл 3M NaOAc (pH 5,2) и 484 мкл 100% этанола (Gold Shield Chemical Co., Hayward, CA). После инкубации пробирку центрифугировали при 14 000 об/мин в микроцентрифуге, помещенной в холодную комнату при 4°C, супернатант удаляли, а осадок промывали дважды 0,5 мл 70% этанола и высушивали на воздухе.

В то время как осадок ДНК подсыхал, готовили клетки CHO DG44 центрифугированием 10^6 суммарных клеток (16,5 мл) в 25 мл конических центрифужных пробирках при 900 об./мин в течение 5 мин. Клетки CHO DG44 ресуспендировали в суммарном объеме 300 мкл ростовой среды PFCHO и помещали в кювету Gene-Pulser Cuvette с 0,4 см электродной щелью (Bio-Rad). После приблизительно 50 мин времени подсыхания ДНК ресуспендировали в 500 мкл ростовой среды PFCHO и добавляли к клеткам в кювету так, что суммарный объем не превышал 800 мкл, и позволяли находиться при комнатной температуре в течение 5 мин для уменьшения образования пузырьков. Кювету помещали в аппарат BioRad Gene Pulser II при 0,296 кВ (киловольт) и 0,950 высокой емкости и немедленно подвергали электропорации.

Клетки инкубировали 5 мин при комнатной температуре перед помещением в суммарный объем 20 мл среды PFCHO в колбе CoStar T-75. Колбу помещали при 37°C и 5% CO_2 в течение 48 ч, затем клетки подсчитывали с использованием гемоцитометра, использующего высвобождение трипанового синего, и помещали в селекционную среду PFCHO без добавки гипотанаксинтимидина и содержащую 200 мМ метотрексата (CalBiochem).

После восстановления процесса селекции с метотрексатом приспособленную среду, содержащую секретированные белки TACI-Fc, проверяли анализом Western Blot.

Пример 3. Структурный анализ белков TACI-Fc.

В определенных случаях слитые белки TACI-Fc частично очищали перед анализом. Кондиционированную среду из-под культуры клеток яичника китайского хомячка стерилизовали фильтрацией через 0,22мкм фильтр и белок TACI-Fc наносили на колонку с протеином A. Материал, связавшийся с протеином A, элюировали и пропускали через гель-фильтрационную колонку S-200 для конечной очистки.

Western Blot-анализ проводили как с кондиционированной клеточной средой, так и с очищенным белком для оценки структурной стабильности белков TACI-Fc. Кратко, образцы белка или супернатанта переносили на нитроцеллюлозные мембраны и детектировали белки TACI-Fc с использованием козьих антимышиных IgG2a, конъюгированных с пероксидазой (Boehringer Mannheim), или с использованием козьих антител, связанных с пероксидазой, против специфической IgG Fc антисыворотки человека (Pierce).

Анализы аминоконцевых аминокислотных последовательностей проводили с использванием системы для сиквенса белков Models 476A и 494 Protein Sequencer Systems, Perkin Elmer Applied Biosystems Division (Foster City, CA). Результаты анализа обрабатывали с помощью Applied Biosystems Model 610A Data Analysis System for Protein Sequencing, version 2.1a (Applied Biosystems, Inc). Большая часть использованных приспособлений и реактивов была от Applied Biosystems, Inc.

Пример 4. Функциональный анализ белков TACI-Fc.

Для оценки характеристик связывания четырех белков TACI-Fc с ZTNF4 использовали два подхода. Первым подходом измеряли способность конструкций TACI-Fc к конкуренции на чашках, покрытых TACI за связывание ZTNF4, меченого ^{125}I. Во втором подходе инкубировали возрастающие концентрации ZTNF4, меченого ^{125}I, с каждой из конструкций TACI-Fc и определяли радиоактивность, связанную с осажденными комплексами ZTNF4-TACI-Fc. Слитые белки TACI-Fc имели фрагменты TACI, которые не содержали 29 первых аминокислотных остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2. Один из слитых белков имел фрагмент TACI с интактной стволовой областью (TACI(d1-29)-Fc5), тогда как три из слитых белков TACI-Fc имели фрагменты с различными делециями в стволовой области (TACI(d1-29,d107-154)-Fc5; TACI(d1-29,d111-154)-Fc5; TACI(d1-29,d120-154)-Fc5).

A. Конкурентный анализ связывания

ZTNF4 йодировали радиоактивным йодом с использованием lodobeads (Pierce), следуя стандартным способам. Кратко, 50 мкг ZTNF4 йодировали 4 мКи ^{125}I с использованием одноразовых шариков lodobead. Реакционную смесь гасили 0,25% раствором бычьего сывороточного альбумина, а свободный ^{125}I удаляли

гель-фильтрацией с использованием колонки PD-10 (Pierce). Специфическую активность препаратов ^{125}I-ZTNF4 определяли осаждением трихлоруксусной кислотой до и после стадии обессоливания.

N-концевой фрагмент рецептора TACI, обозначенный как «TACI-N», вносили в 96-луночные планшеты (по 100 мкл при 0,1 мкг/мл) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты отмывали, блокировали буфером SuperBlock (Pierce) и снова промывали. Конструкции TACI-Fc в различных концентрациях в диапазоне от 0 до 11,5 нг/мл, смешивали с фиксированной концентрацией ^{125}I-ZTNF4 (20 нг/мл) и инкубировали в течение 2 ч при 37°C на планшете, покрытом TACI-N. Контроли содержали или TACI-N в растворе, или не содержали TACI-Fc. После инкубации планшеты отмывали и просчитывали. Каждое определение готовили в трехкратной повторности.

Результаты показали, что все конструкции TACI-Fc полностью ингибировали связывание ^{125}I-ZTNF4 в концентрациях около 100 нг/мл или выше. Белки TACI-Fc, TACI(d1-29)-Fc5, TACI(d1-29,d111-154)-Fc5 и TACI(d1-29,d120-154)-Fc5 были более эффективными ингибиторами, чем конструкция TACI-Fc TACI(d1-29,d107-154)-Fc5. Сам фрагмент Fc не ингибировал связывание. Значения IC_{50} подсчитывали для каждой конструкции в трех экспериментах. Средние значения для конструкций составляли: TACI(d1-29)-Fc5 : 2,07 нМ; TACI(d1-29,d107-154)-Fc5:4,95НМ; TACI(d1-29,d111-154)-Fc5: 2,31 нМ; и TACI(d1-29,d120-154)-Fc5:2,21 нМ.

B. Анализ связывания в растворе

Каждую конструкцию TACI-Fc концентрации 0,05 нМ инкубировали с от 0,4 пкМ до 1,5 нМ ^{125}I-ZTNF4 в течение 30 мин при комнатной температуре в суммарном объеме 0,25 мл/пробирку. В каждую пробирку добавляли суспензию Pansorbin (Staph A) и после 15 мин образцы центрифугировали, дважды промывали и осадки просчитывали. Неспецифическое связывание определяли добавлением 130 нМ немеченого ZTNF4 к смеси ^{125}I-ZTNF4/TACI-Fc. Специфическое связывание определяли вычитанием связанных импульсов/минуту (cpm) в присутствие немеченного ZTNF4 из общего значения связанных имп/мин (cpm) при каждой концентрации ^{125}I-ZTNF4. Каждое определение проводили в трехкратной повторности. Константы связывания рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism software (Macintosh v.3.0).

Фиг. 4 иллюстрирует специфическое связывание ^{125}I-ZTNF4 с различными конструкциями TACI-Fc. Связывание обнаруживали при приближении насыщения каждой конструкцией и было существенно выше для конструкций TACI(d1-29)-Fc5, TACI(d1-29,d111-154)-Fc5, TACI(d1-29,d120-154)-Fc5 по сравнению со связыванием TACI(d1-29,d107-154)-Fc5. Рассчитывали значения максимального связывание (B_{max}) и константу диссоциации (K_d), и результаты суммировали в табл. 7.

Таблица 7. Связывание ^{125}I-ZTNF4 с конструкциями TACI-Fc

Конструкция TACI-Fc	K_d (нМ)	B_{max} (нМ)
TACI(d1-29)-Fc5	0,134	0,023
TACI(d1-29,d107-154)-Fc5	0,121	0,010
TACI(d1-29,d111-154)-Fc5	0,115	0,018
TACI(d1-29,d120-154)-Fc5	0,092	0,021

Пример 5. Определение циркулирующего ZTNF4.

Уровни ZTNF4 у индивидуумов с болезненными состояниями (такими как, например, системная красная волчанка, ревматоидный артрит) по отношению к нормальным индивидуумам определяли с использованием метода электрохемолюминесценции. Стандартную кривую, приготовленную из растворимого ZTNF4 человека в концентрациях 10 нг/мл, 1 нг/мл, 0,1 нг/мл, 0,01 нг/мл и 0 нг/мл, готовили в буфере ORIGIN (Igen, Gaithersburg, MD). Образцы сыворотки разводили в буфере ORIGIN. Стандарты и образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч с биотинилированными кроличьими антителами против ZTNF4-NF BV человека, разведенными до 1 мкг/мл в буфере Origin Assay Buffer (IGEN), и рутенилированными поликлональными кроличьими антителами против ZTNF4-NF BV человека, разведенными до 1 мкг/мл в буфере Origin Assay Buffer (IGEN). После инкубации образцы встряхивали и к каждому образцу и каждому стандарту добавляли 0,4 мг/мл покрытых стрептавидином шариков (streptavidin Dynabeads, Dynal, Oslo, Norway) при 50 мкл/пробирку и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Образцы встряхивали и образцы просчитывали на анализаторе Origin Analyzer (Igen) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Origin-анализ основан на электрохемолюминесценции и производит вывод результатов в ECL. В исследовании измеряли уровень возбуждения ZTNF4 в образцах сыворотки мышей как NZBWF1/J, так и MRL/Mpj-Fas^{lpr}, который прогрессировал в развитых стадиях гломерулонефрита и аутиммунном заболевании.

ORIGIN ASSAY использовали также для определения уровней ZTNF4 в крови пациентов с системной красной волчанкой относительно циркулирующих уровней у здоровых индивидуумов. Калибровочную кривую готовили из растворимого ZTNF4 человека при 10 нг/мл, 1 нг/мл, 0,1 нг/мл, 0,01 нг/мл и 0

нг/мл в буфере ORIGIN (Igen). Все образцы пациентов вели в трехкратной повторности с конечным объемом 25 мкл. Стандарты и образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч с захватывающими антителами, биотинилированными кроличьими поликлональными антителами против ZTNF4-NF BV человека, разведенными до 1 мкг/мл в буфере Origin Assay Buffer (IGEN) и антителами для детекции, рутенилированными кроличьими поликлональными антителами против ZTNF4-NF BV человека, разведенными до 1 мкг/мл в буфере Origin Assay Buffer (IGEN). Вслед за инкубацией образцы встряхивали и добавляли 0,4 мг/мл шариков, покрытых стрептавидином (streptavidin Dynabeads, Dynal), в каждый стандарт и в каждый образец при 50 мкл/пробирку и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Образцы встряхивали и образцы анализировали с использованием анализатора Origin 1,5 Analyzer (Igen) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Анализ включал 28 нормальных контрольных образцов и образцы от 20 пациентов с диагнозом системная красная волчанка (SLE). Повышенные уровни ZTNF4 наблюдали в сыворотке пациентов с диагнозом SLE по сравнению с сывороткой здоровых контрольных доноров. Уровни ZTNF4 рассчитывали в виде кратного увеличения уровней ZTNF4 в образцах пациента или в контрольных образцах по сравнению с произвольным контрольным образцом сыворотки человека. Среднее значение 28 контрольных образцов в 1,36 раза превышало контрольный образец человека и среднее значение 20 образцов пациентов с SLE составляло 4,92. Семеро из 20 пациентов с SLE имели уровни ZTNF4, которые были в два раза выше среднего значения контрольных образцов, несмотря на то, что существовал только один контрольный индивидуум, который имел более, чем двукратное превышение над средним значением в контроле.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Rixon, Mark W.
Gross, Jane A.

<120> слитые белки TACI-иммуноглобулина

<130> 01-20PC

<140> PCT/US02/15910
<141> 2002-05-20

<150> 60/293,343
<151> 2001-05-24

<160> 70

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0.

<210> 1
<211> 1377
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (14)...(892)

<400> 1

```
agcatcctga gta atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg    49
               Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg
                1               5                  10

agc cgt gtg gac cag gag gag cgc ttt cca cag ggc ctg tgg acg ggg   97
Ser Arg Val Asp Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly
        15                  20                  25

gtg gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag tac tgg gat cct ctg ctg   145
Val Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu
    30                  35                  40

ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc aac cat cag agc cag cgc   193
Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg
 45                  50                  55                  60

acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc   241
Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly
                65                  70                  75

aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc   289
Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile
            80                  85                  90

tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc   337
```

```
Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu
         95                 100                 105

agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga   385
Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly
    110                 115                 120

gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag   433
Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu
125                 130                 135                 140

cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt   481
His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser
                145                 150                 155

gca gat cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt   529
Ala Asp Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys
            160                 165                 170

gcc gtc ctc tgc tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag   577
Ala Val Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys
        175                 180                 185

agg ggg gat ccc tgc tcc tgc cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt   625
Arg Gly Asp Pro Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser
    190                 195                 200

ccg gcc aag tct tcc cag gat cac gcg atg gaa gcc ggc agc cct gtg   673
Pro Ala Lys Ser Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val
205                 210                 215                 220

agc aca tcc ccc gag cca gtg gag acc tgc agc ttc tgc ttc cct gag   721
Ser Thr Ser Pro Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu
                225                 230                 235

tgc agg gcg ccc acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac   769
Cys Arg Ala Pro Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp
            240                 245                 250

ccc act tgt gct gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg   817
Pro Thr Cys Ala Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu
        255                 260                 265

cag cct tgc cca cac atc cca gac agt ggc ctt ggc att gtg tgt gtg   865
Gln Pro Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val
    270                 275                 280

cct gcc cag gag ggg ggc cca ggt gca taaatggggg tcagggaggg         912
Pro Ala Gln Glu Gly Gly Pro Gly Ala
285                 290

aaaggaggag ggagagagat ggagaggagg ggagagagaa agagaggtgg ggagagggga 972
gagagatatg aggagagaga gacagaggag gcagaaaggg agagaaacag aggagacaga 1032
gagggagaga gagacagagg gagagagaga cagaggggaa gagaggcaga gagggaaaga 1092
ggcagagaag gaaagagaca ggcagagaag gagagaggca gagagggaga gaggcagaga 1152
gggagagagg cagagagaca gagagggaga gagggacaga gagagataga gcaggaggtc 1212
ggggcactct gagtcccagt tcccagtgca gctgtaggtc gtcatcacct aaccacacgt 1272
```

gcaataaagt cctcgtgcct gctgctcaca gcccccgaga gcccctcctc ctggagaata 1332
aaacctttgg cagctgccct tcctcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1377

<210> 2
<211> 293
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
1 5 10 15
Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
20 25 30
Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
35 40 45
Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
50 55 60
Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
65 70 75 80
His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
85 90 95
Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
100 105 110
Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn
115 120 125
Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser
130 135 140
Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val
145 150 155 160
Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys
165 170 175
Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro
180 185 190
Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser
195 200 205
Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro
210 215 220
Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg Ala Pro
225 230 235 240
Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr Cys Ala
245 250 255
Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro
260 265 270
His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu
275 280 285
Gly Gly Pro Gly Ala
290

<210> 3
<211> 285
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
1 5 10 15

```
Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
            20                  25                  30
Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
        35                  40                  45
Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
    50                  55                  60
Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
65                  70                  75                  80
Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
                85                  90                  95
Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
            100                 105                 110
Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
        115                 120                 125
Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
    130                 135                 140
Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
145                 150                 155                 160
Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser
                165                 170                 175
Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
            180                 185                 190
Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
        195                 200                 205
Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
    210                 215                 220
Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
225                 230                 235                 240
Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly
                245                 250                 255
Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu
            260                 265                 270
Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
        275                 280                 285
```

<210> 4
<211> 250
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5
<211> 762
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (7)...(759)

<400> 5

```
ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc    48
       Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
        1               5                  10

aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc    96
Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 15                  20                  25                  30

cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc   144
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
                 35                  40                  45

ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag   192
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
             50                  55                  60

gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag   240
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
         65                  70                  75

ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag   288
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
     80                  85                  90

ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc   336
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 95                 100                 105                 110

  acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag   384
  Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
                 115                 120                 125

  gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa   432
  Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
             130                 135                 140

  gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc   480
  Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
         145                 150                 155

  cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa   528
  Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
     160                 165                 170

  ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag   576
  Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 175                 180                 185                 190

  ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc   624
  Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
                 195                 200                 205

  tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag   672
  Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
             210                 215                 220

  cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac   720
  Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
         225                 230                 235

  cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga           762
  His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
     240                 245                 250
```

<210> 6
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15
Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
20 25 30
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
35 40 45
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
50 55 60
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
65 70 75 80
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
85 90 95
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
100 105 110
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
115 120 125
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
130 135 140
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
145 150 155 160
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
165 170 175
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
180 185 190
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
195 200 205
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
210 215 220
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
225 230 235 240
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245 250

<210> 7
<211> 44
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 7
atcagcggaa ttcagatctt cagacaaaac tcacacatgc ccac 44

<210> 8
<211> 35
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 8
ggcagtctct agatcattta cccggagaca gggag 35

<210> 9
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 9
ccgtgcccag cacctgaagc cgaggggga ccgtcagtct tcctcttccc c 51

<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 10
ggattctaga ttatttaccc ggagacaggg a 31

<210> 11
<211> 55
<212> DNA
<213> Homo sapiens .

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 11
ggtggcggct cccagatggg tcctgtccga gcccagatct tcagacaaaa ctcac 55

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 12
tgggagggct ttgttgga 18

<210> 13
<211> 42
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 13
tccaacaaag ccctcccatc ctccatcgag aaaaccatct cc 42

<210> 14
<211> 57
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 14
ggatggatcc atgaagcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcggctc ccagatg 57

<210> 15
<211> 59
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 15
ctcagccagg aaatccatgc cgagttgaga cgcttccgta gaatgagtgg cctgggccg 59

<210> 16
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 16
gcatgtgtga gttttgtctg aagatctggg ctccttcagc cccgggag 48

<210> 17
<211> 60
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 17
gcacagaggc tcagaagcaa gtccagctct cccggggctg aaggagccca gatcttcaga 60

<210> 18
<211> 56
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 18
ggggtgggta caaccccaga gctgttttaa tctagattat ttacccggag acaggg 56

<210> 19
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 19
gagcccaaat cttcagacaa aactcacaca tgccca 36

<210> 20
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 20
taattggcgc gcctctagat tatttacccg gagaca 36

<210> 21
<211> 37
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 21
ggcgcgcctc tagattaacc cggagacagg gagaggc 37

<210> 22
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 22
gagcccaaat cttgcgacaa aactcaca 28

<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 23
gtacgtgctt tggtactgct cctcccgcgg ctt 33

<210> 24
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 24
cagtaccaaa gcacgtaccg tgtggtca 28

<210> 25
<211> 35
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Оптимизированная лидерная последовательность tPA

<400> 25

Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5				10					15		
Ala	Val	Phe	Val	Ser	Leu	Ser	Gln	Glu	Ile	His	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg
			20					25				30			
Phe	Arg	Arg													
		35													

<210> 26
<211> 995
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (219)...(770)

<400> 26
aagactcaaa cttagaaact tgaattagat gtggtattca aatccttacg tgccgcgaag 60
acacagacag cccccgtaag aacccacgaa gcaggcgaag ttcattgttc tcaacattct 120
agctgctctt gctgcatttg ctctggaatt cttgtagaga tattacttgt ccttccaggc 180
tgttctttct gtagctccct tgttttcttt ttgtgatc atg ttg cag atg gct ggg 236
Met Leu Gln Met Ala Gly
1 5

cag tgc tcc caa aat gaa tat ttt gac agt ttg ttg cat gct tgc ata 284
Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile
10 15 20

cct tgt caa ctt cga tgt tct tct aat act cct cct cta aca tgt cag 332
Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro Pro Leu Thr Cys Gln
25 30 35

cgt tat tgt aat gca agt gtg acc aat tca gtg aaa gga acg aat gcg 380
Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val Lys Gly Thr Asn Ala
40 45 50

att ctc tgg acc tgt ttg gga ctg agc tta ata att tct ttg gca gtt 428
Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Val
55 60 65 70

ttc gtg cta atg ttt ttg cta agg aag ata agc tct gaa cca tta aag 476
Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile Ser Ser Glu Pro Leu Lys
75 80 85

gac gag ttt aaa aac aca gga tca ggt ctc ctg ggc atg gct aac att 524
Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu Leu Gly Met Ala Asn Ile
90 95 100

gac ctg gaa aag agc agg act ggt gat gaa att att ctt ccg aga ggc 572
Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu Ile Ile Leu Pro Arg Gly
105 110 115

ctc gag tac acg gtg gaa gaa tgc acc tgt gaa gac tgc atc aag agc 620
Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys Glu Asp Cys Ile Lys Ser
120 125 130
aaa ccg aag gtc gac tct gac cat tgc ttt cca ctc cca gct atg gag 668
Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe Pro Leu Pro Ala Met Glu
135 140 145 150

gaa ggc gca acc att ctt gtc acc acg aaa acg aat gac tat tgc aag 716
Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys Thr Asn Asp Tyr Cys Lys
155 160 165

agc ctg cca gct gct ttg agt gct acg gag ata gag aaa tca att tct 764
Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu Ile Glu Lys Ser Ile Ser
170 175 180

gct agg taattaacca tttcgactcg agcagtgcca ctttaaaaat cttttgtcag 820
Ala Arg

aatagatgat gtgtcagatc tctttaggat gactgtattt ttcagttgcc gatacagctt 880
tttgtcctct aactgtggaa actctttatg ttagatatat ttctctaggt tactgttggg 940
agcttaatgg tagaaacttc cttggtttca tgattaaagt ctttttttt cctga 995

<210> 27
<211> 184
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

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

<210> 28
<211> 762
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (7)...(759)

<400> 28

```
ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc    48
       Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
        1               5                  10

aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aga tct tca gac aaa act cac aca tgc    96
Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 15                  20                  25                  30

cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc   144
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
                 35                  40                  45

ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag   192
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
            50                  55                  60

gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag   240
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
        65                  70                  75

ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag   288
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
    80                  85                  90

ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc   336
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 95                 100                 105                 110

acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag   384
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
                115                 120                 125

gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa   432
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
            130                 135                 140

gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc   480
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
        145                 150                 155

cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa   528
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
    160                 165                 170

ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag   576
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
175                 180                 185                 190

ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc   624
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
                195                 200                 205
```

```
tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag   672
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
            210                 215                 220

cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac   720
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
        225                 230                 235

cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga           762
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    240             245                 250
```

<210> 29
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

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

<210> 30
<211> 762
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (7)...(759)
<223> Модифицированный иммуноглобулиновый фрагмент

<400> 30

```
ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc    48
       Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
        1               5                  10

aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aga tct tca gac aaa act cac aca tgc    96
Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 15                  20                  25                  30

cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc   144
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
                 35                  40                  45

ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag   192
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
            50                  55                  60

gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag   240
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
        65                  70                  75

ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag   288
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
    80                  85                  90

ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc   336
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 95                 100                 105                 110

acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag   384
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
                115                 120                 125

gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa   432
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
            130                 135                 140

gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc   480
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
        145                 150                 155

cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa   528
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
    160                 165                 170

ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag   576
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
175                 180                 185                 190

ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc   624
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
```

```
                195                 200                 205

tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag   672
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
            210                 215                 220

cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac   720
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
        225                 230                 235

cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga           762
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    240                 245                 250
```

<210> 31
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

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

<210> 32
<211> 762

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (7)...(759)
<223> Модифицированный иммуноглобулиновый фрагмент

<400> 32

```
ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc    48
       Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
        1               5                  10

aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc    96
Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 15                  20                  25                  30

cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc   144
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
                35                  40                  45

ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag   192
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
            50                  55                  60

gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag   240
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
        65                  70                  75

ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag   288
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
    80                  85                  90

ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc   336
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 95                 100                 105                 110

acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag   384
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
                115                 120                 125

gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa   432
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
            130                 135                 140

gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc   480
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
        145                 150                 155

cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa   528
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
    160                 165                 170

ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag   576
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
175                 180                 185                 190
```

```
  ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc   624
  Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
                  195                 200                 205

  tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag   672
  Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
              210                 215                 220

  cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac   720
  Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
          225                 230                 235

  cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga           762
  His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      240                 245                 250
<210> 33
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1               5                  10                  15
Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
            20                  25                  30
Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
        35                  40                  45
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
    50                  55                  60
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
65                  70                  75                  80
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
                85                  90                  95
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
            100                 105                 110
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
        115                 120                 125
Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
    130                 135                 140
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
145                 150                 155                 160
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
                165                 170                 175
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
            180                 185                 190
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
        195                 200                 205
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
    210                 215                 220
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
225                 230                 235                 240
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                245                 250
```

<210> 34
<211> 759
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (7)...(756)
<223> Модифицированный иммуноглобулиновый фрагмент

<400> 34

```
ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc    48
       Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
        1               5                  10

aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc    96
Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 15                  20                  25                  30

cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc   144
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
                35                  40                  45

ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag   192
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
            50                  55                  60

gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag   240
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
         65                  70                  75

ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag   288
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
     80                  85                  90

ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc   336
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 95                 100                 105                 110

acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag   384
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
                115                 120                 125

gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa   432
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
            130                 135                 140

gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc   480
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
        145                 150                 155

cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa   528
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
    160                 165                 170

ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag   576
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
```

```
175                 180                 185                 190

ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc   624
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
                195                 200                 205

tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag   672
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
            210                 215                 220

cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac   720
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
        225                 230                 235

cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt tga               759
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    240                 245                 250
```

<210> 35
<211> 250
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

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

<210> 36
<211> 762
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (7)...(759)
<223> Модифицированный иммуноглобулиновый фрагмент

<400> 36

```
ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc    48
       Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
        1               5                  10

aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tgc gac aaa act cac aca tgc    96
Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 15                  20                  25                  30

cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc   144
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
                35                  40                  45

ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag   192
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
            50                  55                  60

gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag   240
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
         65                  70                  75

ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag   288
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
     80                  85                  90

ccg cgg gag gag cag tac caa agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc   336
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 95                  100                 105                 110

acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag   384
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
                115                 120                 125

gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa   432
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
            130                 135                 140

gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc   480
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
        145                 150                 155

cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa   528
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
    160                 165                 170
```

```
ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag   576
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
175                 180                 185                 190

ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc   624
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
                195                 200                 205

tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag   672
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
            210                 215                 220

cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac   720
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
        225                 230                 235

cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga           762
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    240                 245                 250
```

<210> 37
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

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

<210> 38
<211> 762
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (7)...(759)
<223> Модифицированный иммуноглобулиновый фрагмент

<400> 38

```
ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc    48
       Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
        1               5                  10

aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc    96
Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 15                  20                  25                  30

cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc   144
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
                 35                  40                  45

ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag   192
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
             50                  55                  60

gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag   240
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
         65                  70                  75

ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag   288
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
     80                  85                  90

ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc   336
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 95                 100                 105                 110

acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag   384
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
                115                 120                 125

gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa   432
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
            130                 135                 140

gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc   480
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
        145                 150                 155

cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa   528
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
```

```
    160                 165                 170

ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag   576
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
175                 180                 185                 190

ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc   624
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
                195                 200                 205

tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag   672
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
            210                 215                 220

cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac   720
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
        225                 230                 235

cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga           762
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    240                 245                 250
   <210> 39
   <211> 251
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

   <400> 39
   Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
    1               5                  10                  15
   Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
                20                  25                  30
   Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
            35                  40                  45
   Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
        50                  55                  60
   Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
   65                  70                  75                  80
   Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
                    85                  90                  95
   Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
                100                 105                 110
   Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
            115                 120                 125
   Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
        130                 135                 140
   Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
   145                 150                 155                 160
   Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
                    165                 170                 175
   Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
                180                 185                 190
   Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
            195                 200                 205
   Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
        210                 215                 220
    Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
    225                 230                 235                 240
    Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                    245                 250
```

<210> 40
<211> 29
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 40
tattaggccg gccaccatgg atgcaatga 29

<210> 41
<211> 29
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 41
tgaagatttg ggctccttga gacctggga 29

<210> 42
<211> 29
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 42
tcccaggtct caaggagccc aaatcttca 29

<210> 43
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 43
tgaagatttg ggctcgttct cacagaagta 30

<210> 44
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 44
atacttctgt gagaacgagc ccaaatcttc a 31

<210> 45
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 45
tttgggctcg ctcctgagct tgttctcaca 30

<210> 46
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 46
ctcaggagcg agcccaaatc ttcagaca 28

<210> 47
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 47
tttgggctcc ctgagctctg gtggaa 26

<210> 48
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 48
gagctcaggg agcccaaatc ttcagaca 28

<210> 49
<211> 1214
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (17)...(1192)
<223> Кодирующая последовательность для слитого белка

<400> 49

```
tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg 52
                  Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
                   1               5                  10

ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc  100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
         15                  20                  25

gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag  148
Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
     30                  35                  40

tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc  196
Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
 45                  50                  55                  60

aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc  244
Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
                 65                  70                  75

tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc  292
Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
             80                  85                  90

atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac  340
Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
         95                  100                 105

ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc  388
Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu
    110                 115                 120

agg aga cag cgg agt gga gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga  436
Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly
125                 130                 135                 140

agg tac caa gga ttg gag cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc  484
Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu
                145                 150                 155

cca ggt ctc aag gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca  532
Pro Gly Leu Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
            160                 165                 170

ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc  580
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
        175                 180                 185

ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc  628
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
    190                 195                 200

aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc  676
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
205                 210                 215                 220
```

```
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg   724
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
                225                 230                 235

cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc   772
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
            240                 245                 250

gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc   820
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
        255                 260                 265

tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc   868
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
    270                 275                 280

aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg   916
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
285                 290                 295                 300

gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc   964
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
                305                 310                 315

ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg   1012
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
            320                 325                 330

gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc   1060
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
        335                 340                 345

ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag   1108
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
    350                 355                 360

ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac   1156
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
365                 370                 375                 380

tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taatctagag        1202
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                385                 390

gcgcgccaat ta                                                    1214

<210> 50
<211> 392
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1               5                  10                  15
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
            20                  25                  30
```

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

<210> 51
<211> 1070
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (17)...(1048)
<223> Кодирующая последовательность для слитого белка

<400> 51

```
tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg 52
                  Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
                   1               5                  10

ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc  100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
         15                  20                  25

gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag  148
Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
     30                  35                  40

tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc  196
Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
 45                  50                  55                  60

aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc  244
Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
                 65                  70                  75

tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc  292
Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
             80                  85                  90

atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac  340
Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
         95                  100                 105

ttc tgt gag aac gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca  388
Phe Cys Glu Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
    110                 115                 120

ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc  436
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
125                 130                 135                 140

ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc  484
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
                145                 150                 155

aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc  532
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
            160                 165                 170

aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg  580
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
        175                 180                 185

cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc  628
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
    190                 195                 200

gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc  676
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
205                 210                 215                 220
```

```
tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc   724
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
                225                 230                 235

aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg   772
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
            240                 245                 250

gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc   820
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
        255                 260                 265

ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg   868
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
    270                 275                 280

gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc   916
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
285                 290                 295                 300

ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag   964
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
                305                 310                 315

ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac   1012
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
            320                 325                 330

tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taatctagag        1058
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        335                 340

gcgcgccaat ta                                                    1070

<210> 52
<211> 344
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1               5                  10                  15
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
            20                  25                  30
Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro
        35                  40                  45
Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
    50                  55                  60
Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
65                  70                  75                  80
Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
                85                  90                  95
Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
            100                 105                 110
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
        115                 120                 125
```

```
Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
    130                 135                 140
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
145                 150                 155                 160
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
                165                 170                 175
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
            180                 185                 190
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
        195                 200                 205
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
    210                 215                 220
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
225                 230                 235                 240
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
                245                 250                 255
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
            260                 265                 270
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
        275                 280                 285
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
    290                 295                 300
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
305                 310                 315                 320
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
                325                 330                 335
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340
```

<210> 53
<211> 1082
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (17)...(1060)
<223> Кодирующая последовательность для слитого белка

<400> 53

```
tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg 52
                  Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
                   1               5                  10

ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc  100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
        15                  20                  25

gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag   148
Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
     30                  35                  40

tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc   196
Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
 45                  50                  55                  60
```

```
aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc   244
Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
                 65                  70                  75

tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc   292
Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
             80                  85                  90

atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac   340
Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
         95                 100                 105

ttc tgt gag aac aag ctc agg agc gag ccc aaa tct tca gac aaa act   388
Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
    110                 115                 120

cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca   436
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser
125                 130                 135                 140

gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg   484
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                145                 150                 155

acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct   532
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            160                 165                 170

gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc   580
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        175                 180                 185

aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc   628
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    190                 195                 200

agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac   676
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
205                 210                 215                 220

aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc   724
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
                225                 230                 235

atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg   772
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
            240                 245                 250

ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc   820
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
        255                 260                 265

ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc   868
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
    270                 275                 280

aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac   916
```

```
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
285                 290                 295                 300

tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc   964
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                305                 310                 315

agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct   1012
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
            320                 325                 330

ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa   1060
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        335                 340                 345

taatctagag gcgcgccaat ta                                         1082

<210> 54
<211> 348
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Слитый белок

<400> 54
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1               5                  10                  15
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
            20                  25                  30
Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro
        35                  40                  45
Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
    50                  55                  60
Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
65                  70                  75                  80
Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
                85                  90                  95
Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
            100                 105                 110
Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
        115                 120                 125
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
    130                 135                 140
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
145                 150                 155                 160
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
                165                 170                 175
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
            180                 185                 190
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
        195                 200                 205
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
    210                 215                 220
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
225                 230                 235                 240
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
                245                 250                 255
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
            260                 265                 270
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
        275                 280                 285
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
    290                 295                 300
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
305                 310                 315                 320
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
                325                 330                 335
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345
```

<210> 55
<211> 1109
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (17)...(1090)
<223> Кодирующая последовательность для слитого белка

<400> 55
tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg 52
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
1 5 10

ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc 100
Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
15 20 25

gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag 148
Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
30 35 40

tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc 196
Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
45 50 55 60

aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc 244
Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
65 70 75

tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc 292
Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
80 85 90

atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac 340
Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
95 100 105

ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc 388
Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu
110 115 120

```
agg gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca   436
Arg Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
125                 130                 135                 140

gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa   484
Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                145                 150                 155

ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg   532
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            160                 165                 170

gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac   580
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        175                 180                 185

gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag   628
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    190                 195                 200

cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac   676
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
205                 210                 215                 220

cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa   724
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                225                 230                 235

gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag   772
Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            240                 245                 250

ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg   820
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
        255                 260                 265

acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc   868
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    270                 275                 280

agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac   916
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
285                 290                 295                 300

tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc   964
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                305                 310                 315

tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc   1012
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            320                 325                 330

ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag   1060
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        335                 340                 345

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa tctagaggcg cgccaatta      1109
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  *
    350                 355
```

<210> 56
<211> 357
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

```
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1               5                  10                  15
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
            20                  25                  30
Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro
        35                  40                  45
Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
    50                  55                  60
Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
65                  70                  75                  80
Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
                85                  90                  95
Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
            100                 105                 110
Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Glu Pro Lys
        115                 120                 125
Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
    130                 135                 140
Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
145                 150                 155                 160
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
                165                 170                 175
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
            180                 185                 190
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
        195                 200                 205
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
    210                 215                 220
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser
225                 230                 235                 240
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
                245                 250                 255
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
            260                 265                 270
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
        275                 280                 285
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
    290                 295                 300
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305                 310                 315                 320
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
                325                 330                 335
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
            340                 345                 350
Leu Ser Pro Gly Lys
        355
```

<210> 57
<211> 9
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Иллюстрированная нуклеотидная последовательность

<400> 57
atgcacggg 9

<210> 58
<211> 9
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Иллюстрированная нуклеотидная последовательность

<400> 58
cccgtgcat 9

<210> 59
<211> 586
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (27)...(578)

<400> 59

```
gcagcttgtg cggcggcgtc ggcacc atg agg cga ggg ccc cgg agc ctg cgg  53
                              Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg
                               1               5

ggc agg gac gcg cca gcc ccc acg ccc tgc gtc ccg gcc gag tgc ttc  101
Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe
 10                  15                  20                  25

gac ctg ctg gtc cgc cac tgc gtg gcc tgc ggg ctc ctg cgc acg ccg  149
Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro
                 30                  35                  40

cgg ccg aaa ccg gcc ggg gcc agc agc cct gcg ccc agg acg gcg ctg  197
Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu
             45                  50                  55

cag ccg cag gag tcg gtg ggc gcg ggg gcc ggc gag gcg gcg ctg ccc  245
Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro
         60                  65                  70

ctg ccc ggg ctg ctc ttt ggc gcc ccc gcg ctg ctg ggc ctg gca ctg  293
Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu
     75                  80                  85
```

```
gtc ctg gcg ctg gtc ctg gtg ggt ctg gtg agc tgg agg cgg cga cag   341
Val Leu Ala Leu Val Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln
 90                  95                  100                 105

cgg cgg ctt cgc ggc gcg tcc tcc gca gag gcc ccc gac gga gac aag   389
Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys
                110                 115                 120

gac gcc cca gag ccc ctg gac aag gtc atc att ctg tct ccg gga atc   437
Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile
            125                 130                 135

tct gat gcc aca gct cct gcc tgg cct cct cct ggg gaa gac cca gga   485
Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly
        140                 145                 150

acc acc cca cct ggc cac agt gtc cct gtg cca gcc aca gag ctg ggc   533
Thr Thr Pro Pro Gly His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly
    155                 160                 165

tcc act gaa ctg gtg acc acc aag acg gcc ggc cct gag caa caa       578
Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
170                 175                 180

tagcaggg                                                         586
```

<210> 60
<211> 184
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

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

<210> 61
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> 26-10 VH signal sequence.

<400> 61

```
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1               5                  10                  15
Val Leu Ser
```

<210> 62
<211> 332
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Слитый белок

<400> 62

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

<210> 63
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> 26-10 VH 5' UTR.

<400> 63
aacatatgtc caatgtcctc tccacagaca ctgaacacac tgactccaac g 51

<210> 64
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Модифицированный 5' 26-10 VH UTR

<400> 64
aacatatgtc caatgtcctc tccacagaca ctgaacacac tgactgccac c 51

<210> 65
<211> 57
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(57)
<223> Сигнальная последовательность 26-10 VH

<400> 65
atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttt ctt ctg tca gga act gca ggt 48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

gtc ctc tct 57
Val Leu Ser

<210> 66
<211> 84
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Интрон 26-10 VH

<400> 66
gtaaggggct ccccagttcc aaaatctgaa gaaaagaaat ggcttgggat gtcacagata 60
tccactctgt ctttctcttc acag 84

<210> 67
<211> 1135
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Слитый белок

<400> 67
aacatatgtc caatgtcctc tccacagaca ctgaacacac tgactccaac gatgggatgg 60
agctggatct ttctctttct tctgtcagga actgcaggta aggggctccc cagttccaaa 120
atctgaagaa aagaaatggc ttgggatgtc acagatatcc actctgtctt tctcttcaca 180
ggtgtcctct ctgctatgag atcctgcccc gaagagcagt actgggatcc tctgctgggt 240
acctgcatgt cctgcaaaac catttgcaac catcagagcc agcgcacctg tgcagccttc 300
tgcaggtcac tcagctgccg caaggagcaa ggcaagttct atgaccatct cctgagggac 360
tgcatcagct gtgcctccat ctgtggacag caccctaagc aatgtgcata cttctgtgag 420
aacaagctca ggagcgagcc caaatcttca gacaaaactc acacatgccc accgtgccca 480
gcacctgaag ccgaggggac accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 540
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 600
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 660
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 720
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccatcc 780
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 840
ctgccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 900
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 960
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1020
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1080
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa ataaa 1135

<210> 68
<211> 1135
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Слитый белок

<400> 68
aacatatgtc caatgtcctc tccacagaca ctgaacacac tgactgccac catgggatgg 60
agctggatct ttctctttct tctgtcagga actgcaggta aggggctccc cagttccaaa 120
atctgaagaa aagaaatggc ttgggatgtc acagatatcc actctgtctt tctcttcaca 180
ggtgtcctct ctgctatgag atcctgcccc gaagagcagt actgggatcc tctgctgggt 240
acctgcatgt cctgcaaaac catttgcaac catcagagcc agcgcacctg tgcagccttc 300
tgcaggtcac tcagctgccg caaggagcaa ggcaagttct atgaccatct cctgagggac 360
tgcatcagct gtgcctccat ctgtggacag caccctaagc aatgtgcata cttctgtgag 420
aacaagctca ggagcgagcc caaatcttca gacaaaactc acacatgccc accgtgccca 480
gcacctgaag ccgagggggc accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 540
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 600
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 660
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 720
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccatcc 780
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 840
ctgccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 900
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 960
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1020
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1080
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa ataaa 1135

<210> 69
<211> 884
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Конструкция энхансер CMV/LTR-промотор MPSV

<400> 69
cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120
caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180
ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240
tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300
accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg 360
ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttgaat gaaagacccc 420
acctgtaggt ttggcaagct agcttaagta acgccatttg caaggcatgg aaaaatacat 480
aactgagaat agagaagttc agatcaaggt caggaacaga gaaacaggag aatatgggcc 540
aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccgctcag ggccaagaac agttggaaca 600
ggagaatatg ggccaaacag gatatctgtg gtaagcagtt cctgccccgc tcagggccaa 660
gaacagatgg tccccagatc ggtcccgccc tcagcagttt ctagagaacc atcagatgtt 720
tccagggtgc cccaaggacc tgaaatgacc ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt 780
cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc tccccgagct caataaaaga gcccacaacc 840
cctcactcgg cgcgccagtc ctccgataga ctgcgtcgcc cggg 884

<210> 70
<211> 455
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> LTR-промотор MPSV без участка негативного контроля

<400> 70
aatgaaagac cccacctgta ggtttggcaa gctagaaggt taggaacaga gagacagcag 60
aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccggctca gggccaagaa 120
cagatggtcc ccagatgcgg tcccgccctc agcagtttct agagaaccat cagatgtttc 180
cagggtgccc caaggacctg aaaatgaccc tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc 240
gcttctcgct tctgttcgcg cgcttctgct ccccgagctc aataaaagag cccacaaccc 300
ctcactcggc gcgccagtcc tccgatagac tgcgtcgccc gggtacccgt gttctcaata 360
aaccctcttg cagttgcatc cgactcgtgg tctcgctgtt ccttgggagg gtctcctctg 420
agtgattgac tacccgtcag cgggggtctt tcagt 455

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий:

(a) фрагмент трансмембранного активатора и кальциевого модулятора и взаимодействующего с циклофилиновым лигандом рецептора (TACI), причем фрагмент рецептора TACI представляет собой полипептид, состоящий из последовательности длиной 32-80 аминокислот, причем фрагмент рецептора

TACI включает в себя по меньшей мере один из (i) аминокислотных остатков с 34 по 66 SEQ ID NO:2 и (ii) аминокислотных остатков с 71 по 104 SEQ ID NO:2, причем фрагмент рецептора TACI связывает по меньшей мере один из ZTNF2 или ZTNF4, и

(b) иммуноглобулиновый фрагмент, который содержит константную область иммуноглобулина.

2. Слитый белок по п.1, где фрагмент рецептора TACI содержит аминокислотные остатки с 34 по 66 SEQ ID NO:2 и аминокислотные остатки с 71 по 104 SEQ ID NO:2.

3. Слитый белок по п.1, где фрагмент рецептора TACI содержит аминокислотные остатки с 34 по 104 SEQ ID NO:2.

4. Слитый белок по п.1, где фрагмент рецептора TACI имеет аминокислотную последовательность аминокислотных остатков с 30 по 110 SEQ ID NO:2.

5. Слитый белок по п.1, где иммуноглобулиновый фрагмент содержит константную область тяжелой цепи.

6. Слитый белок по п.5, где иммуноглобулиновый фрагмент содержит константную область тяжелой цепи человека.

7. Слитый белок по п.6, где константная область тяжелой цепи является константной областью тяжелой цепи IgG1.

8. Слитый белок по п.7, где иммуноглобулиновый фрагмент является Fc-фрагментом IgG1, который содержит C_{H2} и C_{H3} -домены.

9. Слитый белок по п.8, где иммуноглобулиновый фрагмент является Fc-фрагментом IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33.

10. Слитый белок по п.9, где слитый белок TACI-иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54.

11. Слитый белок по п.1, где слитый белок TACI-иммуноглобулина является димером.

12. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует слитый белок по п.1.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по п.12, которая имеет нуклеотидную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:53.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и слитый белок трансмембранного активатора и кальциевого модулятора, взаимодействующего с циклофилиновым лигандом (TACI), с иммуноглобулином, причем слитый белок TACI-иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54.

15. Фармацевтическая композиция по п.14, где слитый белок TACI-иммуноглобулина является димером.

16. Применение слитого белка трансмембранного активатора и кальциевого модулятора, взаимодействующего с циклофилиновым лигандом (TACI) с иммуноглобулином для производства лекарственного средства для снижения уровней ZTNF4 в циркулирующей крови у млекопитающего субъекта, причем слитый белок TACI-иммуноглобулина содержит:

(a) фрагмент рецептора TACI, который представляет собой полипептид, состоящий из последовательности длиной 32-80 аминокислот, причем фрагмент рецептора TACI содержит по меньшей мере один из (i) аминокислотных остатков с 34 по 66 SEQ ID NO:2, и (ii) аминокислотных остатков с 71 по 104 SEQ ID NO:2, причем фрагмент рецептора TACI связывает ZTNF4, и

(b) иммуноглобулиновый фрагмент, содержащий константную область иммуноглобулина.

17. Применение по п.16, где фрагмент рецептора TACI содержит аминокислотные остатки с 34 по 66 последовательности SEQ ID NO:2 и аминокислотные остатки с 71 по 104 последовательности SEQ ID NO:2.

18. Применение по п.16, где фрагмент рецептора TACI содержит аминокислотные остатки с 34 по 104 последовательности SEQ ID NO:2.

19. Применение по п.16, где фрагмент рецептора TACI имеет аминокислотную последовательность аминокислотных остатков с 30 по 110 последовательности SEQ ID NO:2.

20. Применение по п.16, где иммуноглобулиновый фрагмент содержит константную область тяжелой цепи.

21. Применение по п.20, где иммуноглобулиновый фрагмент содержит константную область тяжелой цепи человека.

22. Применение по п.21, где константная область тяжелой цепи является константной областью тяжелой цепи IgG1.

23 Применение по п.22, где иммуноглобулиновый фрагмент является Fc-фрагментом IgG1, который содержит C_{H2} и C_{H3}-домены.

24. Применение по п.23, где иммуноглобулиновый фрагмент является Fc-фрагментом IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33.

25. Применение по п.24, где слитый белок TACI-иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54.

26. Применение по п.16, где слитый белок TACI-иммуноглобулина является димером.

```
        10         20         30         40         50
MSGLGRSRRG GRSRVDQEER FPQGLWTGVA MRSCPEEQYW DPLLGTCMSC

        60         70         80         90        100
KTICNHQSQR TCAAFCRSLS CRKEQGKFYD HLLRDCISCA SICGQHPKQC

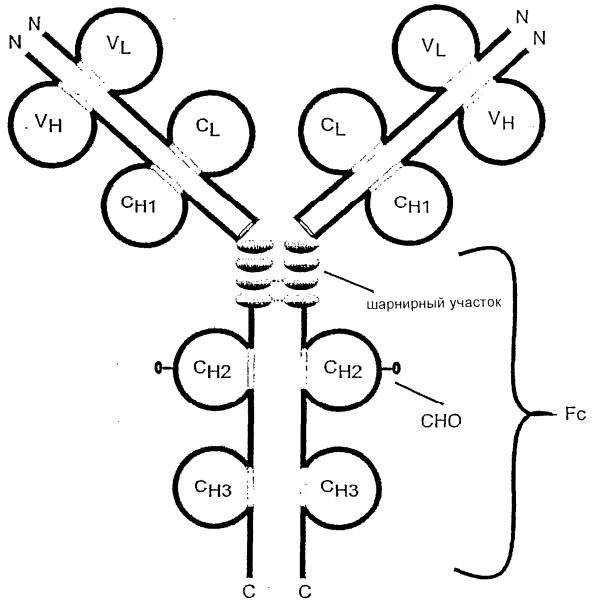
     ------------------------------------------------
    | 110        120        130        140        150
AYFCENKLRS PVNLPPELRR QRSGEVENNS DNSGRYQGLE HRGSEASPAL

----------------
       160       | 170        180        190        200
PGLKLSADQV ALVYSTLGLC LCAVLCCFLV AVACFLKKRG DPCSCQPRSR

       210        220        230        240        250
PRQSPAKSSQ DHAMEAGSPV STSPEPVETC SFCFPECRAP TQESAVTPGT

       260        270        280        290
PDPTCAGRWG CHTRTTVLQP CPHIPDSGLG IVCVPAQEGG PGA
```

Фиг. 1



Фиг. 2

					LC						HC			HC	
			218				222								230
дикий тип	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
Fc-488	.	.	Arg	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	Arg	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

<- шарнирный участок ->

				234	235		237								245
дикий тип	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

CH2 -> домен

															260
дикий тип	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

															275
дикий тип	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Фиг. 3А

															290
дикий тип	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

							297								305
дикий тип	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	Gln	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

															320
дикий тип	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

										330	331				335
дикий тип	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Ser	Ser	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Ser	Ser	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Ser	Ser	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Фиг. 3В

																350
дикий тип	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

<- CH2 домен | CH3 домен ->

						356		358								365
дикий тип	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

																380
дикий тип	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

																395
дикий тип	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Фиг. 3C

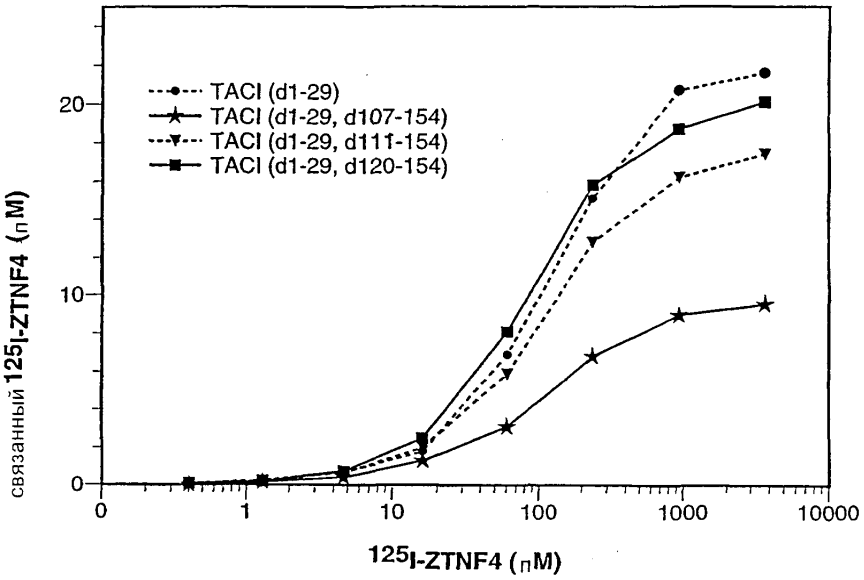
																410
дикий тип	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

																425
дикий тип	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

						431										440
дикий тип	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

						446		
дикий тип	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	***	
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc8	.	.	.	.	.	.	.	.

Фиг. 3D


TACI (d1-29)
TACI (d1-29, d107-154)
TACI (d1-29, d111-154)
TACI (d1-29, d120-154)
связанный 125I-ZTNF4 (пМ)
125I-ZTNF4 (пМ)
0
10
20
0
1
10
100
1000
10000

Фиг. 4