



(51) МПК
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
C07K 14/42 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 39/39 (2006.01); *C07K 14/42* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2014102348, 27.06.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 27.06.2012

Дата регистрации:
 17.08.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 27.06.2011 DE 10 2011 118 023.4

(43) Дата публикации заявки: 10.08.2015 Бюл. № 22

(45) Опубликовано: 17.08.2018 Бюл. № 23

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 27.01.2014

(86) Заявка РСТ:
 EP 2012/062521 (27.06.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2013/000980 (03.01.2013)

Адрес для переписки:
 129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

**ВИТТОН Клаус (DE),
 ЛЕНТЦЕН Ханс (DE)**

(73) Патентообладатель(и):

Мелема Фарма ГмбХ (DE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: **Е. С. LAVELLE et al. The
 identification of plant lectins with mucosal
 adjuvant activity, Immunology 2001, Vol.102,
 pp. 77-86. Е. С. LAVELLE et al. Mistletoe
 lectins enhance immune responses to
 intranasally co-administered herpes simplex
 virus glycoprotein D2, Immunology 2002, Vol.
 107, pp. 268-274. SEONG KYU SONG et al.
 Intranasal immunization (см. прод.)**

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ ЛЕКТИН ОМЕЛЫ БЕЛОЙ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ
 АДЬЮВАНТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к вакцинам, которые содержат антигены и адьювант, что может быть использовано в медицине. Рекомбинантным путем получают и отбирают адьювант из группы рекомбинантных лектинов омелы белой, не имеющей гликозилирования, который используют

в вакцине, которую в свою очередь используют в качестве лекарственного средства и композиции. Изобретение позволяет получить эффективную вакцину, содержащую один антиген или более и, по меньшей мере, один адьювант. 5 н. и 8 з.п. ф-лы, 8 ил., 2 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

with influenza virus and Korean mistletoe lectin C (KML-C) induces heterosubtypic immunity in mice, *Vaccine* 2007, Vol.25, pp. 6359-6366. US 6271368 B1, 07.08.2001. US 6927207 B1, 09.08.2005. US 7265217 B2, 04.09.2007. RU 2241750 C2, 10.12.2004.

R U 2 6 6 4 4 5 8 C 2

R U 2 6 6 4 4 5 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
C07K 14/42 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A61K 39/39 (2006.01); *C07K 14/42* (2006.01)

(21)(22) Application: **2014102348, 27.06.2012**

(24) Effective date for property rights:
27.06.2012

Registration date:
17.08.2018

Priority:

(30) Convention priority:
27.06.2011 DE 10 2011 118 023.4

(43) Application published: **10.08.2015** Bull. № 22

(45) Date of publication: **17.08.2018** Bull. № 23

(85) Commencement of national phase: **27.01.2014**

(86) PCT application:
EP 2012/062521 (27.06.2012)

(87) PCT publication:
WO 2013/000980 (03.01.2013)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskiji Partnery"**

(72) Inventor(s):

**VITTON Klaus (DE),
LENTTSEN Khans (DE)**

(73) Proprietor(s):

Melema Farma GmbKH (DE)

(54) **RECOMBINANT MISTLETOE LECTIN AND USE THEREOF AS ADJUVANT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, specifically to vaccines that contain antigens and adjuvant, which can be used in medicine. Recombinantly, an adjuvant is obtained from the group of recombinant mistletoe lectins of white, without

glycosylation, which is used in the vaccine, which in turn is used as a medicament and composition.

EFFECT: invention makes it possible to obtain an effective vaccine containing one antigen or more and at least one adjuvant.

13 cl, 8 dwg, 2 tbl, 3 ex

RU 2 664 458 C 2

RU 2 664 458 C 2

Изобретение относится к вакцинам, которые содержат антигены и адъювант, и применению адъюванта, при котором адъювант выделен из рекомбинантного лектина омелы белой.

При многих заболеваниях вакцины эффективны только частично, либо неэффективны вообще. Исследования защитного иммунитета и адъювантов, которые вызывают 5 сильные иммунные ответы, могут помочь разработать эффективные вакцины против патогенных микроорганизмов (McKee AS, MacLeod MKL, Kappler JW et al. 2010 BMC Biology;8: 37–46). Вакцинами являются вакцины, полученные из живых, ослабленных (то есть, со сниженной вирулентностью) или инактивированных патогенных агентов, 10 либо инактивированных (обезвреженных) токсинов или анатоксинов патогенных микроорганизмов, или фрагментов поверхностной структуры патогенных микроорганизмов. В настоящее время формально различают три основных типа вакцин: а) ослабленные живые вакцины, которые содержат вирусы или бактерии, подобные действующему возбудителю заболевания, но при этом являющиеся менее патогенными; 15 б) инактивированные вакцины, которые представляют собой температурно-инактивированные или химически инактивированные частицы патогенных микроорганизмов; или в) субъединичные вакцины, состоящие из компонент патогенных микроорганизмов.

В дополнение к антигену, который является объектом адаптивного иммунного 20 ответа, вакцины обычно содержат также патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМПы) или другие вещества, которые усиливают эффект адаптивного ответа. Эти вещества описаны как адъюванты (McKee et al 2010 (выше)).

Известный адъювант, имеющий длительную историю применения в вакцинах для людей, – это соли алюминия (которые также называют квасцами). Протеины (антигены) 25 патогенных микроорганизмов адсорбируются солью алюминия, образуя при этом суспензию, которая вводится внутримышечно.

Гепатит В является инфекционным заболеванием печени, вызываемым вирусом гепатита В, который часто сопровождается острым протеканием (90%) и иногда – хроническим протеканием болезни. Приблизительно 350 миллионов людей хронически 30 инфицированы гепатитом В, что делает его одним из самых распространенных в мире вирусных заболеваний. Хроническое воспаление печени может привести к циррозу печени и гепатоцеллюлярной карциноме. Лечение хронического гепатита В является затруднительным, поэтому наиболее важной мерой предотвращения инфекции и уменьшения количества вирусоносителей является вакцинация.

Ряд вакцин против гепатита В выпускается серийно, среди них – Энджерикс-В (Engerix-В) от GlaxoSmithKline. В этой вакцине в качестве адъюванта используется гидроксид 35 алюминия, а HBsAg (поверхностный антиген вируса гепатита В) вырабатывается в дрожжевых клетках (*Saccharomyces cerevisiae* или пекарские дрожжи) с применением генной инженерии.

При лечении рака путем вакцинации вакцины могут быть терапевтическими либо 40 профилактическими. Адъюванты применяются с целью усиления действия профилактических или терапевтических вакцин, то есть, чтобы вызвать сильный и стойкий иммунный ответ. В частности, существует потребность в субъединичных вакцинах. Субъединичные вакцины состоят из очищенных антигенов, которые 45 специфически распознаются лимфоцитами. И, хотя они более безопасны, чем вакцины, действующие во всем организме, сами по себе они не способны оптимально активизировать иммунную систему, так как лишены собственных ПАМПов (McKee et al 2010 (выше)). Адъюванты могут влиять на баланс антитело- и клеточно-

опосредствованного индуцированного иммунитета. Применение подобных веществ, тем самым, делает возможным уменьшение дозы антигена и количества требуемых инъекций (Salk JE, Laurent AM & Bailey ML 1951 Am J Public Health Nations Health 41: 669-77).

5 Адьюванты также подразделяются на две категории: системы-носители и “иммуностимуляторы”, то есть, иммуномодуляторы (Pashine A, Valiante NM & Ulmer JB 2005 Nature medicine 11: 63-68, Pichichero ME 2008 Human vaccines 4(4): 262270).

Основанные на носителях адьюванты (алюминий) увеличивают взаимодействие между компонентами вакцины и ключевыми клетками иммунной системы.

10 Иммуномодуляторы напрямую активируют антиген-презентирующие клетки (АПК) и естественный иммунный ответ, используя специфические рецепторы (например, Толл-подобные рецепторы (ТПР)) (Pashine et al. (supra), O’Hagan DT & Valiante NM 2003 Nature reviews 2: 727-735).

15 Несколько типов адьювантов для вакцин известны начиная с 1970-х, но на сегодня лишь некоторые из них были разрешены для применения к человеку (O’Hagan DT & De Gregorio E 2009 Drug Discov Today 14(11–12): 541–551).

В последнее время новые адьюванты такие, как агонисты Толл-подобных рецепторов (ТПР) и новые, крупнодисперсные системы-носители такие, как вакцины на основе пептидов, предоставляют возможности для современной иммунотерапии.

20 Тем не менее, все еще необходимы новые адьюванты, которые должны обладать следующими свойствами (Brunner R, Jensen-Jarolim E & Pali-Schöll I 2010 Immunol Lett 128(1): 29-35):

а) укрепление Тх17 (Т-хелперов 17). Адьюванты характеризуются выработкой ИЛ-17 (интерлейкина-17). Они являются важными модуляторами памяти воспалительных и CD4+ Т-клеток.

б) индуцирование стойких клеточных ответов, включающих клетки Т-хелперов (Тх) 1 и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в дополнение к антителам (Guy B 2007 Nat Rev Microbiol 5: 505–517).

В целом, механизмы действия адьювантов могут быть различными (фиг. 1).

30 Неспецифические адьюванты (например, гидроксид алюминия) усиливают презентацию антигенов через активацию метаболизма инфламмасом, для которого характерна секреция ИЛ-1 β (Lamine Mbow M, De Gregorio E, Valiante NM et al. 2010 Current Opinion in Immunology 2010, 22: 411-416). В месте инъекции алюминий образует депо, что приводит к высокой локальной концентрации антигена и, таким образом, улучшает поглощение антигенпрезентирующими клетками (АПК) (HogenEsch H 2002 Vaccine 20 (Suppl 3): 34–39). Более того, распознавание антигена может быть ускорено путем прямой стимуляции иммунных клеток (Gupta RK, Rost BE, Relyveld E et al 1995 Pharm Biotechnol 6: 229–248). Эти, так называемые адьюванты В-типа, взаимодействуют с АПК и антигенами неспецифическим образом, и, вследствие этого, их эффект основан на

40 усилении антигенпрезентирующих молекул ГКГ (главного комплекса гистосовместимости).

В противоположность адьювантам В-типа, адьюванты А-типа имеют специфический механизм действия. Большинство недавно разработанных адьювантов А-типа таких, как монофосфорил-липид А (МФЛ), являются специфическими агонистами ТПР. Они действуют в первую очередь на ТПР и действуют опосредованно путем активации АПК и усиления секреции цитокинов таких, как ИЛ-12. Дополнительно, агонисты ТПР могут действовать на ГКГ-рецепторы путем эффективной презентации применяемых антигенов (Guy B 2007 (выше)).

Более того, существует описание адьювантов С-типа. Их действие основано на усилении ГКГ-рецепторов вследствие взаимодействия ко-стимулирующих клеток с АПК. Предпринимаются усилия для того, чтобы найти клиническое применение для адьювантов С-типа. Один из известных примеров – TGN1412 – новое,
 5 суперагонистическое анти-CD28 моноклональное антитело, которое стимулирует непосредственно Т-клетки, однако, при одном исследовании из-за цитокиновой бури наблюдались кардиогенный шок и острая легочная недостаточность (Suntharalingam G, Perry MR, Ward S et al. 2006 N Engl J Med 355: 1018-1028).

В прототипе существует острая потребность в новых соответствующих требованиям
 10 адьювантах.

Растительные экстракты, выделенные из омелы белой, применялись в терапевтических целях на протяжении столетий. Средства на основе омелы белой применялись, с разной степенью успешности, в частности, в лечении рака (Bocci V 1993 J Biol Regulators and Homeostatic Agents 7(1): 1-6; Gabius H-J, Gabius S, Joshi S S et al. 1993 Planta Med 60: 2-7;
 15 Gabius H-J & Gabius S 1994 PZ 139: 9-16; Ganguly C & Das S 1994 Chemotherapy 40: 272-278, Hajto T, Hostanska K, Gabius H_J 1989 Cancer Res 49: 4803-4808, Hajto T, Hostanska K, Frei K et al. 1990 Cancer Res. 50: 3322-3326). Было показано, что терапевтический эффект оказывается, в частности, так называемыми лектинами омелы белой (вискумин, агглютинин *Viscum album*, VAA). Лектины омелы белой имеют цитотоксическое действие
 20 и вызывают неспецифическую иммуномодуляцию, положительные эффекты которой применяются для лечения опухолевых больных. Различные исследования лектинов омелы белой *in vitro* (Hajto et al., 1990 (выше); Männel D N, Becker H, Gundt A et al. 1991 Cancer Immunol Immunother 33: 177-182; Beuth J, Ko K L, Tunggal L et al. 1993 Drug Res 43: 166-169) и *in vivo* (Hajto T 1986 Oncology 43 suppl 1: 51-65; Hajto et al., 1989 (supra), Beuth J, Ko H L, Gabius H-J et al. 1991 In Vivo 5: 29-32; Beuth J, Ko H L, Gabius H-J et al. 1992 J
 25 Clin Invest 70: 658-661), а также клинические исследования (Beuth et al., 1992 (выше)) показали усиленное выделение воспалительных цитокинов (TNF-alpha (фактор-альфа некроза опухоли), интерлейкин-1 (ИЛ-1), интерлейкин-6 (ИЛ-6)) и активацию клеточных компонентов иммунной системы (Тх-клетки, натуральные клетки-киллеры (НК-клетки)).

На сегодняшний день анализ экстракта омелы белой сводится к идентификации трех лектинов омелы белой (ML-I, ML-II и ML-III), которые имеют различные молекулярный вес и специфику связывания сахаров. Было показано, что иммуностимулирующее действие экстракта омелы белой оказывается ML-I. Лектин ML-I состоит из двух А- и двух В-цепей (MLA и MLB, соответственно), каждая из которых является
 35 гликозилированной. А-цепь ответственна за ферментативную инактивацию рибосом (Endo Y, Tsurugi K & Franz H 1988 FEBS Lett 231: 378–380), а В-цепь участвует в связывании углеводов. Обе цепи связаны между собой дисульфидным мостиком. Полученные в результате мономеры лектина омелы белой могут ассоциировать в димеры с образованием нековалентных связей.

Также существует возможность получать биологически активный лектин омелы белой с помощью рекомбинантной технологии. В EP 0751221 описано выделение полипептидов лектина омелы белой в виде структурно гомогенного вещества, при котором, исходя из генетической последовательности лектина омелы белой,
 40 воспроизводятся рекомбинантные одиночные цепи (А-цепи, В-цепи) высокой чистоты, которые могут быть реассоциированы *in vitro* и тем самым образовывать рекомбинантный лектин омелы белой – голопротеин, который преимущественно является протеин-химически, ферментативно и структурно гомогенным, так называемым авискумином (Aviscumine). Согласно EP 0751221, полипептид рекомбинантного лектина

омелы белой подходит для терапевтического применения как голопротеин, подцепь и в форме субфрагментов, и рассматривается согласно данному изобретению.

Биологически активный лектин омелы белой, который можно получить путем рекомбинантной технологии в *E. coli*, называют не только авискумином (*Aviscumine*), но также и “*rViscumin*” или “*rML*” (*recombinant mistletoe lectin*) (Eck J, Langer, M, Möckel, B et al 1999; *Eur J Biochem* 264: 775-784).

Хотя в EP 0751221 упоминается о возможности применения рекомбинантного лектина омелы белой для лечения инфекционных заболеваний, никакой информации относительно применения рекомбинантного лектина омелы белой в качестве адьюванта в вакцине не предоставляется.

Кроме того, Lavelle et al (Lavelle EC, Grant G, Pusztal A et al. 2002. *Immunology* 107:268-274) описывают использование выделенных из растений лектинов как адьювантов, которые вводятся мукозно путем ингаляции по 1000 нг. Lavelle также обнаружил, что доза в 1000 нг/мышь оказывает негативный эффект на вес животных и влияет на их выживание, то есть, является токсичной.

Song et al (Song SK, Moldoveanu Z, Nguyen HN et al. 2007 *Vaccine* 25: 6359-6366) показали возможность применения лектина корейской омелы в качестве адьювантов, применяемых мукозно.

Как бы то ни было, выделенные из растений лектины омелы белой негомогенны (Soler MH, Stoeva S, Schwamborn C et al. 1996 *FEBS Letter* 399: 153-157, Soler HS, Stoeva S, Voelter W 1998 *Biochem Biophys Res Comm* 246: 596-601) и разнородны или отличны друг от друга в плане действия (EP 1051495 B1), а также не являются эффективными *per se* как адьюванты или иммуномодуляторы. В связи с этим, хотя лектин корейской омелы, к примеру, относится к RIP II протеинам (протеинам-инактиваторам рибосом), он имеет существенные отличия в структуре и конформации по сравнению с рекомбинантным лектином омелы белой, который обсуждается здесь (Kang TB, Song SK, Yoon TJ et al. 2007 *J Biochem Mol Biol* 40(6): 959-965). Недостатком является невозможность точно определить дозировку и то, что выделенные из растений лектины содержат примеси. К тому же, выделенные из растений лектины омелы белой имеют отличия в гликозилировании, что может влиять на их эффективность как адьювантов (в частности, на кинетику и т.д.).

Согласно изобретению лектины рекомбинантной омелы белой преимущественно не имеют такого гликолизирования.

Желательным является увеличение иммуногенности антигенов путем применения адьювантов с целью получить эффективный и улучшенный иммунный ответ у носителя или больного. Также существует большая потребность в безопасных и действенных адьювантах, которые увеличивают эффективность вакцин и просты в применении.

Задача, которую рассматривает данное изобретение, - создание вакцины или адьюванта, с которыми иммунный ответ носителя или больного на антигены мог бы быть усилен.

Эта задача решается созданием вакцины или адьюванта, которые содержат рекомбинантный лектин омелы белой.

Неожиданно было обнаружено что рекомбинантный лектин омелы белой может быть применен как потенциальный адьювант вместе с антигеном.

Таким образом, изобретение относится к адьюванту, содержащему как минимум один рекомбинантный лектин омелы белой (называемый далее адьювантом согласно изобретению).

Также изобретение относится к вакцине, содержащей антиген вместе с адьювантом

согласно изобретению (называемой далее вакциной согласно изобретению).

Вследствие этого, изобретение также относится к лекарству или композиции, содержащим вакцину согласно изобретению и, в некоторых случаях, дополнительные вещества и добавки и/или фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемый растворитель.

Задача решается путем создания адъюванта или вакцины, которые содержат рекомбинантные лектины омелы белой, а рекомбинантные лектины омелы белой состоят из следующих аминокислотных последовательностей:

Лекарственное средство согласно изобретению предпочтительно содержит А-цепь лектина омелы белой (MLA) и В-цепь лектина омелы белой (MLB), как отдельно так и в комбинации для обоих случаев, а также в форме димеров (см., к примеру, EP 0751221 или EP 1051495).

Полипептид рекомбинантного лектина омелы белой А-цепи лектина омелы белой содержит следующие последовательности: SEQ ID No. 1–3, включая их изоформы или функциональные фрагменты.

Полипептид рекомбинантного лектина омелы белой В-цепи лектина омелы белой содержит следующие последовательности: SEQ ID No. 4–12, включая их изоформы или функциональные фрагменты.

(Полностью именуемые в дальнейшем и выше как “рекомбинантные лектины омелы белой”)

В дальнейшем предпочтение отдается рекомбинантному лектину омелы белой согласно изобретению – гетеродимеру, содержащему последовательности SEQ ID No. 1 и SEQ ID No. 4; см., например, EP 0751221, про так называемый авискумин (см. примеры).

В контексте настоящего изобретения, выражение “функциональный фрагмент” означает фрагменты заявленных полипептидов, которые имеют аналогичную биологическую функцию, что и представленные выше полипептиды, содержащие определенную последовательность аминокислот.

В этом контексте выражение “аналогичная биологическая функция” означает, к примеру, что фрагменты или производные полипептидов вызывают в клетках те же сигналы, что и заявленные полипептиды. Примерами фрагментов служат пептидные домены, обладающие определенными функциями. Выражение “аналогичная биологическая функция” также включает цитотоксичность, иммуностимуляцию (врожденной и адаптивной иммунных систем), стимуляцию выделения цитокина, антигенность, индуцирование экспрессии или активации поверхностных маркеров, индуцирование апоптоза или стимуляцию эндорфина.

В этом случае выражение “биологическая активность рекомбинантного лектина омелы белой” относится к любой биологической активности из спектра совокупности биологических активностей рекомбинантного лектина омелы белой. Функцией такого типа является фармакологический эффект рекомбинантного лектина омелы белой, например, его пригодность в качестве адъюванта в комбинации с антигеном (вакцина).

При исследовании мономеров ML-I обнаружено 25 изоформ, которые обусловлены различными комбинациями А- и В-цепей и различными уровнями гликолизирования цепей.

В отношении данного изобретения также рассматриваются полипептид лектина омелы белой или его фрагмент, содержащие разнообразные последовательности MLA и MLB цепей согласно изобретению, для последовательностей SEQ ID No. 1–12.

Лекарственное средство согласно изобретению предпочтительно содержит как

минимум один полипептид рекомбинантного лектина омелы белой, включающий последовательности SEQ ID No. 1–12 либо их функциональный фрагмент, или любую их комбинацию.

К примеру, усиленный иммунный ответ наблюдался при применении вакцины согласно изобретению, содержащей поверхностный антиген гепатита В HBsAg (Hepatitis B surface antigen) и овальбумин в качестве “слабого модельного антигена” (см. примеры). Более того, неожиданно было обнаружено, что активация клеток рекомбинантными лектинами омелы белой происходит путем действенной и исключительно эффективной активации инфламмасом, сравнимым с механизмом действия алюминия (гидроксида алюминия).

В дальнейшем успешном осуществлении изобретения доза рекомбинантных лектинов омелы белой, приходящаяся на пациента (человека или млекопитающего) и, предпочтительно, вводимая подкожно, составляет от 5 до 600 нг/мл, в частности, от 250 до 450 нг/мл, 350 нг/мл или от 5 до 600 нг/пациент, в частности, от 250 до 450 нг/пациент, 350 нг/пациент.

Как показано в примерах, в диапазоне от 5 до 50 нг/животное (или от 50 до 500 нг/мл) или пациента оптимальное выделение интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) происходит в узком диапазоне дозировок 280–420 нг/пациент (280–420 нг/мл), в частности, после подкожного введения. При более высоких дозах интерлейкин не выделяется; наоборот, более вероятно возникновение цитотоксических эффектов в здоровых тканях. ИЛ-1 β является прямым показателем активации инфламмасы, которая особенно важна в плане пригодности адьюванта.

Особым преимуществом является то, что гомогенные рекомбинантные лектины омелы белой могут, таким образом, вызывать оптимальную активацию инфламмасы. Благодаря гомогенности рекомбинантного лектина омелы белой становится возможным определение эффективной точной дозировки в узком диапазоне.

Это также приводит к улучшенной переносимости применения и, следовательно, для успешной вакцинации требуется меньшее количество применений. Согласно Lavelle (выше) для успешной вакцинации требуется четыре применения по причине недостаточной активации инфламмасы. Согласно примеру 2, в качестве целесообразного аналога можно привести достижение успешной вакцинации всего после двух применений.

Рекомбинантные лектины омелы белой должны быть отнесены к такой категории адьювантов как “иммуностимуляторы” (иммуномодуляторы (выше)) благодаря наблюдаемому механизму действия.

АПК активируются следующим образом:

1. Активация фагоцитов (дендритные клетки и моноциты/макрофаги) вследствие фагоцитоза авискумина с последующими
 - а. Презентацией антигена,
 - б. Инициацией откликов Т-клеток и
 - в. Секрецией цитокина,
 и
2. Индуцирование апоптоза (например, моноциты/макрофаги) с последующими
 - а. Активацией соседних фагоцитов путем поглощения мертвых клеток (например, апоптозных телец) апоптоза и
 - б. Секрецией цитокина.

Более того, показана эффективная активация инфламмасы в моноцитах с помощью рекомбинантных лектинов омелы белой согласно изобретению путем стимуляции

каспазы-1 и секрети ИЛ-1 β и ИЛ-18. Совокупность механизмов генерации сильных иммунных ответов, таким образом, характеризует рекомбинантные лектины омелы белой как сильные и уникальные адъюванты.

5 В частности, рекомбинантные лектины омелы белой согласно изобретению обеспечивают специфическую и существенную активацию инфламмосомы, которая, согласно изобретению, считается необходимой в плане пригодности адъюванта.

Следовательно, изобретение также относится к применению рекомбинантных лектинов омелы белой в качестве адъювантов в вакцинах для усиления иммунного ответа носителя (животного, млекопитающего или человека) на один антиген или более.

10 Согласно изобретению созданы вакцины, содержащие как минимум один рекомбинантный лектин омелы белой в качестве адъюванта и антиген, например, антиген HBsAg, полученный из дрожжевых клеток и, в некоторых случаях, фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемый растворитель, и, в некоторых случаях, другие компоненты такие, как хлорид натрия, дигидрат
15 двунатриевого фосфата, первичный кислый фосфат натрия.

Вакцины согласно изобретению преимущественно соединяются с буферным физиологическим раствором и производятся в виде стерильной суспензии для инъекций в ампулах или наполненных шприцах и вызывают иммунологический ответ у носителя (животного, млекопитающего или человека) или донора/пациента. Вакцины согласно
20 изобретению индуцируют образование специфических Т-клеток и образование гуморальных антител к HBsAg.

Вакцины согласно изобретению применяются, например, для активной иммунизации против вируса гепатита В, который у неиммунных людей всех возрастов вызван вирусами всех известных подтипов. Группа людей, подлежащая иммунизации,
25 определяется официальными рекомендациями к вакцинации (Постоянный комитет по вакцинации при институте Роберта Коха).

Для основной иммунизации может быть применена следующая программа вакцинации с использованием вакцины согласно изобретению:

1. Программа вакцинации, предусматривающая вакцинацию на 0, 1 и 6 месяцах,
30 обеспечивает высокую концентрацию антител и, как правило, оптимальную защиту на 7 месяце.

2. Ускоренная программа вакцинации, предусматривающая вакцинацию после 0, 1 и 2 месяцев, делает возможным быстрое наращивание защиты за счет инокуляции. После 12 месяцев следует применять четвертую дозу для обеспечения долговременной
35 защиты.

Эти программы вакцинации, приведенные в качестве примеров, могут корректироваться согласно национальным рекомендациям к вакцинации (Постоянный комитет по вакцинации при институте Роберта Коха).

40 Вакцины согласно изобретению вводятся преимущественно подкожно или внутримышечно.

Количество одного или более антигенов и рекомбинантного лектина омелы белой в вакцине согласно изобретению, а также применяемые дозы, могут быть определены способами, известными специалисту в данной области медицины. Тип дозировки определяется лечащим врачом в соответствии с клиническими предпосылками.
45 Специалист в данной области знает, что тип дозировки зависит от многих факторов таких, как рост, вес, площадь поверхности тела, возраст, пол или общее состояние здоровья пациента, а также от конкретного применяемого средства, длительности и типа применения, и от других лекарств, которые могут приниматься параллельно.

Предпочтительно, чтобы адъювант рекомбинантного лектина омелы белой в вакцинах согласно изобретению вводился в виде водного или физиологического раствора, а антиген, в зависимости от единиц, обычно находился в порядке величины: от наногаммов, микрограммов и до миллиграммов (см. примеры, приведенные ниже).

5 Адъювант рекомбинантного лектина омелы белой согласно изобретению может быть использован с любым подходящим антигеном, и, таким образом, создается вакцина согласно изобретению.

Подходящими антигенами являются преимущественно те, которые применяются как потенциальные вакцины, и не могут быть исключительно такими, как, например, 10 HBsAg (выше), антигены против вирусов гриппа H1N1 и других подвидов, пептидные антигены направленные против иммуногенных опухолей, например, PAX пептиды (Rodeberg DA, Nuss RA, Elsawa SF et al. 2006 Int J Cancer 119: 126-132, Yan M, Himoudi N, Pule M et al. 2008 Cancer Res 68(19): 8058-8065), и многие другие.

Стандартная дозировка адъюванта согласно изобретению отвечает концентрации 15 5 нг и выше.

Вакцины согласно изобретению создаются в удобном виде - как жидкие средства или композиции, которые могут быть приведены к определенному уровню pH (выше).

Выбор подходящих носителей и других добавок зависит от желаемого способа применения и от типа лекарственной формы.

20 С целью увеличить срок годности вакцин может быть использован фармацевтически приемлемый консервант.

Вакцины согласно изобретению приготавливаются путем смешивания компонент согласно общеустановленным методам или по собственному усмотрению.

Следующие примеры служат для иллюстрации изобретения, но без ограничения 25 изобретения этими примерами.

Примеры

Пример 1: Активация инфламмосомы авискумином

МКПК, изолированные с помощью градиентной очистки фиколлом от человеческой донорской крови, высеивали на титровальных планшетах и выдерживали вместе с 30 авискумином на протяжении от 8 до 24 часов, с или без стимуляции липополисахаридом (ЛПС). ЛПС активирует про-ИЛ-1 β и про-ИЛ-18 посредством Толл-подобного рецептора-4 (ТЛР4), а без этого последующая активация каспазы-1 приводит к выделению цитокинов одним ЛПС.

В совместной культуре авискумина и ЛПС цитокины ИЛ-1 β и ИЛ-18 выделяются 35 путем, зависящим от концентрации. Секреция ИЛ-6 и ФНО-альфа (фактор некроза опухолей) не индуцируется (9-часовой эксперимент). Авискумин и ЛПС, находясь по отдельности в клеточной культуре, не вызывают выделение цитокинов ИЛ-1 β .

Авискумин, взятый отдельно, способен вызывать выделение ИЛ-18, и этот эффект усиливается ЛПС. В случае, когда МКПК освобождены от моноцитов магнитной 40 сортировкой клеток (анти-CD14 МАКС гранулы, Miltenyi), ни ИЛ-1 β ни ИЛ-18 не могут выделяться в оставшихся МКПК при выдерживании с авискумином и ЛПС. Цитокины ИЛ-1 β и клетки ИЛ-18, следовательно, выделяются из моноцитов. Индуцирование ИЛ-1 β и ИЛ-18 путем выдерживания МКПК вместе с авискумином и ЛПС свидетельствует об активации инфламмосомного комплекса.

45 In vitro, оптимальное выделение ИЛ-1 β из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) наблюдали в узком диапазоне концентраций при оптимальной концентрации 33 нг/мл, в зависимости от времени выдерживания с авискумином в отсутствие ЛПС. Этот эффект сопровождается конусовидной зависимостью

“концентрация-эффект” (фиг. 8).

а) Иммунизации

Были осуществлены две иммунизации мышей определенной инбредной линии (белые мыши), при которых применяли в совокупности авискумин в качестве адъюванта и по-
 5 поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), а также – в дальнейших экспериментах – овалбумин как антиген. Иммунизации осуществляли с интервалом в 3 недели. Композиции антиген-авискумин вводили подкожно на 1 и 21 дни, а иммунизированных животных умерщвляли через 14 дней после последней иммунизации.

С целью определения иммуногенности проводили окрашивание внутриклеточного
 10 цитокина антиген-специфических Т-клеток CD8 и CD4 и определение антиген-специфических антител. Подобная постановка эксперимента дает возможность регистрировать усиленный иммунный ответ, вызванный авискумином, на клеточном и гуморальном уровнях.

Пример 2. Иммунизация поверхностным антигеном гепатита В (HBsAg)

15 Антиген HBsAg является липопротеиновой частицей размером 20 нм. Такая вирусоподобная частица способна вызывать гуморальный иммунный ответ, часто даже в отсутствие адъюванта. Мягкий ответ Т-клеток CD8 на HBsAg может стимулироваться в белых мышах одним только антигеном.

Данная комбинация антигена и мышинового штамма дает возможность
 20 проанализировать способность авискумина усиливать мягкие гуморальные и клеточные ответы. В этом случае для позитивного контроля использовали AbISCO[®]-100 (ISCONOVA, Уппсала, Швеция), так как известно, что данный адъювант усиливает иммунный ответ в этой модели.

Штамм мышей: белые мыши;

25 2 подкожные иммунизации (1, 21 дни);

5 животных на группу (3 животных для контрольных групп 2 и 3); всего 31 животное.

Таблица 1

Группа	HBsAg (доза/животное)	Адъювант (доза/животное)	Комментарий
1/А	5 мкг	адъювант AbISCO	положительный контроль
2/Б	-	-	физраствор – отрицательный контроль
3/В	-	50 нг авискумина	адъювант контроль
4/Г	5 мкг	-	антиген контроль
5/Д	5 мкг	0,5 нг авискумина	низкая доза
6/Е	5 мкг	5 нг авискумина	средняя доза
7/Ж	5 мкг	50 нг авискумина	высокая доза

Свежие композиции вакцины готовили перед каждой иммунизацией. Авискумин
 растворяли в физрастворе с добавлением 0,01% Твин 80.

Реагенты

40 В качестве антигена для композиций (объем 100 мкл на дозу/животное) применяли по 5 мкг рекомбинантного HBsAg (Rhein Biotech GmbH, Дюссельдорф, Германия) на животное.

В качестве контрольного теста использовали адъювант AbISCO-100 (Isconova,
 45 Уппсала, Швеция) в количестве 12 мкг на дозу. AbISCO-100 является адъювантом, оптимизированным для использования на мышах.

Для повторной стимуляции CD8+ клеток у белых мышей использовали следующие синтетические полипептиды: HBsAg₂₈₋₃₉ IPQSLDSWWTSL как (L^d)-рестриктированные,

HBsAg-специфические пептиды ГКГ класса I. Малярийные CSP₂₈₀₋₂₈₉ SYVPSAEQI как (K^d)-рестриктированные, нерелевантные контрольные пептиды ГКГ класса I.

Специфические CD4+ Т-клетки активировали с помощью антигенов HBsAg (применяемых как и в композиции вакцины).

Исследования

а) Определение HBsAg-специфических IFN γ -образующих CD8+ Т-клеток селезенки

На 14 день после второй иммунизации суспензию, состоящую из одиночных клеток селезенки, активировали *ex vivo* на протяжении 4 часов с помощью соответствующих антиген-специфических пептидов. Брефелдин А добавляли, чтобы поддерживать внутриклеточную выработку цитокинов. Поверхности клеточных мембран окрашивали для CD8, фиксировали и делали проницаемыми для последующего внутриклеточного окрашивания IFN- γ . Окрашенные клетки анализировали с помощью проточного цитометра Beckmann Coulter (FC 500) с применением программного обеспечения СХР. Проанализировали 60000 положительных CD8 клеток. Определили количество CD8+ IFN- γ + Т-клеток на 10⁵ CD8+ Т-клеток.

б) Определение HBsAg-специфических IFN γ -образующих CD4+ Т-клеток селезенки

На 14 день после второй иммунизации суспензию, состоящую из одиночных клеток селезенки, активировали *ex vivo* на протяжении ночи с помощью 1 мкг/мл рекомбинантного HBsAg. Среду для активации использовали в качестве отрицательного контроля. После обработки брефелдином А на протяжении 4 часов поверхности клеточных мембран окрашивали для CD4, фиксировали и делали проницаемыми для последующего внутриклеточного окрашивания IFN- γ . Клетки анализировали с помощью проточного цитометра Beckmann Coulter (FC 500) с применением программного обеспечения СХР. Проанализировали 60000 положительных клеток CD4. Определили количество CD4+IFN- γ + Т-клеток на 10⁵ CD4+ Т-клеток.

в) Определение количества специфических поверхностных антител вируса гепатита В в мышинной сыворотке

С целью определения количества антител использовали оборудование IMx AUSAB (ELISA - энзим связанный иммуносорбентный метод исследования) с IMx Reader (Диагностика Эбботта). Тестирование проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

г) Определение профиля Т-хелперов (Тх) иммунного ответа

Антиген-специфические титры IgG1 и IgG2b определяли с помощью ELISA, а отношение IgG1/IgG2b использовали для определения Тх профиля.

Статистика

Для проведения статистического анализа разницы между двумя группами использовали t-тест (программное обеспечение GraphPad Prism 5).

Результаты

HBsAg-специфический ответ Т-клеток

После 2 иммунизаций наблюдали усиленный HBsAg-специфический ответ CD8+ Т-клеток в группах, к которым применяли по 50 нг и 5 нг авискумина (см. фиг. 4).

Группа, к которой применяли HBsAg с 0,5 нг авискумина, не продемонстрировала усиленного ответа CD8+ по сравнению с группой, к которой применяли один HBsAg (на который у белых мышей наблюдали определенный ответ CD8+). Как и ожидалось, положительный контроль AbISCO продемонстрировал эффективный ответ CD8+. В буферной и адьювантной контрольных группах теневой фенотип не наблюдали (см. фиг. 4).

HBsAg-специфический ответ CD4 Т-клеток наблюдали в группе, получившей HBsAg + 50 нг авискумина (см. фиг. 5).

Эффективность данного CD4+ ответа сравнима с той, что получили с AbISCO. Более низкие дозы авискумина, равно как и буферный и адъювантный контроль, не вызывали HBsAg-специфического ответа CD4 (см. фиг. 5).

Анти-HBsAg гуморальный ответ

Слабый анти-HB гуморальный ответ наблюдали через 2 недели после второй иммунизации в группе, к которой применяли 50 нг авискумина (см. фиг. 6).

Слабый анти-HB гуморальный ответ наблюдали у мышей даже при повторной иммунизации одним HBsAg.

Как и ожидалось, положительный контроль AbISCO вызывает сильный гуморальный ответ, в то время как буферный и адъювантный контроли являются отрицательными.

Профиль Т-хелперов не определили для животных иммунизированных HBsAg по причине слабых или негативных анти-HB титров.

Пример 3. Иммунизация овальбумином (ОВА)

Овальбумин (ОВА) является растворимым мономерным протеином, который может вызывать выработку анти-ОВА антител только в комбинации с адъювантами. Для позитивного контроля использовали AbISCO®-100 (Isconova, Уппсала, Швеция), так как известно, что данный адъювант увеличивает иммунный отклик в этой модели.

Штамм мышей: C57BL/6 (инбредные черные мыши);

2 подкожные иммунизации (1, 21 дни);

5 животных на группу (3 животных для контрольных групп 9 и 10); всего 31 животное.

Таблица 2

Группа	ОВА (доза/животное)	Адъювант (доза/животное)	Комментарий
8/З	10 мкг	адъювант AbISCO	положительный контроль
9/И	-	-	физраствор – отрицательный контроль
10/К	-	50 нг авискумина	адъювант контроль
11/Л	10 мкг	-	антиген контроль
12/М	10 мкг	0,5 нг авискумина	низкая доза
13/Н	10 мкг	5 нг авискумина	средняя доза
14/О	10 мкг	50 нг авискумина	высокая доза

Свежие композиции вакцины готовили перед каждой иммунизацией. Авискумин растворяли в физрастворе с добавлением 0,01% Твин 80.

Реагенты

В качестве антигена для композиций (объем 100 мкл на дозу/животное) применяли по 10 мкг обедненного эндотоксинами овальбумина (Hyglos GmbH, Регенсбург, Германия) на животное.

В качестве контрольного теста использовали адъювант AbISCO-100 (Isconova, Уппсала, Швеция) в количестве 12 мкг на дозу. AbISCO-100 является адъювантом, оптимизированным для использования на мышах.

Исследования

а) Определение количества специфических антител ОВА в мышинной сыворотке Alpha Diagnostics International.

Для определения количества анти-ОВА антител у мышей применяли метод ELISA от Alpha Diagnostics International. Тестирование проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

б) Определение профиля Т-хелперов (Тх) иммунного ответа

Антиген-специфические титры IgG1 и IgG2b определяли с помощью ELISA, а отношение IgG1/IgG2b использовали для определения Тх профиля.

Статистика

Для проведения статистического анализа разницы между двумя группами использовали t-тест (программное обеспечение GraphPad Prism 5).

Результаты

Анти-ОВА антитела

ОВА-специфический гуморальный ответ наблюдали в группе, к которой применяли 50 нг авискумина (см. фиг. 7). Буферная и адьювантная контрольные группы оказались отрицательными. Контрольная группа AbISCO была положительной (см. фиг. 7).

Определение ОВА-специфических изотипов IgG1 и IgG2b в группах с наибольшим применением авискумина (50 нг) показало, что анти-ОВА антитела подавлялись IgG1. Это служит показателем профиля Тх2 иммунного ответа.

Общие замечания

После первой и второй иммунизации никаких нежелательных явлений у животных не наблюдали.

Вывод

Исследования авискумина с антигенами HBsAg и ОВА показали наличие эффекта от применения адьюванта у мышей после подкожных иммунизаций (на 1 и 21 дни) при более высоких применяемых дозах (5 нг (50 нг/мл) и 50 нг (500 нг/мл)).

Т-клеточный ответ

Ответ CD4+ и CD8+ на HBsAg наблюдали в случае их применения вместе с авискумином (в дозировках 50 нг (500 нг/мл) и 5 нг (50 нг/мл)). В частности, ответу CD4+ Т-клетки в большой мере способствует авискумин.

Так как HBsAg отдельно вызывает определенный ответ CD8+ у белых мышей, как это известно, эффект авискумина как адьюванта усиливает этот исходный уровень.

Эти результаты показывают, что авискумин обладает свойствами адьюванта, в частности в отношении ответа CD4+ Т-хелперов.

Гуморальный иммунный ответ

Анти-HBsAg ответ был отрицательным, исключение составлял случай с одним животным из пяти. Известно, что антитела анти-HBsAg характеризуются медленной кинетикой. В таком случае, животные, у которых не обнаружили антител анти-HBsAg, с течением времени проявили бы положительный эффект. В идеальном варианте антитела определяются через 4 недели после иммунизации. Однако исследования были сфокусированы на ответе Т-клеток и поэтому животные умерщвлялись через 14 дней после иммунизации.

Анти-ОВА гуморальный иммунный ответ наблюдали на момент умерщвления животных, то есть, через 14 дней после иммунизации.

Определение изотипов анти-ОВА антител характеризует профиль Тх2 иммунного ответа. Это согласуется с наблюдаемым индуцированием CD4 Т-клеток.

Обобщающие результаты

Дозы авискумина в 50 нг (500 нг/мл) и 5 нг (50 нг/мл) на животное усиливают специфические ответы CD8 Т-клеток и, в особенности, CD4 Т-клеток на HBsAg, который является сложным липопротеиновым антигеном. Были определены специфические антитела к ОВА, имеющие Тх2 профиль.

Эти данные показывают, что авискумин оказывает эффект адьюванта с усиленным ответом CD4 Т-хелперов.

Дозы авискумина, при которых проявлялся усиленный иммунный ответ на HBsAg,

были низкими.

Эффект авискумина как адьюванта, возможно, может быть усиленным изменением дозировок, или бустер-иммунизации, или базовой композиции с целью достижения определенных концентраций антител в каждом случае.

5 Описание фигур

Фиг. 1 описывает механизм действия неспецифических адьювантов (фигура из Lamine Mbow M et al. 2010 (выше)).

На Фиг. 2 показана секреция ИЛ-1 β (пг/мл) из человеческих МКПК авискумином и ЛПС.

10 На Фиг. 3 показана секреция ИЛ-18 (пг/мл) из человеческих МКПК авискумином и ЛПС.

На Фиг. 4 показаны результаты исследования HBsAg-специфического ответа Т-клеток, при котором измеряли ответ CD8 Т-клеток белых мышей. Повторная стимуляция происходила с участием поверхностного эпитопа ГВ 28-39.

15 На Фиг. 5 показаны результаты исследования HBsAg-специфического ответа Т-клеток, при котором измеряли ответ CD4 Т-клеток белых мышей. Повторная стимуляция происходила с участием HBsAg.

На Фиг. 6 показаны результаты исследования анти-HBs гуморального иммунного ответа у белых мышей.

20 На Фиг. 7 показаны результаты исследования анти-ОВА гуморального иммунного ответа у черных мышей штамма C57BL/6.

На Фиг. 8 показана индуцированная авискумином секреция ИЛ-1 β (пг/мл) из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) добровольных доноров после выдерживания на протяжении 24 часов в присутствии ЛПС.

25

(57) Формула изобретения

1. Вакцина, содержащая один антиген или более и, по меньшей мере, один адьювант, отобранный из группы рекомбинантных лектинов омелы белой с аминокислотными последовательностями SEQ ID No. 1 и SEQ ID No. 4, где рекомбинантный лектин омелы белой не имеет какого-либо гликозилирования.

30 2. Вакцина по п. 1, которая вводится подкожно или внутримышечно.

3. Вакцина по п. 1, в которой полипептид рекомбинантного лектина омелы белой представляет собой А-цепь лектина омелы белой, отобранную из группы аминокислотных последовательностей SEQ ID No. 1.

35 4. Вакцина по п. 1, в которой полипептид рекомбинантного лектина омелы белой представляет собой В-цепь лектина омелы белой, отобранную из группы аминокислотных последовательностей SEQ ID No. 4.

40 5. Вакцина по п. 1, отличающаяся тем, что вакцина дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемый растворитель, в некоторых случаях - вспомогательные вещества и добавки.

6. Лекарственное средство, содержащее вакцину по п. 1, где адьювант присутствует в концентрации от 5 до 600 нг/мл, в частности от 250 до 450 нг/мл, 350 нг/мл, или от 5 до 600 нг/пациент, в частности от 250 до 450 нг/пациент, 350 нг/пациент.

7. Лекарственное средство по п. 6, которое вводится подкожно или внутримышечно.

45 8. Лекарственное средство по п. 6, в котором полипептид рекомбинантного лектина омелы белой представляет собой А-цепь лектина омелы белой, отобранную из группы аминокислотных последовательностей SEQ ID No. 1.

9. Лекарственное средство по п. 6, в котором полипептид рекомбинантного лектина

омелы белой представляет собой В-цепь лектина омелы белой, отобранную из группы аминокислотных последовательностей SEQ ID No. 4.

10. Лекарственное средство по п. 6, отличающееся тем, что вакцина дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемый растворитель, в некоторых случаях - вспомогательные вещества и добавки.

11. Композиция для применения в качестве вакцины, содержащая вакцину по п. 1, где адъювант присутствует в концентрации от 5 до 600 нг/мл, в частности от 250 до 450 нг/мл, 350 нг/мл, или от 5 до 600 нг/пациент, в частности от 250 до 450 нг/пациент, 350 нг/пациент.

12. Лекарственное средство для применения в качестве вакцины, содержащее вакцину по п. 1.

13. Композиция для применения в качестве вакцины, содержащая вакцину по п. 1.

15

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ЦИТАВИС БИОФАРМА ГМБХ
 <120> Рекомбинантный лектин омелы белой и его применение в качестве адъюванта
 <130> СУТ26WO
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 253
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственный
 <220>
 <223> EP0751221 рекомбинантный белок
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa может представлять собой Met или может быть удален
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa может представлять собой Ile или Leu
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa может представлять собой Glu или Asp
 <400> 1
 Xaa Tyr Glu Arg Xaa Arg Leu Arg Val Thr His Gln Thr Thr Gly Xaa
 1 5 10 15
 Glu Tyr Phe Arg Phe Ile Thr Leu Leu Arg Asp Tyr Val Ser Ser Gly
 20 25 30
 Ser Phe Ser Asn Glu Ile Pro Leu Leu Arg Gln Ser Thr Ile Pro Val
 35 40 45
 Ser Asp Ala Gln Arg Phe Val Leu Val Glu Leu Thr Asn Gln Gly Gly
 50 55 60
 Asp Ser Ile Thr Ala Ala Ile Asp Val Thr Asn Leu Tyr Val Val Ala
 65 70 75 80
 Tyr Gln Ala Gly Asp Gln Ser Tyr Phe Leu Arg Asp Ala Pro Arg Gly
 85 90 95
 Ala Glu Thr His Leu Phe Thr Gly Thr Thr Arg Ser Ser Leu Pro Phe
 100 105 110

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(76)
<223> Хаа может представлять собой Leu или Ala
<220>
<221> misc_feature
<222> (108)..(108)
<223> Хаа может представлять собой Asp-Arg или может быть удален

<220>
<221> misc_feature
<222> (114)..(114)
<223> Хаа может представлять собой Asn или Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (118)..(118)
<223> Хаа может представлять собой Pro или Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (135)..(135)
<223> Хаа может представлять собой Asp или Glu

<220>
<221> misc_feature
<222> (142)..(142)
<223> Хаа может представлять собой Ser или Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (146)..(146)
<223> Хаа может представлять собой Phe или Tyr

<220>
<221> misc_feature
<222> (153)..(153)
<223> Хаа может представлять собой Ala или Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (178)..(178)
<223> Хаа может представлять собой Ala или Tyr
<220>
<221> misc_feature
<222> (181)..(181)
<223> Хаа может представлять собой Tyr или Asp

<220>
<221> misc_feature
<222> (186)..(186)
<223> Хаа может представлять собой Ala или Glu

<220>
<221> misc_feature
<222> (192)..(192)
<223> Хаа может представлять собой Val или Met
<220>
<221> misc_feature
<222> (220)..(220)
<223> Хаа может представлять собой Ile или Phe

<220>

4

<221> misc_feature
 <222> (225)..(226)
 <223> Xaa может представлять собой Pro-Ser или Pro-Thr

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (233)..(233)
 <223> Xaa может представлять собой Thr или Ser

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (237)..(237)
 <223> Xaa может представлять собой Asp или Ser

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (255)..(256)
 <223> Xaa может представлять собой Ser-Ser или может быть удален

<400> 2

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

5

Arg Xaa Arg Gln Xaa Ile Asn Ser Gly Xaa Ser Phe Leu Pro Asp Xaa
 180 185 190

Tyr Met Leu Glu Leu Glu Thr Ser Trp Gly Gln Gln Ser Thr Gln Val
 195 200 205

Gln His Ser Thr Asp Gly Val Phe Asn Asn Pro Xaa Arg Leu Ala Ile
 210 215 220

Xaa Xaa Gly Asn Phe Val Thr Leu Xaa Asn Val Arg Xaa Val Ile Ala
 225 230 235 240

Ser Leu Ala Ile Met Leu Phe Val Cys Gly Glu Arg Pro Ser Xaa Xaa
 245 250 255

<210> 3
 <211> 257
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственный

<220>
 <223> EP1051495 рекомбинантный белок

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa может представлять собой Met или может быть удален

<400> 3

Xaa Tyr Glu Arg Leu Arg Leu Arg Val Thr His Gln Thr Thr Gly Asp
 1 5 10 15

Glu Tyr Phe Arg Phe Ile Thr Leu Leu Arg Asp Tyr Val Ser Ser Gly
 20 25 30

Ser Phe Ser Asn Glu Ile Pro Leu Leu Arg Gln Ser Thr Ile Pro Val
 35 40 45

Ser Asp Ala Gln Arg Phe Val Leu Val Glu Leu Thr Asn Gln Gly Gln
 50 55 60

Asp Ser Ile Thr Ala Ala Ile Asp Val Thr Asn Ala Tyr Val Val Ala
 65 70 75 80

Tyr Gln Ala Gly Asp Gln Ser Tyr Phe Leu Arg Asp Ala Pro Arg Gly
 85 90 95

Ala Glu Thr His Leu Phe Thr Gly Thr Thr Arg Asp Arg Ser Ser Leu
 100 105 110

Pro Phe Thr Gly Ser Tyr Thr Asp Leu Glu Arg Tyr Ala Gly His Arg
 115 120 125

Asp Gln Ile Pro Leu Gly Ile Glu Gln Leu Ile Gln Ser Val Ser Ala
 130 135 140

Leu Arg Tyr Pro Gly Gly Ser Thr Arg Ala Gln Ala Arg Ser Ile Leu
 145 150 155 160

Ile Leu Ile Gln Met Ile Ser Glu Ala Ala Arg Phe Asn Pro Ile Leu
 165 170 175

Trp Arg Tyr Arg Gln Asp Ile Asn Ser Gly Glu Ser Phe Leu Pro Asp
 180 185 190

Met Tyr Met Leu Glu Leu Glu Thr Ser Trp Gly Gln Gln Ser Thr Gln
 195 200 205

Val Gln His Ser Thr Asp Gly Val Phe Asn Asn Pro Phe Arg Leu Ala
 210 215 220

Ile Ser Thr Gly Asn Phe Val Thr Leu Ser Asn Val Arg Ser Val Ile
 225 230 235 240

Ala Ser Leu Ala Ile Met Leu Phe Val Cys Gly Glu Arg Pro Ser Ser
 245 250 255

Ser

<210> 4
 <211> 264
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственный

<220>
 <223> EP0751221 рекомбинантный белок

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa может представлять собой Met или может быть удален

<400> 4

Xaa Asp Asp Val Thr Cys Ser Ala Ser Glu Pro Thr Val Arg Ile Val
 1 5 10 15

Gly Arg Asn Gly Met Cys Val Asp Val Arg Asp Asp Asp Phe Arg Asp
 20 25 30

Gly Asn Gln Ile Gln Leu Trp Pro Ser Lys Ser Asn Asn Asp Pro Asn
 35 40 45

Gln Leu Trp Thr Ile Lys Arg Asp Gly Thr Ile Arg Ser Asn Gly Ser
 50 55 60

Cys Leu Thr Thr Tyr Gly Tyr Thr Ala Gly Val Tyr Val Met Ile Phe
 65 70 75 80

Asp Cys Asn Thr Ala Val Arg Glu Ala Thr Leu Trp Gln Ile Trp Gly
 85 90 95

Asn Gly Thr Ile Ile Asn Pro Arg Ser Asn Leu Val Leu Ala Ala Ser
 100 105 110

Ser Gly Ile Lys Gly Thr Thr Leu Thr Val Gln Thr Leu Asp Tyr Thr
 115 120 125

Leu Gly Gln Gly Trp Leu Ala Gly Asn Asp Thr Ala Pro Arg Glu Val
 130 135 140

Thr Ile Tyr Gly Phe Arg Asp Leu Cys Met Glu Ser Asn Gly Gly Ser
 145 150 155 160

Val Trp Val Glu Thr Cys Val Ser Ser Gln Lys Asn Gln Arg Trp Ala
 165 170 175

Leu Tyr Gly Asp Gly Ser Ile Arg Pro Lys Gln Asn Gln Asp Gln Cys
 180 185 190

Leu Thr Cys Gly Arg Asp Ser Val Ser Thr Val Ile Asn Ile Val Ser
 195 200 205

Cys Ser Ala Gly Ser Ser Gly Gln Arg Trp Val Phe Thr Asn Glu Gly
 210 215 220

Ala Ile Leu Asn Leu Lys Asn Gly Leu Ala Met Asp Val Ala Gln Ala
 225 230 235 240

Asn Pro Lys Leu Arg Arg Ile Ile Ile Tyr Pro Ala Thr Gly Lys Pro
 245 250 255

Asn Gln Met Trp Leu Pro Val Pro
 260

<210> 5
 <211> 268
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственный

<220>

<223> EP0751221 рекомбинантный белок

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa может представлять собой Met или может быть удален

<400> 5

Xaa Asp Asp Val Thr Cys Ser Ala Ser Glu Pro Thr Val Arg Ile Val
1 5 10 15

Gly Arg Asn Gly Met Cys Val Asp Val Arg Asp Asp Asp Phe Arg Asp
20 25 30

Gly Asn Gln Ile Gln Leu Trp Pro Ser Lys Ser Asn Asn Asp Pro Asn
35 40 45

Gln Leu Trp Thr Ile Lys Arg Asp Gly Thr Ile Arg Ser Asn Gly Ser
50 55 60

Cys Leu Thr Thr Tyr Gly Tyr Thr Ala Gly Val Tyr Val Met Ile Phe
65 70 75 80

Asp Cys Asn Thr Ala Val Arg Glu Ala Thr Leu Trp Gln Ile Trp Gly
85 90 95

Asn Gly Thr Ile Ile Asn Pro Arg Ser Asn Leu Val Leu Ala Ala Ser
100 105 110

Ser Gly Ile Lys Gly Thr Thr Leu Thr Val Gln Thr Leu Asp Tyr Thr
115 120 125

Leu Gly Gln Gly Trp Leu Ala Gly Asn Asp Thr Ala Pro Arg Glu Val
130 135 140

Thr Ile Tyr Gly Phe Arg Asp Leu Cys Met Glu Ser Asn Gly Gly Ser
145 150 155 160

Val Trp Val Glu Thr Cys Val Ser Ser Gln Lys Asn Gln Arg Trp Ala
165 170 175

Leu Tyr Gly Asp Gly Ser Ile Arg Pro Lys Gln Asn Gln Asp Gln Cys
180 185 190

Leu Thr Cys Gly Arg Asp Ser Val Ser Thr Val Ile Asn Ile Val Ser
195 200 205

Cys Ser Ala Gly Ser Ser Gly Gln Arg Trp Val Phe Thr Asn Glu Gly
 210 215 220

Ala Ile Leu Asn Leu Lys Asn Gly Leu Ala Met Asp Val Ala Gln Ala
 225 230 235 240

Asn Pro Lys Leu Arg Arg Ile Ile Ile Tyr Pro Ala Thr Gly Lys Pro
 245 250 255

Asn Gln Met Trp Leu Pro Val Pro Gly Gly Tyr His
 260 265

<210> 6

<211> 265

<212> БЕЛОК

<213> Искусственный

<220>

<223> EP1051495 рекомбинантный белок

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Хаа может представлять собой Met или может быть удален

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> Хаа может представлять собой Asn или Ser

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> Хаа может представлять собой Cys или Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> Хаа может представлять собой Gly или Asn

<220>

<221> misc_feature

<222> (96)..(96)

<223> Хаа может представлять собой Gly или Asn

<220>

<221> misc_feature

<222> (158)..(158)

<223> Хаа может представлять собой Gly или Gln

<220>

<221> misc_feature

<222> (167)..(167)

<223> Хаа может представлять собой Val или Asp

<220>

<221> misc_feature

<222> (171)..(171)

<223> Хаа может представлять собой Gln или Lys

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (174)..(175)
<223> Xaa может представлять собой Gly или может быть удален или может
представлять собой Gly-Arg или Gly-Lys или Arg или Lys

<220>
<221> misc_feature
<222> (196)..(196)
<223> Xaa может представлять собой Cys или Val или Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (212)..(213)
<223> Xaa может представлять собой Ala-Ala или Ala-Gly или Gly-Ala или Gly-Gly

<220>
<221> misc_feature
<222> (215)..(216)
<223> Xaa может представлять собой Ser-Ser или Ser-Gly или Gly-Ser или Gly-Gly

<220>
<221> misc_feature
<222> (225)..(225)
<223> Xaa может представлять собой Gly или Tyr

<220>
<221> misc_feature
<222> (232)..(236)
<223> Xaa232 может представлять собой Asn, Ser, Thr или Lys, Xaa233 может
представлять собой Ser или Gly, Xaa234 может представлять собой Leu или Pro,
Xaa235 может представлять собой Ala или Met, Xaa 236 может представлять собой
Met или Val

<220>
<221> misc_feature
<222> (265)..(265)
<223> Xaa может представлять собой Pro или Phe

<400> 6

Xaa Asp Asp Val Thr Cys Ser Ala Ser Glu Pro Thr Val Arg Ile Val
1 5 10 15

Gly Arg Xaa Gly Met Xaa Val Asp Val Arg Asp Asp Asp Phe His Asp
20 25 30

Gly Asn Gln Ile Gln Leu Trp Pro Ser Lys Ser Asn Asn Asp Pro Asn
35 40 45

Gln Leu Trp Thr Ile Lys Arg Asp Xaa Thr Ile Arg Ser Asn Gly Ser
50 55 60

Cys Leu Thr Thr Tyr Gly Tyr Thr Ala Gly Val Tyr Val Met Ile Phe
65 70 75 80

Asp Cys Asn Thr Ala Val Arg Glu Ala Thr Ile Trp Gln Ile Trp Xaa
85 90 95

```

Asn Gly Thr Ile Ile Asn Pro Arg Ser Asn Leu Val Leu Ala Ala Ser
 100 105 110

Ser Gly Ile Lys Gly Thr Thr Leu Thr Val Gln Thr Leu Asp Tyr Thr
 115 120 125

Leu Gly Gln Gly Trp Leu Ala Gly Asn Asp Thr Ala Pro Arg Glu Val
 130 135 140

Thr Ile Tyr Gly Phe Arg Asp Leu Cys Met Glu Ser Asn Xaa Gly Ser
 145 150 155 160

Val Trp Val Glu Thr Cys Xaa Ser Ser Gln Xaa Asn Gln Xaa Xaa Trp
 165 170 175

Ala Leu Tyr Gly Asp Gly Ser Ile Arg Pro Lys Gln Asn Gln Asp Gln
 180 185 190

Cys Leu Thr Xaa Gly Arg Asp Ser Val Ser Thr Val Ile Asn Ile Val
 195 200 205

Ser Cys Ser Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Gln Arg Trp Val Phe Thr Asn Glu
 210 215 220

Xaa Ala Ile Leu Asn Leu Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Val Ala Gln
 225 230 235 240

Ala Asn Pro Lys Leu Arg Arg Ile Ile Ile Tyr Pro Ala Thr Gly Lys
 245 250 255

Pro Asn Gln Met Trp Leu Pro Val Xaa
 260 265

<210> 7
 <211> 264
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственный

<220>
 <223> EP1051495 рекомбинантный белок

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa может представлять собой Met или может быть удален

<400> 7

Xaa Asp Asp Val Thr Cys Ser Ala Ser Glu Pro Thr Val Arg Ile Val
 1 5 10 15

Gly Arg Asn Gly Met Cys Val Asp Val Arg Asp Asp Asp Phe His Asp
 20 25 30

Gly Asn Gln Ile Gln Leu Trp Pro Ser Lys Ser Asn Asn Asp Pro Asn
 35 40 45

Gln Leu Trp Thr Ile Lys Arg Asp Gly Thr Ile Arg Ser Asn Gly Ser
 50 55 60

Cys Leu Thr Thr Tyr Gly Tyr Thr Ala Gly Val Tyr Val Met Ile Phe
 65 70 75 80

Asp Cys Asn Thr Ala Val Arg Glu Ala Thr Ile Trp Gln Ile Trp Gly
 85 90 95

Asn Gly Thr Ile Ile Asn Pro Arg Ser Asn Leu Val Leu Ala Ala Ser
 100 105 110

Ser Gly Ile Lys Gly Thr Thr Leu Thr Val Gln Thr Leu Asp Tyr Thr
 115 120 125

Leu Gly Gln Gly Trp Leu Ala Gly Asn Asp Thr Ala Pro Arg Glu Val
 130 135 140

Thr Ile Tyr Gly Phe Arg Asp Leu Cys Met Glu Ser Asn Gly Gly Ser
 145 150 155 160

Val Trp Val Glu Thr Cys Val Ser Ser Gln Gln Asn Gln Arg Trp Ala
 165 170 175

Leu Tyr Gly Asp Gly Ser Ile Arg Pro Lys Gln Asn Gln Asp Gln Cys
 180 185 190

Leu Thr Cys Gly Arg Asp Ser Val Ser Thr Val Ile Asn Ile Val Ser
 195 200 205

Cys Ser Ala Gly Ser Ser Gly Gln Arg Trp Val Phe Thr Asn Glu Gly
 210 215 220

Ala Ile Leu Asn Leu Lys Asn Gly Leu Ala Met Asp Val Ala Gln Ala
 225 230 235 240

Asn Pro Lys Leu Arg Arg Ile Ile Ile Tyr Pro Ala Thr Gly Lys Pro
 245 250 255

Asn Gln Met Trp Leu Pro Val Pro
 260

<210> 8
 <211> 265
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственный

 <220>
 <223> EP1051495 рекомбинантный белок

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa может представлять собой Met или может быть удален

 <400> 8

 Xaa Asp Asp Val Thr Cys Ser Ala Ser Glu Pro Thr Val Arg Ile Val
 1 5 10 15

 Gly Arg Asn Gly Met Arg Val Asp Val Arg Asp Asp Asp Phe His Asp
 20 25 30

 Gly Asn Gln Ile Gln Leu Trp Pro Ser Lys Ser Asn Asn Asp Pro Asn
 35 40 45

 Gln Leu Trp Thr Ile Lys Arg Asp Gly Thr Ile Arg Ser Asn Gly Ser
 50 55 60

 Cys Leu Thr Thr Tyr Gly Tyr Thr Ala Gly Val Tyr Val Met Ile Phe
 65 70 75 80

 Asp Cys Asn Thr Ala Val Arg Glu Ala Thr Ile Trp Gln Ile Trp Asp
 85 90 95

 Asn Gly Thr Ile Ile Asn Pro Arg Ser Asn Leu Val Leu Ala Ala Ser
 100 105 110

 Ser Gly Ile Lys Gly Thr Thr Leu Thr Val Gln Thr Leu Asp Tyr Thr
 115 120 125

 Leu Gly Gln Gly Trp Leu Ala Gly Asn Asp Thr Ala Pro Arg Glu Val
 130 135 140

 Thr Ile Tyr Gly Phe Arg Asp Leu Cys Met Glu Ser Asn Gly Gly Ser
 145 150 155 160

 Val Trp Val Glu Thr Cys Asp Ser Ser Gln Lys Asn Gln Gly Lys Trp
 165 170 175

 Ala Leu Tyr Gly Asp Gly Ser Ile Arg Pro Lys Gln Asn Gln Asp Gln
 180 185 190

Cys Leu Thr Ser Gly Arg Asp Ser Val Ser Thr Val Ile Asn Ile Val
 195 200 205

Ser Cys Ser Gly Ala Ser Gly Ser Gln Arg Trp Val Phe Thr Asn Glu
 210 215 220

Gly Ala Ile Leu Asn Leu Lys Asn Gly Leu Ala Met Asp Val Ala Gln
 225 230 235 240

Ala Asn Pro Lys Leu Arg Arg Ile Ile Ile Tyr Pro Ala Thr Gly Lys
 245 250 255

Pro Asn Gln Met Trp Leu Pro Val Phe
 260 265

<210> 9
 <211> 265
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственный
 <220>
 <223> EP1051495 рекомбинантный белок

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa может представлять собой Met или может быть удален
 <400> 9

Xaa Asp Asp Val Thr Cys Ser Ala Ser Glu Pro Thr Val Arg Ile Val
 1 5 10 15

Gly Arg Ser Gly Met Arg Val Asp Val Arg Asp Asp Asp Phe His Asp
 20 25 30

Gly Asn Gln Ile Gln Leu Trp Pro Ser Lys Ser Asn Asn Asp Pro Asn
 35 40 45

Gln Leu Trp Thr Ile Lys Arg Asp Asn Thr Ile Arg Ser Asn Gly Ser
 50 55 60

Cys Leu Thr Thr Tyr Gly Tyr Thr Ala Gly Val Tyr Val Met Ile Phe
 65 70 75 80

Asp Cys Asn Thr Ala Val Arg Glu Ala Thr Ile Trp Gln Ile Trp Asp
 85 90 95

Asn Gly Thr Ile Ile Asn Pro Arg Ser Asn Leu Val Leu Ala Ala Ser
 100 105 110

Ser Gly Ile Lys Gly Thr Thr Leu Thr Val Gln Thr Leu Asp Tyr Thr
 115 120 125

Leu Gly Gln Gly Trp Leu Ala Gly Asn Asp Thr Ala Pro Arg Glu Val
 130 135 140

Thr Ile Tyr Gly Phe Arg Asp Leu Cys Met Glu Ser Asn Gln Gly Ser
 145 150 155 160

Val Trp Val Glu Thr Cys Asp Ser Ser Gln Lys Asn Gln Gly Lys Trp
 165 170 175

Ala Leu Tyr Gly Asp Gly Ser Ile Arg Pro Lys Gln Asn Gln Asp Gln
 180 185 190

Cys Leu Thr Val Gly Arg Asp Ser Val Ser Thr Val Ile Asn Ile Val
 195 200 205

Ser Cys Ser Gly Ala Ser Gly Ser Gln Arg Trp Val Phe Thr Asn Glu
 210 215 220

Tyr Ala Ile Leu Asn Leu Lys Ser Gly Leu Ala Met Asp Val Ala Gln
 225 230 235 240

Ala Asn Pro Lys Leu Arg Arg Ile Ile Ile Tyr Pro Ala Thr Gly Lys
 245 250 255

Pro Asn Gln Met Trp Leu Pro Val Phe
 260 265

<210> 10
 <211> 265
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственный

<220>
 <223> EP1051495 рекомбинантный белок

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa может представлять собой Met или может быть удален

<400> 10

Xaa Asp Asp Val Thr Cys Ser Ala Ser Glu Pro Thr Val Arg Ile Val
 1 5 10 15

Gly Arg Asn Gly Met Arg Val Asp Val Arg Asp Asp Asp Phe His Asp
 20 25 30

Gly Asn Gln Ile Gln Leu Trp Pro Ser Lys Ser Asn Asn Asp Pro Asn
 35 40 45

Gln Leu Trp Thr Ile Lys Arg Asp Gly Thr Ile Arg Ser Asn Gly Ser
 50 55 60

Cys Leu Thr Thr Tyr Gly Tyr Thr Ala Gly Val Tyr Val Met Ile Phe
 65 70 75 80

Asp Cys Asn Thr Ala Val Arg Glu Ala Thr Ile Trp Gln Ile Trp Asp
 85 90 95

Asn Gly Thr Ile Ile Asn Pro Arg Ser Asn Leu Val Leu Ala Ala Ser
 100 105 110

Ser Gly Ile Lys Gly Thr Thr Leu Thr Val Gln Thr Leu Asp Tyr Thr
 115 120 125

Leu Gly Gln Gly Trp Leu Ala Gly Asn Asp Thr Ala Pro Arg Glu Val
 130 135 140

Thr Ile Tyr Gly Phe Arg Asp Leu Cys Met Glu Ser Asn Gly Gly Ser
 145 150 155 160

Val Trp Val Glu Thr Cys Asp Ser Ser Gln Lys Asn Gln Gly Lys Trp
 165 170 175

Ala Leu Tyr Gly Asp Gly Ser Ile Arg Pro Lys Gln Asn Gln Asp Gln
 180 185 190

Cys Leu Thr Ser Gly Arg Asp Ser Val Ser Thr Val Ile Asn Ile Val
 195 200 205

Ser Cys Ser Gly Ala Ser Gly Ser Gln Arg Trp Val Phe Thr Asn Glu
 210 215 220

Gly Ala Ile Leu Asn Leu Lys Thr Gly Leu Ala Met Asp Val Ala Gln
 225 230 235 240

Ala Asn Pro Lys Leu Arg Arg Ile Ile Ile Tyr Pro Ala Thr Gly Lys
 245 250 255

Pro Asn Gln Met Trp Leu Pro Val Phe
 260 265

<210> 11
 <211> 265

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственный

 <220>
 <223> EP1051495 рекомбинантный белок

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа может представлять собой Met или может быть удален

 <400> 11

 Xaa Asp Asp Val Thr Cys Ser Ala Ser Glu Pro Thr Val Arg Ile Val
 1 5 10 15

 Gly Arg Asn Gly Met Arg Val Asp Val Arg Asp Asp Asp Phe His Asp
 20 25 30

 Gly Asn Gln Ile Gln Leu Trp Pro Ser Lys Ser Asn Asn Asp Pro Asn
 35 40 45

 Gln Leu Trp Thr Ile Lys Arg Asp Gly Thr Ile Arg Ser Asn Gly Ser
 50 55 60

 Cys Leu Thr Thr Tyr Gly Tyr Thr Ala Gly Val Tyr Val Met Ile Phe
 65 70 75 80

 Asp Cys Asn Thr Ala Val Arg Glu Ala Thr Ile Trp Gln Ile Trp Asp
 85 90 95

 Asn Gly Thr Ile Ile Asn Pro Arg Ser Asn Leu Val Leu Ala Ala Ser
 100 105 110

 Ser Gly Ile Lys Gly Thr Thr Leu Thr Val Gln Thr Leu Asp Tyr Thr
 115 120 125

 Leu Gly Gln Gly Trp Leu Ala Gly Asn Asp Thr Ala Pro Arg Glu Val
 130 135 140

 Thr Ile Tyr Gly Phe Arg Asp Leu Cys Met Glu Ser Asn Gly Gly Ser
 145 150 155 160

 Val Trp Val Glu Thr Cys Asp Ser Ser Gln Lys Asn Gln Gly Lys Trp
 165 170 175

 Ala Leu Tyr Gly Asp Gly Ser Ile Arg Pro Lys Gln Asn Gln Asp Gln
 180 185 190

 Cys Leu Thr Ser Gly Arg Asp Ser Val Ser Thr Val Ile Asn Ile Val
 195 200 205

Ser Cys Ser Gly Ala Ser Gly Ser Gln Arg Trp Val Phe Thr Asn Glu
 210 215 220

Gly Ala Ile Leu Asn Leu Lys Lys Gly Pro Ala Met Asp Val Ala Gln
 225 230 235 240

Ala Asn Pro Lys Leu Arg Arg Ile Ile Ile Tyr Pro Ala Thr Gly Lys
 245 250 255

Pro Asn Gln Met Trp Leu Pro Val Phe
 260 265

<210> 12
 <211> 265
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственный

<220>
 <223> EP1051495 рекомбинантный белок

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa может представлять собой Met или может быть удален

<400> 12

Xaa Asp Asp Val Thr Cys Ser Ala Ser Glu Pro Thr Val Arg Ile Val
 1 5 10 15

Gly Arg Asn Gly Met Arg Val Asp Val Arg Asp Asp Asp Phe His Asp
 20 25 30

Gly Asn Gln Ile Gln Leu Trp Pro Ser Lys Ser Asn Asn Asp Pro Asn
 35 40 45

Gln Leu Trp Thr Ile Lys Arg Asp Gly Thr Ile Arg Ser Asn Gly Ser
 50 55 60

Cys Leu Thr Thr Tyr Gly Tyr Thr Ala Gly Val Tyr Val Met Ile Phe
 65 70 75 80

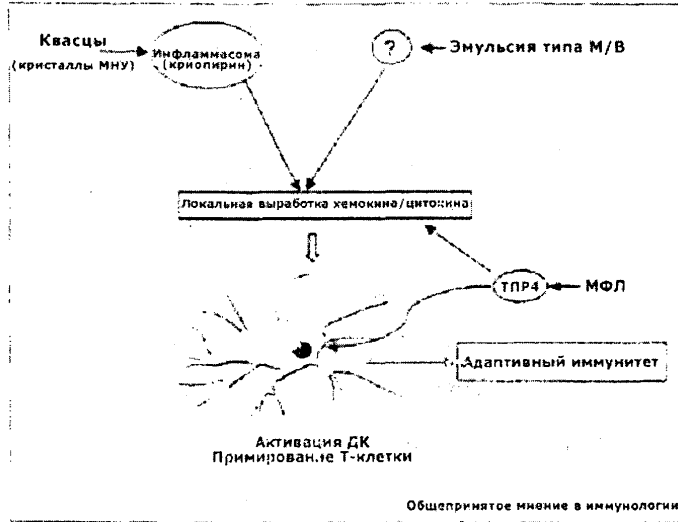
Asp Cys Asn Thr Ala Val Arg Glu Ala Thr Ile Trp Gln Ile Trp Asp
 85 90 95

Asn Gly Thr Ile Ile Asn Pro Arg Ser Asn Leu Val Leu Ala Ala Ser
 100 105 110

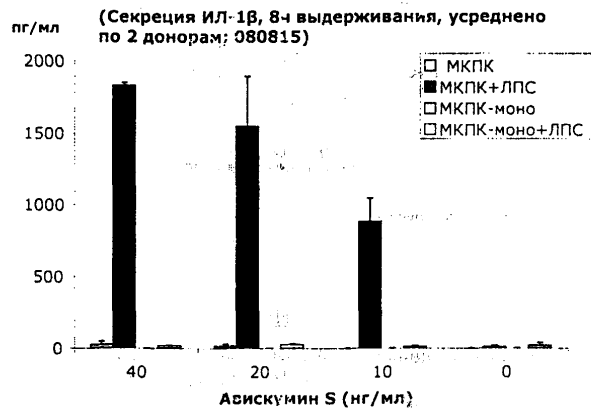
Ser Gly Ile Lys Gly Thr Thr Leu Thr Val Gln Thr Leu Asp Tyr Thr
 115 120 125

Leu Gly Gln Gly Trp Leu Ala Gly Asn Asp Thr Ala Pro Arg Glu Val
 130 135 140
 Thr Ile Tyr Gly Phe Arg Asp Leu Cys Met Glu Ser Asn Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Val Trp Val Glu Thr Cys Asp Ser Ser Gln Lys Asn Gln Gly Lys Trp
 165 170 175
 Ala Leu Tyr Gly Asp Gly Ser Ile Arg Pro Lys Gln Asn Gln Asp Gln
 180 185 190
 Cys Leu Thr Ser Gly Arg Asp Ser Val Ser Thr Val Ile Asn Ile Val
 195 200 205
 Ser Cys Ser Gly Ala Ser Gly Ser Gln Arg Trp Val Phe Thr Asn Glu
 210 215 220
 Gly Ala Ile Leu Asn Leu Lys Asn Ser Leu Met Val Asp Val Ala Gln
 225 230 235 240
 Ala Asn Pro Lys Leu Arg Arg Ile Ile Ile Tyr Pro Ala Thr Gly Lys
 245 250 255
 Pro Asn Gln Met Trp Leu Pro Val Phe
 260 265

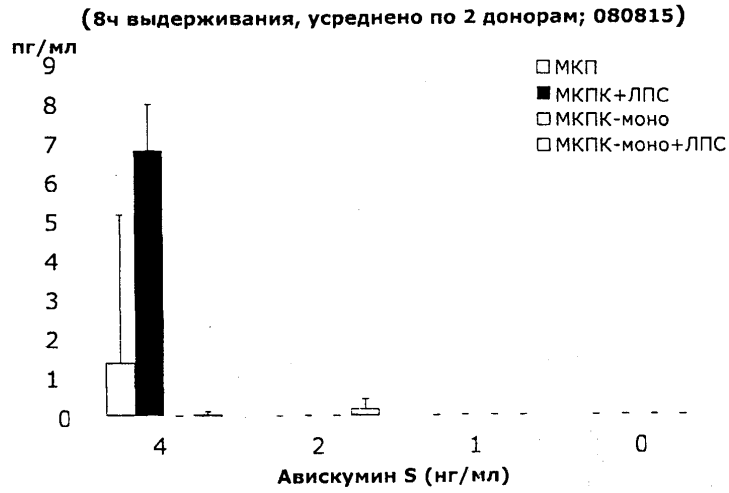
Фиг. 1



Фиг. 2



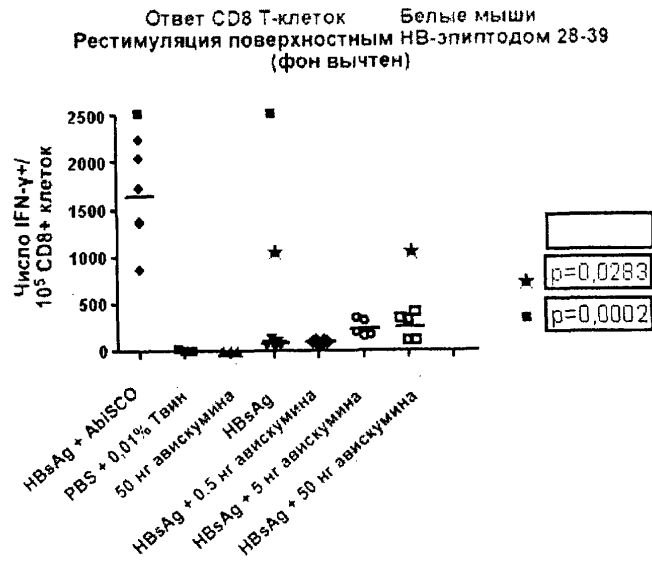
Фиг. 3



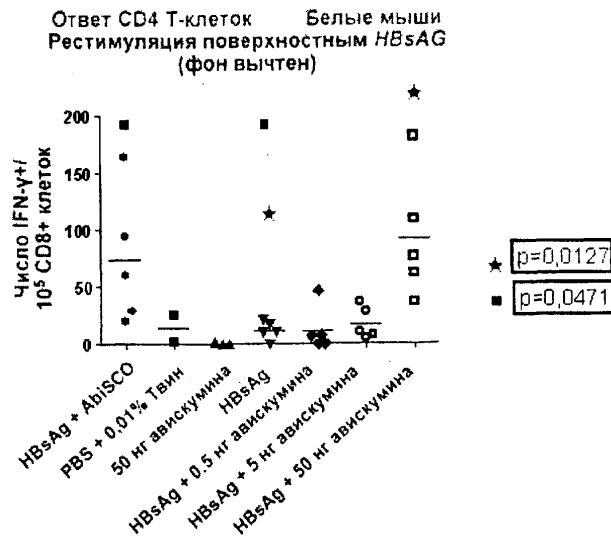
DE	EN	РУ
Inkubation	Incubation	Выдерживание
Mittelwert aus 2 Spendern	Mean of 2 donors	Усреднено по 2 донорам
Aviscuminum	Aviscumine	Авискумин

Фиг. 4

3/5

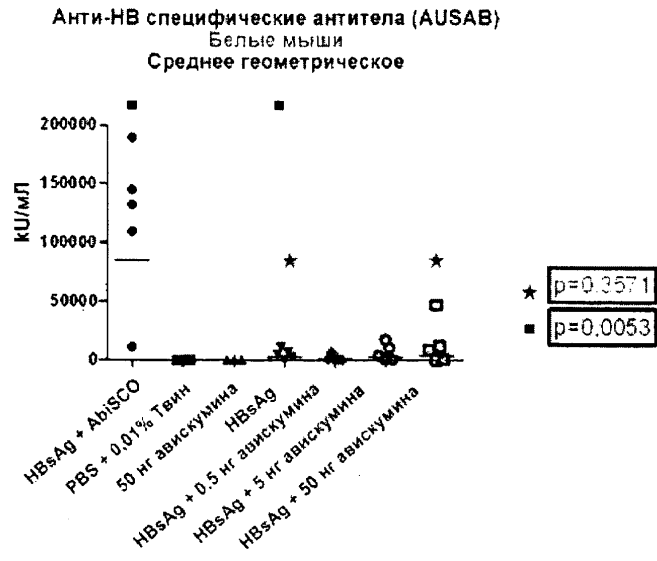


Фиг. 5

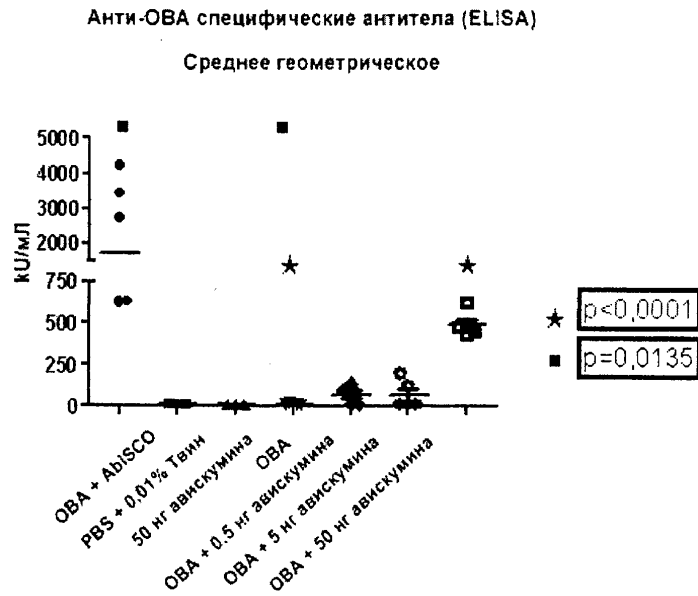


Фиг. 6

4/5



Фиг. 7



5/5

Фиг. 8

