

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **015657**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2011.10.31

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)

(21) Номер заявки
200870244

(22) Дата подачи заявки
2007.01.23

(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ RAGE И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **60/771,619**

(32) **2006.02.09**

(33) **US**

(43) **2009.02.27**

(86) **PCT/US2007/001686**

(87) **WO 2007/094926 2007.08.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТРАНСТЕК ФАРМА, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Мджалли Аднан М.М., Вебстер
Джеффри К., Ротлейн Роберт, Тянь Йе
Э. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A2-2004016229**

WO-A2-2006012415

**SYSTEMS R&D et al., Recombinant human
RAGE/FC chimera, catalog number: 1145-RG,
05.03.2004, [найдено 15.01.2009] [он-лайн] по
адресу: "http://www.mdsystems.com/pdf/1145-rg.pdf"**

WO-A2-2006002971

RU-C2-2219947

EA-B1-003634

(57) Раскрыты слитые белки RAGE, содержащие последовательности полипептида RAGE, связанные со вторым полипептидом, отличным от полипептида RAGE. В слитом белке RAGE можно использовать домен полипептида RAGE, содержащий участок связывания лиганда RAGE, и междоменный линкер, непосредственно связанный с доменом C₂ иммуноглобулина. Такие слитые белки могут обеспечивать специфичное, высокоаффинное связывание с лигандами RAGE. Также раскрыто применение слитых белков RAGE в качестве терапевтических средства для опосредованных RAGE патологий.

B1

015657

015657

B1

Настоящая заявка претендует на приоритет согласно 35 U.S.C. §119(e) на основании предварительной заявки на выдачу патента США с порядковым № 60/771619, поданной 9 февраля 2006 г. Описание предварительной заявки США 60/771619 на выдачу патента включено в настоящую заявку в виде ссылки в полном объеме.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к регуляции рецептора конечного продукта глубокого гликозилирования (RAGE). Более конкретно, в настоящем изобретении описаны слитые белки, содержащие полипептид RAGE, способы получения таких слитых белков и применение таких белков для лечения основанных на RAGE расстройств.

Уровень техники

Инкубация белков или липидов с альдозными сахарами приводит к неферментативному гликозилированию и окислению аминокислотных групп белков с образованием продуктов Амадори. С течением времени аддукты подвергаются дополнительным перегруппировкам, дегидратации и поперечному сшиванию с другими белками с образованием комплексов, называемых конечными продуктами глубокого гликозилирования (AGE). Факторы, которые стимулируют образование AGE, включают замедленный метаболизм лизина, и высокие уровни глюкозы в крови (например, как в случае диабета) (Hori et al., J. Biol. Chem. 270: 25752-761, (1995)). AGE вовлечены в различные расстройства, включая осложнения, связанные с диабетом и обычным старением.

Наблюдается специфическое и насыщаемое связывание AGE рецепторами клеточной поверхности на моноцитах, макрофагах, эндотелиальных клетках капилляров, гладкомышечных клетках, мезенгиальных клетках и нейронах. Рецептор конечных продуктов глубокого гликозилирования (RAGE) является представителем супергенного семейства молекул иммуноглобулинов. Внеклеточный (N-концевой) домен RAGE включает три области иммуноглобулинового типа: один домен V-типа (вариабельный), за которым следуют два домена C-типа (конститутивный) (Neeper et al., J. Biol. Chem., 267: 14998-15004 (1992); Schmidt et al., Circ. (Suppl.) 96-194 (1997)). Один проходящий через мембрану домен и короткий, высокозаряженный цитозольный хвост следуют за внеклеточным доменом. N-концевой внеклеточный домен может быть выделен в результате протеолиза RAGE или молекулярно-биологическими способами, чтобы создать растворимый RAGE (sRAGE), состоящий из V- и C-доменов.

RAGE экспрессируется на многих типах клеток, включая лейкоциты, нейроны, микроглиальные клетки и эндотелий сосудов (например, Hori et al., J. Biol. Chem., 270: 25752-761 (1995)). Повышенные уровни RAGE также встречаются в стареющих тканях (Schleicher et al., J. Clin. Invest. 99 (3): 457-468 (1997)) и сетчатке, сосудах и почках при диабете (Schmidt et al., Nature Med., 1: 1002-1004 (1995)).

Другие соединения, помимо AGE, могут связываться и модулировать RAGE. RAGE связывается с множеством функционально и структурно отличающихся лигандов, включая амилоид бета (A β), сывороточный амилоид A (SAA), конечные продукты глубокого гликозилирования (AGE), S100 (провоспалительный представитель семейства калгранулина), карбоксиметиллизин (CML), амфотерин и CD11b/CD18 (Bucciarelli et al., Cell Mol. Life Sci., 59: 1117-128 (2002); Chavakis et al., Microbes Infect., 6: 1219-1225 (2004); Kokkola et al., Scand. J. Immunol., 61: 1-9 (2005); Schmidt et al., J. Clin. Invest., 108: 949-955 (2001); Rocken et al., Am. J. Pathol., 162: 1213-1220 (2003)).

Показано, что связывание лигандов, таких как AGE, S100/калгранулин, β -амилоид, CML (N^ε-карбоксиметиллизин) и амфотерин, с RAGE модифицирует экспрессию множества генов. Их взаимодействия затем могут инициировать механизмы сигнальной трансдукции, включая активацию p38, p21ras, MAP-киназ, фосфорилирование Erk1-2 и активацию транскрипционного медиатора передачи сигнала воспаления, NF- κ B (Yeh et al., Diabetes, 50: 1495-1504 (2001)). Например, во многих типах клеток взаимодействие между RAGE и его лигандами может создавать окислительный стресс, который приводит к активации чувствительного к свободным радикалам фактора транскрипции NF- κ B и активации регулируемых NF- κ B генов, таких как цитокины IL-1 β и TNF- α . Кроме того, экспрессия RAGE подвергается повышающей регуляции посредством NF- κ B, и повышенная экспрессия наблюдается в местах воспаления или окислительного стресса (Tanaka et al., J. Biol. Chem., 275: 25781-25790 (2000)). Таким образом, возрастающая и часто опасная спираль может подпитываться петлей положительной обратной связи, инициированной связыванием лиганда.

Активация RAGE в разных тканях и органах может приводить к ряду патофизиологических последствий. RAGE вовлечен в различные состояния, включая: острое и хроническое воспаление (Hofmann et al., Cell 97: 889-901 (1999)), развитие поздних осложнений диабета, таких как повышенная проницаемость сосудов (Wautier et al., J. Clin. Invest., 97: 238-243 (1995)), нефропатия (Teillet et al., J. Am. Soc. Nephrol., 11: 1488-1497 (2000)), артериосклероз (Vlassara et al., The Finnish Medical Society DUODECIM, Ann. Med., 28: 419-426 (1996)) и ретинопатия (Hammes et al., Diabetologia, 42: 603-607 (1999)). RAGE также вовлечен в болезнь Альцгеймера (Yan et al., Nature, 382: 685-691 (1996)), и инвазию метастазы опухолей (Taguchi et al., Nature, 405: 354-357 (2000)).

Несмотря на широкую экспрессию RAGE и его выраженную плеiotропную роль во множестве раз-

ных моделей заболеваний, RAGE, по-видимому, не является необходимым для нормального развития. Например, нокаутированные по RAGE мыши не имеют явного аномального фенотипа, что свидетельствует о том, что хотя RAGE может играть роль в патологии заболеваний при хронической стимуляции, ингибирование RAGE, по-видимому, не вносит вклада в какой-либо нежелательный острый фенотип (Lilienstiek et al., J. Clin. Invest., 113: 1641-50 (2004)).

Антагонистическое действие на связывание физиологических лигандов с RAGE может приводить к понижающей регуляции патофизиологических изменений, вызванных избыточными концентрациями AGE и других лигандов RAGE. При уменьшении связывания эндогенных лигандов с RAGE могут быть уменьшены симптомы, связанные с опосредованными RAGE расстройствами. Растворимый RAGE (sRAGE) способен быть эффективным антагонистом связывания RAGE-лигандов с RAGE. Однако sRAGE может иметь время полужизни при введении *in vivo*, которое может быть слишком коротким для его терапевтической применимости в случае одного или нескольких расстройств. Таким образом, существует необходимость в разработке соединений, которые являлись бы антагонистами связывания AGE и других физиологических лигандов с рецептором RAGE, при этом соединения должны иметь подходящий фармакологический профиль.

Сущность изобретения

Варианты осуществления настоящего изобретения включают слитые белки RAGE и способы применения таких белков. Настоящее изобретение может быть осуществлено различными способами. Варианты осуществления настоящего изобретения могут быть связаны со слитым белком RAGE, содержащим полипептид RAGE, связанный со вторым полипептидом, отличным от полипептида RAGE. В одном варианте слитый белок RAGE содержит участок связывания лиганда RAGE. Слитый белок RAGE может дополнительно содержать полипептид RAGE, непосредственно связанный с полипептидом, содержащим домен C₂ иммуноглобулина или часть домена C₂.

Настоящее изобретение также относится к способу получения слитого белка RAGE. В одном варианте способ включает в себя связывание полипептида RAGE со вторым полипептидом, отличным от RAGE. В одном варианте полипептид RAGE содержит участок связывания лиганда RAGE. Способ может заключаться в связывании полипептида RAGE непосредственно с полипептидом, содержащим домен C₂ иммуноглобулина или часть домена C₂.

В других вариантах настоящее изобретение может относиться к способам и композициям для лечения RAGE-опосредованного расстройства у пациента. Способ может включать в себя введение пациенту слитого белка RAGE согласно настоящему изобретению. Композиция может содержать слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе.

Существуют различные преимущества, которые могут быть связаны с конкретными вариантами осуществления настоящего изобретения. В одном варианте слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению могут быть метаболически стабильными при введении пациенту. Также слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению могут проявлять высокоаффинное связывание по отношению к лигандам RAGE. В некоторых вариантах слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению связываются с лигандами RAGE с аффинностью в диапазоне от высоких наномолярных до низких наномолярных значений. Благодаря связыванию с высокой аффинностью с физиологическими лигандами RAGE слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению можно применять для ингибирования связывания эндогенных лигандов с RAGE, тем самым обеспечивая средства для улучшения состояния в случае RAGE-опосредованных заболеваний.

Также слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению могут быть представлены в форме белка или нуклеиновой кислоты. В одном иллюстративном варианте слитый белок RAGE может быть введен системно и может сохраняться в сосудистой системе для потенциального лечения сосудистых заболеваний, отчасти опосредованных RAGE. В другом иллюстративном варианте слитый белок RAGE может быть введен место для лечения заболеваний, при которых лиганды RAGE вносят вклад в патологию заболевания. Альтернативно, конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок RAGE, может быть доставлена к месту с применением подходящего носителя, такого как вирус или "голая" ДНК, где временная локальная экспрессия может местно ингибировать взаимодействие между лигандами RAGE и рецепторами. Таким образом, введение может быть временным (например, как в случае, когда вводят слитый белок RAGE) или более постоянным по природе (например, как в случае, когда слитый белок RAGE вводят в виде рекомбинантной ДНК).

Существует несколько дополнительных отличительных признаков изобретения, которые будут описаны далее. Необходимо понимать, что изобретение не ограничено в своем применении подробностями, указанными в следующей формуле изобретения, описании и на фигурах. Возможны другие варианты осуществления изобретения, и изобретение может быть осуществлено на практике или выполнено различными способами.

Краткое описание фигур

Различные признаки, аспекты и преимущества настоящего изобретения станут понятнее при обращении к следующим фигурам.

На фиг. 1 показаны различные последовательности RAGE и последовательности иммуноглобулина

согласно альтернативным вариантам осуществления настоящего изобретения: панель А, SEQ ID NO: 1, аминокислотная последовательность RAGE человека; и SEQ ID NO: 2, аминокислотная последовательность RAGE человека без сигнальной последовательности аминокислот 1-22; Панель В, SEQ ID NO: 3, аминокислотная последовательность RAGE человека без сигнальной последовательности аминокислот 1-23; Панель С, SEQ ID NO: 4, аминокислотная последовательность sRAGE человека; SEQ ID NO: 5, аминокислотная последовательность sRAGE человека без сигнальной последовательности аминокислот 1-22, и SEQ ID NO: 6, аминокислотная последовательность sRAGE человека без сигнальной последовательности аминокислот 1-23; Панель D, SEQ ID NO: 7, аминокислотная последовательность, содержащая V-домен RAGE человека; SEQ ID NO: 8, альтернативная аминокислотная последовательность, содержащая V-домен RAGE человека; SEQ ID NO: 9, N-концевой фрагмент V-домена RAGE человека; SEQ ID NO: 10, альтернативный N-концевой фрагмент V-домена RAGE человека; SEQ ID NO: 11, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 124-221 RAGE человека; SEQ ID NO: 12, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 227-317 RAGE человека; SEQ ID NO: 13, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 23-123 RAGE человека; Панель E, SEQ ID NO: 14, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 24-123 RAGE человека; SEQ ID NO: 15, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 23-136 RAGE человека; SEQ ID NO: 16, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 24-136 RAGE человека; SEQ ID NO: 17, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 23-226 RAGE человека; SEQ ID NO: 18, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 24-226 RAGE человека; Панель F, SEQ ID NO: 19, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 23-251 RAGE человека; SEQ ID NO: 20, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 24-251 RAGE человека; SEQ ID NO: 21, междоменный линкер RAGE; SEQ ID NO: 22, второй междоменный линкер RAGE; SEQ ID NO: 23, третий междоменный линкер RAGE; SEQ ID NO: 24, четвертый междоменный линкер RAGE; Панель G, SEQ ID NO: 25, ДНК, кодирующая аминокислоты RAGE человека 1-118; SEQ ID NO: 26, ДНК, кодирующая аминокислоты RAGE человека 1-123; и SEQ ID NO: 27, ДНК, кодирующая аминокислоты RAGE человека 1-136; Панель H, SEQ ID NO: 28, ДНК, кодирующая аминокислоты RAGE человека 1-230; и SEQ ID NO: 29, ДНК, кодирующая аминокислоты RAGE человека 1-251; Панель I, SEQ ID NO: 38, частичная аминокислотная последовательность доменов C_H2 и C_H3 IgG человека; SEQ ID NO: 39, ДНК, кодирующая часть доменов C_H2 и C_H3 человека IgG человека; SEQ ID NO: 40, аминокислотная последовательность доменов C_H2 и C_H3 IgG человека; Панель J, SEQ ID NO: 41, ДНК, кодирующая домены C_H2 и C_H3 человека IgG человека; SEQ ID NO: 42, аминокислотная последовательность домена C_H2 IgG человека; SEQ ID NO: 43, аминокислотная последовательность домена C_H3 IgG человека; и SEQ ID NO: 44, пятый междоменный линкер RAGE.

На фиг. 2 показана последовательность ДНК (SEQ ID NO: 30) кодирующей области первого слитого белка RAGE (TTP-4000) согласно варианту осуществления настоящего изобретения. Кодирующая последовательность 1-753, выделенная жирным шрифтом, кодирует N-концевую последовательность белка RAGE, тогда как последовательность 754-1386 кодирует последовательность белка IgG (γ 1) человека.

На фиг. 3 показана последовательность ДНК (SEQ ID NO: 31) кодирующей области второго слитого белка RAGE (TTP-3000) согласно варианту осуществления настоящего изобретения. Кодирующая область 1-408, выделенная жирным шрифтом, кодирует N-концевую последовательность белка RAGE, тогда как последовательность 409-1041 кодирует последовательность белка IgG (γ 1) человека.

На фиг. 4 показаны аминокислотные последовательности, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, каждая из которых кодирует состоящий из четырех доменов слитый белок RAGE согласно альтернативным вариантам осуществления настоящего изобретения. Последовательность RAGE выделена жирным шрифтом.

На фиг. 5 показаны аминокислотные последовательности, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37, каждая из которых кодирует состоящий из трех доменов слитый белок RAGE согласно альтернативным вариантам осуществления настоящего изобретения. Последовательность RAGE выделена жирным шрифтом.

На фиг. 6, панель А, показано сравнение белковых доменов в RAGE человека и в белке Fc Ig гамма-1 человека, и точки расщепления, используемые для получения TTP-3000 (в положении 136) и TTP-4000 (в положении 251) согласно альтернативным вариантам осуществления настоящего изобретения; и на панели В показана структура доменов TTP-3000 и TTP-4000 согласно альтернативным вариантам осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 7 показаны результаты анализа связывания *in vitro* для sRAGE и первого слитого белка RAGE TTP-4000 (TT4) и второго слитого белка RAGE TTP-3000 (TT3) с лигандами RAGE амилоидом-бета (А-бета), S100b (S100) и амфотерином (Ampho) согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 8 показаны результаты анализа связывания *in vitro* для первого слитого белка RAGE TTP-4000 (TT4) ("белок") с амилоидом-бета по сравнению с негативным контролем, включающим только реагенты для иммунодетекции ("только комплекс"), и антагонизм такого связывания антагонистом RAGE

("лиганд RAGE") согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 9 показаны результаты анализа связывания *in vitro* для второго слитого белка RAGE TTP-3000 (TT3) ("белок") с амилоидом-бета по сравнению с негативным контролем, включающим в себя только реагенты для иммунодетекции ("только комплекс"), и антагонизм такого связывания антагонистом RAGE ("лиганд RAGE") согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 10 показаны результаты основанного на клетках анализа, в котором измеряют ингибирование индуцированной S100b-RAGE продукции TNF- α слитыми белками RAGE TTP-3000 (TT3) и TTP-4000 (TT4) и sRAGE согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 11 показан фармакокинетический профиль слитого белка RAGE TTP-4000 согласно варианту осуществления настоящего изобретения, на котором каждая кривая представляет отдельное животное в одних и тех же условиях эксперимента.

На фиг. 12 показаны относительные уровни высвобождения TNF- α из клеток THP-1 вследствие стимуляции слитым белком RAGE TTP-4000 и стимуляции IgG человека, в качестве меры воспалительного ответа согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 13 показано применение слитого белка RAGE TTP-4000 для уменьшения рестеноза у животных с диабетом согласно альтернативным вариантам осуществления настоящего изобретения, при этом на панели А показано, что слитый белок RAGE TTP-4000 уменьшал отношение интима/средняя оболочка стенки кровеносного сосуда по сравнению с негативным контролем (IgG), и на панели В показано, что слитый белок RAGE TTP-4000 уменьшал пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов зависимым от дозы образом.

На фиг. 14 показано применение слитого белка RAGE TTP-4000 для уменьшения образования амилоида и нарушения когнитивной функции у животных с болезнью Альцгеймера (AD) согласно альтернативным вариантам осуществления настоящего изобретения, при этом на панели А показано, что слитый белок RAGE TTP-4000 уменьшал амилоидную нагрузку в головном мозге, и на панели В показано, что слитый белок RAGE TTP-4000 улучшал когнитивную функцию.

На фиг. 15 показаны кривые насыщения связывания TTP-4000 с различными известными иммобилизованными лигандами RAGE согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 16 показаны различные последовательности RAGE и последовательности иммуноглобулина согласно альтернативным вариантам осуществления настоящего изобретения: Панель А, SEQ ID NO: 45, аминокислотная последовательность sRAGE человека без сигнальной последовательности аминокислот 1-23, при этом остаток глутамина на N-конце был циклизован с образованием пироглутаминовой кислоты, SEQ ID NO: 46, альтернативная аминокислотная последовательность, содержащая V-домен sRAGE человека, где остаток глутамина на N-конце был циклизован с образованием пироглутаминовой кислоты, SEQ ID NO: 47, альтернативный N-концевой фрагмент V-домена RAGE человека, где остаток глутамина на N-конце был циклизован с образованием пироглутаминовой кислоты, SEQ ID NO: 48, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 24-123 RAGE человека, где остаток глутамина на N-конце был циклизован с образованием пироглутаминовой кислоты; Панель В, SEQ ID NO: 49, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 24-136 RAGE человека, где остаток глутамина на N-конце был циклизован с образованием пироглутаминовой кислоты, SEQ ID NO: 50, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 24-226 RAGE человека, где остаток глутамина на N-конце был циклизован с образованием пироглутаминовой кислоты, SEQ ID NO: 51, аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислот 24-251 RAGE человека, где остаток глутамина на N-конце был циклизован с образованием пироглутаминовой кислоты; Панель С, SEQ ID NO: 52, альтернативная последовательность ДНК, кодирующая часть доменов C₂ и C₃ человека IgG человека в SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 53, альтернативная последовательность ДНК, кодирующей домены C₂ и C₃ человека IgG человека в SEQ ID NO: 40.

На фиг. 17 показана альтернативная последовательность ДНК (SEQ ID NO: 54) кодирующей области первого слитого белка RAGE (TTP-4000) согласно варианту осуществления настоящего изобретения. Кодирующая последовательность 1-753, выделенная жирным шрифтом, кодирует N-концевую последовательность белка RAGE, и последовательность 754-1386, кодирует последовательность белка IgG (γ 1) человека.

На фиг. 18 показана альтернативная последовательность ДНК (SEQ ID NO: 55) кодирующей области второго слитого белка RAGE (TTP-3000) согласно варианту осуществления настоящего изобретения. Кодирующая последовательность 1-408, выделенная жирным шрифтом, кодирует N-концевую последовательность белка RAGE, и последовательность 409-1041 кодирует последовательность белка IgG (γ 1) человека.

На фиг. 19 показана аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 56, которая кодирует состоящий из четырех доменов слитый белок RAGE согласно альтернативному варианту осуществления настоящего изобретения. Последовательность RAGE выделена жирным шрифтом.

На фиг. 20 показана аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 57, которая кодирует состоящий из трех доменов слитый белок RAGE согласно альтернативному варианту осуществления настоящего

го изобретения. Последовательность RAGE выделена жирным шрифтом.

На фиг. 21 показано применение слитого белка RAGE TTP-4000 для уменьшения отторжения аллогенных трансплантатов островковых клеток поджелудочной железы согласно альтернативным вариантам осуществления настоящего изобретения, при этом открытыми (незаштрихованными) кружками обозначены необработанные контрольные животные; кружками с косой штриховкой обозначены животные, обработанные TTP-4000 в первой дозе; кружками с волнистой штриховкой обозначены животные, обработанные TTP-4000 во второй дозе; кружками с ромбами внутри обозначены животные, обработанные контрольным PBS; и полностью закрашенными кружками обозначены животные, обработанные контрольным IgG.

На фиг. 22 показано применение слитых белков RAGE TTP-4000 для уменьшения отторжения сингенных трансплантатов островковых клеток поджелудочной железы согласно альтернативным вариантам осуществления настоящего изобретения, где открытыми (незаштрихованными) кружками обозначены необработанные контрольные животные; и заштрихованными кружками обозначены животные, обработанные TTP-4000.

Подробное описание

В целях настоящего описания, если не оговорено особо, все числа, выражающие количества ингредиентов, условия реакции и т.д., используемые в описании, необходимо понимать как скорректированные во всех случаях термином "примерно". Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, указанные в следующем описании, являются приближениями, которые могут варьировать в зависимости от требуемых свойств, которые пытаются получить благодаря настоящему изобретению. Как минимум, и не как попытка ограничить применимость принципа эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр следует рассматривать по меньшей мере учитывая ряд указанных значащих цифр и применяя обычные способы округления.

Несмотря на то что численные диапазоны и параметры, указывающие общий объем изобретения, являются приблизительными, численные значения, указанные в конкретных примерах, указаны точно, насколько это возможно. Однако любое численное значение, по существу, содержит некоторые ошибки, обязательно возникающие в результате стандартного отклонения, найденного в соответствующих измерениях при тестировании. Кроме того, необходимо понимать, что все диапазоны, указанные в данном описании, охватывают любой и все входящие в них поддиапазоны. Например, следует считать, что указанный диапазон "от 1 до 10" включает любой и все поддиапазоны между (и включая) минимальным значением 1 и максимальным значением 10; то есть все поддиапазоны, начиная с минимального значения 1, или более, например от 1 до 6,1, и заканчивая максимальным значением 10, или менее, например от 5,5 до 10. Кроме того, любую ссылку, в которой указано "включено в данное описание" следует понимать, как "включено в полном объеме".

Кроме того, следует отметить, что в используемом в данном описании смысле формы единственного числа включают множественные объекты, если определенно и недвусмысленно не ограничены одним объектом. Термин "или" используют взаимозаменяемо с термином "и/или", если контекст явно не указывает иное.

Также термины "часть" и "фрагмент" используют взаимозаменяемо, чтобы указать части полипептида, нуклеиновой кислоты или другой молекулярной конструкции.

"Полипептид" и "белок" используют в данном описании взаимозаменяемо, чтобы описать белковые молекулы, которые могут включать либо неполные, либо полноразмерные белки.

Как известно в данной области, "белки", "пептиды", "полипептиды" и "олигопептиды" представляют собой цепи аминокислот (обычно L-аминокислот), в которых альфа-углеродные атомы связаны посредством пептидных связей, образованных в реакции конденсации между карбоксильной группой у альфа-углеродного атома одной аминокислоты и аминогруппой у альфа-углеродного атома другой аминокислоты. Обычно аминокислоты, составляющие белок, нумеруют по порядку, начиная с аминоконцевого остатка и продолжая в направлении к карбоксильному концевому остатку белка.

В используемом в данном описании смысле термин "выше" относится к остатку, который является N-концевым по отношению ко второму остатку, когда молекула представляет собой белок, или с 5'-стороны по отношению ко второму остатку, когда молекула представляет собой нуклеиновую кислоту. Также в используемом в данном описании смысле термин "ниже" относится к остатку, который является C-концевым по отношению ко второму остатку, когда молекула представляет собой белок, или с 3'-стороны по отношению ко второму остатку, когда молекула представляет собой нуклеиновую кислоту.

Если не оговорено особо, все технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют такое же значение, которые обычно подразумеваются специалистом в данной области. Практикам особенно рекомендуется обратиться к *Current Protocols in Molecular Biology* (см., например, Ausubel, F.M. et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th Ed., Chapter 2, John Wiley and Sons, N. Y.) в отношении определений и терминов в данной области. Сокращения аминокислотных остатков представляют собой стандартный 3-буквенный и/или 1-буквенный код, используемый в данной области по отношению к одной из 20 распространенных L-аминокислот.

"Нуклеиновая кислота" представляет собой полинуклеотид, такой как дезоксирибонуклеиновая ки-

слота (ДНК) или рибонуклеиновая кислота (РНК). Термин используют для обозначения одонитевых нуклеиновых кислот, двунитевых нуклеиновых кислот, и РНК и ДНК, состоящих из нуклеотидных и нуклеозидных аналогов.

Термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая может быть использована для транспорта второй молекулы нуклеиновой кислоты в клетку. В одном варианте вектор обеспечивает возможность репликации последовательностей ДНК, встроенных в вектор. Вектор может содержать промотор для усиления экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, по меньшей мере в некоторых клетках-хозяевах. Векторы могут реплицироваться автономно (внехромосомные) или могут быть интегрированы в хромосому клетки-хозяина. В одном варианте вектор может представлять собой экспрессирующий вектор, способный продуцировать белок, полученный по меньшей мере с части последовательности нуклеиновой кислоты, встроенной в вектор.

Как известно в данной области, условия для гибридизации последовательностей нуклеиновых кислот друг с другом могут быть описаны в виде диапазона от условий низкой жесткости до условий высокой жесткости. В общем, условия гибридизации высокой жесткости относятся к промывке гибридов в буфере с низкой концентрацией соли при высоких температурах. Гибридизация может быть осуществлена со связанной на фильтре ДНК с использованием растворов для гибридизации, стандартных в данной области, таких как 0,5 M NaHPO₄, 7% додецилсульфат натрия (SDS), при 65°C, и промывка в 0,25 M NaHPO₄, 3,5% SDS с последующей промывкой 0,1×SSC/0,1% SDS при температуре в диапазоне от комнатной температуры до 68°C в зависимости от длины зонда (Ausubel et al.). Например, промывка при высокой жесткости включает в себя промывку в 6×SSC/0,05% пирогосфате натрия при 37°C в случае олигонуклеотидного зонда длиной 14 оснований, или при 48°C в случае олигонуклеотидного зонда длиной 17 оснований, или при 55°C в течение олигонуклеотидного зонда длиной 20 оснований, или при 60°C в случае олигонуклеотидного зонда длиной 25 оснований, или при 65°C в случае нуклеотидного зонда длиной примерно 250 нуклеотидов. Зонды нуклеиновой кислоты можно метить радионуклеотидами посредством концевое мечения, например, с использованием [γ -³²P]АТФ, или включением радиоактивно меченых нуклеотидов, таких как [α -³²P]dCTP, посредством мечения случайными праймерами. Альтернативно, зонды могут быть мечены включением биотинилированных или меченых флуоресцентным нуклеотидов, и зонд выявляют с использованием стрептавидина или антител против флуоресцеина.

В используемом в данном описании смысле "малые органические молекулы" представляют собой молекулы с молекулярной массой менее 2000 Да, которые содержат по меньшей мере один атом углерода.

Термин "слитый белок" относится к белку или полипептиду, который имеет аминокислотную последовательность, полученную из двух или более белков. Слитый белок также может включать связывающие области аминокислот между состоящими из аминокислот частями, полученными из отдельных белков.

В используемом в данном описании смысле "полипептид, отличный от RAGE" представляет собой любой полипептид, который не получен из RAGE или его фрагмента. Такие полипептиды, отличные от полипептида RAGE, включают пептиды иммуноглобулина, димеризующие полипептиды, стабилизирующие полипептиды, амфифильные пептиды или полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, которые обеспечивают "метки" для целенаправленного воздействия и очистки белка.

В используемом в данном описании смысле "иммуноглобулиновые пептиды" могут содержать тяжелую цепь иммуноглобулина или ее часть. В одном варианте часть тяжелой цепи может представлять собой Fc-фрагмент или его часть. В используемом в данном описании смысле Fc-фрагмент содержит полипептид шарнира тяжелой цепи и домены C_H2 и C_H3 тяжелой цепи иммуноглобулина, либо в мономерной, либо в димерной форме. Или в качестве иммуноглобулинового полипептида можно использовать C_H1 и Fc-фрагмент. Тяжелая цепь (или ее часть) может быть получена из любого одного из известных изоформ тяжелой цепи: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ) или IgA (α). Кроме того, тяжелая цепь (или ее часть) может быть получена из любого одного из известных подтипов тяжелой цепи: IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), или мутаций таких изоформ или подтипов, которые изменяют биологическую активность. Примером биологической активности, которая может быть изменена, является уменьшение способности изоформа связываться с некоторыми рецепторами Fc, например, посредством модификации шарнирной области.

Термины "идентичность" или "процент идентичности" относятся к идентичности последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя последовательностями нуклеиновой кислоты. Идентичность в процентах может быть определена при выравнивании двух последовательностей и относится к количеству идентичных остатков (т.е. аминокислот или нуклеотидов) в положениях, общих в сравниваемых последовательностях. Выравнивание и сравнение последовательностей можно проводить с использованием стандартных в данной области алгоритмов (например, Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482; Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443; Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 2444) или с использованием компьютеризованных версий таких алгоритмов (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Sci-

ence Drive, Madison, WI), общедоступных в виде BLAST и FASTA. Также можно использовать ENTREZ, доступную из the National Institutes of Health, Bethesda MD, для сравнения последовательностей. В одном варианте идентичность в процентах двух последовательностей можно определить, используя GCG с оценкой пробела 1, так, чтобы каждый аминокислотный пробел оценивался так, как будто имеет место одно несовпадение аминокислот в двух последовательностях.

В используемом в данном описании смысле термин "консервативные остатки" относится к аминокислотам, которые являются одинаковыми во множестве белков, имеющих одну и ту же структуру и/или функцию. Область консервативных остатков может быть важной для структуры или функции белка. Таким образом, последовательные консервативные остатки, которые выявляют в трехмерном белке, могут быть важны для структуры или функции белка. Чтобы найти консервативные остатки или консервативные области 3-D-структуры можно осуществить сравнение последовательностей для одинаковых или сходных белков из разных видов или особей одного вида.

В используемом в данном описании смысле термин "гомолог" означает полипептид, имеющий определенную степень гомологии с аминокислотной последовательностью дикого типа. Сравнения в отношении гомологии могут быть проведены визуально или более обычно с помощью легко доступных программ для сравнения последовательностей. Такие коммерчески доступные компьютерные программы могут вычислять гомологию в процентах между двумя или более последовательностями (например, Wilbur, W. J. and Lipman, D. J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 726-730). Например, гомологичными последовательностями можно считать последовательности, которые включают в себя аминокислотные последовательности, которые в альтернативных вариантах по меньшей мере на 70% идентичны, на 75% идентичны, на 80% идентичны, на 85% идентичны, на 90% идентичны, на 95% идентичны, на 97% идентичны или на 98% идентичны или на 99% идентичны друг другу.

В используемом в данном описании смысле термин "по меньшей мере на 90% идентичны" включает последовательности, которые имеют идентичность в диапазоне от 90 до 99,99% с указанными последовательностями, и включает все диапазоны между таким значениями. Таким образом, термин "по меньшей мере на 90% идентичны" включает последовательности, которые на 91, 91,5, 92, 92,5, 93, 93,5, 94, 94,5, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,5% идентичны указанной последовательности. Подобным образом термин "по меньшей мере на 70% идентичны" включает последовательности, которые имеют идентичность в диапазоне от 70 до 99,99% со всеми диапазонами между указанными значениями. Определение идентичности в процентах осуществляют, используя алгоритмы, описанные в данной публикации.

В используемом в данном описании смысле "домен" полипептида или белка содержит область в полипептиде или белке, которая составляет независимую единицу. Домены можно определить с точки зрения структуры, последовательности и/или биологической активности. В одном варианте полипептидный домен может содержать область белка, которая подвергается укладке таким образом, который, по существу, не зависит от остальной части белка. Домены могут быть идентифицированы с использованием баз данных о доменах, таких как без ограничения PFAM, PRODOM, PROSITE, BLOCKS, PRINTS, SBASE, ISREC PROFILES, SAMRT и PROCLASS.

В используемом в данном описании смысле "иммуноглобулиновый домен" означает последовательность аминокислот, которая структурно гомологична или идентична домену иммуноглобулина. Длина последовательности аминокислот иммуноглобулинового домена может быть любой. В одном варианте иммуноглобулиновый домен может иметь длину менее 250 аминокислот. В иллюстративном варианте иммуноглобулиновый домен может иметь длину примерно 80-150 аминокислот. Например, вариабельная область и области C_H1, C_H2 и C_H3 IgG являются доменами иммуноглобулина. В другом примере вариабельная область, области C_H1, C_H2, C_H3 и C_H4 IgM являются доменами иммуноглобулина.

В используемом в данном описании смысле "иммуноглобулиновый домен RAGE" означает последовательность аминокислот из белка RAGE, которая структурно гомологична или идентична домену иммуноглобулина. Например, иммуноглобулиновый домен RAGE может содержать V-домен RAGE, Ig-подобный домен RAGE C2-типа 1 ("C1-домен") или Ig-подобный домен RAGE C2-типа 2 ("C2-домен").

В используемом в данном описании смысле "междоменный линкер" содержит полипептид, который связывает вместе два домена. Шарнирная область Fc является примером междоменного линкера в IgG.

В используемом в данном описании смысле "непосредственно связанный" означает ковалентную связь между двумя разными группами (например, последовательностями нуклеиновой кислоты, полипептидами, полипептидными доменами), которые не имеют каких-либо промежуточных атомов между двумя группами, которые связаны.

В используемом в данном описании смысле "домен связывания лиганда" относится к домену белка, отвечающему за связывание лиганда. Термин "домен связывания лиганда" включает гомолог домена связывания лиганда или его часть. В этом отношении могут быть осуществлены преднамеренные замены аминокислот в участке связывания лиганда на основе сходства полярности, заряда, растворимости, гидрофобности или гидрофильности остатков, при условии сохранения специфичности связывания домена связывания лиганда.

В используемом в данном описании смысле "участок связывания лиганда" включает в себя остатки

в белке, которые непосредственно взаимодействуют с лигандом, или остатки, вовлеченные в размещение лиганда в тесной близости с остатками, которые непосредственно взаимодействуют с лигандом. Взаимодействие остатков в участке связывания лиганда можно определить на основании пространственной близости остатков к лиганду в модели или структуре. Термин "участок связывания лиганда" включает гомолог участка связывания лиганда или его часть. В этом отношении могут быть осуществлены преднамеренные замены аминокислот в участке связывания лиганда на основе сходства полярности, заряда, растворимости, гидрофобности или гидрофильности остатков, при условии сохранения специфичности связывания участка связывания лиганда. Участок связывания лиганда может существовать в одном или нескольких доменах связывания лиганда в белке или полипептиде.

В используемом в данном описании смысле термин "взаимодействует" относится к условию близости между лигандом или соединением или его частями или фрагментами и частью второй представляющей интерес молекулы. Взаимодействие может быть нековалентным, например, в результате образования водородных связей, ван-дер-ваальсовых взаимодействий или электростатических или гидрофобных взаимодействий, или оно может быть ковалентным.

В используемом в данном описании смысле "лиганд" относится к молекуле или соединению, или элементу, который взаимодействует с участком связывания лиганда, включая субстраты или их аналоги или части. Как описано в данной публикации, термин "лиганд" может относиться к соединениям, которые связываются с представляющим интерес белком. Лиганд может быть агонистом, антагонистом или модулятором. Или лиганд может не оказывать биологического влияния. Или лиганд может блокировать связывание других лигандов, тем самым ингибируя биологический эффект. Лиганды могут включать в себя, без ограничения ими, низкомолекулярные ингибиторы. К таким малым молекулам могут относиться пептиды, пептидомиметики, органические соединения и тому подобное. Лиганды также могут включать полипептиды и/или белки.

В используемом в данном описании смысле "соединение-модулятор" относится к молекуле, которая преобразует или изменяет биологическую активность представляющей интерес молекулы. Соединение-модулятор может увеличивать или уменьшать активность или изменять физические или химические характеристики или функциональные или иммунологические свойства представляющей интерес молекулы. В случае RAGE соединение-модулятор может увеличивать или уменьшать активность или изменять характеристики или функциональные или иммунологические свойства RAGE или его части. Соединение-модулятор может включать природные и/или химически синтезированные или искусственные пептиды, модифицированные пептиды (например, фосфопептиды), антитела, углеводы, моносахариды, олигосахариды, полисахариды, гликолипиды, гетероциклические соединения, нуклеозиды или нуклеотиды или их части и малые органические или неорганические молекулы. Соединение-модулятор может представлять собой эндогенное физиологическое соединение, или оно может быть природным или синтетическим соединением. Или соединение-модулятор может представлять собой малую органическую молекулу. Термин "соединение-модулятор" также включает химически модифицированный лиганд или соединение и включает изомеры и рацемические формы.

"Агонист" означает соединение, которое связывается с рецептором с образованием комплекса, который вызывает фармакологический ответ специфичный для вовлеченного в процесс рецептора.

"Антагонист" означает соединение, которое связывается с агонистом или рецептором с образованием комплекса, который не вызывает значимого фармакологического ответа и может ингибировать биологический ответ, индуцированный агонистом.

Следовательно, агонисты RAGE могут связываться с RAGE и стимулировать опосредованные RAGE клеточные процессы, а антагонисты RAGE могут ингибировать опосредованные RAGE процессы, не давая агонисту RAGE их стимулировать. Например, в одном варианте клеточным процессом, стимулируемым агонистами RAGE является активация транскрипции гена TNF- α .

Термин "миметики пептидов" относится к структурам, которые служат в качестве заменителей пептидов во взаимодействиях между молекулами (Morgan et al., 1989, Ann. Reports Med. Chem., 24: 243-252). К миметикам пептидов могут относиться синтетические структуры, которые могут содержать или могут не содержать аминокислот и/или пептидных связей, которые сохраняют структурные функциональные признаки пептида или агониста или антагониста. Миметики пептидов также включают пептоиды, олигопептоиды (Simon et al., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 93 67); и пептидные библиотеки, содержащие пептиды требуемой длины, представляющие все возможные последовательности аминокислот, соответствующие пептиду или агонисту или антагонисту согласно изобретению.

Термин "лечение" или "лечить" относится к ослаблению симптома заболевания или расстройства и может включать исцеление от заболевания, по существу, предотвращение появления расстройства или улучшение состояния субъекта. Термин "лечение" в используемом в данном описании смысле относится к полному спектру лечения данного расстройства, от которого страдает пациент, включая ослабление одного симптома или большинства симптомов, возникающих в результате данного расстройства, лечение конкретного расстройства или профилактику появления расстройства.

В используемом в данном описании смысле термин "EC50" определяют как концентрацию средства, которая приводит к достижению 50% измеряемого биологического эффекта. Например, EC50 для те-

рапевтического средства, оказывающего измеряемый биологический эффект, может представлять собой значение, при котором средство дает 50% биологический эффект.

В используемом в данном описании смысле термин "IC50" определяют как концентрацию средства, которая приводит к 50% ингибированию измеряемого эффекта. Например, IC50 антагониста связывания RAGE может представлять собой значение, при котором антагонист уменьшает связывание лиганда с участком связывания лиганда в RAGE на 50%.

В используемом в данном описании смысле "эффективное количество" означает количество средства, которое эффективно для достижения требуемого эффекта у субъекта. Термин "терапевтически эффективное количество" означает такое количество лекарственного средства или фармацевтического средства, которое будет вызывать терапевтический ответ животного или человека, которого стремятся добиться. Реальная доза, которая содержит эффективное количество, может зависеть от пути введения, массы и состояния здоровья субъекта, расстройства, подвергаемого лечению, и тому подобного.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" в используемом в данном описании смысле может относиться к соединениям и композициям, которые подходят для применения на человеке или животном, как, например, для терапевтических композиций, вводимых для лечения опосредованного RAGE расстройства или заболевания.

Термин "фармацевтическая композиция" используют в данном описании для обозначения композиции, которую можно вводить хозяину-млекопитающему, например, перорально, парентерально, местно, с помощью спрея для ингаляции, интраназально или ректально, в виде стандартных лекарственных препаратов, содержащих обычные нетоксичные носители, разбавители, адъюванты, наполнители и тому подобное.

Термин "парентеральный" в используемом в данном описании смысле включает способы подкожных инъекций, внутривенных, внутримышечных, интрацестеральных инъекций или инфузий.

В используемом в данном описании смысле "отторжение" относится к иммунному или воспалительному ответу на ткань, который приводит к деструкции клеток, тканей или органов или который приводит к повреждению клеток тканей или органов. Отторгнутые клетки, ткани или орган могут происходить из организма того же субъекта, у которого установлен ответ в виде отторжения, или могут быть трансплантированы от другого субъекта субъекту, у которого установлен ответ в виде отторжения.

В используемом в данном описании смысле термин "клетка" относится к структурным и функциональным единицам живой системы млекопитающего, каждая из которых представляет собой независимую биологическую систему. Как известно в данной области, клетки содержат ядро, цитоплазму, внутриклеточные органеллы и клеточную стенку, которая ограждает клетку и позволяет клетке быть независимой от других клеток.

В используемом в данном описании смысле термин "ткань" относится к совокупности клеток, которые имеют сходную структуру и функцию или которые работают вместе, осуществляя конкретную функцию. Ткань может содержать совокупность сходных клеток и межклеточные вещества, окружающие клетки. Ткани включают без ограничения мышечную ткань, нервную ткань и кости.

В используемом в данном описании смысле "орган" относится к полностью дифференцированной структурной и функциональной единице в организме животного, которая специализирована на выполнении определенной специфичной функции. Орган может содержать группу тканей, которые выполняют конкретную функцию или группу функций. Органы включают, без ограничения, сердце, легкие, головной мозг, глаз, желудок, селезенку, поджелудочную железу, почки, печень, кишечник, кожу, матку, мочевой пузырь и кость.

Слитые белки RAGE

Варианты осуществления настоящего изобретения включают слитые белки RAGE, способы получения таких слитых белков и способы применения таких слитых белков. Настоящее изобретение может быть осуществлено разными способами.

Например, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к слитым белкам RAGE, содержащим полипептид RAGE, связанный со вторым полипептидом, отличным от полипептида RAGE. В одном варианте слитый белок RAGE может содержать участок связывания лиганда RAGE. В одном варианте участок связывания лиганда составляет большую часть N-концевого домена слитого белка RAGE. Участок связывания лиганда RAGE может содержать V-домен RAGE или его часть. В одном варианте участок связывания лиганда RAGE содержит последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 10 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

В другом варианте участок связывания лиганда может содержать аминокислоты 23-53 последовательности SEQ ID NO: 1. В другом варианте участок связывания лиганда может содержать аминокислоты 24-52 последовательности SEQ ID NO: 1. В другом варианте участок связывания лиганда может содержать аминокислоты 31-52 последовательности SEQ ID NO: 1. В другом варианте участок связывания лиганда может содержать аминокислоты 31-116 последовательности SEQ ID NO: 1. В другом варианте участок связывания лиганда может содержать аминокислоты 19-52 последовательности SEQ ID NO: 1.

В одном варианте полипептид RAGE может быть связан с полипептидом, содержащим домен иммуноглобулина или часть (например, его фрагмент) домена иммуноглобулина. В одном варианте полипептид, содержащий домен иммуноглобулина, содержит по меньшей мере часть по меньшей мере одного из доменов C_H2 или C_H3 IgG человека.

Белок или полипептид RAGE может содержать полноразмерный белок RAGE человека (например, SEQ ID NO: 1), или фрагмент RAGE человека. В используемом в данном описании смысле фрагмент полипептида RAGE в длину составляет по меньшей мере 5 аминокислот, может быть длиной более 30 аминокислот, но меньше, чем полная аминокислотная последовательность. В альтернативных вариантах белков, способов и композиций согласно настоящему изобретению полипептид RAGE может содержать последовательность, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичная RAGE человека или его фрагменту. Например, в одном варианте полипептид RAGE может содержать RAGE человека или его фрагмент с глицином в качестве первого остатка вместо метионина (см., например, Neerer et al., (1992)). Или RAGE человека может содержать полноразмерный RAGE с удаленной сигнальной последовательностью (например, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3) (фиг. 1A и 1B) или часть такой аминокислотной последовательности.

Слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению также могут содержать sRAGE (например, SEQ ID NO: 4), полипептид по меньшей мере на 90% идентичный sRAGE, или фрагмент sRAGE. В используемом в данном описании смысле sRAGE означает белок RAGE, который не содержит трансмембранной области или цитоплазматического хвоста (Park et al., *Nature Med.*, 4: 1025-1031 (1998)). Например, полипептид RAGE может содержать sRAGE человека или его фрагмент с глицином в качестве первого остатка вместо метионина (см., например, Neerer et al., (1992)). Или полипептид RAGE может содержать sRAGE человек с удаленной сигнальной последовательностью (см., например, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6 на фиг. 1C или SEQ ID NO: 45 на фиг. 16A) или часть такой аминокислотной последовательности.

В других вариантах белок RAGE может содержать V-домен RAGE (см., например, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 на фиг. 1D (Neerer et al., (1992); Schmidt et al. (1997) или SEQ ID NO: 46 на фиг. 16A). Или можно использовать последовательность по меньшей мере на 90% идентичную V-домену RAGE или его фрагменту.

Или белок RAGE может содержать фрагмент V-домена RAGE (например, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 на фиг. 1D или SEQ ID NO: 47 на фиг. 16A). В одном варианте белок RAGE может содержать участок связывания лиганда. В одном варианте участок связывания лиганда может содержать последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 10 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%. В еще одном варианте фрагмент RAGE является синтетическим пептидом.

Таким образом, полипептид RAGE, используемый в слитых белках RAGE согласно настоящему изобретению, может содержать фрагмент полноразмерного RAGE. Как известно в данной области, RAGE содержит три подобных иммуноглобулину полипептидных домена, V-домен и домены C1 и C2, связанные друг с другом междоменным линкером. Полноразмерный RAGE также содержит трансмембранный полипептид и цитоплазматический хвост ниже (С-концевой) домена C2 и связанные с доменом C2.

В одном варианте полипептид RAGE не содержит никаких остатков сигнальной последовательности. Сигнальная последовательность RAGE может содержать либо остатки 1-22, либо остатки 1-23 полноразмерного RAGE. Кроме того, как известно в данной области, в тех вариантах, в которых на N-конце слитого белка находится глутамин (например, сигнальная последовательность содержит остатки 1-23), N-концевой глутамин (Q24) может подвергаться циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты (pE). Примеры конструкций таких молекул показаны в виде последовательностей SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49, 50 и 51, а также слитые белки RAGE показаны в виде последовательностей 56 и 57.

Как известно в данной области, в область C_H3 слитого белка RAGE согласно настоящему изобретению может быть отщеплена С-концевая аминокислота посредством посттрансляционной модификации при экспрессии в некоторых рекомбинантных системах. (См., например, Li, et al., *BioProcessing J.*, 2005; 4, 23-30). В одном варианте отщепляемой С-концевой аминокислотой является лизин (K).

Таким образом, в различных вариантах полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-116 RAGE человека (SEQ ID NO: 7) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-116 RAGE человека (SEQ ID NO: 8) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-116 RAGE человека, где Q24 циклизуется с образованием pE (SEQ ID NO: 46) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую V-домену RAGE. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 124-221 RAGE человека (SEQ ID NO: 11) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующие домену C1 RAGE. В другом варианте полипептид RAGE может содержать аминокислоты 227-317 RAGE человека (SEQ ID NO: 12) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующие домену C2 RAGE. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-123 RAGE человека (SEQ

ID NO: 13) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-123 RAGE человека (SEQ ID NO: 14) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую V-домену RAGE и расположенному ниже междоменному линкеру. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 24-123 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием pE, (SEQ ID NO: 48) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-226 RAGE человека (SEQ ID NO: 17) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-226 RAGE человека (SEQ ID NO: 18) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую V-домену, домену C1 и междоменному линкеру, связывающему указанные два домена. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 24-226 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием pE (SEQ ID NO: 50), или последовательность, идентичную им на 90%. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-339 RAGE человека (SEQ ID NO: 5) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или 24-339 RAGE человека (SEQ ID NO: 6) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую sRAGE (т.е. кодирующую домены V, C1 и C2 и междоменные линкеры). Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 24-339 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием pE, (SEQ ID NO: 45) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%. Или можно использовать фрагменты каждой из указанных последовательностей.

Слитый белок RAGE может включать в себя несколько типов пептидов, которые не получены из RAGE или его фрагмента. Второй полипептид слитого белка RAGE может содержать полипептид, полученный из иммуноглобулина. В одном варианте полипептид иммуноглобулина может содержать тяжелую цепь иммуноглобулина или ее часть (т.е. фрагмент). Например, фрагмент тяжелой цепи может содержать полипептид, полученный из Fc-фрагмента иммуноглобулина, при этом Fc-фрагмент содержит шарнирный полипептид тяжелой цепи и домены C_H2 и C_H3 тяжелой цепи иммуноглобулина в качестве мономера. Тяжелая цепь (или ее часть) может быть получена из любого известного изотипа тяжелой цепи: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ε) или IgA (α). Кроме того, тяжелая цепь (или ее часть) может быть получена из любого известного подтипа тяжелой цепи: IgG1 (γ1)/ IgG2 (γ2), IgG3 (γ3), IgG4 (γ4), IgA1 (α1), IgA2 (α2) или мутаций таких изотипов или подтипов, которые изменяют биологическую активность. Второй полипептид может содержать домены C_H2 и C_H3 IgG1 человека или части любого или обоих указанных доменов. В качестве иллюстративных вариантов полипептид, содержащий домены C_H2 и C_H3 IgG1 человека или их части, может содержать последовательность SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40. Пептид иммуноглобулина может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 41. Последовательность иммуноглобулина в SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40 также может кодироваться последовательностями SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53, в которых молчащие изменения оснований для кодонов, которые кодируют пролин (CCG на CCC) и глицин (GGT на GGG) на С-конце последовательности, удаляют криптоический сайт сплайсинга РНК вблизи терминального кодона.

Fc-часть цепи иммуноглобулина может быть провоспалительной *in vivo*. Таким образом, в одном варианте слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению содержит междоменный линкер, полученный из RAGE, а не из междоменного шарнирного полипептида, полученного из иммуноглобулина.

Таким образом, в одном варианте слитый белок RAGE может содержать полипептид RAGE, непосредственно связанный с полипептидом, содержащим домен C_H2 иммуноглобулина или фрагмент или часть домена C_H2 иммуноглобулина. В одном варианте домен C_H2 или его фрагмент содержит последовательность SEQ ID NO: 42. В одном варианте фрагмент последовательности SEQ ID NO: 42 содержит последовательность SEQ ID NO: 42 с удаленными первыми десятью аминокислотами. В одном варианте полипептид RAGE может содержать участок связывания лиганда. Участок связывания лиганда RAGE может содержать V-домен RAGE или его часть. В одном варианте участок связывания лиганда RAGE содержит последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или последовательность SEQ ID NO: 10 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

Полипептид RAGE, используемый в слитых белках RAGE согласно настоящему изобретению, может содержать иммуноглобулиновый домен RAGE. Дополнительно или альтернативно, фрагмент RAGE может содержать междоменный линкер. Или полипептид RAGE может содержать иммуноглобулиновый домен RAGE, связанный с расположенным выше (т.е. ближе к N-концу) или расположенным ниже (т.е. ближе к С-концу) междоменным линкером. В еще одном варианте полипептид RAGE может содержать два (или более) иммуноглобулиновых домена RAGE, связанных друг с другом междоменным линкером. Полипептид RAGE может дополнительно содержать множество иммуноглобулиновых доменов RAGE, связанных друг с другом одним или несколькими междоменными линкерами и имеющих концевой междоменный линкер, связанный с N-концевым иммуноглобулиновым доменом RAGE и/или С-концевым иммуноглобулиновым доменом. Дополнительные комбинации иммуноглобулиновых доменов RAGE и междоменных линкеров входят в объем настоящего изобретения.

В одном варианте полипептид RAGE содержит междоменный линкер RAGE, связанный с иммуноглобулиновым доменом RAGE, так что С-концевая аминокислота иммуноглобулинового домена RAGE связана с N-концевой аминокислотой междоменного линкера, а С-концевая аминокислота междоменного линкера RAGE непосредственно связана с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего домен C_н2 иммуноглобулина или его фрагмент. Полипептид, содержащий домен C_н2 иммуноглобулина, может содержать домены C_н2 и C_н3 IgG1 человека или часть любого одного или обоих доменов. В качестве иллюстративного варианта полипептид, содержащий домены C_н2 и C_н3 или их часть IgG1 человека, может содержать последовательность SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40.

Как описано выше, слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению может содержать один или несколько доменов из RAGE. Также полипептид RAGE, содержащий междоменный линкер, связанный с доменом полипептида RAGE, может содержать фрагмент полноразмерного белка RAGE. Например, полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-136 RAGE человека (SEQ ID NO: 15) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-136 RAGE человека (SEQ ID NO: 16) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-136 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием pE (SEQ ID NO: 49), или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую V-домену RAGE и расположенному ниже междоменному линкеру. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-251 RAGE человека (SEQ ID NO: 19) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-251 RAGE человека (SEQ ID NO: 20) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-251 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием pE (SEQ ID NO: 51), или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую V-домену, домену C1, междоменному линкеру, связывающему указанные два домена, и второму междоменному линкеру, расположенному ниже C1.

Например, в одном варианте слитый белок RAGE может содержать два иммуноглобулиновых домена, полученных из белка RAGE, и два иммуноглобулиновых домена, полученных из полипептида Fc человека. Слитый белок RAGE может содержать первый иммуноглобулиновый домен RAGE и первый междоменный линкер RAGE, связанные со вторым иммуноглобулиновым доменом RAGE и вторым междоменным линкером RAGE, так, что N-концевая аминокислота первого междоменного линкера связана с С-концевой аминокислотой первого иммуноглобулинового домена RAGE, N-концевая аминокислота второго иммуноглобулинового домена RAGE связана с С-концевой аминокислотой первого междоменного линкера, N-концевая аминокислота второго междоменного линкера связана с С-концевой аминокислотой второго иммуноглобулинового домена RAGE, и С-концевая аминокислота второго междоменного линкера RAGE непосредственно связана с N-концевой аминокислотой иммуноглобулинового домена C_н2. В одном варианте состоящий из четырех доменов слитый белок RAGE может содержать последовательность SEQ ID NO: 32. В альтернативных вариантах состоящий из четырех доменов слитый белок RAGE содержит последовательность SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 56.

Альтернативно, состоящий из трех доменов слитый белок RAGE может содержать один иммуноглобулиновый домен, полученный из RAGE и два иммуноглобулиновых домена, полученных из Fc-полипептида человека. Например, слитый белок RAGE может содержать один иммуноглобулин домен RAGE, связанный посредством междоменного линкера RAGE с N-концевой аминокислотой иммуноглобулинового домена C_н2 или частью иммуноглобулинового домена C_н2. В одном варианте состоящий из трех доменов слитый белок RAGE может содержать последовательность SEQ ID NO: 35. В альтернативных вариантах состоящий из трех доменов слитый белок RAGE может содержать последовательность SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 57.

Фрагмент междоменного линкера RAGE может содержать пептидную последовательность, которая в природе располагается ниже и, следовательно, связана с иммуноглобулиновым доменом RAGE. Например, в случае V-домена RAGE междоменный линкер может содержать аминокислотные последовательности, которые в природе располагаются ниже V-домена. В одном варианте линкер может содержать последовательность SEQ ID NO: 21, соответствующую аминокислотам 117-123 полноразмерного RAGE. Или линкер может содержать пептид, имеющий дополнительные части природной последовательности RAGE. Например, можно использовать междоменный линкер, содержащий несколько аминокислот (например, 1-3, 1-5 или 1-10, или 1-15 аминокислот) выше и ниже последовательности SEQ ID NO: 21. Таким образом, в одном варианте междоменный линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 23, включающую в себя аминокислоты 117-136 полноразмерного RAGE. Или можно использовать фрагменты последовательности SEQ ID NO: 21, в которых делетированы, например, 1, 2 или 3 аминокислоты с любого конца линкера. В альтернативных вариантах линкер может содержать пептид, который по меньшей мере на 70% идентичен, на 75% идентичен, на 80% идентичен, на 85% идентичен, на 90% идентичен, на 95% идентичен, на 97% идентичен, на 98% идентичен или на 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 23.

В случае домена C1 RAGE линкер может содержать пептидную последовательность, которая в природе находится ниже домена C1. В одном варианте линкер может содержать SEQ ID NO: 22, соответствующую аминокислотам 222-251 полноразмерного RAGE. Или линкер может содержать пептид, имею-

щий дополнительные части природной последовательности RAGE. Например, можно использовать линкер, содержащий несколько (1-3, 1-5 или 1-10 или 1-15 аминокислот) аминокислот выше и ниже последовательности SEQ ID NO: 22. Или можно использовать фрагменты последовательности SEQ ID NO: 22, в которых делетированы, например, 1-3, 1-5 или 1-10, или 1-15 аминокислот с любого конца линкера. Например, в одном варианте междоменный линкер RAGE может содержать последовательность SEQ ID NO: 24, соответствующую аминокислотам 222-226, или междоменный линкер может содержать последовательность SEQ ID NO: 44, соответствующую аминокислотам 318-342 RAGE.

Кроме того, специалисту будет понятно, что отдельные замены, делеции или добавления, которые изменяют, добавляют или делетируют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот (обычно примерно менее 5%, более обычно примерно менее 1%) в кодируемой последовательности, представляют собой консервативно модифицированные варианты, в которых изменения приводят к замене аминокислоты химически сходной аминокислотой. Таблицы консервативных замен, в которых представлены функционально сходные аминокислоты, хорошо известны в данной области. Далее приведены примеры групп, каждая из которых содержит аминокислоты, которые являются друг для друга консервативными заменами:

- 1) аланин (A), серин (S), треонин (T);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); и
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W). Консервативной заменой является замена, при которой заменяющая аминокислота (встречающаяся в природе или модифицированная) является структурно родственной аминокислоте, которую она заменяет, т.к. имеет примерно такой же размер и электронные свойства как и аминокислота, которая заменяется. Таким образом, заменяющая аминокислота может иметь такую же или сходную функциональную группу в боковой цепи, как и исходная аминокислота. Термин "консервативная замена" также относится к использованию заменяющей аминокислоты, которая идентична заменяемой аминокислоте за исключением того, что функциональная группа в боковой цепи защищена подходящей защитной группой.

Как известно в данной области, аминокислоты могут стать химически модифицированными по сравнению с их природной структурой посредством механизмов либо ферментативных, либо неферментативных реакций. Например, в одном варианте N-концевая глутаминовая кислота или глутамин могут подвергаться циклизации с потерей воды с образованием пироглутаминовой кислоты (pyroE или pE) (Chelius et al., Anal. Chem, 78: 2370-2376 (2006) и Burstein et al. Proc. National Acad. Sci., 73:2 604-2608 (1976)). Кроме того, слитый белок RAGE с последовательностью SEQ ID NO: 56 потенциально можно получить через последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую глутаминовую кислоту в положении остатка 24, а не глутамин в положении остатка 24 (на основе нумерации полноразмерного RAGE).

Способы получения слитых белков RAGE

Настоящее изобретение также относится к способу получения слитого белка RAGE. Таким образом, в одном варианте настоящее изобретение относится к способу получения слитого белка RAGE, включающему в себя стадию ковалентного связывания полипептида RAGE, связанного со вторым полипептидом, отличным от полипептида RAGE, в котором полипептид RAGE содержит участок связывания лиганда RAGE. Например, связанный полипептид RAGE и второй полипептид, отличный от RAGE, могут кодироваться рекомбинантной конструкцией ДНК. Способ может дополнительно включать в себя стадию введения конструкции ДНК в экспрессирующий вектор. Также способ может включать в себя стадию встраивания экспрессирующего вектора в клетку-хозяина.

Например, варианты согласно настоящему изобретению относятся к слитым белкам RAGE, содержащий полипептид RAGE, связанный со вторым полипептидом, отличным от RAGE. В одном варианте слитый белок RAGE может содержать участок связывания лиганда RAGE. В одном варианте участок связывания лиганда содержит большую часть N-концевого домена слитого белка RAGE. Участок связывания лиганда RAGE может содержать V-домен RAGE или его часть. В одном варианте участок связывания лиганда RAGE содержит последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 10 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

В одном варианте полипептид RAGE может быть связан с полипептидом, содержащим иммуноглобулиновый домен или часть (например, его фрагмент) иммуноглобулинового домена. В одном варианте полипептид, содержащий иммуноглобулиновый домен, содержит по меньшей мере часть по меньшей мере одного из доменов C_H2 или C_H3 IgG человека.

Слитый белок RAGE может быть сконструирован с использованием методики рекомбинантной ДНК. Например, в одном варианте настоящее изобретение относится к изолированной последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей, комплементарной или имеющей существенную идентичность с полинуклеотидной последовательностью, которая кодирует полипептид RAGE, связанный со вторым

полипептидом, отличным от RAGE. В одном варианте полипептид RAGE может содержать участок связывания лиганда RAGE.

Белок или полипептид RAGE может содержать полноразмерный RAGE человека (например, SEQ ID NO: 1), или фрагмент RAGE человека. В одном варианте полипептид RAGE не содержит никаких остатков сигнальной последовательности. Сигнальная последовательность RAGE может содержать либо остатки 1-22, либо остатки 1-23 полноразмерного RAGE (SEQ ID NO: 1). В альтернативных вариантах полипептид RAGE может содержать последовательность, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична RAGE человека, или ее фрагмент. Например, в одном варианте полипептид RAGE может содержать RAGE человека или его фрагмент с глицином в качестве первого остатка вместо метионина (см., например, Neeper et al., (1992)). Или RAGE человека может содержать полноразмерный RAGE с удаленной сигнальной последовательностью (например, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3) (фиг. 1A и 1B) или часть такой аминокислотной последовательности. Слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению также могут содержать sRAGE (например, SEQ ID NO: 4), полипептид по меньшей мере на 90% идентичный sRAGE, или фрагмент sRAGE. Например, полипептид RAGE может содержать sRAGE человека или его фрагмент с глицином в качестве первого остатка вместо метионина (см., например, Neeper et al., (1992)). Или RAGE человека может содержать sRAGE с удаленной сигнальной последовательностью (см., например, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6 на фиг. 1C или SEQ ID NO: 45 на фиг. 16A) или часть такой аминокислотной последовательности. В других вариантах белок RAGE может содержать V-домен (см., например, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 на фиг. ID или SEQ ID NO: 46 на фиг. 16A). Или можно использовать последовательность по меньшей мере на 90% идентичную V-домену, или его фрагмент. Или белок RAGE может содержать фрагмент RAGE, содержащий часть V-домена (см., например, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 на фиг. ID или SEQ ID NO: 47 на фиг. 16A). В одном варианте участок связывания лиганда может содержать последовательность SEQ ID NO: 9, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 10, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 47, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%. В еще одном варианте фрагмент RAGE представляет собой синтетический пептид.

В одном варианте последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность SEQ ID NO: 25, кодирующую аминокислоты 1-118 RAGE человека или его фрагмент. Например, можно использовать последовательность, содержащую нуклеотиды 1-348 SEQ ID NO: 25 для кодирования аминокислот 1-116 RAGE человека. Или нуклеиновая кислота может содержать последовательность SEQ ID NO: 26, кодирующую аминокислоты 1-123 RAGE человека. Или нуклеиновая кислота может содержать последовательность SEQ ID NO: 27, кодирующую аминокислоты 1-136 RAGE человека. Или нуклеиновая кислота может содержать SEQ ID NO: 28, кодирующую аминокислоты 1-230 RAGE человека. Или нуклеиновая кислота может содержать последовательность SEQ ID NO: 29, кодирующую аминокислоты 1-251 RAGE человека, или можно использовать фрагменты таких последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующие фрагменты полипептида RAGE.

Слитый белок RAGE может включать в себя несколько типов пептидов, которые получены не из RAGE или его фрагмента. Второй полипептид слитого белка RAGE может содержать полипептид, полученный из иммуноглобулина. Тяжелая цепь (или ее часть) может быть получена из любого из известных изоформ тяжелых цепей: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ) или IgA (α). Кроме того, тяжелая цепь (или ее часть) может быть получена из любого из известных подтипов тяжелых цепей: IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), или мутаций указанных изоформ или подтипов, которые изменяют биологическую активность. Второй полипептид может содержать домены C_H2 и C_H3 IgG1 человека или часть любого одного или обоих указанных доменов. В качестве иллюстративных вариантов полипептид, содержащий домены C_H2 и C_H3 IgG1 человека или их часть, может содержать последовательность SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40. Пептид иммуноглобулина может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 41. В альтернативных вариантах последовательность иммуноглобулина в SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40 также может кодироваться последовательностями SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53 соответственно.

Fc-часть цепи иммуноглобулина может быть провоспалительной *in vivo*. Таким образом, слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению содержит междоменный линкер, полученный из RAGE, а не из междоменного шарнирного полипептида, полученного из иммуноглобулина. Например, в одном варианте слитый белок RAGE может кодироваться рекомбинантной конструкцией ДНК. Также способ может включать в себя стадию встраивания конструкции ДНК в экспрессирующий вектор. Также способ может включать в себя трансфекцию экспрессирующего вектора в клетку-хозяина.

Таким образом, в одном варианте настоящее изобретение относится к способу получения слитого белка RAGE, включающему в себя стадию ковалентного связывания полипептид RAGE с полипептидом, содержащим домен C_H2 иммуноглобулина или часть домена C_H2 иммуноглобулина. В одном варианте слитый белок RAGE может содержать участок связывания лиганда RAGE. Участок связывания лиганда RAGE может содержать V-домен RAGE или его часть. В одном варианте участок связывания лиганда

RAGE содержит последовательность SEQ ID NO: 9, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 10, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 47, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

Например, в одном варианте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид RAGE, непосредственно связанный с полипептидом, содержащим домен C_н2 иммуноглобулина, или его фрагмент. В одном варианте домен C_н2 или его фрагмент содержит последовательность SEQ ID NO: 42. В одном варианте фрагмент последовательности SEQ ID NO: 42 содержит последовательность SEQ ID NO: 42, в которой удалены первые десять аминокислот. Второй полипептид может содержать домены C_н2 и C_н3 IgG1 человека. В качестве иллюстративного варианта полипептид, содержащий домены C_н2 и C_н3 IgG1 человека, может содержать последовательность SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40. Пептид иммуноглобулина может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 41. Последовательность иммуноглобулина в SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40 также может кодироваться последовательностями SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53, в которых молчащие изменения оснований для кодонов, которые кодируют пролин (CCG на CCC) и глицин (GGT на GGG) на С-конце последовательности удаляют криптический сайт сплайсинга РНК вблизи терминального кодона.

В одном варианте полипептид RAGE может содержать междоменный линкер RAGE, связанный с иммуноглобулиновым доменом RAGE, так, что С-концевая аминокислота иммуноглобулинового домена RAGE связана с N-концевой аминокислотой междоменного линкера, а С-концевая аминокислота междоменного линкера RAGE непосредственно связана с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего домен C_н2 иммуноглобулина или его фрагмент. Полипептид, содержащий домен C_н2 иммуноглобулина или его часть, может содержать полипептид, включающий в себя домены C_н2 и C_н3 IgG1 человека или часть обоих или любого из указанных доменов. В качестве иллюстративного варианта полипептид, содержащий домены C_н2 и C_н3 IgG1 человека или их часть, может содержать последовательности SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40.

Слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению может содержать один или несколько доменов из RAGE. Также полипептид RAGE, содержащий междоменный линкер, связанный с иммуноглобулиновым доменом RAGE, может содержать фрагмент полноразмерного белка RAGE. Например, в одном варианте слитый белок RAGE может содержать два иммуноглобулиновых домена, полученных из белка RAGE и два иммуноглобулиновых домена, полученных из полипептида Fc человека. Слитый белок RAGE может содержать первый иммуноглобулиновый домен RAGE и первый междоменный линкер, связанные со вторым иммуноглобулиновым доменом RAGE и вторым междоменным линкером RAGE, так, что N-концевая аминокислота первого междоменного линкера связана с С-концевой аминокислотой первого иммуноглобулинового домена RAGE, N-концевая аминокислота второго иммуноглобулинового домена RAGE связана с С-концевой аминокислотой первого междоменного линкера, N-концевая аминокислота второго междоменного линкера связана с С-концевой аминокислотой второго иммуноглобулинового домена RAGE, и С-концевая аминокислота второго междоменного линкера RAGE непосредственно связана с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего домен C_н2 иммуноглобулина или его фрагмент. Например, полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-251 RAGE человека (SEQ ID NO: 19) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-251 RAGE человека (SEQ ID NO: 20) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-251 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием рЕ (SEQ ID NO: 51), или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую V-домену, домену C1, междоменному линкеру, связывающему указанные два домена, и второму междоменному линкеру ниже C1. В одном варианте, конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность SEQ ID NO: 30 или ее фрагмент, может кодировать слитый белок RAGE, стоящий из четырех доменов. В другом варианте конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность SEQ ID NO: 54, может кодировать слитый белок RAGE, состоящий из четырех доменов, в который вводят молчащие изменения оснований в кодонах, которые кодируют пролин (CCG на CCC) и глицин (GGT на GGG) на С-конце последовательности, чтобы удалить криптический сайт сплайсинга РНК вблизи терминального кодона.

Альтернативно, состоящий из трех доменов слитый белок RAGE может содержать один иммуноглобулиновый домен, полученный из RAGE, и два иммуноглобулиновых домена, полученных из полипептида Fc человека. Например, слитый белок RAGE может содержать один иммуноглобулиновый домен RAGE, связанный посредством междоменного линкера RAGE с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего иммуноглобулиновый домен C_н2 или его фрагмент. Например, полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-136 RAGE человека (SEQ ID NO: 15) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-136 RAGE человека (SEQ ID NO: 16) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-136 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием рЕ (SEQ ID NO: 49), или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую V-домену RAGE и расположенному ниже междоменному линкеру. В одном варианте конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность SEQ ID NO:

31 или ее фрагмент, может кодировать состоящий из трех доменов слитый белок RAGE. В другом варианте конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность SEQ ID NO: 55, может кодировать состоящий из трех доменов слитый белок RAGE, в котором молчащие изменения оснований в кодонах, которые кодируют пролин (CCG на CCC) и глицин (GGT на GGG) на С-конце последовательности удаляют криптический сайт сплайсинга РНК вблизи терминального кодона.

Фрагмент междоменного линкера RAGE может содержать пептидную последовательность, которая в природе расположена ниже и, следовательно, связана с иммуноглобулиновым доменом RAGE. Например, в случае V-домена RAGE междоменный линкер может содержать аминокислотные последовательности, которые в природе располагаются ниже V-домена. В одном варианте линкер может содержать последовательность SEQ ID NO: 21, соответствующую аминокислотам 117-123 полноразмерного RAGE. Или линкер может содержать пептид, имеющий дополнительные части природной последовательности RAGE. Например, можно использовать междоменный линкер, содержащий несколько аминокислот (например, 1-3, 1-5 или 1-10, или 1-15 аминокислот) выше и ниже последовательности SEQ ID NO: 21. Таким образом, в одном варианте междоменный линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 23, включающую в себя аминокислоты 117-136 полноразмерного RAGE. Или можно использовать фрагменты последовательности SEQ ID NO: 21, в которых делетированы, например, 1, 2 или 3 аминокислоты с любого конца линкера. В альтернативных вариантах линкер может содержать последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична или на 80% идентична, или на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 23.

В случае домена C1 RAGE линкер может содержать пептидную последовательность, которая в природе находится ниже домена C1. В одном варианте линкер может содержать SEQ ID NO: 22, соответствующую аминокислотам 222-251 полноразмерного RAGE. Или линкер может содержать пептид, имеющий дополнительные части природной последовательности RAGE. Например, можно использовать линкер, содержащий несколько (1-3, 1-5 или 1-10 или 1-15 аминокислот) аминокислот выше и ниже последовательности SEQ ID NO: 22. Или можно использовать фрагменты последовательности SEQ ID NO: 22, в которых делетированы, например, 1-3, 1-5 или 1-10, или 1-15 аминокислот с любого конца линкера. Например, в одном варианте междоменный линкер RAGE может содержать последовательность SEQ ID NO: 24, соответствующую аминокислотам 222-226. Или междоменный линкер может содержать последовательность SEQ ID NO: 44, соответствующую аминокислотам 318-342 RAGE.

Способ может дополнительно включать в себя стадию встраивания конструкции ДНК в экспрессирующий вектор. Таким образом, в одном варианте настоящее изобретение относится к экспрессирующему вектору, который кодирует слитый белок RAGE, содержащий полипептид RAGE, непосредственно связанный с полипептидом, содержащим домен C₂ иммуноглобулина или часть домена C₂ иммуноглобулина. В одном варианте полипептид RAGE содержит конструкции, такие как конструкции, описанные в данной публикации, имеющие междоменный линкер RAGE, связанный с иммуноглобулиновым доменом RAGE, так, что С-концевая аминокислота иммуноглобулинового домена RAGE связана с N-концевой аминокислотой междоменного линкера, а С-концевая аминокислота междоменного линкера RAGE непосредственно связана с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего домен C₂ иммуноглобулина или его часть. Например, экспрессирующий вектор, используемый для трансфекции клеток, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 30 или ее фрагмент, SEQ ID NO: 54 или ее фрагмент, SEQ ID NO: 31 или ее фрагмент или SEQ ID NO: 55 или ее фрагмент.

Способ может дополнительно включать в себя стадию трансфекции клетки экспрессирующим вектором согласно настоящему изобретению. Таким образом, в одном варианте настоящее изобретение относится к клетке, трансфицированной экспрессирующим вектором, который экспрессирует слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению, так, что клетка экспрессирует слитый белок RAGE, содержащий полипептид RAGE, непосредственно связанный с полипептидом, содержащим домен C₂ иммуноглобулина или часть домена C₂ иммуноглобулина. В одном варианте полипептид RAGE содержит конструкции, такие как конструкции, описанные в данной публикации, имеющие междоменный линкер RAGE, связанный с иммуноглобулиновым доменом RAGE, так, что С-концевая аминокислота иммуноглобулинового домена RAGE связана с N-концевой аминокислотой междоменного линкера, а С-концевая аминокислота междоменного линкера RAGE непосредственно связана с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего домен C₂ иммуноглобулина или его часть. Например, экспрессирующий вектор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 30 или ее фрагмент, SEQ ID NO: 54 или ее фрагмент, SEQ ID NO: 31 или ее фрагмент или SEQ ID NO: 55 или ее фрагмент.

Например, могут быть сконструированы плазмиды для экспрессии слитых белков RAGE-IgG посредством слияния имеющих разную длину 5'-последовательности кДНК RAGE с 3'-последовательностью кДНК IgG1 (γ 1) человека. Последовательности кассеты экспрессии могут быть встроены в такой экспрессирующий вектор, как pcDNA3.1 (Invitrogen, CA) с использованием стандартных способов рекомбинации.

Также способ может включать в себя трансфекцию экспрессирующего вектора в клетку-хозяина. Слитые белки RAGE могут быть экспрессированы в системах экспрессии млекопитающих, включая системы, в которых экспрессирующие конструкции вводят в клетки млекопитающих с использованием ви-

руса, такого как ретровирус или аденовирус. Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области и включают многие линии иммортализованных клеток, доступных из Американской коллекции типов культур (ATCC). Такие линии наряду с прочим включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NSO, SP2, клетки HeLa, клетки почек сирийского хомячка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоклеточной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549 и ряд других линий клеток. Линии клеток могут быть выбраны на основании определения того, какие линии клеток имеют высокие уровни экспрессии слитого белка RAGE. Другие линии клеток, которые могут быть использованы, включают линии клеток насекомых, таких как клетки Sf9. Растительные клетки-хозяева включают, например, клетки *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ряски, кукурузы, пшеницы, картофеля и т.д. Бактериальные клетки-хозяева включают клетки *E. coli* и *Streptomyces species*. Дрожжевые клетки-хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*. Когда рекомбинантные экспрессирующие векторы, кодирующие гены слитого белка RAGE, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, слитые белки RAGE продуцируются при культивировании клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения экспрессии слитого белка RAGE в клетках-хозяевах или секреции слитого белка RAGE в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяева. Слитые белки RAGE могут быть извлечены из культуральной среды с использованием стандартных способов очистки белка.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие слитые белки RAGE, и экспрессирующие векторы, содержащие такие молекулы нуклеиновых кислот, могут быть использованы для трансфекции подходящей клетки млекопитающего, растения, бактерии или дрожжей. Трансформацию можно осуществлять любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают опосредованную декстраном трансфекцию, преципитацию фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсулирование полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в клетки млекопитающих с помощью вирусных векторов. Способы трансфекции растительных клеток хорошо известны в данной области, включая, например, опосредованную *Agrobacterium* трансформацию, биолистическую трансформацию, прямую инъекцию, электропорацию и вирусную трансформацию. Способы трансформации бактериальных и дрожжевых клеток также хорошо известны в данной области.

Экспрессирующий вектор также может быть доставлен в систему экспрессии с использованием биолистических способов доставки ДНК, при этом плазмиду осаждают на микроскопических частицах, предпочтительно золота, и частицы перемещают в клетку-мишень или систему экспрессии. Способы биолистики ДНК хорошо известны в данной области, и устройства, например, "генная пушка", коммерчески доступны для доставки микрочастиц в клетку (например, Helios Gene Gun, Bio-Rad Labs., Hercules, CA) и в кожу (PMED Device, PowderMed Ltd., Oxford, UK).

Экспрессия Слитых белков RAGE в линиях клеток-производителей может быть усилена с использованием ряда известных способов. Например, система экспрессии гена глутаминсинтетазы (система GS) и система кодируемой цитоплазмой резистентности к неомицину являются распространенными способами усиления экспрессии при определенных условиях.

Слитые белки RAGE, экспрессированные разными линиями клеток, могут иметь разный характер гликозилирования. Однако все слитые белки RAGE, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, предлагаемыми в настоящем изобретении, или содержащие аминокислотные последовательности, предлагаемые в изобретении, являются частью настоящего изобретения, независимо от гликозилирования слитого белка RAGE.

В одном варианте рекомбинантный экспрессирующий вектор может быть трансфицирован в клетки яичника китайского хомячка (CHO), и экспрессия может быть оптимизирована. В альтернативных вариантах клетки могут продуцировать от 0,1 до 20 г/л или от 0,5 до 10 г/л, или примерно 1-2 г/л.

Как известно в данной области, такие конструкции нуклеиновых кислот могут быть модифицированы мутацией, например, ПЦР-амплификацией матрицы нуклеиновой кислоты с праймерами, содержащими представляющую интерес мутацию. Таким образом могут быть сконструированы полипептиды, имеющие разную аффинность по отношению к лигандам RAGE. В одном варианте мутантные последовательности могут быть на 90% или более идентичны исходной ДНК. Как таковые варианты могут включать нуклеотидные последовательности, которые гибридизуются в жестких условиях (т.е. условиях, эквивалентных температуре примерно на 20-27°C ниже температуры плавления (ТМ) дуплекса ДНК в 1 молярной соли).

Кодирующая последовательность может быть экспрессирована в результате трансфекции экспрессирующего вектора в подходящего хозяина. Например, рекомбинантные векторы могут быть стабильно трансфицированы в клетки яичника китайского хомячка (CHO), и клетки, экспрессирующие слитый белок RAGE, могут быть отобраны и клонированы. В одном варианте клетки, экспрессирующие рекомбинантную конструкцию, отбирают в отношении кодируемой плазмидой резистентности к неомицину при внесении антибиотика G418. Отдельные клоны могут быть отобраны, и клоны, экспрессирующие высокие уровни рекомбинантного белка, которые выявляют при Вестерн-блот-анализе надосадка клеток, мо-

гут быть размножены, а генный продукт очищен аффинной хроматографией с использованием колонок, содержащих белок А.

Выбранные варианты рекомбинантных нуклеиновых кислот, которые кодируют слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению, показан на фиг. 2-5 и фиг. 17-20. Например, как описано выше, слитый белок RAGE, продуцируемый рекомбинантной конструкцией ДНК, может содержать полипептид RAGE, связанный со вторым полипептидом, отличным от полипептида RAGE. Слитый белок RAGE может содержать два домена, полученных из белка RAGE, и два домена, полученных из иммуноглобулина. Пример конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок RAGE, TTP-4000 (TT4), имеющий такой тип структуры, показан на фиг. 2 (SEQ ID NO: 30) и фиг. 17 (SEQ ID NO: 54). Как показано на фиг. 2 и фиг. 17, кодирующая последовательность 1-753 (выделена жирным шрифтом) кодирует N-концевую последовательность белка RAGE, тогда как последовательность 754-1386 кодирует последовательность белка IgG.

В случае получения из последовательности SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 54 или последовательности, идентичной им по меньшей мере на 90%, слитый белок RAGE может содержать состоящую из четырех доменов аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, или полипептид с удаленной сигнальной последовательностью (см., например, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34 на фиг. 4 или SEQ ID NO: 56 на фиг. 19.) На фиг. 4 и фиг. 19 аминокислотная последовательность RAGE выделена жирным шрифтом. Последовательность иммуноглобулина представляет собой иммуноглобулиновые домены C_H2 и C_H3 IgG. Как показано на фиг. 6B, первые 251 аминокислот полноразмерного слитого белка RAGE TTP-4000 включают в себя в качестве последовательности полипептида RAGE сигнальную последовательность, содержащую аминокислоты 1-22/23, иммуноглобулиновый V-домен (включая участок связывания лиганда), содержащий аминокислоты 23/24-116, междоменный линкер, содержащий аминокислоты 117-123, второй иммуноглобулиновый домен (C1), содержащий аминокислоты 124-221, и расположенный ниже междоменный линкер, содержащий аминокислоты 222-251.

В одном варианте слитый белок RAGE необязательно может содержать второй иммуноглобулиновый домен RAGE. Например, слитый белок RAGE может содержать один иммуноглобулиновый домен, полученный из RAGE, и два иммуноглобулиновых домена, полученных из полипептида Fc человека. Пример конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей такой тип слитого белка RAGE, показан на фиг. 3 (SEQ ID NO: 31) и на фиг. 18 (SEQ ID NO: 55). Как показано на фиг. 3 и фиг. 18, кодирующая последовательность от нуклеотида 1 до 408 (выделена жирным шрифтом) кодирует N-концевую последовательность белка RAGE, тогда как последовательность 409-1041 кодирует последовательность белка IgG1 (γ1).

В случае получения из последовательности SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 55 или последовательности, идентичной им по меньшей мере на 90%, слитый белок RAGE может содержать состоящую из трех доменов аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, или полипептид с удаленной сигнальной последовательностью (см., например, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37 на фиг. 5 или SEQ ID NO: 57 на фиг. 20). На фиг. 5 и фиг. 20, аминокислотная последовательность RAGE выделена жирным шрифтом. Как показано на фиг. 6B, первые 136 аминокислот полноразмерного слитого белка RAGE TTP-3000 содержат в качестве полипептида RAGE сигнальную последовательность, содержащую аминокислоты 1-22/23, иммуноглобулиновый V-домен (включая участок связывания лиганда), содержащий аминокислоты 23/24-116, и междоменный линкер, содержащий аминокислоты 117-136. Последовательность 137-346 включает иммуноглобулиновые домены C_H2 и C_H3 IgG.

Слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению могут иметь повышенную стабильность *in vivo* по сравнению с полипептидами RAGE, не содержащими второго полипептида. Слитый белок RAGE может быть дополнительно модифицирован, чтобы повысить стабильность, эффективность, активность и биодоступность. Таким образом, слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы в результате посттрансляционного процессинга или посредством химической модификации. Например, слитый белок RAGE может быть получен в результате синтеза так, чтобы он содержал L-, D- или неприродные аминокислоты, альфа-дизамещенные аминокислоты или N-алкиламинокислоты. Кроме того, белки могут быть модифицированы ацетилированием, ацилированием, АДФ-рибозилированием, амидированием, связыванием липидов, таких как фосфатидилинозитол, образованием дисульфидных связей и тому подобным. Кроме того, может быть добавлен полиэтиленгликоль, чтобы повысить биологическую стабильность слитого белка RAGE.

Связывание антагонистов RAGE со слитыми белками RAGE

Слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению могут иметь ряд применений. Например, слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению можно использовать в анализе связывания для идентификации лигандов RAGE, таких как агонисты, антагонисты или модуляторы RAGE.

Например, в одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ выявления модуляторов RAGE, включающий в себя: (а) получение слитого белка RAGE, содержащего полипептид RAGE, связанный со вторым полипептидом, отличным от RAGE, при этом полипептид RAGE содержит участок связывания лиганда; (б) смешивание представляющего интерес соединения и лиганда, имеющего известную аффинность связывания по отношению к RAGE, со слитым белком RAGE; и (с)

измерение связывания известного лиганда RAGE со слитым белком RAGE в присутствии представляющего интерес соединения. В одном варианте участок связывания лиганда включает в себя большую часть N-концевого домена слитого белка RAGE.

Слитые белки RAGE также могут быть предложены в виде наборов для выявления модуляторов RAGE. Например, в одном варианте набор согласно настоящему изобретению может содержать (а) соединение, имеющее известную аффинность связывания с RAGE, в качестве позитивного контроля; (b) слитый белок RAGE, содержащий полипептид RAGE, связанный со вторым полипептидом, отличным от RAGE, при этом полипептид RAGE содержит участок связывания лиганда RAGE; и (с) инструкции по применению. В одном варианте участок связывания лиганда включает в себя большую часть N-концевого домена слитого белка RAGE.

Например, слитый белок RAGE можно использовать в анализе связывания, чтобы идентифицировать возможные RAGE лиганды. В одном иллюстративном варианте такого анализа связывания, известным лигандом RAGE покрывают твердую подложку (например, планшеты Maxisorb) в концентрации примерно 5 мкг на лунку, при этом каждая лунка содержит общий объем примерно 100 мкл. Планшеты можно инкубировать при 4°C в течение ночи, чтобы обеспечить возможность для абсорбции лиганда. Альтернативно, можно использовать более короткие периоды инкубации при более высокой температуре (например, при комнатной температуре). После определенного периода времени, позволяющего лиганду связаться с подложкой из анализируемых лунок можно аспирировать жидкость и добавить блокирующий буфер (например, 1% БСА в 50 мМ имидазольном буфере, pH 7,2), чтобы блокировать неспецифичное связывание. Например, блокирующий буфер может быть добавлен в планшеты на 1 ч при комнатной температуре. Затем из планшетов можно удалить жидкость и/или промыть буфером для промывки. В одном варианте в качестве буфера для промывки можно использовать буфер, содержащий 20 мМ имидазол, 150 мМ NaCl, 0,05% твин-20, 5 мМ CaCl₂ и 5 мМ MgCl₂, pH 7,2. Затем в анализируемые лунки можно добавить слитый белок RAGE в возрастающих разведениях. Затем обеспечивают возможность для инкубации слитого белка RAGE с иммобилизованным лигандом в анализируемой лунке, так чтобы связывание могло достичь равновесия. В одном варианте обеспечивают возможность для инкубации слитого белка RAGE с иммобилизованным лигандом примерно в течение одного часа при 37°C. В альтернативных вариантах можно использовать более длительные периоды инкубации при более низкой температуре. После инкубации слитого белка RAGE и иммобилизованного лиганда планшет можно промыть, чтобы удалить несвязанный слитый белок RAGE. Слитый белок RAGE, связанный с иммобилизованным лигандом, может быть выявлен разными способами. В одном варианте для выявления используют ELISA. Таким образом, в одном варианте к слитому белку RAGE, иммобилизованному в анализируемой лунке может быть добавлен комплекс для иммунологического анализа, содержащий мышинное моноклональное антитело против IgG1, биотинилированное антитело козы против IgG мыши и связанную с авидином щелочную фосфатазу. Обеспечивают возможность связывания комплекса для иммунологического анализа с иммобилизованным слитым белком RAGE, так чтобы связывание между слитым белком RAGE и комплексом для иммунологического анализа достигло равновесия. Например, позволяют комплексу связываться со слитым белком RAGE в течение одного часа при комнатной температуре. В указанной точке не связавшийся комплекс можно удалить промывкой анализируемой лунки буфером для промывки. Связанный комплекс может быть выявлен при добавлении субстрата щелочной фосфатазы, паранитрофенилфосфата (PNPP) и измерении превращения PNPP в паранитрофенол (PNP) в виде увеличения оптической плотности при 405 нм.

В одном варианте лиганд RAGE лиганд связывается со слитым белком RAGE с наномолярной (нМ) или микромолярной (мкМ) аффинностью. Эксперимент, иллюстрирующий связывание лигандов RAGE со слитыми белками RAGE согласно настоящему изобретению, показан на фиг. 7. Готовили растворы TTP-3000 (TT3) и TTP-4000 (TT4), имеющие начальные концентрации 1,082 мг/мл и 370 мкг/мл соответственно. Как показано на фиг. 1, при разных разведениях слитые белки RAGE TTP-3000 и TTP-4000 способны связываться с иммобилизованными лигандами RAGE амилоидом-бета (Abeta) (амилоид бета (1-40) из Biosource), S100b (S100) и амфотерином (Ampho), что приводит к увеличению оптической плотности. В отсутствие лиганда (т.е. при покрывании только БСА) не наблюдалось увеличение оптической плотности.

Анализ связывания согласно настоящему изобретению можно использовать для количественного анализа связывания лиганда с RAGE. В альтернативных вариантах лиганды RAGE могут связываться со слитым белком RAGE согласно настоящему изобретению с аффинностями связывания в диапазоне от 0,1 до 1000 наномолей (нМ) или от 1 до 500 нМ или от 10 до 80 нМ.

Слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению также можно использовать для идентификации соединений, обладающих способностью связываться с RAGE. Как показано на фиг. 8 и 9, соответственно, лиганд RAGE можно анализировать в отношении его способности конкурировать с иммобилизованным амилоидом бета за связывание со слитыми белками RAGE TTP-4000 (TT4) или TTP-3000 (TT3). Таким образом, можно видеть, что лиганд RAGE в конечной анализируемой концентрации (FAC) 10 мкМ может отстранять амилоид-бета от связывания со слитым белком RAGE в концентрациях, составляющих 1:3, 1:10, 1:30 и 1:100 от начальной концентрации раствора TTP-4000 (фиг. 8) или TTP-3000

(фиг. 9).

Модулирование клеточных эффекторов

Варианты слитых белков RAGE согласно настоящему изобретению можно использовать для модулирования биологического ответа, опосредованного RAGE. Например, могут быть сконструированы слитые белки RAGE для модулирования RAGE-индуцированных увеличений экспрессии генов. Таким образом, в одном варианте слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению можно использовать для модулирования функции биологических ферментов. Например, взаимодействие между RAGE и его лигандами может приводить к окислительному стрессу и активацию NF- κ B и регулируемых NF- κ B генов, таких как гены цитокинов IL-1 β , TNF- α и тому подобных. Кроме того, показано, что некоторые другие регуляторные пути, такие как пути, в которые вовлечены p21ras, MAP-киназы, ERK1 и ERK2, активируются при связывании AGE и других лигандов с RAGE.

Применение слитых белков RAGE согласно настоящему изобретению для модулирования экспрессии клеточного эффектора TNF- α показано на фиг. 10. миелоидные клетки THP-1 можно культивировать в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS и индуцировать секрецию TNF- α посредством стимуляции RAGE лигандом S100b. Когда такая стимуляция происходит в присутствии слитого белка RAGE индукция TNF- α под воздействием связывания S100b с RAGE может быть ингибирована. Таким образом, как показано на фиг. 10, добавление 10 мкг слитого белка RAGE TTP-3000 (TT3) или TTP-4000 (TT4) снижает вызванную S100b индукцию TNF- α примерно на 50-75%. Слитый белок RAGE TTP-4000 может быть эффективным в блокировании вызванной S100b индукции TNF- α по меньшей мере также как sRAGE (фиг. 10). Специфичность ингибирования для последовательностей RAGE TTP-4000 и TTP-3000 показана в эксперименте, в котором отдельно добавляли IgG к стимулированным S100b клеткам. Добавление IgG и S100b в анализ показывает такие же уровни TNF- α , как в случае добавления S100b отдельно.

Физиологические свойства слитых белков RAGE

Хотя sRAGE может быть терапевтически полезным для модулирования опосредованных RAGE заболеваний, sRAGE человека может иметь ограничения как отдельное терапевтическое средство из-за относительно короткого времени полужизни sRAGE в плазме. Например, хотя sRAGE грызунов имеет время полужизни у здоровых и диабетических крыс примерно 20 ч, sRAGE человека имеет время полужизни менее 2 ч при оценке сохранения иммунореактивности sRAGE (Renard et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 290: 1458-1466 (1999)).

Чтобы создать терапевтическое средство RAGE, которое имеет характеристики связывания, сходные с sRAGE, но более стабильный фармакокинетический профиль, можно использовать слитый белок RAGE, содержащий участок связывания лиганда RAGE, связанный с одним или несколькими доменами иммуноглобулина человека. Как известно в данной области, иммуноглобулиновые домены могут включать Fc-часть тяжелой цепи иммуноглобулина.

Fc-часть иммуноглобулина может придавать несколько свойств слитому белку RAGE. Например, слитый белок Fc может увеличивать время полужизни таких слитых белков в сыворотке, часто от часов до нескольких дней. Повышение фармакокинетической стабильности обычно является результатом взаимодействия линкера между областями C_H2 и C_H3 Fc-фрагмента с рецептором FcRn (Wines et al., J. Immunol., 164: 5313-5318 (2000)).

Хотя слитые белки, содержащие полипептид Fc иммуноглобулина, могут обеспечивать преимущество повышенной стабильности, слитые белки иммуноглобулина могут вызывать воспалительный ответ при введении хозяину. Воспалительный ответ может быть в значительной степени из-за Fc-части иммуноглобулина в слитом белке. Провоспалительный ответ может быть желательным признаком. Если мишень экспрессируется на клетках патологического типа, которые необходимо удалить (например, злокачественная клетка или популяция лимфоцитов, вызывающих аутоиммунное заболевание). Провоспалительный ответ может быть нейтральным признаком, если мишенью является растворимый белок, так как большинство растворимых белков не активируют иммуноглобулины. Однако провоспалительный ответ может быть отрицательным признаком, если мишень экспрессируется на типах клеток, разрушение которых может привести к неблагоприятным побочным эффектам. Также провоспалительный ответ может быть негативным признаком, если воспалительный каскад формируется в месте связывания слитого белка с тканевой мишенью, так как многие медиаторы воспаления могут быть вредны для окружающей ткани и/или могут вызывать системные эффекты.

Основной провоспалительный участок на Fc-фрагментах иммуноглобулина находится в шарнирной области между C_H1 и C_H2. Указанная шарнирная область взаимодействует с FcR1-3 на различных лейкоцитах и приводит эти клетки в действие для атаки мишени. (Wines et al., J. Immunol., 164: 5313-5318 (2000)).

В качестве средств терапии RAGE-опосредованных заболеваний слитые белки RAGE не требуют формирования воспалительного ответа. Таким образом, варианты слитых белков RAGE согласно настоящему изобретению могут включать слитый белок RAGE, содержащий полипептид RAGE, связанный с иммуноглобулиновым доменом(ами), в которых шарнирная область Fc из иммуноглобулина удалена и заменена полипептидом RAGE. Таким образом, взаимодействие между слитым белком RAGE и рецепто-

рами Fc на воспалительных клетках может быть минимизировано. Однако может быть важным сохранение правильной сборки и других взаимодействий в трехмерной структуре между разными иммуноглобулиновыми доменами слитого белка RAGE. Соответственно в вариантах слитых белков RAGE согласно настоящему изобретению можно заменять биологически инертным, но структурно сходным междоменным линкером RAGE, который разделяет домены V и C1 в RAGE, или линкером, который разделяет домены C1 и C2 RAGE, нормальную шарнирную область тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, полипептид RAGE слитого белка RAGE может содержать последовательность междоменного линкера, которая в природе находится ниже иммуноглобулинового домена RAGE, с образованием фрагмента иммуноглобулиновый домен RAGE/линкер.

Таким образом, можно сохранить трехмерные взаимодействия между иммуноглобулиновыми доменами, вносимыми либо RAGE, либо иммуноглобулином.

В одном варианте слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению может иметь значительно повышенную фармакологическую стабильность по сравнению с sRAGE. Например, на фиг. 11 показано, что после того, как слитый белок RAGE TTP-4000 насыщается лигандами, он может иметь время полужизни, составляющее более 300 ч. Это отличается от времени полужизни sRAGE в плазме человека только на несколько часов.

Таким образом, в одном варианте слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению можно использовать для антагонистического воздействия на связывание физиологических лигандов с RAGE в качестве средств лечения опосредованных RAGE заболеваний, не вызывая неприемлемой величины воспаления. Слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению могут давать значительное снижение формирования провоспалительного ответа по сравнению с IgG. Например, как показано на фиг. 12, слитый белок RAGE TTP-4000 не стимулирует высвобождение TNF- α из клеток в условиях, когда выявляется вызванная IgG человека стимуляция высвобождения TNF- α .

Лечение заболевания слитыми белками RAGE

Настоящее изобретение также относится к способам лечения опосредованного RAGE расстройства у человека. В одном варианте способ может включать в себя введение пациенту слитого белка RAGE, содержащего полипептид RAGE, который содержит участок связывания лиганда RAGE, связанный со вторым полипептидом, отличным от полипептида RAGE.

В одном варианте слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению может быть введен разными путями. Введение слитого белка RAGE согласно настоящему изобретению можно осуществлять внутрибрюшинной (в/б) инъекцией. Альтернативно, слитый белок RAGE можно вводить перорально, интраназально или в виде аэрозоля. В другом варианте введение является внутривенным (в/в). Слитый белок RAGE также можно вводить подкожно. В другом варианте введение слитого белка RAGE является внутриартериальным. В другом варианте введение является подъязычным. Также введение можно осуществлять в капсуле для длительного высвобождения. В еще одном варианте введение может быть через прямую кишку, в виде суппозитория или тому подобного. Например, подкожное введение можно применять для лечения хронических заболеваний, когда желательно самостоятельное введение.

Множество моделей на животных применяют для обоснования применения соединений, которые модулируют RAGE, в качестве терапевтических средств. Примеры таких моделей приведены ниже:

а) Ингибируемое sRAGE образование неинтимы в модели рестеноза у крыс после повреждения артерий у диабетических и здоровых крыс при ингибировании активации эндотелиальных, гладкомышечных клеток и макрофагов посредством RAGE (Zhou et al., *Circulation* 107: 2238-2243 (2003));

б) Ингибирование взаимодействий RAGE/лиганд с использованием либо sRAGE, либо анти-RAGE-антитела, уменьшенное образование амилоидных бляшек в мышинной модели системного амилоидоза (Yan et al., *Nat. Med.*, 6: 643-651 (2000)). Уменьшению количества амилоидных бляшек сопутствовало уменьшение уровня воспалительных цитокинов, интерлейкина-6 (IL-6) и колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF), а также сниженная активация NF- κ B у обработанных животных;

с) У трансгенных по RAGE мышей (сверхэкспрессирующие RAGE и экспрессирующие доминантную негативную форму RAGE) наблюдали образование бляшек и нарушение когнитивных функций в мышинной модели AD (Arancio et al., *EMBOJ.*, 23: 4096-4105 (2004));

д) Лечение диабетических крыс с применением sRAGE уменьшало проницаемость сосудов (Bonnardel-Phu et al., *Diabetes*, 48: 2052-2058 (1999));

е) Лечение с применением sRAGE уменьшало атеросклеротические повреждения у диабетических мышей с нуль-мутацией по аполипопротеину E и предотвращало функциональные и морфологические показатели диабетической нефропатии у мышей db/db (Hudson et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 419: 80-88 (2003)); и

ф) sRAGE ослаблял тяжесть воспаления в мышинной модели индуцированного коллагеном артрита (Hofmann et al., *Genes Immunol.*, 3: 123-135 (2002)), мышинной модели экспериментального аллергического энцефаломиелита (Yan et al., *Nat. Med.* 9: 28-293 (2003)) и мышинной модели воспалительного заболевания кишечника (Hofmann et al., *Cell*, 97: 889-901 (1999)).

Таким образом, в одном варианте слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению можно

применять для лечения симптома диабета и/или осложнений в результате диабета, опосредованного RAGE. В альтернативных вариантах симптом диабета или поздние осложнения диабета могут включать диабетическую нефропатию, диабетическую ретинопатию, диабетические язвы стопы, сердечно-сосудистые осложнения диабета или диабетическую нейропатию.

Исходно идентифицированный в качестве рецептора для молекул, экспрессия которых связана с патологией диабета, RAGE сам по себе имеет существенной значения для патофизиологии диабетических осложнений. Показано, что ингибирование *in vivo* взаимодействия с RAGE с его лигандом(ами) оказывает терапевтическое влияние во многих моделях диабетических осложнений и воспаления (Hudson et al., Arch. Biochem. Biophys., 419: 80-88 (2003)). Например, двухмесячное лечение анти-RAGE-антителами нормализовало функцию почек и уменьшало аномальную гистопатологию почек у диабетических мышей (Flyvbjerg et al., Diabetes 53: 166-172 (2004)). Кроме того, лечение растворимой формой RAGE (sRAGE), которая связывается с лигандами RAGE и ингибирует взаимодействия RAGE/лиганд, уменьшало атеросклеротические повреждения у диабетических мышей с нуль-мутацией по аполипопротеину E и уменьшало функциональную и морфологическую патологию при диабетической нефропатии у мышей db/db (Bucciarelli et al., Circulation 106: 2827-2835 (2002)).

Также показано, что неферментативное гликоокисление макромолекул, в конце концов приводящее к образованию конечных продуктов глубокого гликозилирования (AGE), усиливается в местах воспаления при почечной недостаточности, при наличии гипергликемии и других состояний, связанных с системным или местным окислительным стрессом (Dyer et al., J. Clin. Invest, 91: 2463-2469 (1993); Reddy et al., Biochem., 34: 10872-10878 (1995); Dyer et al., J. Biol. Chem., 266: 11654-11660 (1991); Degenhardt et al., Cell Mol. Biol., 44: 1139-1145 (1998)). Накопление AGE в сосудистой сети может происходить в виде очагов, как в случае амилоида в суставах, состоящего из AGE- β_2 -микроглобулина, встречающегося у пациентов с амилоидозом, связанным с диализом (Miyata et al., J. Clin. Invest., 92: 1243-1252 (1993); Miyata et al., J. Clin. Invest., 98: 1088-1094 (1996)), или повсеместно, как, например, в сосудистой сети и тканях пациентов с диабетом (Schmidt et al., Nature Med., 1: 1002-1004 (1995)). Прогрессирующее накопление AGE с течением времени у пациентов с диабетом свидетельствует, что эндогенный механизм клиренса не способен эффективно функционировать в местах отложения AGE. Такие накапливаемые AGE обладают способностью изменять свойства клеток разными механизмами. Хотя RAGE экспрессируется на низких уровнях в нормальных тканях и сосудистой сети, показано, что в среде, где накапливаются лиганды рецептора, имеет место повышающая регуляция RAGE (Li et al., J. Biol. Chem., 272: 16498-16506 (1997); Li et al., J. Biol. Chem., 273: 30870-30878 (1998); Tanaka et al., J. Biol. Chem., 275: 25781-25790 (2000)). Экспрессия RAGE возрастает в эндотелии, гладкомышечных клетках и инфильтрующих мононуклеарных фагоцитах в сосудистой сети при диабете. Также, исследования на культуре клеток показали, что взаимодействие AGE-RAGE вызывает изменения клеточных свойств, важных для гомеостаза в сосудистой сети.

Применение слитых белков RAGE для лечения связанной с диабетом патологии показано на фиг. 13. Слитый белок RAGE TTP-4000 оценивали в модели рестеноза у крыс при диабете, при этом измеряли пролиферацию гладкомышечных клеток и увеличение интимы после повреждения сосудов. Как показано на фиг. 13, обработка TTP-4000 может значимо уменьшить соотношение интима/средняя оболочка стенки кровеносных сосудов (I/M) (фиг. 13A; табл. 1) при связанном с диабетом рестенозе зависимым от дозы образом. Также обработка TTP-4000 может значимо уменьшать связанную с рестенозом пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов зависимым от дозы образом.

Таблица 1. Эффект TTP-4000 в модели рестеноза у крыс

	IgG (n=9)	TTP-4000 (n=9) Низкая доза ** (0,3 мг/животное через день ×4)	TTP-4000 (n=9) Высокая доза** (1,0 мг/животное через день ×4)
Площадь просвета (мм ²)	0,2±0,03	0,18±0,04	0,16±0,02
Площадь средней оболочки (мм ²)	0,12±0,01	0,11±0,02	0,11±0,01
Отношение I/M	1,71±0,27	1,61±0,26	1,44*±0,15

*P<0,05; **как в случае высокой, так и в случае низкой дозы использовали ударную дозу 3 мг/животное.

В других вариантах слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению также могут быть использованы для лечения или отмены амилоидоза и болезни Альцгеймера. RAGE является рецептором для амилоида бета (A β), а также других амилоидогенных белков, включая SAA и амилин (Yan et al., Nature, 382:685-691 (1996); Yan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94: 5296-5301 (1997); Yan et al., Nat. Med., 6: 643-651 (2000); Sousa et al., Lab Invest., 80: 1101-1110 (2000)). Также лиганды RAGE, включая белки

AGE, S100b и A β , обнаружены в ткани, окружающей старческие бляшки у мужчин (Luth et al., *Cereb. Cortex* 15: 211-220 (2005); Petzold et al., *Neurosci. Lett.*, 336: 167-170 (2003); Sasaki et al., *Brain Res.*, 12: 256-262 (2001); Yan et al., *Restor. Neurol. Neurosci.*, 12: 167-173 (1998)). Показано, что RAGE связывает вещество β -слоя фибрилл, независимо от состава субъединиц (пептид амилоида- β , амилин, сывороточный амилоид A, полученный из приона пептид) (Yan et al., *Nature*, 382: 685-691 (1996); Yan et al., *Nat. Med.*, 6: 643-651 (2000)). Кроме того, показано, что отложение амилоида приводит к усиленной экспрессии RAGE. Например, в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера (AD) экспрессия RAGE возрастает в нейронах и глии (Yan, et al., *Nature* 382: 685-691 (1996)). Одновременно с экспрессией RAGE-лигандов RAGE подвергается повышающей регуляции в астроцитах и микроглиальных клетках в гиппокампе пациентов с AD, но не подвергается повышающей регуляции у людей, которые не имеют AD (Lue et al., *Exp. Neurol.*, 171: 29-45 (2001)). Полученные данные свидетельствуют, что клетки, экспрессирующие RAGE, активируются посредством взаимодействий RAGE/лиганд RAGE вблизи старческой бляшки. Также *in vitro* опосредованная A β активация микроглиальных клеток может быть блокирована антителами, направленными против связывающего лиганд домена RAGE (Yan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94: 5296-5301 (1997)). Также показано, что RAGE может служить в качестве фокальной точки для сборки фибрилл (Deane et al., *Nat. Med.* 9:907-913 (2003)).

Также ингибирование *in vivo* взаимодействий RAGE/лиганд с использованием либо sRAGE, либо анти-RAGE-антитела может уменьшать образование амилоидных бляшек в мышинной модели системного амилоидоза (Yan et al., *Nat. Med.*, 6: 643-651 (2000)). У дважды трансгенных мышей, которые сверхэкспрессируют RAGE человека и белок-предшественник амилоида человека (APP), с мутациями Swedish и London (мутант hAPP), в нейронах развиваются нарушения, связанные с обучением, и нейрпатологические аномалии раньше, чем у их трансгенных аналогов с одной мутацией pAPP. Напротив, у дважды трансгенных мышей со сниженной способностью передачи сигнала A β вследствие нейронов, экспрессирующих доминантную негативную форму RAGE на таком же мутантном фоне hAPP, наблюдается отсроченное появление нейрпатологических аномалий и нарушений обучения по сравнению с их трансгенными аналогами с одной мутацией APP (Arancio et al., *EMBO J.*, 23: 4096-4105 (2004)).

Кроме того, показано, что ингибирование взаимодействия RAGE-амилоид снижает экспрессию клеточного RAGE и маркеров клеточного стресса (а также активацию NF- κ B) и уменьшает отложение амилоида (Yan et al., *Nat. Med.*, 6: 643-651 (2000)), что свидетельствует о роли взаимодействия RAGE-амилоид в нарушении свойств клеток в окружении, обогащенном амилоидом (даже на ранних стадиях), а также в накоплении амилоида.

Таким образом, слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению также можно применять для лечения, позволяющего снизить амилоидоз и уменьшить образование амилоидных бляшек и нарушение когнитивной функции, связанные с болезнью Альцгеймера (AD). Как описано выше, показано, что sRAGE уменьшает как образование амилоидных бляшек ТВ в головном мозге, так и последующее увеличение уровня маркеров воспаления в животной модели AD. На фиг. 14А и 14В показано, что мыши, которые имеют AD и которых лечат в течение 3 месяцев либо TTP-4000, либо мышиным sRAGE, имеют меньше бляшек амилоида-бета (A β) и меньшее нарушение когнитивной функции, чем животные, которые получали наполнитель или IgG человека в качестве негативного контроля (IgG1). Подобно sRAGE, TTP-4000 также может снижать уровень воспалительных цитокинов IL-1 и TNF- α (данные не показаны), связанных с AD.

Также слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению можно применять для лечения атеросклероза и других сердечно-сосудистых расстройств. Таким образом, показано, что ишемическая болезнь сердца особенно часто встречается у пациентов с диабетом (Robertson, et al., *Lab. Invest.*, 18: 538-551 (1968); Kannel et al., *J. Am. Med. Assoc.*, 241: 2035-2038 (1979); Kannel et al., *Diab. Care*, 2: 120-126 (1979)). Кроме того, исследования показали, что атеросклероз у пациентов с диабетом ускорен и более обширен, чем у пациентов, не страдающих диабетом (см., например, Waller et al., *Am. J. Med.*, 69:498-506 (1980); Crall et al., *Am. J. Med.* 64:221-230 (1978); Hamby et al. *Chest*, 2:251-257 (1976); и Pyorala et al., *Diab. Metab. Rev.*, 3:463-524 (1978)). Хотя причин ускоренного атеросклероза в условиях диабета много, показано, что уменьшение AGE может снижать образование бляшек.

Например, слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению также можно применять для лечения инсульта. Когда TTP-4000 сравнивали с sRAGE в соответствующей животной модели инсульта, обнаружено, что TTP-4000 дает значительно большее снижение объема инфаркта. В такой модели среднюю мозговую артерию мыши перевязывают и затем подвергают реперфузии, чтобы вызвать инфаркт. Чтобы оценить эффективность слитых белков RAGE при лечении или профилактике инсульта мышей обрабатывали sRAGE или TTP-4000 или контрольным иммуноглобулином непосредственно перед реперфузией. Как можно видеть в таблице 2, TTP-4000 был более эффективным, чем sRAGE в ограничении площади инфаркта у таких животных, что свидетельствует о том, что TTP-4000 вследствие более длительного времени полужизни в плазме способен обеспечивать лучшую защиту, чем sRAGE.

Таблица 2. Уменьшение инфаркта при инсульте

	% уменьшения инфаркта**
sRAGE	15%*
ТТР-4000 (300 мкг)	38%*
ТТР-4000 (300 мкг)	21%*
ТТР-4000 (300 мкг)	10%*
Контроль изотипа IgG (300 мкг)	4%

* значимо, $p < 0,001$; ** по сравнению с физиологическим раствором.

В другом варианте слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению можно применять для лечения злокачественной опухоли. В одном варианте злокачественная опухоль, которую лечат с использованием слитых белков RAGE согласно настоящему изобретению, содержит злокачественные клетки, которые экспрессируют RAGE. Например, злокачественные опухоли, которые можно лечить слитым белком RAGE согласно настоящему изобретению, включают некоторые злокачественные опухоли легких, некоторые глиомы, некоторые папилломы и тому подобное. Амфотерин является негистоновым связывающим хромосомную ДНК белком группы с высокой подвижностью I (Rauvala et al., J. Biol. Chem., 262: 16625-16635 (1987); Parkikinen et al., J. Biol. Chem. 268: 19726-19738 (1993)), который, как показано, взаимодействует с RAGE. Показано, что амфотерин стимулирует рост нейритов, а также служит в качестве поверхности для сборки протеазных комплексов в фибринолитической системе (также известно, что он вносит вклад в подвижность клеток). Кроме того, наблюдали локальный ингибирующий рост опухоли эффект блокирования RAGE в модели первичной опухоли (глиома C6), модели метастазов легкого Льюис (Taguchi et al., Nature 405: 354-360 (2000)) и спонтанно возникающих папилломах у мышей, экспрессирующих трансген v-Ha-ras (Leder et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 9178-9182 (1990)).

В еще одном варианте слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению можно применять для лечения воспаления. В альтернативных вариантах слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению можно применять для лечения воспаления, связанного с воспалительным заболеванием кишечника, воспаления, связанного с ревматоидным артритом, воспаления, связанного с псориазом, воспаления, связанного с рассеянным склерозом, воспаления, связанного с гипоксией, воспаления, связанного с инсультом, воспаления, связанного с сердечным приступом, воспаления, связанного с геморрагическим шоком, воспаления, связанного с сепсисом, воспаления, связанного с трансплантацией органов, воспаления, связанного с нарушенным заживлением ран, или воспаления, связанного с отторжением собственных (например, аутоиммунное) или не собственных (например, трансплантированных) клеток, тканей или органов.

Например, после тромболитического лечения воспалительные клетки, такие как гранулоциты, инфильтруют ишемическую ткань и продуцируют радикалы кислорода, которые могут разрушать больше клеток, чем погибает при гипоксии. Показано, что ингибирование рецептора на нейтрофилах, ответственного за способность нейтрофилов к инфильтрации ткани, антителами или другими белковыми антагонистами ослабляет ответ. Так как RAGE является лигандом для указанного рецептора нейтрофилов, то слитый белок RAGE, содержащий фрагмент RAGE, может действовать в качестве ловушки и предотвращать перемещение нейтрофилов к месту реперфузии и, следовательно, предотвращать дальнейшее разрушение ткани. Роль RAGE в предотвращении воспаления можно продемонстрировать благодаря исследованиям, показывающим, что sRAGE увеличивал неинтиму в модели рестеноза у крыс после повреждения артерий как у диабетических, так и у здоровых крыс, по-видимому, в результате ингибирования пролиферации эндотелиальных, гладкомышечных клеток и активации макрофагов под действием RAGE (Zhou et al, Circulation, 107:2238-2243 (2003)). Кроме того, sRAGE ингибировал модели воспаления, включая гиперчувствительность замедленного типа, экспериментальный аутоиммунный энцефалит и воспалительное заболевание кишечника (Hofman et al., Cell, 97: 889-901 (1999)).

В одном варианте слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению можно применять для лечения расстройств, основанных на аутоиммунных реакциях. Например, в одном варианте слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению можно применять для лечения почечной недостаточности. Таким образом, слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению можно применять для лечения системного волчаночного нефрита или воспалительного волчаночного нефрита. Например, показано, что S100/калгранулины содержат семейство близко родственных связывающих кальций полипептидов, характеризующихся двумя областями со структурой EF-руки, связанными соединительным пептидом (Schafer et al., TIBS, 21: 134-140 (1996); Zimmer et al., Brain Res. Bull, 37: 417-429 (1995); Rammes et al., J. Biol. Chem., 272: 9496-9502 (1997); Lugering et al., Eur. J. Clin. Invest., 25: 659-664 (1995)). Хотя в них отсутствуют сигнальные пептиды, давно известно, что S100/калгранулины получают доступ во внеклеточное пространство, особенно в местах хронических иммунных/воспалительных ответов, например при кистозном фиброзе и ревматоидном артрите. RAGE является рецептором для многих представителей семей-

ства S100/калгранулинов, опосредуя их провоспалительное действие на такие клетки, как лимфоциты и мононуклеарные фагоциты. Также исследования в моделях реакции гиперчувствительности замедленного типа, колита у мышей нуль-мутантов по IL-10, индуцированного коллагеном артрита и экспериментального аутоиммунного энцефалита свидетельствуют, что взаимодействие RAGE-лиганд (вероятно с S100/калгранулинами) играет непосредственную роль в воспалительном каскаде.

Диабет типа I является аутоиммунным расстройством, которое можно предотвратить или ослабить посредством лечения слитыми белками RAGE согласно настоящему изобретению. Например, показано, что sRAGE может обеспечивать возможность переноса спленоцитов от не страдающих ожирением диабетических мышей (NOD) мышам NOD с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (мыши NOD-scid). У мышей NOD-scid диабет спонтанно не проявляется, а требуется присутствие иммунных клеток, способных разрушать островковые клетки, так, что после этого индуцируется диабет. Обнаружено, что у реципиентов NOD-scid, которых обрабатывали sRAGE, наблюдается уменьшение появления диабета, индуцированного спленоцитами, перенесенными от диабетической мыши (NOD), по сравнению с реципиентами NOD-scid, которых не обрабатывали sRAGE (публикация патента США 2002/0122799). Как утверждают авторы указанного изобретения, экспериментально полученные результаты с использованием sRAGE в такой модели имеют отношение к заболеванию человека, такому как клиническая ситуация, при которой может иметь место будущая иммунотерапия и трансплантация островков.

Таким образом, в одном варианте слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению можно применять для лечения воспаления, связанного с трансплантацией по меньшей мере одного органа, ткани или множества клеток из первого участка во второй. Первый и второй участки могут быть в разных организмах или в одном и том же организме. В альтернативных вариантах, трансплантированные клетки, ткань или орган содержат клетки поджелудочной железы, кожи, печени, почки, сердца, легкого, костного мозга, крови, костей, мышц, эндотелиальные клетки, клетки артерии, вены, хряща, щитовидной железы, нервной системы или стволовые клетки. Например, введение слитых белков RAGE согласно настоящему изобретению можно применять для облегчения трансплантации от одного субъекта, не имеющего диабета, другому субъекту, имеющему диабет.

В другом варианте настоящее изобретение относится к способу лечения остеопороза благодаря введению пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка RAGE согласно настоящему изобретению. (Zhou et al., J. Exp. Med., 203: 1067-1080 (2006)). В одном варианте способ лечения остеопороза дополнительно может включать в себя стадию повышения плотности костей у пациента или снижения скорости уменьшения плотности костей у пациента.

Таким образом, в различных выбираемых вариантах настоящее изобретение может относиться к способу ингибирования взаимодействия AGE с RAGE у субъекта посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества слитого белка RAGE согласно настоящему изобретению. Субъектом, которого лечат с применением слитых белков RAGE согласно настоящему изобретению, может быть животное. В одном варианте субъектом является человек. Субъект может страдать от связанного с AGE заболевания, такого как диабет, осложнений диабета, таких как нефропатия, невропатия, ретинопатия, язвы стопы, амилоидоз или почечная недостаточность и воспаления. Или субъектом может быть человек с болезнью Альцгеймера. В альтернативном варианте субъектом может быть человек со злокачественной опухолью. В еще одном варианте субъект может страдать от системной красной волчанки или воспалительного волчаночного нефрита. Другие заболевания могут быть опосредованы RAGE и, следовательно, их можно лечить, используя слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению. Таким образом, в дополнительных альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения, слитые белки RAGE можно применять для лечения болезни Крона, артрита, васкулита, нефропатий, ретинопатий и невропатий у человека или животного. В других вариантах воспаление, в которое вовлечены аутоиммунные реакции (например, отторжение собственных клеток) и неаутоиммунные реакции (например, отторжение чужеродных клеток), может быть опосредовано RAGE и, следовательно, его можно лечить с использованием слитых белков RAGE согласно настоящему изобретению.

Терапевтически эффективное количество может содержать количество, которое способно предотвращать взаимодействие RAGE с AGE или другими типами эндогенных лигандов RAGE у субъекта. Соответственно, количество будет варьировать в зависимости от того, какого субъекта подвергают лечению. Введение соединения может быть ежечасным, ежедневным, еженедельным, ежемесячным, ежегодным или в виде единичного события. В различных альтернативных вариантах эффективное количество слитого белка RAGE может быть в диапазоне примерно от 1 нг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела, или примерно от 10 мкг/кг массы тела до примерно 50 мг/кг массы тела, или примерно от 100 мкг/кг массы тела до примерно 20 мг/кг массы тела. Реальное эффективное количество может быть установлено в анализе зависимости доза/ответ с использованием способов, стандартных в данной области (Johnson et al., Diabetes. 42: 1179, (1993)). Таким образом, как известно специалистам в данной области, эффективное количество может зависеть от биодоступности, биологической активности и биологического распада соединения.

Композиции

Настоящее изобретение может включать в себя композицию, содержащую слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению, смешанный с фармацевтически приемлемым носителем. Слитый белок RAGE может содержать полипептид RAGE, связанный со вторым полипептидом, отличным от полипептида RAGE. В одном варианте слитый белок RAGE может содержать участок связывания лиганда RAGE. В одном варианте участок связывания лиганда включает в себя большую часть N-концевого домена слитого белка RAGE. Участок связывания лиганда RAGE может содержать V-домен RAGE или его часть. В одном варианте участок связывания лиганда RAGE содержит последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 10 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

В другом варианте участок связывания лиганда может содержать аминокислоты 22-51 последовательности SEQ ID NO: 1. В другом варианте участок связывания лиганда может содержать аминокислоты 23-51 последовательности SEQ ID NO: 1. В другом варианте участок связывания лиганда может содержать аминокислоты 31-51 последовательности SEQ ID NO: 1. В другом варианте участок связывания лиганда может содержать аминокислоты 31-116 последовательности SEQ ID NO: 1.

В одном варианте полипептид RAGE может быть связан с полипептидом, содержащим домен иммуноглобулина или часть (например, его фрагмент) домена иммуноглобулина. В одном варианте полипептид, содержащий домен иммуноглобулина, содержит по меньшей мере часть по меньшей мере одного из доменов C₁2 или C₁3 IgG человека.

Белок или полипептид RAGE может содержать полноразмерный RAGE человека (например, SEQ ID NO: 1) или фрагмент RAGE человека. В одном варианте полипептид RAGE не содержит никаких остатков сигнальной последовательности. Сигнальная последовательность RAGE может включать в себя либо остатки 1-22, либо остатки 1-23 полноразмерного RAGE (SEQ ID NO: 1). В альтернативных вариантах полипептид RAGE может содержать последовательность, которая, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична RAGE человека или его фрагменты. Например, в одном варианте полипептид RAGE может содержать RAGE человека или его фрагмент с глицином в качестве первого остатка вместо метионина (см., например, Neeger et al., (1992)). Или RAGE человека может содержать полноразмерный RAGE с удаленной сигнальной последовательностью (например, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3) (фиг. 1A и 1B) или частью такой аминокислотной последовательности.

Слитые белки RAGE согласно настоящему изобретению также могут содержать sRAGE (например, SEQ ID NO: 4), полипептид по меньшей мере на 90% идентичный sRAGE, или фрагмент sRAGE. Например, полипептид RAGE может содержать sRAGE человека или его фрагмент с глицином в качестве первого остатка вместо метионина (см., например, Neeger et al., (1992)). Или RAGE человека может содержать sRAGE с удаленной сигнальной последовательностью (см., например, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6 на фиг. 1C или SEQ ID NO: 45 на фиг. 16A) или частью такой аминокислотной последовательности. В других вариантах белок RAGE может содержать V-домен (см., например, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 на фиг. 1D или SEQ ID NO: 46 на фиг. 16A). Или можно использовать последовательность по меньшей мере на 90% идентичную V-домену или его фрагменту. Или белок RAGE может содержать фрагмент RAGE, содержащий часть V-домена (см., например, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 на фиг. 1D или SEQ ID NO: 47 на фиг. 16A). В одном варианте участок связывания лиганда может содержать последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 10 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%. В еще одном варианте фрагмент RAGE представляет собой синтетический пептид.

Например, полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-116 RAGE человека (SEQ ID NO: 7) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-116 RAGE человека (SEQ ID NO: 8) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-116 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием pE (SEQ ID NO: 46), или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую V-домену RAGE. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 124-221 RAGE человека (SEQ ID NO: 11) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую домену C1 RAGE. В другом варианте полипептид RAGE может содержать аминокислоты 227-317 RAGE человека (SEQ ID NO: 12) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую домену C2 RAGE. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-123 RAGE человека (SEQ ID NO: 13) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-123 RAGE человека (SEQ ID NO: 14) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую V-домену RAGE и расположенному ниже междоменному линкеру. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 24-123 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием pE (SEQ ID NO: 48), или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-226 RAGE человека (SEQ ID NO: 17) или последовательность, идентичную им, по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-226 RAGE человека (SEQ ID NO: 18) или последователь-

ность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую V-домену, домену C1 и междоменному линкеру, связывающему указанные два домена. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 24-226 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием pE (SEQ ID NO: 50), или последовательность, идентичную им на 90%. Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-339 RAGE человека (SEQ ID NO: 5) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или 24-339 RAGE человека (SEQ ID NO: 6) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, соответствующую sRAGE (т.е. кодирующую домены V, C1 и C2 и междоменные линкеры). Или полипептид RAGE может содержать аминокислоты 24-339 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием pE (SEQ ID NO: 45), или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%. Или можно использовать фрагменты каждой из указанных последовательностей.

Слитый белок RAGE может содержать несколько типов пептидов, которые не получены из RAGE или его фрагмента. Второй полипептид слитого белка RAGE может содержать полипептид, полученный из иммуноглобулина. Тяжелая цепь (или ее часть) может быть получена из любого из известных изотипов тяжелых цепей: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ) или IgA (α). Кроме того, тяжелая цепь (или ее часть) может быть получена из любого одного из известных подтипов тяжелой цепи: IgG1 (γ 1), IgG2 (γ 2), IgG3 (γ 3), IgG4 (γ 4), IgA1 (α 1), IgA2 (α 2), или мутаций таких изотипов или подтипов, которые изменяют биологическую активность. Второй полипептид может содержать домены C_H2 и C_H3 IgG1 человека или часть любого одного или обоих указанных доменов. В качестве иллюстративных вариантов полипептид, содержащий домены C_H2 и C_H3 IgG1 человека или их часть, может содержать последовательность SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40. Пептид иммуноглобулина может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 41. Последовательность иммуноглобулина SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40 может кодироваться последовательностями SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53.

Fc-часть цепи иммуноглобулина может быть провоспалительной *in vivo*. Соответственно, в одном варианте слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению содержит междоменный линкер, полученный из RAGE, а не из междоменного шарнирного полипептида, полученного из иммуноглобулина.

Соответственно, в одном варианте слитый белок RAGE может дополнительно содержать полипептид RAGE, непосредственно связанный с полипептидом, содержащим домен C_H2 иммуноглобулина или его фрагмент. В одном варианте домен C_H2 или его фрагмент содержит последовательность SEQ ID NO: 42. В одном варианте фрагмент последовательности SEQ ID NO: 42 содержит последовательность SEQ ID NO: 42 с удаленными первыми десятью аминокислотами.

В одном варианте полипептид RAGE содержит междоменный линкер RAGE, связанный с иммуноглобулиновым доменом RAGE, так, что C-концевая аминокислота иммуноглобулинового домена RAGE связана с N-концевой аминокислотой междоменного линкера, а C-концевая аминокислота междоменного линкера RAGE непосредственно связана с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего домен C_H2 иммуноглобулина или его фрагмент. Полипептид, содержащий домен C_H2 иммуноглобулина или его часть, может содержать домены C_H2 и C_H3 IgG1 человека или часть обоих или любого одного из указанных доменов. В качестве иллюстративного варианта полипептид, содержащий домены C_H2 и C_H3 IgG1 человека или их часть, может содержать последовательность SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40.

Слитый белок RAGE согласно настоящему изобретению может содержать один или несколько доменов из RAGE. Также полипептид RAGE, содержащий междоменный линкер, связанный с иммуноглобулиновым доменом RAGE, может содержать фрагмент полноразмерного белка RAGE. Например, в одном варианте слитый белок RAGE может содержать два иммуноглобулиновых домена, полученных из белка RAGE, и два иммуноглобулиновых домена, полученных из полипептида Fc человека. Слитый белок RAGE может содержать первый иммуноглобулиновый домен RAGE и первый междоменный линкер, связанные со вторым иммуноглобулиновым доменом RAGE и вторым междоменным линкером RAGE, так, что N-концевая аминокислота первого междоменного линкера связана с C-концевой аминокислотой первого иммуноглобулинового домена RAGE, N-концевая аминокислота второго иммуноглобулинового домена RAGE связана с C-концевой аминокислотой первого междоменного линкера, N-концевая аминокислота второго междоменного линкера связана с C-концевой аминокислотой второго иммуноглобулинового домена RAGE, и C-концевая аминокислота второго междоменного линкера RAGE непосредственно связана с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего иммуноглобулиновый домен C_H2 или его фрагмент. Например, полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-251 RAGE человека (SEQ ID NO: 19) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-251 RAGE человека (SEQ ID NO: 20) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-251 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием pE, или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90% (SEQ ID NO: 51), соответствующую V-домену, домену C1, междоменному линкеру, связывающему указанные два домена, и второму междоменному линкеру, расположенному ниже C1. В одном варианте конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность SEQ ID NO: 30 или ее фрагмент, может кодировать состоящий из четырех доменов слитый белок RAGE. В другом варианте конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последователь-

ность SEQ ID NO: 54, может кодировать состоящий из четырех доменов слитый белок RAGE, в который введены молчащие изменения оснований в кодонах, которые кодируют пролин (CCG на CCC) и глицин (GGT на GGG) на С-конце последовательности, чтобы удалить криптический сайт сплайсинга РНК вблизи терминального кодона.

Альтернативно, состоящий из трех доменов слитый белок RAGE может содержать один иммуноглобулиновый домен, полученный из RAGE, и два иммуноглобулиновых домена, полученных из полипептида Fc человека. Например, слитый белок RAGE может содержать один иммуноглобулин домен RAGE, связанный посредством междоменного линкера RAGE с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего домен иммуноглобулина C_H2 или его фрагмент. Например, полипептид RAGE может содержать аминокислоты 23-136 RAGE человека (SEQ ID NO: 15) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-136 RAGE человека (SEQ ID NO: 16) или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90%, или аминокислоты 24-136 RAGE человека, где Q24 циклизован с образованием pE, или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90% (SEQ ID NO: 49), соответствующую V-домену RAGE, и расположенному ниже междоменному линкеру. В одном варианте конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность SEQ ID NO: 31 или ее фрагмент, может кодировать состоящий из трех доменов слитый белок RAGE. В другом варианте конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность SEQ ID NO: 55, может кодировать состоящий из трех доменов слитый белок RAGE, в который введены молчащие изменения оснований в кодонах, которые кодируют пролин (CCG на CCC) и глицин (GGT на GGG) на С-конце последовательности, чтобы удалить криптический сайт сплайсинга РНК вблизи терминального кодона.

Фрагмент междоменного линкера RAGE может содержать пептидную последовательность, которая в природе расположена ниже и, следовательно, связана с иммуноглобулиновым доменом RAGE. Например, в случае V-домена RAGE междоменный линкер может содержать аминокислотные последовательности, которые в природе расположены ниже V-домена. В одном варианте линкер может содержать последовательность SEQ ID NO: 21, соответствующую аминокислотам 117-123 полноразмерного RAGE. Или линкер может содержать пептид, имеющий дополнительные части природной последовательности RAGE. Например, можно использовать междоменный линкер, содержащий несколько аминокислот (например, 1-3, 1-5 или 1-10 или 1-15 аминокислот) выше или ниже последовательности SEQ ID NO: 21. Соответственно, в одном варианте междоменный линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 23, содержащую аминокислоты 117-136 полноразмерного RAGE.

Или можно использовать фрагменты последовательности SEQ ID NO: 21 с делецией, например, 1, 2 или 3 аминокислот с любого конца линкера. В альтернативных вариантах линкер может содержать последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична или на 80% идентична, или на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 23.

В случае домена C1 RAGE линкер может содержать пептидную последовательность, которая в природе расположена ниже домена C1. В одном варианте линкер может содержать последовательность SEQ ID NO: 22, соответствующую аминокислотам 222-251 полноразмерного RAGE. Или линкер может содержать пептид, имеющий дополнительные части природной последовательности RAGE. Например, можно использовать линкер, содержащий несколько (1-3, 1-5 или 1-10, или 1-15 аминокислот) аминокислот выше и ниже последовательности SEQ ID NO: 22. Или можно использовать фрагменты SEQ ID NO: 22 с делецией, например, 1-3, 1-5 или 1-10 или 1-15 аминокислот с любого конца линкера. Например, в одном варианте междоменный линкер RAGE может содержать последовательность SEQ DD NO: 24, соответствующую аминокислотам 222-226. Или междоменный линкер может содержать последовательность SEQ ID NO: 44, соответствующую аминокислотам 318-342 RAGE.

Фармацевтически приемлемые носители могут включать любой из стандартных фармацевтически приемлемых носителей, известных в данной области. В одном варианте фармацевтический носитель может представлять собой жидкость, и слитый белок RAGE или конструкция нуклеиновой кислоты могут быть в форме раствора. В другом варианте фармацевтически приемлемый носитель может быть в форме порошка, лиофилизованного порошка или таблетки. Или фармацевтический носитель может представлять собой гель, суппозиторий или крем. В альтернативных вариантах носитель может содержать липосому, микрокапсулу, инкапсулированную в полимер клетку или вирус. Следовательно, термин "фармацевтически приемлемый носитель" охватывает, но не ограничивает указанным, любой из стандартных фармацевтически приемлемых носителей, таких как вода, спирты, раствор фосфатно-солевого буфера, сахара (например, сахарозу или маннит), масла или эмульсии, такие как эмульсии типа масло/вода или эмульсии триглицеридов, различные типы увлажнителей, таблетки, таблетки, покрытые оболочками, и капсулы.

Введение слитых белков RAGE согласно настоящему изобретению можно осуществлять различными путями. Таким образом, введение слитого белка RAGE согласно настоящему изобретению можно осуществлять с помощью внутрибрюшинной (в/б) инъекции. Альтернативно, слитый белок RAGE можно вводить перорально, интраназально или в виде аэрозоля. В другом варианте введение осуществляют внутривенно (в/в). Слитый белок RAGE также можно инъецировать подкожно. В другом варианте введение слитого белка RAGE является внутриапериальным. В другом варианте введение является подъя-

зычным. Также введение можно осуществлять в капсуле для длительного высвобождения. Например, подкожное введение может быть применимо для лечения хронических заболеваний, при которых желательно самостоятельно введение.

Фармацевтические композиции могут иметь форму стерильного инъекционного раствора в нетоксичном парентерально приемлемом растворителе или наполнителе. К приемлемым наполнителям и растворителям, которые можно использовать, относятся вода, раствор Рингера, 3-бутандиол, изотонический раствор хлорида натрия или водные буферы, как например, физиологически приемлемый цитратный, ацетатный, глициновый, гистидиновый, фосфатный, трис- или сукцинатный буферы. Инъекционный раствор может содержать стабилизаторы, чтобы защитить от химического разрушения и образования агрегатов. Стабилизаторы могут включать антиоксиданты, такие как бутилированный гидроксианизол (ВНА) и бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), буферы (цитраты, глицин, гистидин) или поверхностно-активные вещества (полисорбат 80, полксамеры). Раствор также может содержать противомикробные консерванты, такие как бензиловый спирт и парабены. Раствор также может содержать поверхностно-активные вещества для уменьшения агрегации, такие как полисорбат 80, полксамер или другие поверхностно-активные вещества, известные в данной области. Раствор также может содержать другие добавки, такие как сахар (сахара) или раствор соли, для доведения осмотического давления композиции до давления, сходного с давлением крови человека.

Фармацевтические композиции могут иметь форму стерильного лиофилизованного порошка для инъекции после перерастворения в разбавителе. Разбавителем может быть вода для инъекций, бактериостатическая вода для инъекций или стерильный физиологический раствор. Лيوфилизированный порошок может быть получен путем лиофилизации раствора слитого белка с получением белка в сухой форме. Как известно в данной области лиофилизированный белок, как правило, имеет повышенную стабильность и более длительный срок хранения, чем жидкий раствор белка. Лيوфилизированный порошок (спекшаяся масса) может содержать буфер для доведения pH, а также, например, физиологический приемлемый цитратный, ацетатный, глициновый, гистидиновый, фосфатный, трис или сукцинатный буфер. Лيوфилизированный порошок также может содержать протекторы для лиофилизации для сохранения его физической и химической стабильности. Обычно используемыми для лиофилизации протекторами являются невосстанавливающие сахара и дисахариды, такие как сахароза, маннит или трегалоза. Лيوфилизированный порошок может содержать стабилизаторы для защиты от химического разрушения и образования агрегатов. Стабилизаторы могут включать без ограничения антиоксиданты (ВНА, ВНТ), буферы (цитраты, глицин, гистидин) или поверхностно-активные вещества (полисорбат 80, полксамеры). Лيوфилизированный порошок также может содержать противомикробные консерванты, такие как бензиловый спирт и парабены. Лيوфилизированный порошок также может содержать поверхностно-активные вещества для уменьшения агрегации, такие как без ограничения, полисорбат 80 и полксамер. Лيوфилизированный порошок также может содержать добавки (например, сахара или раствор соли) для доведения осмотического давления до давления, сходного с давлением крови человека, при перерастворении порошка. Лيوфилизированный порошок также может содержать наполнители, такие как сахара и дисахариды.

Фармацевтические композиции для инъекции также могут иметь форму масляной суспензии. Такая суспензия может быть приготовлена известными способами с применением подходящих диспергирующих средств, увлажнителей и суспендирующих агентов, описанных выше. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно используют стерильные нелетучие масла. В указанных целях можно использовать любое легкое нелетучее масло и синтетические моно- или диглицериды. Также масляные суспензии могут быть приготовлены путем суспендирования активного ингредиента в растительном масле, например арахисовом масле, оливковом масле, кунжутном масле или кокосовом масле, или в минеральном масле, таком как жидкий парафин. Например, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, применимы для приготовления инъекционных препаратов. Масляные суспензии могут содержать загустители, например пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. В такие композиции могут быть добавлены консерванты, например антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также могут быть в форме эмульсий типа "масло в воде" или водных суспензий. Масляной фазой может быть растительное масло, например, оливковое масло или арахисовое масло, или минеральное масло, например жидкий парафин, или их смесь. Подходящими эмульгаторами могут быть встречающиеся в природе камеди, например аравийская камедь или трагакантовая камедь, встречающиеся в природе фосфатиды, например из соевых бобов, лецитин, и сложные эфиры или неполные эфиры, полученные из жирных кислот и ангидридов гексита, например, моноолеат сорбитана, и продукты конденсации указанных неполных эфиров с этиленоксидом, например полиэтиленсорбитан.

Водные суспензии также могут содержать активные соединения в смеси с эксципиентами. Такие эксципиенты могут включать суспендирующие агенты, например, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь и аравийскую камедь; диспергирующие агенты и увлажнители, такие как встречающийся в природе фосфатид, такой как лецитин, или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например, стеарат полиоксиэтилена, или продукты конденсации этиленоксида с алифатическими спир-

тами с длинной цепью, например гептадекаэтиленоксигетанол, или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами жирных кислот и гексита, такие как моноолеат полиоксиэтиленсорбитана, или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гексита, например, моноолеат полиэтиленсорбитана.

Диспергируемые порошки и гранулы, подходящие для приготовления водной суспензии посредством добавления воды, могут содержать активное соединение в смеси с диспергирующим агентом, суспендирующим агентом и одним или несколькими консервантами. Подходящие консерванты, диспергирующие агенты и суспендирующие агенты описаны выше.

Композиции также могут быть в форме суппозитория для ректального введения соединений согласно изобретению. Такие композиции могут быть приготовлены смешиванием лекарственного средства с подходящим нераздражающим эксципиентом, который является твердым при обычных температурах, но жидким при ректальной температуре и, следовательно, будет плавиться в прямой кишке, высвобождая лекарственное средство. К таким веществам относятся, например, масло какао и полиэтиленгликоли.

Для местного применения можно использовать кремы, мази, желе, растворы или суспензии, содержащие соединения согласно изобретению. Местные применения также включают растворы для промывания ротовой полости и полоскания. Можно использовать подходящие консерванты, антиоксиданты, такие как ВНА и ВНТ, диспергирующие агенты, поверхностно-активные вещества или буферы.

Соединения согласно настоящему изобретению также могут быть введены в форме липосомной системы доставки, такой как мелкие однослойные везикулы, крупные однослойные везикулы и многослойные везикулы. Липосомы могут быть образованы из различных фосфолипидов, таких как холестерин, стеариламин или фосфатидилхолины.

В некоторых вариантах соединения согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы, чтобы дополнительно замедлить выведение из кровообращения метаболическими ферментами. В одном варианте соединения могут быть модифицированы ковалентным связыванием водорастворимых полимеров, таких как полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры ПЭГ и полипропиленгликоля, поливинилпирролидон или полипролин, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт и тому подобное. Такие модификации также могут увеличивать растворимость соединения в водном растворе. Полимеры, такие как ПЭГ, могут быть ковалентно связаны с одним или несколькими химически активными аминокислотными остатками, сульфгидрильными остатками или карбоксильными остатками. Описаны многочисленные активированные формы ПЭГ, включая активные сложные эфиры карбоновой кислоты или карбонатных производных, особенно такие, в которых удаляемыми группами являются N-гидроксисукцинимид, п-нитрофенол, имидазол или 1-гидрокси-2-нитробензол-3-сульфон для взаимодействия с аминокислотными группами, многомодалные или галогенацетильные производные для взаимодействия с сульфгидрильными группами, и производные аминогидразина или гидразида для взаимодействия с углеводными группами.

Дополнительные способы получения препаратов белков, которые можно использовать в случае слитых белков согласно настоящему изобретению, описаны в патентах США №№ 6267958 и 5567677.

В следующем аспекте настоящего изобретения слитые белки RAGE согласно изобретению можно во вспомогательной терапии или комбинированной терапии с другими известными терапевтическими средствами. Ниже приведен неполный список адъювантов и дополнительных терапевтических средств, которые можно использовать в сочетании с модуляторами на основе слитых белков RAGE согласно настоящему изобретению:

Фармакологическая классификация противоопухолевых средств:

1. Алкилирующие агенты: циклофосфамид, нитрозомочевина, карбоплатин, цисплатин, прокарбазин.
2. Антибиотики: блеомицин, даунорубин, доксорубин.
3. Антиметаболиты: метотрексат, citarabin, фторурацил, азатиоприн, 6-меркаптопурин и цитотоксические противоопухолевые химиотерапевтические средства.
4. Растительные алкалоиды: винбластин, винкристин, этопозид, паклитаксел.
5. Гормоны: тамоксифен, ацетат октреотида, финастерид, флутамид.
6. Модификаторы биологических реакций: интерфероны, интерлейкины.

Фармакологическая классификация средств для лечения ревматоидного артрита:

1. Анальгетики: аспирин.
 2. НПВС (нестероидные противовоспалительные лекарственные средства): ибупрофен, напроксен, диклофенак.
 3. DMARD (антивоспалительные средства, модифицирующие течение заболевания): метотрексат, препараты золота, гидроксихлорохин, сульфасалазин.
 4. Модификаторы биологических реакций, DMARD: этанерцепт, инфликсимаб, глюкокортикоиды, такие как беклометазон, метилпреднизолон, бетаметазон, преднизон, дексаметазон и гидрокортизон.
- Фармакологическая классификация средств для лечения сахарного диабета:
1. Сульфонилмочевины: толбутамид, толазамид, глибурид, глипизид.
 2. Бигуаниды: метформин.

3. Разнообразные пероральные средства: акарбоза, троглитазон.

4. Инсулин.

Фармакологическая классификация средств для лечения болезни Альцгеймера:

1. Ингибитор холинэстеразы: такрин, донепезил.

2. Антипсихотические средства: галоперидол, тиоридазин.

3. Антидепрессанты: дезипрамин, флуоксетин, тразодон, пароксетин.

4. Противосудорожные средства: карбамазепин, вальпроевая кислота.

В одном варианте композиции согласно настоящему изобретению могут содержать терапевтически эффективное количество слитого белка RAGE в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. Кроме описанных ранее средств можно использовать следующие терапевтические средства в комбинации со слитыми белками RAGE согласно настоящему изобретению: иммуносупрессоры, такие как циклоспорин, такролимус, рапамицин и другие иммуносупрессоры типа FK-506.

Таким образом, в одном варианте настоящее изобретение относится к способу лечения опосредованных RAGE заболеваний, при этом способ включает в себя введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества слитого белка RAGE в комбинации с терапевтическими средствами, выбранными из группы, состоящей из алкилирующих агентов, антиметаболитов, растительных алкалоидов, антибиотиков, гормонов, модификаторов биологических реакций, анальгетиков, НПВС, DMARD, модификаторов биологических реакций (например, глюкокортикоидов), сульфонилмочевин, бигуанидов, инсулина, ингибиторов холинэстеразы, антипсихотических средств, антидепрессантов, противосудорожных средств и иммуносупрессоров, таких как циклоспорин, такролимус, рапамицин и другие иммуносупрессоры типа FK-506. В следующем варианте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции согласно изобретению, которая описана выше, дополнительно содержащей одно или несколько терапевтических средств, выбранных из группы, состоящей из алкилирующих агентов, антиметаболитов, растительных алкалоидов, антибиотиков, гормонов, модификаторов биологических реакций, анальгетиков, НПВС, DMARD, модификаторов биологических реакций (например, глюкокортикоидов), сульфонилмочевин, бигуанидов, инсулина, ингибиторов холинэстеразы, антипсихотических средств, антидепрессантов, противосудорожных средств и иммуносупрессоров, таких как циклоспорин, такролимус, рапамицин и другие иммуносупрессоры типа FK-506.

Примеры

Характерные признаки и преимущества идеи изобретения, охватываемой настоящим изобретением, дополнительно проиллюстрированы в следующих далее примерах.

Пример 1А. Получение слитых белков RAGE.

Конструировали две плазмиды для экспрессии слитых белков RAGE-IgG. Обе плазмиды конструировали лигированием 5'-последовательности кДНК RAGE человека разной длины с такой же 3'-последовательностью ДНК IgG ($\gamma 1$) человека. Затем указанные последовательности экспрессии (т.е. продукты лигирования) встраивали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (Invitrogen, CA). Последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют область кодирования слитого белка RAGE, показаны на фиг. 2 и 3. В случае слитого белка RAGE TTP-4000 последовательность нуклеиновой кислоты от 1 до 753 (выделена жирным шрифтом) кодирует N-концевую последовательность белка RAGE, тогда как последовательность нуклеиновой кислоты от 754 до 1386 кодирует последовательность белка IgG (фиг. 2). В случае TTP-3000 последовательность нуклеиновой кислоты от 1 до 408 (выделена жирным шрифтом) кодирует N-концевую последовательность белка RAGE, тогда как последовательность нуклеиновой кислоты от 409 до 1041 кодирует последовательность белка IgG (фиг. 3).

Чтобы получить слитые белки RAGE экспрессирующие векторы, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты либо SEQ ID NO: 30, либо SEQ ID NO: 31, стабильно трансфицировали в клетки СНО. Позитивные трансформанты отбирали в отношении резистентности к неомицину, придаваемой плазмидой, и клонировали. Высокопродуктивные клоны, которые выявляли Вестерн-блот-анализом надосадка, размножали и генный продукт очищали аффинной хроматографией, используя колонки с белком А. Экспрессию оптимизировали так, чтобы клетки продуцировали рекомбинант TTP-4000 на уровне примерно 1,3 г на литр.

Пример 1В. Получение слитых белков RAGE.

Конструировали плазмиду, экспрессирующую слитые белки RAGE-IgG. Плазмиду конструировали лигированием 5'-последовательности кДНК RAGE человека с 3'-последовательностью кДНК IgG ($\gamma 1$) человека. Для амплификации кДНК использовали ПЦР. Кроме того, на 5'-конце праймер ПЦР добавлял сайт узнавания ферментом рестрикции Eco RI в результате клонирования и консенсусную последовательность инициации трансляции Козака. На 3'-конце праймер ПЦР добавлял сайт рестрикции Xho I сразу после терминального кодона. На 3'-конце праймер ПЦР также включал два молчащих изменения оснований, чтобы удалить криптический сайт сплайсинга РНК в иммуноглобулиновой части вблизи терминального кодона. Кодон, кодирующий пролин (остаток 409 на основании нумерации в последовательности белка в SEQ ID NO: 32) меняли с CCG на CCC, и кодон, кодирующий глицин (остаток 410 на ос-

новании нумерации в последовательности белка в SEQ ID NO: 32) меняли с GGT на GGG. ПЦР-фрагмент расщепляли Eco RI и Xho I и затем встраивали в ретровекторную плазмиду (pCNS-newMCS-WPRE (new ori), доступную из Gala, Inc.), которая была расщеплена Mfe I (с образованием совместимых концов с Eco RI) и расщеплена Xho I. Встроенная часть клонированной плазмиды и места соединений для клонирования секвенировали, чтобы удостовериться, что во время клонирования не возникали мутации.

Чтобы получить слитый белок RAGE-IgG экспрессирующий вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 54, стабильно трансфицировали в клетки CHO.

Последовательность выделенного слитого белка RAGE TTP-4000, экспрессированного трансфицированными клетками, подтверждали различными проводимыми для получения характеристик исследованиями, либо как последовательность SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 56, либо как обе последовательности SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 56. Таким образом, сигнальная последовательность, кодируемая первыми 23 аминокислотами последовательности SEQ ID NO: 32 была отщеплена, и N-концевым остатком был глутамин (Q) или пироглутаминовая кислота (pE) или их смесь. Проводимые для получения характеристик исследования также выявили сайты гликозилирования в положении N2 и N288 (на основании нумерации последовательности SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 56) и показали, что в области C₁3 слитого белка RAGE может быть отщеплен иметь C-концевой остаток посредством посттрансляционной модификации при экспрессии в указанной рекомбинантной системе.

Пример 2. Способ тестирования активности слитого белка RAGE-IgG1

A. Связывание лиганда *in vitro*.

Известными лигандами RAGE покрывали поверхность планшетов Maxisorb в концентрации 5 мкг на лунку. Планшеты инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации с лигандом жидкость из планшетов аспирировали и в планшеты добавляли блокирующий буфер, 1% БСА в 50 мМ имидазольном буфере (pH 7,2), на 1 ч при комнатной температуре. Затем жидкость из планшетов аспирировали и/или промывали буфером для промывки (20 мМ имидазол, 150 мМ NaCl, 0,05% твин-20, 5 мМ CaCl₂ и 5 мМ MgCl₂, pH 7,2). Готовили раствор TTP-3000 (TT3) в начальной концентрации 1,082 мкг/мл раствор TTP-4000 (TT4) в начальной концентрации 370 мкг/мл. Слитый белок RAGE добавляли в возрастающих разведениях начального образца. Слитый белок RAGE инкубировали с иммобилизованным лигандом при 37°C в течение одного часа, после указанного периода времени планшет промывали и анализировали в отношении связывания слитого белка RAGE. Связывание выявляли при добавлении комплекса для иммунологического анализа, содержащего моноклональное мышиное антитело против IgG1 человека в разведении 1:11000 до конечной концентрации в анализе (FAC) 21 нг/100 мкл, биотинилированное антитело козы против IgG мыши в разведении 1:500 до FAC 500 нг/мкл и связанную с авидином щелочную фосфатазу. Комплекс инкубировали с иммобилизованным слитым белком RAGE в течение одного часа при комнатной температуре, после этого планшет промывали и добавляли субстрат щелочной фосфатазы пара-нитрофенилфосфат (PNPP). Связывание комплекса с иммобилизованным слитым белком RAGE количественно оценивали, измеряя превращение PNPP в пара-нитрофенол (PNP), который измеряли спектрофотометрически при 405 нм.

Как показано на фиг. 7, слитые белки RAGE TTP-4000 (TT4) и TTP-3000 (TT3) специфично взаимодействуют с известными лигандами RAGE амилоидом-бета (А-бета), S100b (S100) и амфотерином (Ampho). В отсутствие лиганда, т.е. при покрывании только БСА (БСА или БСА + промывка) не было увеличения оптической плотности по сравнению с уровнями, которые можно отнести к неспецифичному связыванию комплекса для иммунологического анализа. В случае использования амилоида-бета в качестве меченого лиганда может быть необходима предварительная инкубация амилоида-бета перед анализом. Предварительная инкубация может позволять амилоиду-бета самоагрегировать в форму складчатого листа, так как амилоид-бета предпочтительно может связываться с RAGE в форме складчатого листа.

Дополнительное доказательство специфичного взаимодействия между слитыми белками RAGE TTP-4000 и TTP-3000 и лигандами RAGE проиллюстрировано в исследованиях, показывающих, что лиганд RAGE способен эффективно конкурировать с известным лигандом RAGE за связывание со слитыми белками RAGE. В указанных исследованиях амилоид-бета (А-бета) иммобилизовали на планшете Maxisorb и добавляли слитый белок RAGE, как описано выше. Кроме того, в некоторые лунки добавляли лиганд RAGE одновременно со слитым белком RAGE.

Обнаружено, что лиганд RAGE может блокировать связывание TTP-4000 (TT4) примерно на 25%-30%, когда TTP-4000 присутствует в концентрации 123 мкг/мл (разведение 1:3, фиг. 8). Когда исходный раствор TTP-4000 разбавляли в 10 или 30 раз (1:10 или 1:30), связывание слитого белка RAGE с иммобилизованным лигандом было полностью ингибировано лигандом RAGE. Подобным образом лиганд RAGE блокировал связывание TTP-3000 (TT3) примерно на 50%, когда TTP-3000 присутствовал в концентрации 360 мкг/мл (разведение 1:3, фиг. 9). Когда исходный раствор TTP-3000 разбавляли в 10 раз (1:10), связывание слитого белка RAGE с иммобилизованным лигандом было полностью ингибировано лигандом RAGE. Таким образом, специфичность связывания слитого белка RAGE с лигандом RAGE зависело от дозы. Также, как показано на фиг. 8 и 9, по существу не выявлено связывание в отсутствие слитого белка RAGE, т.е. при использовании только комплекса для иммунологического анализа ("только комплекс").

В. Действие слитых белков RAGE в основанных на клетках анализах.

В предыдущей работе показано, что миелоидные клетки THP-1 могут секретировать TNF- α в ответ на лиганды RAGE. В данном анализе клетки THP-1 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS, используя протокол, предлагаемый ATCC. Клетки индуцировали для секреции TNF- α , стимулируя RAGE с использованием 0,1 мг/мл S100b как в отсутствие, так и в присутствии слитых белков RAGE TTP-3000 (TТ3) или TTP-4000 (TТ4) (10 мкг), sRAGE (10 мкг) и IgG человека (10 мкг) (в качестве негативного контроля). Количество TNF- α , секретированного клетками THP-1, измеряли через 24 ч после добавления белков в культуру клеток с использованием коммерчески доступного набора для ELISA TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN). Результаты, представленные на фиг. 10, показывают, что слитые белки RAGE ингибируют индуцированную S100b/RAGE продукцию TNF- α в указанных клетках. Как показано на фиг. 10, после добавления 10 мкг слитого белка RAGE TTP-3000 или TTP-4000 индукция TNF- α под действием S100b (FAC 0,1 мг/мл) снижалась примерно на 45%-70%, соответственно. Слитый белок TTP-4000 может быть эффективным в блокировании индукции TNF- α под влиянием S100b по меньшей мере в такой же степени, как и sRAGE (фиг. 10). Специфичность ингибирования в отношении последовательностей RAGE TTP-4000 и TTP-3000 показана в эксперименте, в котором к стимулированным S100b клеткам добавляли только IgG. При добавлении IgG и S100b в анализируемую смесь выявлены такие же уровни TNF- α , как и в случае добавления S100b отдельно. Специфичность ингибирования индукции TNF- α белками TTP-4000 и TTP-3000, связанная с последовательностями RAGE слитого белка RAGE, показана в эксперименте, в котором к стимулированным S100b клеткам добавляли только IgG. Можно видеть, что добавление IgG, т.е. IgG человека без последовательности RAGE (IgG человека Sigma, добавляемый по 10 мкг/лунку) и S100b к анализируемой смеси приводило к таким же уровням TNF- α , как в случае добавления только S100b.

Пример 3. Фармакокинетический профиль TTP-4000.

Чтобы определить может ли TTP-4000 иметь лучший фармакокинетический профиль по сравнению с sRAGE человека, крысам и приматам, отличным от человека, вводили внутривенную (в/в) инъекцию TTP-4000 (5 мг/кг) и затем оценивали плазму в отношении присутствия TTP-4000. В указанных экспериментах два нативных самца обезьян получали однократную в/в болюсную дозу TTP-4000 (5 мг/мл/кг) в периферическую вену с последующим вливанием примерно 1,0 миллилитра (мл) физиологического раствора. Образцы крови (примерно 1,0 мл) собирали перед введением дозы (т.е. до инъекции TTP-4000) или во временных точках 0,083, 0,25, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240, 288 и 336 часов после введения дозы в пробирки, содержащие гепарин лития. После сбора пробирки помещали на влажный лед (максимум на 30 мин) до центрифугирования с охлаждением (при 2-8°C) при 1500×g в течение 15 мин. Затем каждый собранный образец плазмы хранили в замороженном виде (-70°C±10°C) вплоть до анализа в отношении полипептида RAGE с использованием ELISA в разных временных точках после инъекции, как описано в примере 6.

Кинетический профиль, показанный на фиг. 11, демонстрирует, что после того, как TTP-4000 насыщал лиганды, как видно по явному быстрому наклону кривой для альфа-фазы у 2 животных, он сохраняет конечное время полужизни, составляющий более 300 ч. Такой период полувыведения значительно превышает период полувыведения sRAGE человека из плазмы (обычно примерно 2 ч) и дает возможность для однократных инъекций в случае острых и полухронических показаний. На фиг. 11 каждая кривая представляет отдельного животного в одних и тех же экспериментальных условиях.

Пример 4. Активация Fc TTP-4000.

Проводили эксперименты для измерения активации Fc-рецептора слитым белком RAGE TTP-4000 по сравнению с IgG человека. Активацию рецептора Fc измеряли посредством количественного определения секреции TNF- α из клеток THP-1, которые экспрессируют рецептор Fc. В указанных экспериментах 96-луночный планшет покрывали 10 мкг/лунку TTP-4000 или IgG человека. Стимуляция Fc приводит к секреции TNF- α . Количество TNF- α измеряли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Соответственно, в таком анализе миелоидную линию клеток THP-1 (ATTC № TIB-202) поддерживали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка согласно инструкциям ATCC. Обычно 40000-80000 клеток на лунку индуцировали для секреции TNF-альфа путем стимуляции рецептора Fc посредством предварительного покрытия лунки 10 мкг/лунку либо агрегированного под действием нагревания (63°C в течение 30 мин) TTP-4000, либо IgG1 человека. Количество TNF-альфа, секретированного клетками THP-1, измеряли в надосадках, собранных из 24-часовых культур клеток в обработанных лунках с использованием коммерчески доступного набора для ELISA TNF (R&D Systems, Minneapolis, MN № DTA00C) согласно инструкциям.

Результаты показаны на фиг. 12, на которой можно видеть, что TTP-4000 вызывает образование менее 2 нг/лунку TNF, и IgG вызывает образование более 40 нг/лунку.

Пример 5. Активность TTP-4000 in vivo.

Активность TTP-4000 сравнивали с sRAGE в нескольких моделях заболевания человека in vivo.

А. TTP-4000 в животной модели рестеноза.

Слитый белок RAGE TTP-4 000 оценивали в модели рестеноза у диабетических крыс, которая за-

ключается в измерении пролиферации гладкомышечных клеток и увеличения интимы через 21 день после повреждения сосудов. В указанных экспериментах с помощью баллона осуществляли повреждение левой общей сонной артерии у диабетических и недиабетических крыс Zucker, используя стандартный способ. Ударную дозу (3 мг/крысу) IgG, TTP-4000 или фосфатно-солевого буфера (PBS) вводили внутривентриально (в/в) за один день до повреждения.

Поддерживающую дозу вводили через день вплоть до 7 дня после повреждения (т.е. в 1, 3, 5 и 7 дни после повреждения). Поддерживающая доза была высокой=1 мг/животное в одной группе или низкой=0,3 мг/животное во второй группе. Чтобы измерить пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов (VSMC) животных умерщвляли на 4 день и 21 день после повреждения.

Для измерения пролиферации клеток на 4 день животные получали внутривентриальную инъекцию бромдезоксипуридина (BrdU) 50 мг/кг за 18, 12 и 2 ч до эвтаназии. После умерщвления собирали полные левые и правые сонные артерии. Образцы хранили в фиксаторе Histochoice в течение по меньшей мере 24 ч до заливки. Оценку пролиферации VSMC осуществляли с использованием мышиного моноклонального антитела против BrdU. Применяли флуоресцентно меченое второе антитело козы против Ig мыши. Количество BrdU-позитивных ядер на срез подсчитывали два исследователя вслепую, не имея информации о схемах обработки.

Остальных крыс умерщвляли на 21 день для морфометрического анализа. Морфометрические анализы исследователь осуществлял вслепую, не имея информации о группах исследования, используя компьютерную программу для цифровой микроскопической планиметрии Image-Pro Plus на серийных срезах (толщиной 5 мкм) сонных артерий, окрашенных по Ван Гизону. Все данные выражали в виде среднего значения $\pm$ SD. Статистический анализ проводили с использованием компьютерной программы SPSS. Непрерывные переменные сравнивали, используя непарные t-критерии. Значение $P < 0,05$ считали статистически значимым.

Как показано на фиг. 13А и 13В, обработка TTP-4000 значительно уменьшала отношение интима/средняя оболочка стенки кровеносных сосудов и пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов зависимым от дозы образом. На фиг. 13В на у-оси представлено количество BrdU-пролиферирующих клеток.

В. TTP-4000 в модели AD на животных.

Проводили эксперименты для оценки того, может ли TTP-4000 влиять на образование амилоида и нарушение когнитивной функции в мышинной модели AD. В экспериментах использовали трансгенных мышей, экспрессирующих белок-предшественник амилоида человека с мутацией Swedish (APP) под контролем промотора цепи PDGF-В. С течением времени у таких мышей образуются высокие уровни лиганда RAGE, амилоида-бета ($A\beta$). Ранее показано, что обработка sRAGE в течение 3 месяцев уменьшает образование амилоидных бляшек в головном мозге, а также связанное увеличение уровня маркеров воспаления в такой модели.

Мышей APP (самцов), используемых в данном эксперименте, создавали микроинъекцией гена APP человека (с мутациями Swedish и London) в яйцеклетки мышей под контролем промотора гена цепи полученного из тромбоцитов фактора роста В (PDGF-В). Мышей получали на фоне C57BL/6 в Molecular Therapeutics Inc. Животных кормили ad libitum и поддерживали благодаря скрещиванию между сибсами. У мышей, полученных в результате такого конструирования, развивались амилоидные отложения, начиная с 6-месячного возраста. Животные достигали 6-месячного возраста и затем их содержали в течение 90 дней и умерщвляли для количественной оценки амилоида.

Трансгенным мышам APP вводили наполнитель или TTP-4000 через день [через день (в/в)] в течение 90 дней, начиная с 6-месячного возраста. К концу эксперимента животных умерщвляли и исследовали в отношении нагрузки $A\beta$ -амилоидными бляшками в головном мозге (т.е. в отношении количества бляшек). Контрольную группу 6-месячных мышей APP использовали для определения исходного уровня отложений амилоида. Кроме того, к концу исследования животных подвергали анализу поведения (водный лабиринт Морриса). Для исследования соединений исследовали слепой способ. Образцы вводили мышам в количестве 0,25 мл/мышь/через день. Кроме того, одной группе мышей вводили 200 мкг/сутки sRAGE человека.

1. Отложение амилоида-бета.

Для гистологического исследования животных анестезировали внутривентриальной инъекцией (в/в) пентобарбитала натрия (50 мг/кг). Животным проводили транскардиальную перфузию, используя охлажденный до 4°C фосфатно-солевой буфер (PBS), затем 4% параформальдегид. Головной мозг извлекали и помещали в 4% параформальдегид в течение ночи. Головной мозг обрабатывали парафином и заливали. Получали десять срезов толщиной 30-мкм головного мозга. Срезы подвергали обработке первым антителом в течение ночи при 4°C (антитело против пептида $A\beta$), чтобы выявить отложения амилоида в головном мозге трансгенных животных (Guo et al., J. Neurosci., 22: 5900-5909 (2002)).

Срезы промывали в трис-солевом буфере (TBS) и добавляли второе антитело и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки срезы инкубировали, как указано в инструкции к набору Vector ABC Elite (Vector Laboratories) и красили диаминобензойной кислотой (DAB). Реакции останавливали в воде и покрывали покровными стеклами после обработки ксилолом. Площадь ами-

лоида на каждом срезе определяли, используя компьютерную систему анализа изображения, состоящую из компьютера Power Macintosh, оборудованного картой захвата изображения для быстрого улавливания, камеры Hitachi CCD, соединенной с микроскопом Olympus, и штатива камеры. Использовали компьютерную программу анализа изображения NIH, версию 1.55. Захватывали изображения и определяли общую площадь амилоида на десяти срезах. Все измерения проводил один человек слепым способом. Проводили суммирование размеров амилоида на срезах и деление на общее количество срезов, чтобы рассчитать размер амилоида.

Для количественного анализа использовали твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) для измерения уровней общего Аβ человека, Аβ_{total} и Аβ₁₋₄₂ в головном мозге трансгенных мышей APP (Bio-source International, Camarillo, CA). Аβ_{total} и Аβ₁₋₄₂ экстрагировали из головного мозга мышей, используя гидрохлорид гуанидина, и количественно оценивали, как описано производителем. В таком анализе экстрагировали общий пептид Аβ из головного мозга (как растворимый, так и агрегированный).

2. Когнитивная функция.

Тест в водном лабиринте Морриса осуществляли следующим образом. Всех мышей тестировали в водном лабиринте Морриса в конце эксперимента. Мышей тренировали в водном лабиринте в открытом поле 1,2 м. Бассейн заполняли до глубины 30 см водой и температуру поддерживали при 25°C. Спасательную площадку (10 кв. см) помещали на 1 см ниже поверхности воды. Во время испытаний платформу убирали из бассейна. Поисковый тест осуществляли в бассейне, окруженном белыми шторами, чтобы скрыть любые внешние по отношению к лабиринту ориентиры. Всех животных подвергали непространственным предварительным тренировкам (NSP) в течение трех последовательных дней. Такие испытания проводили для подготовки животных к начальному тестированию поведения, чтобы определить запоминание пути к платформе. Такие испытания не регистрировали, а проводили только в целях тренировки. В случае тренировок и исследований обучения шторы убирали, чтобы открыть внешние по отношению к бассейну ориентиры (это позволяло идентифицировать животных с нарушениями плавания). В 1 день мышей помещали на скрытую платформу на 20 с (испытание 1), для испытаний 2-3 животных отпускали в воду на расстоянии 10 см от платформы с ориентирами или скрытой платформы (испытание 4) и давали возможность плыть к платформе. На второй день испытаний скрытую платформу случайным образом передвигали относительно центра бассейна или центра каждого квадранта. Животных выпускали в бассейн повернутыми к стене случайным образом и давали им 60 секунд, чтобы достичь платформы (3 испытания). В третьем испытании животных подвергали трем испытаниям, двум со скрытой платформой и одному с платформой с ориентирами. Через два дня после NSP животных подвергали конечным испытаниям поведения (тест в водном лабиринте Морриса). Для указанных испытаний (3 на животное) платформу помещали в центре одного квадранта бассейна и животных выпускали повернутыми к стене случайным образом. Животному давали возможность найти платформу или плыть в течение 60 секунд (время ожидания, время, которое затрачивается на поиск платформы). Всех животных тестировали в интервале 4-6 часов после введения дозы, и их случайным образом отбирали для тестирования человеком, который не имел информации о группе тестирования.

Результаты выражали в виде среднего значения ± стандартное отклонение (SD). Значимость различий в отношении амилоида и исследований поведения анализировали, используя t-критерий. Сравнения проводили между контрольной группой 6-месячных мышей APP и группой животных, обработанных TTP-4000, а также, группой 9-месячных животных APP, обработанных носителем и обработанных TTP-4000. Различия ниже 0,05 считали значимыми. Изменения в процентах в уровне амилоида и поведении определяли суммированием данных в каждой группе и делением на данные в группе сравнения (т.е. 1, в/б/6-месячный контроль=% изменения).

На фиг. 14А и 14В показано, что у мышей, обрабатываемых в течение 3 месяцев либо TTP-4000, либо sRAGE мыши было меньше Аβ-бляшек и меньше нарушение когнитивной функции, чем у животных, обрабатываемых наполнителем и негативным контролем IgG1 человека (IgG1). Полученные данные показывают, что TTP-4000 является эффективным в снижении патологии AD в модели на трансгенных мышцах. Также обнаружено, что подобно sRAGE, TTP-4000 может снижать уровни воспалительных цитокинов IL-1 и TNF-α (данные не показаны).

С. Эффективность TTP-4000 в животной модели инсульта.

TTP-4000 также сравнивали с sRAGE в соответствующей животной модели инсульта. В указанной модели среднюю сонную артерию мыши перевязывали в течение 1 ч с последующей реперфузией в течение 23 ч, в указанной точке мышей умерщвляли и оценивали площадь инфаркта в головном мозге. Мышей обрабатывали sRAGE или TTP-4000 или контрольным иммуноглобулином непосредственно перед реперфузией.

В таких экспериментах самцам C57BL/6 инъекцировали наполнитель 250 мкл/мышь или тестируемые препараты TTP (TTP-3000, TTP-4000 по 250 мкл/мышь). Инъекции мышам проводили внутривенно через 1 ч после инициации ишемии. Мышей подвергали одночасовой ишемии головного мозга с последующей 24-часовой реперфузией. Чтобы индуцировать ишемию каждую мышь анестезировали и температуру тела поддерживали при 36-37°C внешним согреванием. Левую общую сонную артерию

(ССА) открывали срединного разреза на шее. Микрохирургический зажим помещали вокруг начала внутренней сонной артерии (ICA). Дистальный конец ЕСА перевязывали шелковой лигатурой и поперечно разрезали. Шелковую лигатуру 6-0 свободно завязывали вокруг культи ЕСА. Оплавленный кончик нейлоновой лигатуры осторожно вводили в культю ЕСА. Петлю шелковой нити 6-0 затягивали вокруг культи и нейлоновую лигатуру продвигали во внутренней сонной артерии (ICA) вплоть до ее остановки в передней мозговой артерии, при этом она закупоривала переднюю соединительную и среднюю мозговую артерии. После нахождения нейлоновой лигатуры на месте в течение 1 ч животного повторно анестезировали, регистрировали ректальную температуру и лигатуру извлекали и закрывали разрез.

Объем инфаркта определяли посредством анестезии животных внутрибрюшинной инъекцией пентобарбитала натрия (50 мг/кг) и затем извлечения головного мозга. Затем делали четыре среза головного мозга толщиной 2 мм, проходящих через область инфаркта, и помещали в 2% хлорид трифенилтетразолия (TTC) на 30 мин. Затем срезы помещали в 4% параформальдегид на ночь. Площадь инфаркта на каждом срезе определяли с помощью компьютеризованной системы анализа изображения, состоящей из компьютера Power Macintosh, оборудованного картой захвата изображения для быстрого улавливания, камеры Hitachi CCD, смонтированной на штативе камеры. Использовали компьютерную программу анализа изображения NIH, версию 1.55. Изображения захватывали и определяли общую площадь инфаркта на срезах. Все измерения проводил один человек, не осведомленный о характере обработки. Суммируя размеры инфаркта на срезах, рассчитывали общий размер инфаркта. Результаты выражали в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD). Значимость различия в размере инфаркта анализировали, используя t-критерий.

Как проиллюстрировано данными, приведенными в таблице 2, TTP-4000 был более эффективным, чем sRAGE в ограничении площади инфаркта у таких животных, что свидетельствует о том, что TTP-4000 вследствие большего времени полужизни в плазме способен лучше осуществлять защиту у таких мышей.

Пример 6. Определение слитого белка RAGE способом ELISA.

Сначала планшеты покрывали 50 мкл специфичного по отношению к RAGE моноклонального антитела 1H1011 в концентрации 10 мкг/мл в 1×PBS pH 7,3 при инкубации в течение ночи. Когда планшеты были готовы к применению, их три раза промывали 300 мкл 1× буфера для промывки на основе имидазола-твина и блокировали 1% БСА. Образцы (разбавленные) и стандартные известные разведения TTP-4000 добавляли в конечном объеме 100 мкл. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа. После инкубации планшеты три раза промывали. Добавляли конъюгат антитела коза против IgG1 человека (Sigma A3312)-AP в 1×PBS с 1% БСА и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшеты три раза промывали. Оценивали окраску паранитрофенилфосфатом.

Пример 7. Количественная оценка связывания лиганда RAGE со слитым белком RAGE.

На фиг. 15 показаны кривые насыщающего связывания TTP-4000 с разными иммобилизованными известными лигандами RAGE. Лиганды иммобилизовали на планшете для микротитрования и инкубировали в присутствии возрастающих концентраций слитого белка RAGE от 0 до 360 нМ. Взаимодействие между слитым белком RAGE и лигандом определяли, используя поликлональное антитело, конъюгированное со щелочной фосфатазой, которая является специфичной по отношению к IgG-части слитой химеры. Относительные K_d рассчитывали, используя компьютерную программу Graphpad Prism, и они совпадали с установленными в литературе значениями для взаимодействия RAGE-лиганд RAGE.

HMC1B=амфотерин, CML=карбоксиметиллизин, A-бета=амилоид-бета 1-40.

Пример 8. Применение слитого белка RAGE для предотвращения отторжения аллогенного трансплантата.

Можно ожидать, что блокада RAGE блокирует отторжение аллогенного трансплантата. В таких экспериментах исследовали, может ли блокада взаимодействий лиганд-RAGE с использованием слитого белка RAGE согласно изобретению ослаблять отторжение островковых клеток, которые были трансплантированы от здорового донора диабетическому животному, которое измеряли по продолжительности периода времени, в течение которого у животных с трансплантацией поддерживался уровень глюкозы в крови ниже целевой концентрации. Как обсуждается в данном описании, обнаружено, что введение слитого белка RAGE (например, TTP-4000) диабетическим животным, которые получили трансплантаты островковых клеток, значимо снижало рецидивы гипергликемии и, следовательно, отторжение трансплантированных островковых клеток в двух моделях трансплантата (аллогенного и сингенного).

А. Аллогенная трансплантация островков у мышей.

В первой группе экспериментов проверяли, может ли введение слитого белка RAGE (TTP-4000) модулировать аллогенное отторжение трансплантированных островковых клеток и рецидивы диабета в модели диабета у мышей C57BL/6J (B6).

Животная модель диабета

Диабет у мышей C57BL/6J (6-8-недельного возраста) (B6) получали однократной внутривенной инъекцией стрептозотоцина (STZ) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) в дозе 200 мг/кг. Мыши BALB/cJ (6-8-недельного возраста) (BALB) служили в качестве доноров для трансплантации островков, что обес-

печивало совпадение по аллотипу трансплантатов островков.

Выделение островков

Мышей (BALB/c) анестезировали раствором кетамина HCl/ксилазина HCl (Sigma, St. Louis MO). После инъекции внутрь протока 3 мл холодного сбалансированного солевого раствора Хенкса (HBSS, Gibco, Grand Island NY), содержащего 1,5 мг/мл коллагеназы Р (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ), хирургически доставляли поджелудочную железу и подвергали расщеплению при 37°C в течение 20 мин. Островки промывали в HBSS и очищали центрифугированием в ступенчатом градиенте, используя полисахарозу 400 (Cellgro, Herndon VA) с четырьмя разными плотностями (26, 23, 20 и 11%). Фрагменты ткани на границе раздела слоев с плотностью 20 и 23% собирали, промывали и ресуспендировали в HBSS. Отдельные островки, не содержащие связанной с ними ацинарной, сосудистой ткани и ткани протока, отбирали вручную под инвертированным микроскопом, получая высокоочищенные островки для трансплантации.

Трансплантация островков

Индукцированные стрептозотоцином диабетические мыши C57BL/6 (B6) получали трансплантаты островков не позднее 2 дней после диагностирования диабета. Мыши BALB/cJ (6-8-недельного возраста) (BALB) служили в качестве доноров для аллогенной трансплантации островков. Для трансплантации 500-600 свежевыделенных островков (т.е. в среднем 550 островков) от донорных мышей собирали с помощью установки для инфузии и трансплантировали в субкапсулярное пространство правой почки реципиента.

Обработка тестируемыми соединениями

Тестируемые соединения вводили сразу, как только трансплантировали островки; введение продолжали в течение примерно 60 дней, в зависимости от того, как чувствовало себя контрольное животное. Мышам инъецировали 0,25 мл либо фосфатно-солевого буфера (PBS), либо ТТР-4000 в PBS, либо IgG в PBS в соответствии с приведенной ниже схемой (табл. 3).

Таблица 3. Введение тестируемых соединений и/или наполнителя

Тестируемая группа	Количество мышей	Ударная доза	Поддерживающая доза	Схема
Необработанный контроль	8			
Контрольный наполнитель (PBS)	8	0,25 мл/доза/мышь в 1 день	0,25 мл/доза/мышь, начиная со 2 дня	Через день (QOD) × 60 дней; в/б
IgG	8	(300 мкг) 0,25 мл/доза/мышь в 1 день	(100 мкг) 0,25 мл/доза/мышь, начиная со 2 дня	(100 мкг) Через день (QOD) × 60 дней; в/б
ТТР-4000	8	(300 мкг) 0,25 мл/доза/мышь в 1 день	(100 мкг) 0,25 мл/доза/мышь, начиная со 2 дня	(100 мкг) Через день (QOD) × 60 дней; в/б
ТТР-4000	8	(300 мкг) 0,25 мл/доза/мышь в 1 день	(30 мкг) 0,25 мл/доза/мышь, начиная со 2 дня	(30 мкг) Через день (QOD) × 60 дней; в/б

Наблюдение за функционированием трансплантатов островков

Функционирование трансплантатов островков контролировали, используя серийные измерения уровня глюкозы в крови ежедневно в течение первых 2 недель после трансплантации островков, затем через день. Устранение диабета определяли как наличие уровня глюкозы в крови менее 200 мг/дл в двух следующих друг за другом измерениях. Утрату трансплантата определяли в том случае, когда уровень глюкозы в крови превышал 250 мг/дл в двух следующих друг за другом измерениях. Результаты показаны в табл. 4.

Таблица 4. Влияние ТТР-4000 на аллогенный трансплантат островков*

	ТТР-4000 300 мкг ударная доза + 100 мкг через день в/б (Группа 1)	PBS (Группа 2)	ТТР-4000 300 мкг + 30 мкг через день в/б (Группа 3)	IgG 300 мкг ударная доза + 100 мкг через день в/б (Группа 4)	Необработанный контроль
	14	9	13	8	9
	16	8	14	9	8
	13	10	12	10	9
	13	8	12	8	10
	12	11	11	8	9
	16	8	11	8	8
	15	8	8	9	11
	14	8	8	11	9
					7
					9
					8
					9
Среднее	14,125	8,75	11,125	8,875	8,833333
SD	1,457738	1,164965	2,167124	1,125992	1,029857
n	8	8	8	8	12

* Значения отражают день утраты трансплантата для каждого животного, который определяли по рецидиву повышенных уровней глюкозы в крови.

Влияние введения ТТР-4000 на отторжение аллотранспланта островков BALB/c у мышей B6 показано в виде графика кумулятивной жизнеспособности по Каплану-Мейеру на фиг. 21. Можно видеть, что имеет место увеличение периода времени до выявления отсутствия трансплантата у животных, обработанных ТТР-4000 (группы 1 и 3), в отличие от животных, которых не обрабатывали совсем (контроль), или животных, обработанных наполнителем (PBS) или (IgG1 человека). Применение различных статистических анализов (Mantel-Cox Logrank, Breslow-Gehan-Wilcoxon; Tarone-Ware, Peto-Peto-Wilcoxin; и Harrington-Fleming), показано, что различия между контролем и ТТР-4000 (группы 1 и 3) были значимыми (табл. 5).

Таблица 5

Статистический способ	Контроль по сравнению с группой 1 (ТТР 4000)			Контроль по сравнению с группой 3 (ТТР 4000)		
	Хи-квадрат	DF*	P-значение	Хи-квадрат	DF	P-значение
Logrank (Mantel-Cox)	18,777	1	<0,0001	7,662	1	0,0056
Breslow-Gehan-Wilcoxon	15,092	1	0,0001	4,904	1	0,0268
Tarone-Ware	16,830	1	0,0001	6,212	1	0,0127
Peto-Peto-Wilcoxon	14,359	1	0,0002	4,315	1	0,0378
Harrington-Fleming (rho=0,5)	16,830	1	0,0001	6,212	1	0,0127

* Степень свободы

В. Трансплантация островков у мышей NOD в качестве модели аутоиммунного заболевания.

Во второй группе экспериментов проверяли, может ли введение слитого белка RAGE (т.е. ТТР-4000 или ТТР-3000) модулировать течение рецидивирующего диабета у мышей NOD, используя модель сингенной трансплантации NOD.

Животная модель диабета

Мыши со спонтанным аутоиммунным диабетом, не связанным с ожирением (NOD/LtJ) (12-25-недельного возраста), служили в качестве реципиентов островковых клеток, тогда как молодые мыши NOD/LtJ (6-7-недельного возраста) до развития диабета служили в качестве доноров при сингенной трансплантации островков. Островки для трансплантации выделяли, как описано выше в разделе А (для аллогенной трансплантации островков).

Трансплантация островков

Диабетические мыши NOD/LtJ получали трансплантаты островков не позднее 2 дней после диагностирования диабета. 500-600 свежесекретированных островков (т.е. в среднем 550 островков) от донорных мышей собирали с помощью установки для инфузии и трансплантировали в субкапсулярное пространство правой почки.

Обработка тестируемыми соединениями

Тестируемые соединения вводили сразу, как только трансплантировали островки, и введение продолжали в течение примерно 8 недель. Мышам инъектировали 0,25 мл либо PBS, либо ТТР-4000 в PBS, либо ТТР-3000 в PBS в соответствии с приведенной ниже схемой (табл. 6).

Таблица 6

Группа	Количество мышей	Величина ударной дозы	Величина поддерживающей дозы	Схема
ТТР-4000	8	(300 мкг) 0,25 мл/доза/мышь в 1 день	(100 мкг) 0,25 мл/доза/мышь, начиная со 2 дня	(100 мкг) Через день (QOD) × 8 недель; в/б
ТТР-3000	8	(300 мкг) 0,25 мл/доза/мышь в 1 день	(100 мкг) 0,25 мл/доза/мышь, начиная со 2 дня	(100 мкг) Через день (QOD) × 8 недель; в/б
PBS	8	0,25 мл/доза/мышь в 1 день	0,25 мл/доза/мышь, начиная со 2 дня	Через день (QOD) × 8 недель; в/б

Наблюдение за функционированием трансплантатов островков

Функционирование трансплантатов островков контролировали, используя серийные измерения уровня глюкозы в крови ежедневно в течение первых 2 недель после трансплантации островков, затем через день. Устранение диабета определяли как наличие уровня глюкозы в крови менее 200 мг/дл в двух следующих друг за другом измерениях. Утрату трансплантата определяли в том случае, когда уровень глюкозы в крови превышал 250 мг/дл в двух следующих друг за другом измерениях. Результаты показаны в табл. 7.

Таблица 7. Влияние ТТР-4000 и ТТР-3000 на рецидивирующий диабет при наличии сингенных трансплантатов островков у мышей NOD *

	ТТР-4000 300 мкг LD + 100 мкг через день в/б (Группа 1)	ТТР-3000 300 мкг + 100 мкг через день в/б (Группа 2)	Контроль
	35	44	23
	38	46	25
	40	42	26
	43	41	22
	36	34	22
	45	32	24
	44	30	21
	38		20
			22
			21
			24
Среднее	39,875	38,42857	22,727273
SD	3,758324	6,32079	1,8488326
n	8	7	11

* Значения отражают день утраты трансплантата для каждого животного, который определяли по рецидиву повышенных уровней глюкозы в крови.

Влияние введения ТТР-4000 на отторжение сингенных трансплантированных островков у диабетических мышей NOD показано в виде графика кумулятивной жизнеспособности по Каплану-Мейеру на фиг. 22. Как видно на основании данных, приведенных в табл. 7, имеет место увеличение периода времени до выявления отсутствия трансплантата у животных, обработанных ТТР-4000 (группа 1) и ТТР-3000 (группа 2), в отличие от животных, которых не обрабатывали совсем (контроль). На фиг. 22 показано увеличение периода времени до выявления отсутствия трансплантата у животных, обработанных ТТР-4000 (группа 1), и животных, которых не обрабатывали совсем. Применение различных статистических анализов (Mantel-Cox Logrank, Breslow-Gehan-Wilcoxon; Tarone-Ware, Peto-Peto-Wilcoxon; Harrington-Fleming), показано, что различия между контролем и ТТР-4000 (группа 1) и между контролем и ТТР-3000 (группа 2) были значимыми (табл. 8).

Таблица 8

Статистический способ	Контроль по сравнению с группой 1 (ТГР 4000)			Контроль по сравнению с группой 2 (ТГР-3000)		
	Хи-квадрат	DF*	P-значение	Хи-квадрат	DF	P-значение
Logrank (Mantel-Cox)	18,410	1	0,0001	16,480	1	<0,0001
Breslow-Gehan-Wilcoxon	14,690	1	0,0001	12,927	1	0,0001
Tarone-Ware	16,529	1	<0,0001	14,686	1	0,0001
Peto-Peto-Wilcoxon	14,812	1	0,0001	13,027	1	0,0003
Harrington-Fleming (rho=0,5)	16,529	1	<0,0001	14,686	1	0,0001

* Степень свободы

Приведенное выше описание следует считать только как иллюстрацию сущности изобретения. Поскольку специалисты в данной области легко смогут осуществить модификации и изменения, то описание не предназначено для ограничения изобретения конкретными показанными и описанными вариантами, и следует считать, что идея изобретения охватывает все подходящие модификации и эквиваленты, входящие в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение слитого белка RAGE для получения лекарственного средства для лечения у субъекта воспаления и/или отторжения, ассоциированного с трансплантацией ткани или множества выделенных клеток из первого участка во второй участок, где слитый белок RAGE содержит полипептид RAGE, непосредственно связанный с полипептидом, содержащим домен C_n2 иммуноглобулина или часть домена C_n2 иммуноглобулина, где слитый белок RAGE содержит междоменный линкер RAGE, полученный из полипептида RAGE, а не междоменного шарнирного полипептида, полученного из иммуноглобулина, и где полипептид RAGE содержит участок связывания лиганда.

2. Применение по п.1, согласно которому полипептид RAGE содержит междоменный линкер RAGE, связанный с иммуноглобулиновым доменом RAGE, так, что С-концевая аминокислота иммуноглобулинового домена RAGE связана с N-концевой аминокислотой междоменного линкера RAGE, а С-концевая аминокислота междоменного линкера RAGE непосредственно связана с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего домен C_n2 иммуноглобулина или часть домена C_n2 иммуноглобулина.

3. Применение по п.1 или 2, согласно которому участок связывания лиганда RAGE содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

4. Применение по любому из предшествующих пунктов, согласно которому полипептид RAGE содержит междоменный линкер, связанный с иммуноглобулиновым доменом RAGE, и где полипептид RAGE содержит фрагмент полноразмерного белка RAGE.

5. Применение по любому из предшествующих пунктов, согласно которому слитый белок RAGE дополнительно содержит первый иммуноглобулиновый домен RAGE и первый междоменный линкер RAGE, связанный со вторым иммуноглобулиновым доменом RAGE и вторым междоменным линкером RAGE, так, что N-концевая аминокислота первого междоменного линкера RAGE связана с С-концевой аминокислотой первого иммуноглобулинового домена RAGE, N-концевая аминокислота второго иммуноглобулинового домена RAGE связана с С-концевой аминокислотой первого междоменного линкера, N-концевая аминокислота второго междоменного линкера RAGE связана с С-концевой аминокислотой второго иммуноглобулинового домена RAGE, и С-концевая аминокислота второго междоменного линкера RAGE непосредственно связана с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего домен C_n2 иммуноглобулина или часть домена C_n2 иммуноглобулина.

6. Применение по любому из предшествующих пунктов, согласно которому слитый белок RAGE содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 34, или SEQ ID NO: 56.

7. Применение по любому из пп.1-5, согласно которому слитый белок RAGE содержит любую из следующих аминокислотных последовательностей: SEQ ID NO: 33 без С-концевого остатка аминокислоты лизина, SEQ ID NO: 34 без С-концевого остатка аминокислоты лизина или SEQ ID NO: 56 без С-концевого остатка аминокислоты лизина.

8. Применение по любому из пп.2-7, согласно которому междоменный линкер RAGE, непосредственно связанный с доменом C_n2 иммуноглобулина или частью домена C_n2 иммуноглобулина, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или последовательность SEQ ID NO: 24 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

9. Применение по любому из пп.1-4, согласно которому слитый белок RAGE содержит один иммуноглобулиновый домен RAGE, связанный междоменным линкером RAGE с N-концевой аминокислотой

полипептида, содержащего домен C_n2 иммуноглобулина или часть домена C_n2 иммуноглобулина.

10. Применение по любому из пп.1-4 и 9, согласно которому слитый белок RAGE содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, или SEQ ID NO: 37, или SEQ ID NO: 57.

11. Применение по любому из пп.1-4 и 9, согласно которому слитый белок RAGE содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 без С-концевого остатка аминокислоты лизина, SEQ ID NO: 37 без С-концевого остатка аминокислоты лизина или SEQ ID NO: 57 без С-концевого остатка аминокислоты лизина.

12. Применение по любому из пп.2-4 и 9-11, согласно которому междоменный линкер RAGE, непосредственно связанный с полипептидом, содержащим домен C_n2 иммуноглобулина или часть домена C_n2 иммуноглобулина, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%.

13. Применение по любому из предшествующих пунктов, согласно которому лекарственное средство предназначено для внутривенного введения, внутрибрюшинного введения или подкожного введения слитого белка RAGE субъекту.

14. Применение по любому из предшествующих пунктов, согласно которому междоменный линкер RAGE содержит (i) междоменный линкер RAGE, который разделяет домены V и C1 в RAGE, или (ii) междоменный линкер RAGE, который разделяет домены C1 и C2 RAGE, вместо шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина.

15. Применение по любому из предшествующих пунктов, согласно которому первый участок и второй участок находятся в организмах разных субъектов.

16. Применение по любому из пп.1-14, согласно которому первый участок и второй участок находятся в организме одного и того же субъекта.

17. Применение по любому из предшествующих пунктов, согласно которому трансплантированные клетки или ткань содержат стволовые клетки или клетку или ткань поджелудочной железы, происходящие из кожи, печени, почки, сердца, костного мозга, крови, кости, мышцы, артерии, вены, хряща, щитовидной железы, нервной системы.

18. Применение по любому из предшествующих пунктов, согласно которому лекарственное средство предназначено для предотвращения отторжения трансплантированной ткани или множества клеток.

19. Применение слитого белка RAGE для получения лекарственного средства для лечения остеопороза у субъекта, где слитый белок RAGE содержит полипептид RAGE, непосредственно связанный с полипептидом, содержащим домен C_n2 иммуноглобулина или часть домена C_n2 иммуноглобулина, где слитый белок RAGE содержит междоменный линкер RAGE, полученный из полипептида RAGE, а не междоменного шарнирного полипептида, полученного из иммуноглобулина, и где полипептид RAGE содержит участок связывания лиганда RAGE.

20. Применение по п.19, согласно которому междоменный линкер RAGE содержит (i) междоменный линкер RAGE, который разделяет домены V и C1 в RAGE, или (ii) междоменный линкер RAGE, который разделяет домены C1 и C2 в RAGE, вместо шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина.

21. Применение по п.19 или 20, согласно которому слитый белок RAGE дополнительно содержит первый иммуноглобулиновый домен RAGE и первый междоменный линкер RAGE, связанные со вторым иммуноглобулиновым доменом RAGE и вторым междоменным линкером RAGE, так, что N-концевая аминокислота первого междоменного линкера RAGE связана с С-концевой аминокислотой первого иммуноглобулинового домена RAGE, N-концевая аминокислота второго иммуноглобулинового домена RAGE связана с С-концевой аминокислотой первого междоменного линкера RAGE, N-концевая аминокислота второго междоменного линкера RAGE связана с С-концевой аминокислотой второго иммуноглобулинового домена RAGE, и С-концевая аминокислота второго междоменного линкера RAGE непосредственно связана с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего домен C_n2 иммуноглобулина или часть домена C_n2 иммуноглобулина.

22. Применение по п.19 или 20, согласно которому слитый белок дополнительно содержит один иммуноглобулиновый домен RAGE, связанный междоменным линкером RAGE с N-концевой аминокислотой полипептида, содержащего домен C_n2 иммуноглобулина или часть домена C_n2 иммуноглобулина.

RAGE человека (SEQ ID NO: 1)

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
 WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LALALGILGG
 LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
 TGGP

RAGE человека без сигнальной последовательности (SEQ ID NO: 2)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
 WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LALALGILGG
 LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
 TGGP

Фиг. 1A

RAGE человека без сигнальной последовательности (SEQ ID NO: 3)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
 WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LALALGILGG
 LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
 TGGP

Фиг. 1B

sRAGE человека — (SEQ ID NO: 4)

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
 WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

sRAGE человека без сигнальной последовательности (SEQ ID NO: 5)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
 WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

sRAGE человека без сигнальной последовательности (SEQ ID NO: 6)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
 WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

Фиг. 1C

V-домен RAGE человека (SEQ ID NO: 7)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRV R

V-домен RAGE человека (SEQ ID NO: 8)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRV R

фрагмент V-домена RAGE человека (SEQ ID NO: 9)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WK

фрагмент V-домена RAGE человека (SEQ ID NO: 10)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WK

аминокислоты RAGE человека 124-221 (SEQ ID NO: 11)

PEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL R

аминокислоты RAGE человека 227-317 (SEQ ID NO: 12)

PRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSQPIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVS

аминокислоты RAGE человека 23-123 (SEQ ID NO: 13)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRV R VYQI
 PGK

Фиг. 1D

аминокислоты RAGE человека 24-123 (SEQ ID NO: 14)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRV R VYQI
 PGK

аминокислоты RAGE человека 23-136 (SEQ ID NO: 15)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRV R VYQI
 PGKPEIVDSA SELTAG

аминокислоты RAGE человека 24-136 (SEQ ID NO: 16)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRV R VYQI
 PGKPEIVDSA SELTAG

аминокислоты RAGE человека 23-226 (SEQ ID NO: 17)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRV R VYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQ

аминокислоты RAGE человека 24-226 (SEQ ID NO: 18)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRV R VYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQ

Фиг. 1E

аминокислоты RAGE человека 23-251 (SEQ ID NO: 19)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGA P

аминокислоты RAGE человека 24-251 (SEQ ID NO: 20)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG
 PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGA P

линкер RAGE человека (SEQ ID NO: 21)

VYQIPGK

линкер RAGE человека (SEQ ID NO: 22)

TAPIQPRVWE PVPLEEVQLV VEPEGGA VAP

линкер RAGE человека (SEQ ID NO: 23)

VYQIPGKPEI VDSASELTAG

линкер RAGE человека (SEQ ID NO: 24)

TAPIQ

Фиг. 1F

ДНК, кодирующая RAGE человека 1-118 (SEQ ID NO: 25)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCAGGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAAC TACC GAGTCCGTGT
 CTAC

ДНК, кодирующая RAGE человека 1-123 (SEQ ID NO: 26)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCAGGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAAC TACC GAGTCCGTGT
 CTACCAGATT CCTGGGAAG

ДНК, кодирующая RAGE человека 1-136 (SEQ ID NO: 27)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCAGGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAAC TACC GAGTCCGTGT
 CTACCAGATT CCTGGGAAG CAGAAATGT AGATTCTGCC TCTGAAC TCA
 CGGCTGGT

Фиг. 1G

ДНК, кодирующая RAGE человека 1-230 (SEQ ID NO: 28)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
 TGGAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAGGTCC TGTCTCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
 СТАССАГАТТ ССТГГГААГС САГАААТТГТ АГАТТСТГСС ТСТГААСТСА
 CGGCTGGTGT TCCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
 CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGAAGCCCC TGGTGCCTAA
 TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
 GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCAGC CCGGGGAGGA
 GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCAGGCC TTCCCCGACA
 CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CATCCAGCC CCGTGTCTGG

ДНК, кодирующая RAGE человека 1-251 (SEQ ID NO: 29)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
 TGGAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAGGTCC TGTCTCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
 СТАССАГАТТ ССТГГГААГС САГАААТТГТ АГАТТСТГСС ТСТГААСТСА
 CGGCTGGTGT TCCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
 CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGAAGCCCC TGGTGCCTAA
 TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
 GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCAGC CCGGGGAGGA
 GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCAGGCC TTCCCCGACA
 CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
 CTGTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
 CCT

Фиг. 1H

неполные домены C_{H2} и C_{H3} человека (SEQ ID NO: 38)

PSVF LFPPPKPDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP
 IEKTIKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
 ESNQRPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA
 LHNHYTQKSL SLSPGK

ДНК, кодирующая неполные домены C_{H2} и C_{H3} человека (SEQ ID NO: 39)

CCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAATA CCAAGGACA CCCTCATGAT
 CTCCCGGACC CTTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
 ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
 GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
 CAGCGTCCTC ACCGTCTGTC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC
 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
 ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
 CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
 CTTCTTCTCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
 ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

домены C_{H2} и C_{H3} человека (SEQ ID NO: 40)

PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
 LPAPIEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKG FYPSDI
 AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVVFSCSV
 MEALHNHYT QKSLSLSPGK

Фиг. 1I

ДНК, кодирующая домены C_{H2} и C_{H3} человека (SEQ ID NO: 41)

CCGTGCCCAG CACCTGAAC T CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
 CAAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
 AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
 AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
 ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC
 GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTTAC AGCAAGCTCA
 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
 TCCGGGTAAA TGA

домен C_{H2} человека (SEQ ID NO: 42)

PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA
 LPAPIEKTIS KAK

домен C_{H3} человека (SEQ ID NO: 43)

GQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
 AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

линкер RAGE (SEQ ID NO: 44)

ISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LA

Фиг. 1J

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGGTC TGTCTCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTGCGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAAC TACC GAGTCCGTGT
 CTACCAAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
 CGGCTGGTGT TCCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTGAGA GGGGAGCTAC
 CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGGAAGCCC TGGTGCTTAA
 TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
 GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCAGC CCGGGGAGGA
 GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCAGGCC TTCCCCGACA
 CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
 CTCTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
 CCTCCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT
 CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
 ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
 GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
 CAGCTCTCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC
 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
 ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
 AAGGCTCTTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCGAG
 CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
 CTTCTTCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
 ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

Последовательность ДНК кодирующей области

RAGE-Fc (TTP-4000) (SEQ ID NO:30)

Фиг. 2

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGGAAGGTCC TGTCCTCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAAC TACC GAGTCCGTGT
 CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
 CGGCTGGTCC GTCAGTCTTC CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCTC
 ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGCG GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA
 CGAAGACCTT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC
 ATAATGCCAA GACAAAGCCG CCGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
 GTGGTCAGCG TCCTCACCCT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA
 GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA
 CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCTG
 CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTACGCC TGACCTGCCT
 GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
 GGCAGCCGGA GAACAAC TAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
 GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
 ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAATG A

Последовательность ДНК кодирующей области RAGE-Fc (TTP-3000)
 (SEQ ID NO: 31).

Фиг. 3

SEQ ID NO: 32

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
 WKLTNTRTEA WKVLSPQGGG PWDVARVLP NGSLEFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCTVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI
 SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ
 PENNYKTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY
 TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 33

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL WKLTNTRTEA WKVLSPQGGG
 PWDVARVLP NGSLEFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCTVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 34

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL WKLTNTRTEA WKVLSPQGGG
 PWDVARVLP NGSLEFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCTVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

Альтернативные последовательности, кодирующие состоящий
 из четырех доменов слитый белок RAGE-Fc IgG

Фиг. 4

SEQ ID NO: 35

MAAGTAVGAW VLVL~~SL~~WGAV VQAQNTARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL~~E~~
 WK~~LN~~TGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL
 MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD
 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 36

AQNTARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL~~E~~ WK~~LN~~TGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 37

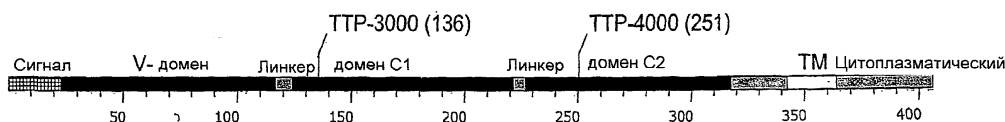
QNTARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL~~E~~ WK~~LN~~TGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

Альтернативные последовательности, кодирующие состоящий

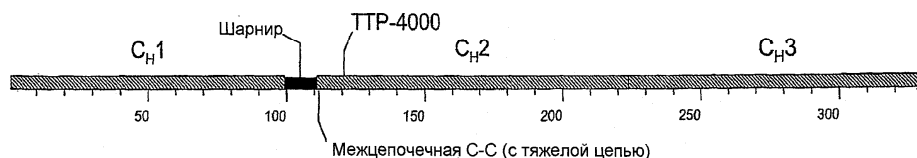
из трех доменов слитый белок RAGE-Fc IgG

Фиг. 5

Доменная структура hRAGE

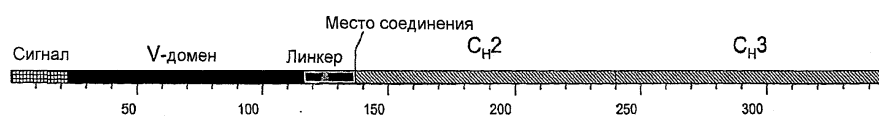


Fc Ig гамма-1 человека



Фиг. 6А

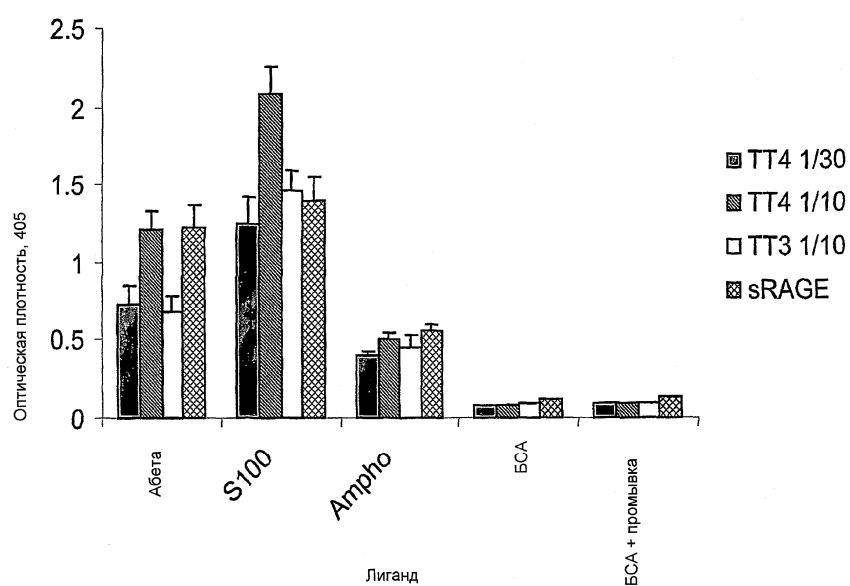
ТТР-3000



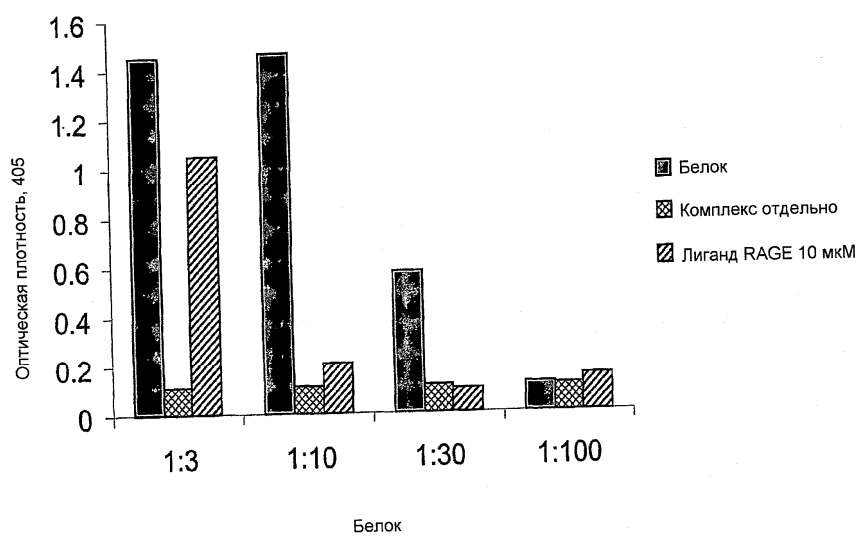
ТТР-4000



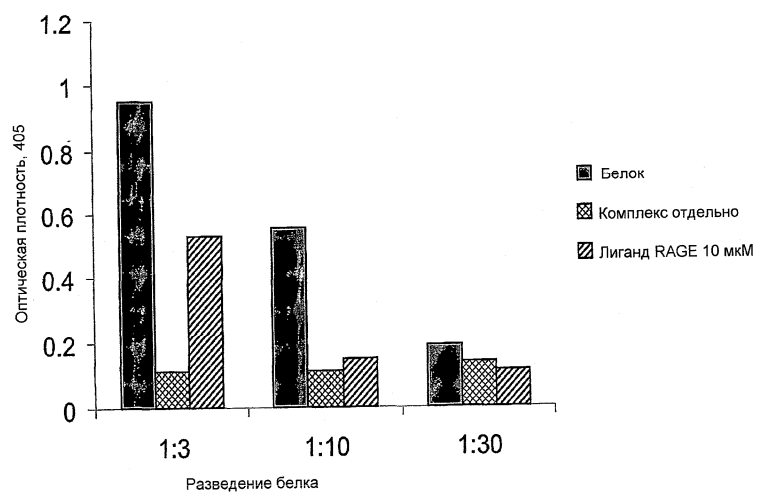
Фиг. 6В



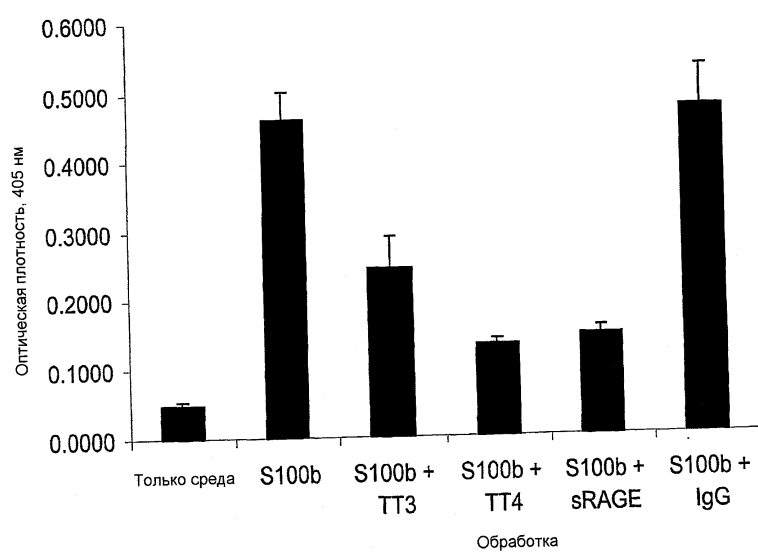
Фиг. 7



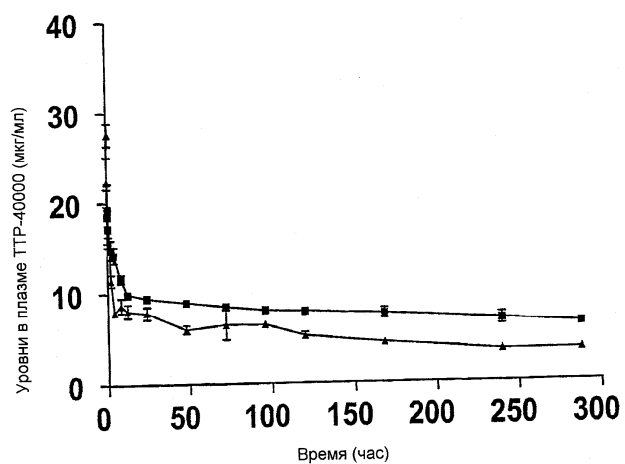
Фиг. 8



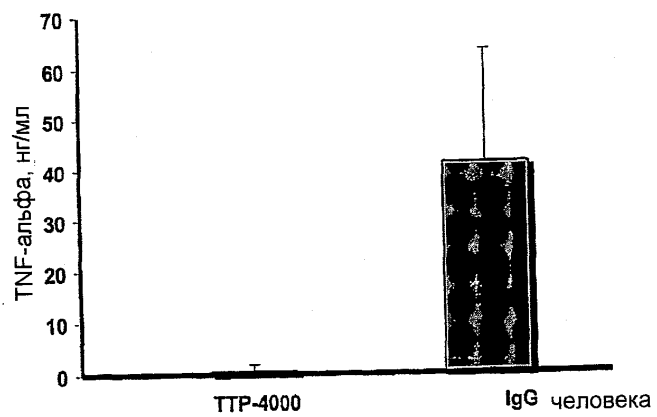
Фиг. 9



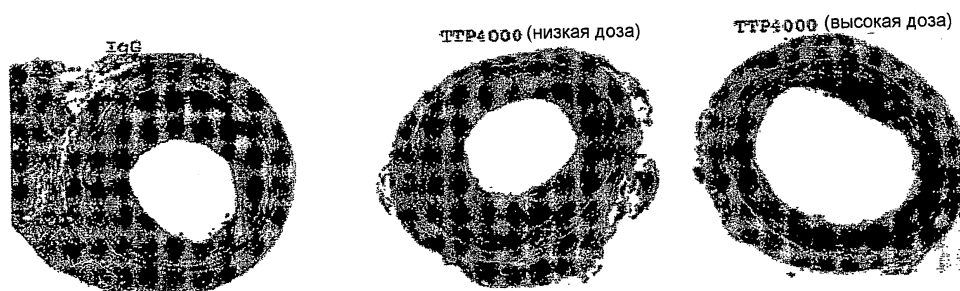
Фиг. 10



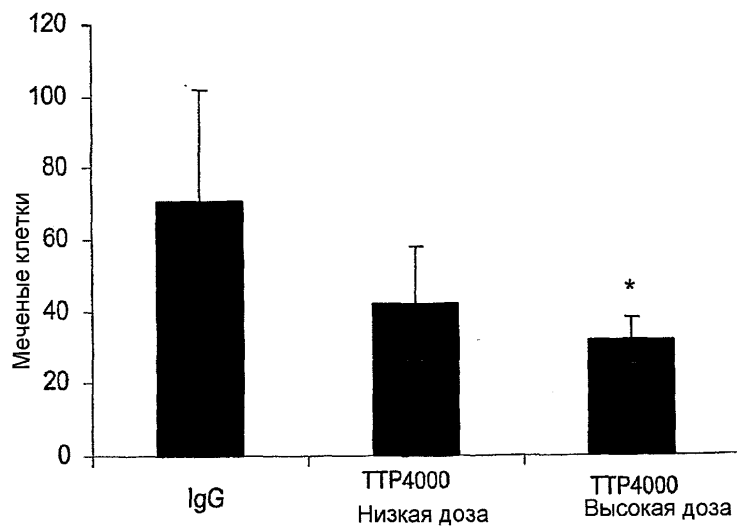
Фиг. 11



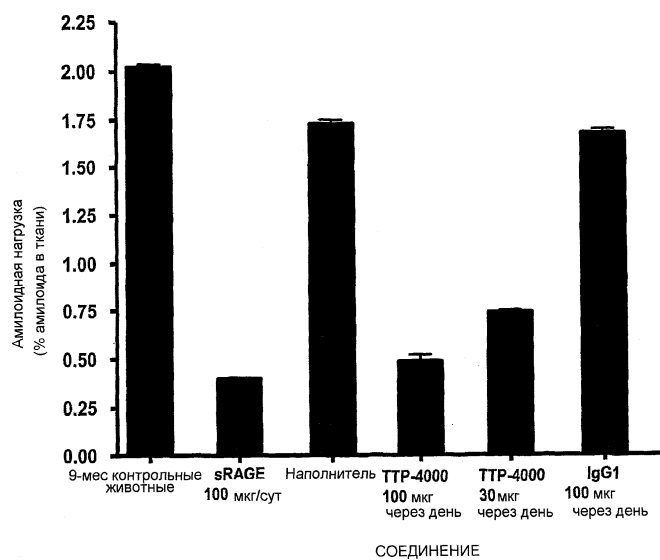
Стимулятор
Фиг. 12



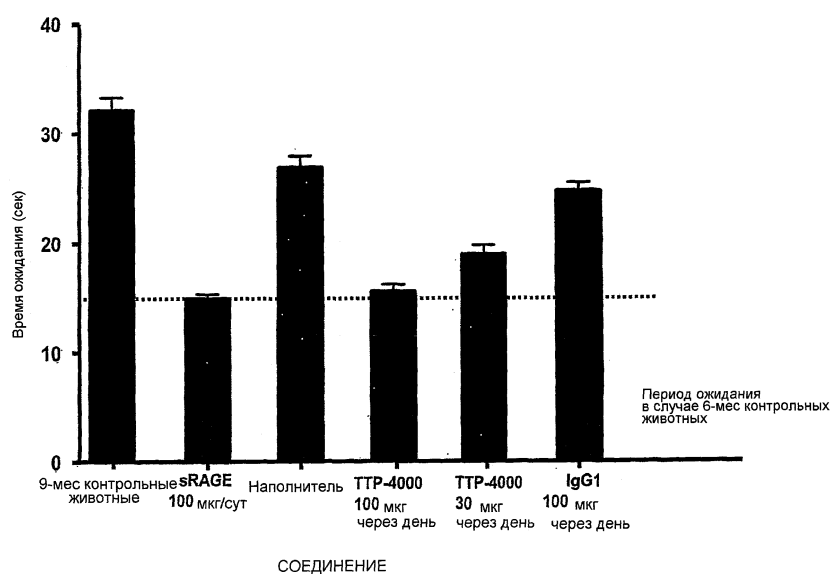
Фиг. 13А



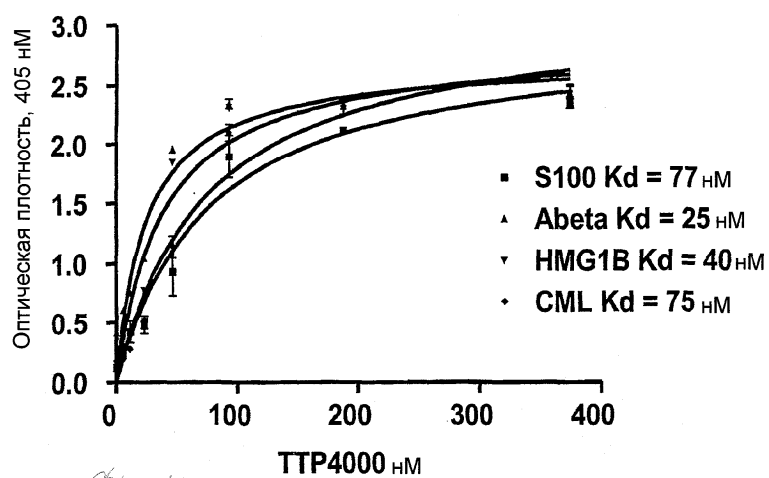
Фиг. 13В



Фиг. 14А



Фиг. 14В



sRAGE человека без сигнальной последовательности (SEQ ID NO: 45)

pENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E
 WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

V-домен RAGE человека (SEQ ID NO: 46)

pENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVR

фрагмент V-домена RAGE человека (SEQ ID NO: 47)

pENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WK

аминокислоты RAGE человека 24-123 (SEQ ID NO: 48)

pENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGK

Фиг. 16А

аминокислоты RAGE человека 24-136 (SEQ ID NO: 49)

pENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAG

аминокислоты RAGE человека 24-226 (SEQ ID NO: 50)

pENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQ

аминокислоты RAGE человека 24-251 (SEQ ID NO: 51)

pENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
 PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA P

Фиг. 16В

ДНК, кодирующая неполные домены

C_{H2} и C_{H3} человека (SEQ ID NO: 52)

```

CCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT
CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
ACCCGTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
CAGCGTCCTC ACCGTCTCTG ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
CTTCTTCTCT TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCCGGG AAATGA

```

ДНК, кодирующая домены

C_{H2} и C_{H3} человека (SEQ ID NO: 53)

```

CCGTGCCCCAG CACCTGAACCT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
CCCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTACAT
GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCTGCACC
AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
CTCCCAAGCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACCT ACAAGACCAC
GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAC AGCAAGCTCA
CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
TCCCGGGAAA TGA

```

Фиг. 16С

```

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGSCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGCTGCTGAA GTGTAAAGGGG GCCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGTCC TGCTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCTTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGGTGT TCCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTGAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGGAAGCCCC TGGTGCCTAA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCACAG CCGGGGAGGA
GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCCAGGCC TTCCCCGACA
CCGGGCTTGG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
CTCTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
CCTCCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT
CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
ACCCGTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
CAGCGTCCTC ACCGTCTCTG ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
CTTCTTCTCT TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCCGGG AAATGA

```

Альтернативная последовательность ДНК кодирующей области RAGE-Fc (TTP-4000)
(SEQ ID NO: 54)

Фиг. 17

```

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GCGGAGCCAC
TGGTGTCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGTCC TGTCTCCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTGCGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTCC GTCAGTCTTC CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCTC
ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA
CGAAGACCTT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC
ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
GTGGTCAGCG TCCTCACCCT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA
GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA
CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCTTG
CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
GCTCAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
GGCAGCCGGA GAACAACCTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGAATCCGAC
GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CCGGGAATG A

```

Альтернативная последовательность ДНК кодирующей области RAGE-Fc (TTP-3000)
(SEQ ID NO: 55).

Фиг. 18

SEQ ID NO: 56

```

DENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLETLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSDGSFFL
YSKLTVDKSR WQQGNVFCFS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

```

Альтернативная последовательность, кодирующая состоящий из
четырёх доменов слитый белок RAGE-Fc IgG

Фиг. 19

SEQ ID NO: 57

```

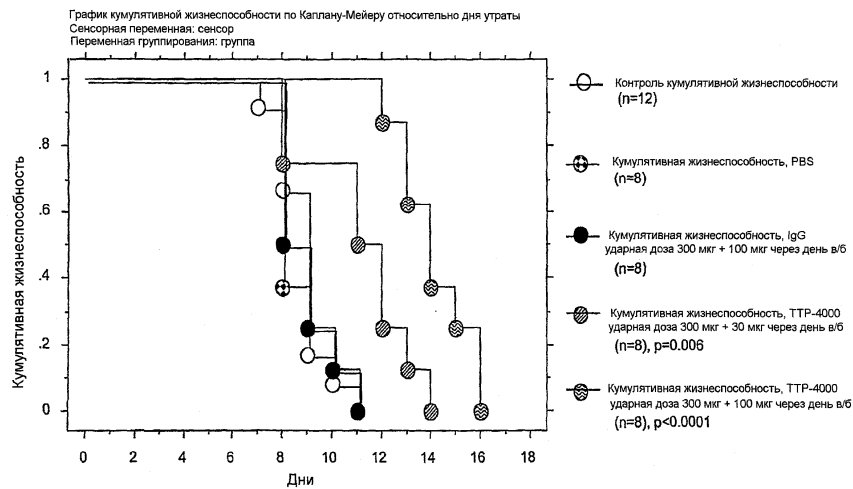
DENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSPGK

```

Альтернативные последовательности, кодирующие состоящий из
трех доменов слитый белок RAGE-Fc IgG

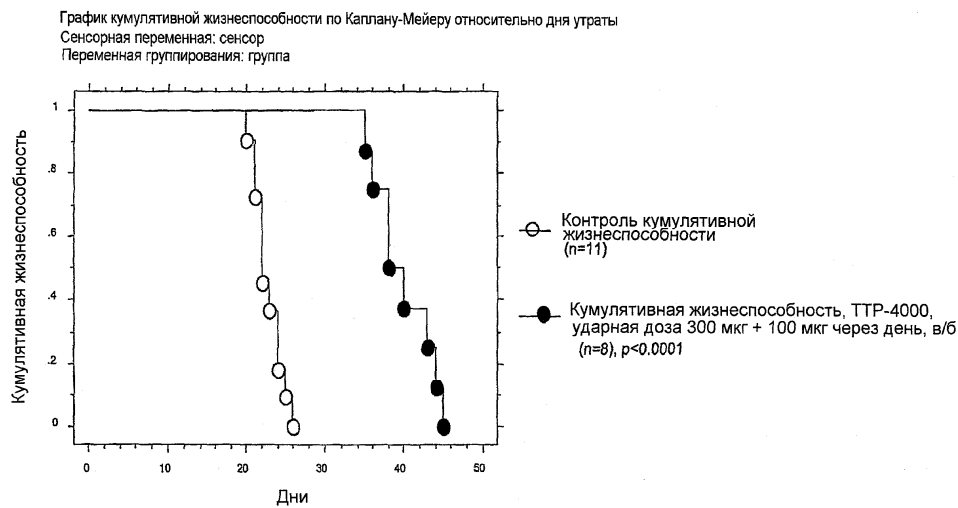
Фиг. 20

Влияние ТТР4000 на отторжение аллотрансплантатов островков (BALB/c в B6)



Фиг. 21

Влияние обработки ТТР-4000 на рецидивирующий диабет в трансплантированных островках диабетических мышей NOD



Фиг. 22

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> TransTech Pharma, Inc.
 Mjalli, АДНKn M.M.
 Rothlein, Robert
 Webster, Jeffrey C.
 Tian, Ye Edward

<120> СЛИТЫЕ БЕЛКИ RAGE И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 57739-365573

<140> 200870244

<141> 2007-01-23

<150> US 60/771,619

<151> 2006-02-09

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 404

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
 20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
 35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
 50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
 65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
 85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
 100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
 115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys
 130 135 140

Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
 145 150 155 160
 Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
 165 170 175
 Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
 180 185 190
 Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
 195 200 205
 Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro
 210 215 220
 Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
 225 230 235 240
 Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
 245 250 255
 Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
 260 265 270
 Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu
 275 280 285
 Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
 290 295 300
 His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
 305 310 315 320
 Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
 325 330 335
 Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly
 340 345 350
 Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg
 355 360 365
 Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu
 370 375 380
 Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser
 385 390 395 400

Thr Gly Gly Pro

<210> 2
 <211> 382
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
 1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
 20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
 35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
 50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
 85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
 100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
 115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
 130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
 145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
 165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
 180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
 195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
 210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro
 225 230 235 240

Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu
 245 250 255

Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln
 260 265 270

Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro
 275 280 285

Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu
 290 295 300

Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala
 305 310 315 320

Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly Thr Ala Ala Leu Leu Ile
 325 330 335

Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys
 340 345 350

Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln
 355 360 365

Ser Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser Thr Gly Gly Pro
 370 375 380

<210> 3
 <211> 381
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro

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

Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly
 325 330 335

Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala
 340 345 350

Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser
 355 360 365

Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser Thr Gly Gly Pro
 370 375 380

<210> 4

<211> 339

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
 20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
 35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
 50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
 65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
 85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
 100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
 115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys
 130 135 140

Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
 145 150 155 160

Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
 165 170 175

Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
 180 185 190

Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
 195 200 205

Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro
 210 215 220

Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
 225 230 235 240

Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
 245 250 255

Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
 260 265 270

Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu
 275 280 285

Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
 290 295 300

His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
 305 310 315 320

Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
 325 330 335

Gly Leu Gly

<210> 5
 <211> 317
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
 1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
 20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
 35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
 50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
 85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
 100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
 115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
 130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
 145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
 165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
 180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
 195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
 210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro
 225 230 235 240

Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu
 245 250 255

Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln
 260 265 270

Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro
 275 280 285

Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu
 290 295 300

Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly
 305 310 315

<210> 6
 <211> 316
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
 85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
 115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
 130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
 145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
 165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
 180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
 195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
 210 215 220

Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala
225 230 235 240

Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro
245 250 255

Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp
260 265 270

Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro Gln
275 280 285

Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly
290 295 300

Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly
305 310 315

<210> 7
<211> 94
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg
85 90

<210> 8
<211> 93
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg
 85 90

<210> 9
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
 1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys
 20 25 30

<210> 10
 <211> 29
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys
 20 25

<210> 11
 <211> 98
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn
 1 5 10 15

015657

Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu
20 25 30

Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val
35 40 45

Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr
50 55 60

Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg
65 70 75 80

Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala
85 90 95

Leu Arg

<210> 12
<211> 91
<212> BEJOK
<213> Homo sapiens

<400> 12
Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val
1 5 10 15

Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
20 25 30

Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp
35 40 45

Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu
50 55 60

Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser
65 70 75 80

Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser
85 90

<210> 13
<211> 101
<212> BEJOK
<213> Homo sapiens

<400> 13

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

015657

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys
100

<210> 14
<211> 100
<212> BEJOK
<213> Homo sapiens

<400> 14
Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
85 90 95

Ile Pro Gly Lys
100

<210> 15
<211> 114
<212> BEJOK
<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly

<210> 16
<211> 113
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala

100

105

110

Gly

<210> 17
 <211> 204
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

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

<210> 18
 <211> 203
 <212> БЕЖОК
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
 85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
 115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
 130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
 145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
 165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
 180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln
 195 200

<210> 19
 <211> 229
 <212> БЕЖОК
 <213> Homo sapiens

<400> 19

015657

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro
225

<210> 20
<211> 228
<212> BEJOK
<213> Homo sapiens
<400> 20

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro
225

<210> 21
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 21

Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys
 1 5

<210> 22

<211> 30

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 22

Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro
 20 25 30

<210> 23

<211> 20

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 23

Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu
 1 5 10 15

Leu Thr Ala Gly
 20

<210> 24

<211> 5

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 24

Thr Ala Pro Ile Gln
 1 5

<210> 25

<211> 354

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 25

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggtgctgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccaccca ggggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
 tggaagggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctac 354

<210> 26
 <211> 369
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggtgctgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca ggggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
 tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc cctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaag 369

<210> 27
 <211> 408
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggtgctgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca ggggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
 tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc cctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggt 408

<210> 28
 <211> 690
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggtgctgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca ggggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
 tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc cctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtgt tcccaataag 420
 gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttgat 480

gggaagcccc tggcgcctaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac 540
 cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgaccccagc ccggggagga 600
 gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc ttccccgaca ccgggccttg 660
 cgcacagccc ccatccagcc ccgtgtctgg 690

<210> 29
 <211> 753
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggcgcctgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca gcgctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
 tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtgt tcccaataag 420
 gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttggat 480
 gggaagcccc tggcgcctaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac 540
 cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgaccccagc ccggggagga 600
 gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc ttccccgaca ccgggccttg 660
 cgcacagccc ccatccagcc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggagga ggtccaattg 720
 gtggtggagc cagaaggtgg agcagtagct cct 753

<210> 30
 <211> 1386
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственная = синтетическая конструкция

<400> 30
 atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggcgcctgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca gcgctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
 tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtgt tcccaataag 420

gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttggat 480
 gggaagcccc tgggtgcctaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac 540
 cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgacccagc ccggggagga 600
 gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc ttccccgaca ccgggccttg 660
 cgcacagccc ccatccagcc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggagga ggtccaattg 720
 gtgggtggagc cagaagggtg agcagtagct cctccgtcag tcttctctt cccccaaaa 780
 cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 840
 agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900
 gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc 960
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa 1020
 gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1080
 caggtgtaca ccctgcccc atcccggtg gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140
 tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
 ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgtggact ccgacggctc cttcttctc 1260
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320
 gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
 aaatga 1386

<210> 31

<211> 1041

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная = синтетическая конструкция

<400> 31

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgtgtgtcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgctc aaaacatcac agcccggtt ggagagccac tgggtgctgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
 tggaaggctc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc 240
 aacggctccc tcttcttccc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccgggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctgggtc gtcagtcttc 420
 ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 480
 gtgggtgggtg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 540
 gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 600

```

gtggtcagcg tcttcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc      660
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg      720
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac      780
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg      840
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac      900
ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggaggca gcaggggaac      960
gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc     1020
tccctgtctc cgggtaaattg a                                     1041

```

<210> 32

<211> 461

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная = синтетическая конструкция

<400> 32

```

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

```

```

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
          20           25           30

```

```

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
          35           40           45

```

```

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
          50           55           60

```

```

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65           70           75           80

```

```

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
          85           90           95

```

```

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
          100          105          110

```

```

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
          115          120          125

```

```

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys
          130          135          140

```

Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
 145 150 155 160

 Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
 165 170 175

 Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
 180 185 190

 Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
 195 200 205

 Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro
 210 215 220

 Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
 225 230 235 240

 Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu
 245 250 255

 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 260 265 270

 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 275 280 285

 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 290 295 300

 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 305 310 315 320

 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 325 330 335

 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 340 345 350

 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 355 360 365

 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 370 375 380

 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400

 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

405

410

415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 33

<211> 439

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная = синтетическая конструкция

<400> 33

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
 1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
 20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
 35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
 50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
 85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
 100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
 115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
 130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
 145 150 155 160

015657

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435

<210> 34
 <211> 438
 <212> ВЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственная = синтетическая конструкция

<400> 34

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
 85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
 115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
 130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
 145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
 165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro

180	185	190
Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu		
195	200	205
Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly		
210	215	220
Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
225	230	235 240
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
	245	250 255
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
	260	265 270
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
	275	280 285
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
	290	295 300
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
305	310	315 320
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
	325	330 335
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		
	340	345 350
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
	355	360 365
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
	370	375 380
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
385	390	395 400
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
	405	410 415
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
	420	425 430
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		

435

<210> 35
 <211> 346
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственная = синтетическая конструкция

<400> 35

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

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
 20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
 35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
 50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
 65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
 85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
 100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
 115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 130 135 140

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 145 150 155 160

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 165 170 175

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 180 185 190

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 195 200 205

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 210 215 220

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 225 230 235 240

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 245 250 255

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 260 265 270

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 275 280 285

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 290 295 300

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 305 310 315 320

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 325 330 335

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345

<210> 36
 <211> 324
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственная = синтетическая конструкция

<400> 36

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
 1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
 20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
 35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
 50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met

<210> 37
 <211> 323
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственная = синтетическая конструкция

<400> 37

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
 85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 115 120 125

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 130 135 140

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 145 150 155 160

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 165 170 175

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 180 185 190

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 195 200 205

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
210 215 220

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
225 230 235 240

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
245 250 255

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
260 265 270

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
275 280 285

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
290 295 300

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
305 310 315 320

Pro Gly Lys

<210> 38

<211> 210

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 38

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
1 5 10 15

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
20 25 30

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
35 40 45

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
50 55 60

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
65 70 75 80

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
85 90 95

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

100 105 110
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 115 120 125
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 130 135 140
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 145 150 155 160
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 165 170 175
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 180 185 190
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 195 200 205
 Gly Lys
 210

<210> 39
 <211> 633
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 ccgtcagtct tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc 60
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 120
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 180
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctcgcacc aggactgggt gaatggcaag 240
 gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 300
 aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 360
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 420
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 480
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gacgaggtgg 540
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 600
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 633

<210> 40
 <211> 220
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 40

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 100 105 110

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 115 120 125

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 165 170 175

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 195 200 205

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 41

<211> 663

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 41
 ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 60
 aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc 120
 cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 180
 aagacaaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc 240
 gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc 300
 ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 360
 gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 420
 ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 480
 gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 540
 agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 600
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 660
 tga 663

<210> 42
 <211> 113
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 100 105 110

Lys

<210> 43
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 43

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 44
 <211> 25
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala
 20 25

<210> 45
 <211> 316
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 <223> Глутаминовая кислота модифицирована в пироглутаминовую кислоту
 (PyroGlu)

<400> 45

Glu Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys

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

260 265 270

Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro Gln
275 280 285

Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly
290 295 300

Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly
305 310 315

<210> 46
<211> 93
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (1)..(1)
<223> Глутаминовая кислота модифицирована в пироглутаминовую кислоту (PyroGlu)

<400> 46

Glu Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg
85 90

<210> 47
<211> 29
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (1)..(1)
<223> Глутаминовая кислота модифицирована в пироглутаминовую кислоту (PyroGlu)

<400> 47

Glu Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys
 20 25

<210> 48

<211> 100

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК

<222> (1)..(1)

<223> Глутаминовая кислота модифицирована в пироглутаминовую кислоту (PyroGlu)

<400> 48

Glu Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
 85 90 95

Ile Pro Gly Lys
 100

<210> 49

<211> 113

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК

<222> (1)..(1)

<223> Глутаминовая кислота модифицирована в пироглутаминовую кислоту (PyroGlu)

<400> 49

Glu Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
 85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110

Gly

<210> 50

<211> 203

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК

<222> (1)..(1)

<223> Глутаминовая кислота модифицирована в пироглутаминовую кислоту (PyroGlu)

<400> 50

Glu Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln
195 200

<210> 51
<211> 228
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (1)..(1)
<223> Глутаминовая кислота модифицирована в пироглутаминовую кислоту
(PyroGlu)

<400> 51

Glu Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro

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

<210> 52

<211> 633

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная = синтетическая конструкция

<400> 52

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccocct 60

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 120

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 180

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 240

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccacgcagaa aaccatctcc 300
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 360
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 420
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 480
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 540
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 600
cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa tga 633

<210> 53
<211> 663
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Искусственная = синтетическая конструкция

<400> 53
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 60
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc 120
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 180
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 240
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 300
ctcccagccc ccacgcagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 360
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 420
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 480
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt ctctctctac 540
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 600
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa 660
tga 663

<210> 54
<211> 1386
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Искусственная = синтетическая конструкция

<400> 54
atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctgggtc tcagtctgtg gggggcagta 60
gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tgggtgctgaa gtgtaagggg 120
gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180

tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc	240
aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag	300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt	360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggtcgtgtg tcccaataag	420
gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttggat	480
gggaagcccc tgggtgcctaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac	540
cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgacccagc ccggggagga	600
gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc tccccgaca ccgggccttg	660
cgcacagccc ccatccagcc cagtgtctgg gagcctgtgc ctctggagga ggtccaattg	720
gtggtggagc cagaaggtgg agcagtagct cctccgtcag tcttcctctt cccccaaaa	780
cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg	840
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	900
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggg cagcgtctc	960
accgtctgac accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa	1020
gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca	1080
caggtgtaca cctgcccccc atcccgatg gagctgacca agaaccaggc cagcctgacc	1140
tgcttggtca aaggcttcta tccagcagc atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1200
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgtggact ccgacggctc cttcttctc	1260
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	1320
gtgatgcatg aggtctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctcccg	1380
aatga	1386

<210> 55

<211> 1041

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная = синтетическая конструкция

<400> 55

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgtgtgtcc tcagtctgtg gggggcagta	60
gtaggtgtctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tgggtgtgaa gtgtaagggg	120
gccccaaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct	180
tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc	240
aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag	300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt	360

```

cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtcc gtcagtcttc      420
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc      480
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc      540
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt      600
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc      660
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg      720
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac      780
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg      840
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgctgt ggactccgac      900
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      960
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc    1020
tccctgtctc ccgggaaatg a                                             1041

```

<210> 56

<211> 438

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность = синтетическая конструкция

<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК

<222> (1)..(1)

<223> Глутаминовая кислота модифицирована в пироглутаминовую кислоту (PyroGlu)

<400> 56

```

Glu Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1           5           10           15

```

```

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
          20           25           30

```

```

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
          35           40           45

```

```

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
          50           55           60

```

```

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65           70           75           80

```

```

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
          85           90           95

```

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
 115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
 130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
 145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
 165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
 180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
 195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
 210 215 220

Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 225 230 235 240

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 245 250 255

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 260 265 270

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 275 280 285

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 290 295 300

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 305 310 315 320

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 325 330 335

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 340 345 350

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 355 360 365

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 370 375 380

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 385 390 395 400

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 405 410 415

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 420 425 430

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435

<210> 57

<211> 323

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность = синтетическая конструкция <213>

<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК

<222> (1)..(1)

<223> Глутаминовая кислота модифицирована в пироглутаминовую кислоту (PyroGlu)

<400> 57

Glu Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln

85 90 95
 Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 115 120 125
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 130 135 140
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 145 150 155 160
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 165 170 175
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 180 185 190
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 195 200 205
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 210 215 220
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 225 230 235 240
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 245 250 255
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 260 265 270
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 275 280 285
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 290 295 300
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 305 310 315 320
 Pro Gly Lys

