

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033437**(13) **B9**

**(12) ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К
ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(15) Информация об исправлении
Версия исправления: 1 (W1 B1)
исправления в формуле: п.8, 9, 10, 11

(51) Int. Cl. **C07K 14/735** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(48) Дата публикации исправления
2020.03.19, Бюллетень №3'2020

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.10.31

(21) Номер заявки
201590845

(22) Дата подачи заявки
2013.10.30

**(54) ФС-ГАММА-РЕЦЕПТОР IIB И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ
ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И/ИЛИ АУТОИММУННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(31) 13/663,527

(56) EP-A1-1870422
WO-A2-03043648

(32) 2012.10.30

(33) US

(43) 2015.08.31

(86) PCT/EP2013/072741

(87) WO 2014/068012 2014.05.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЗУППРЕМОЛЬ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
**Сондерман Петер, Тер Мер Доминик,
Поль Томас, Винтер Рено, Якоб Уве
(DE)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей Fc-гамма-рецептор IIB (FcγRIIB) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, обладающий повышенной растворимостью в присутствии высоких концентраций сульфата аммония; к вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту, и к клетке-хозяину, содержащей указанную нуклеиновую кислоту или указанный вектор. Настоящее изобретение также относится к рецептору FcγRIIB, полученному посредством экспрессии указанной нуклеиновой кислоты или указанного вектора в клетке-хозяине. В дополнение к этому настоящее изобретение охватывает фармацевтическую композицию для лечения или предупреждения воспалительных заболеваний и/или аутоиммунных заболеваний, содержащую заявленный рецептор. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения или предупреждения воспалительных заболеваний и/или аутоиммунных заболеваний, содержащей варианты рецептора FcγRIIB с последовательностями SEQ ID NO: 2, 3, 4 и 5.

B9**033437****033437****B9**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей Fc-гамма-рецептор IIВ (FcγRIIB) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1; вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту, и клетке-хозяину, содержащей указанную нуклеиновую кислоту или указанный вектор. Настоящее изобретение также относится к рецептору FcγRIIB, полученному посредством экспрессии указанной нуклеиновой кислоты или указанного вектора в клетке-хозяине. Кроме того, настоящее изобретение относится к рецептору FcγRIIB, кодируемому указанной нуклеиновой кислотой. В дополнение к этому настоящее изобретение охватывает фармацевтические композиции. Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей рецептор FcγRIIB с последовательностью SEQ ID NO: 2 и/или 3, при этом композиция может дополнительно содержать рецептор FcγRIIB с последовательностью SEQ ID NO: 4 и/или 5.

Предпосылки изобретения

FcγR принадлежат к семейству Fc-рецепторов (FcR), которые играют важнейшую роль в защите организма человека от инфекций. Как правило, следует различать активирующие FcγR и ингибирующие FcγR. Среди трех основных видов FcγR у человека FcγRI может связываться с мономерным IgG, тогда как FcγRII и FcγRIII связываются с поливалентными иммунными комплексами (IC), состоящими из антигенов и антител (Takai, T. *Nature Reviews Immunology* 2002: 580-592.). В зависимости от типа экспрессируемого FcR и ассоциированных с ним белков эффекторные функции, активируемые посредством FcγR, включают эндоцитоз с последующей нейтрализацией патогенов и презентацией антигена, антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), секрецию медиаторов или регуляцию выработки антител (Fridman et al. *Immunol Rev.* 1992;125:49-76, van de Winkel and Capel *Immunol Today.* 1993: 14(5):215-21).

В WO 00/32767 описываются растворимые Fc-рецепторы (FcR), которые состоят лишь из внеклеточной части рецептора и не являются гликозилированными. Из-за отсутствия трансмембранного домена и сигнального пептида данные белки присутствуют в растворимой форме и не связаны с клетками. Более того, описанные в WO 00/32767 FcR можно получить рекомбинантным путем, и они были предложены для лечения аутоиммунных заболеваний из-за их способности к связыванию с Fc-частью антител, не затрагивая другие компоненты иммунной системы. В WO 00/32767 дополнительно описывается кристаллическая структура определенных FcR и возможность поиска веществ, ингибирующих взаимодействие IgG с FcR, с помощью этих кристаллических структур. Определение кристаллической структуры обеспечивает возможность поиска таких ингибиторов путем скрининга баз данных с использованием доступных компьютерных программ. Настоящее изобретение, в котором, как указано в WO 03/043648, дальнейшее развитие получили результаты из WO 00/32767, предлагает способы лечения, в частности, таких заболеваний, как рассеянный склероз (MS), системная красная волчанка (SLE), ревматоидный артрит (RA), а также заболеваний с повышенным уровнем естественных клеток-киллеров.

В случае, когда указанные рецепторы были получены у прокариот и являлись, таким образом, негликозилированными, авторы изобретения WO 03/043648 выявили, что несмотря на то, что для негликозилированных белков ожидалась плохая растворимость, рецепторы могут быть очищены с высокими концентрациями FcγR в растворимой форме. В WO 03/043648 и других публикациях указано, что FcR играют важную роль в защитных реакциях иммунной системы.

Fc-рецепторы играют ключевую роль в иммунной системе, где они контролируют продолжительность и силу иммунного ответа. Оказалось, что, в частности, растворимый Fc-гамма-рецептор IIВ (sFcγRIIB) (т.е. внеклеточная часть Fc-гамма рецептора IIВ), который конкурирует с FcγR, экспрессируемыми на иммунных клетках, за образование патогенных иммунных комплексов, является предпочтительным в лечении аутоиммунных заболеваний. Вмешательства на ранней стадии иммунных реакций, которые возникают при аутоиммунных заболеваниях, предупреждают активацию каскада, который в результате приводит к воспалению и разрушению тканей. В частности, уже сейчас sFcγRIIB находится во II фазе клинических исследований в отношении показаний для лечения первичной иммунной тромбоцитопении (ITP) и системной красной волчанки (SLE). Как широко известно, для клинических испытаний требуется биологический материал, в данном случае sFcγRIIB, который предпочтительно характеризуется надлежащими химическими свойствами, процессом производства и контролем качества (СМС), как, например, высокой чистотой и стабильностью при очистке.

Таким образом, задачей настоящего изобретения являлось обеспечение белков FcγRIIB человека с надлежащими СМС-свойствами. Данная задача решается с помощью описанных в данном документе вариантов осуществления, воспроизведенных в формуле изобретения, поясненных в примерах и на фигурах.

Для белков, таких как описанные в данном документе, было показано, что можно достичь более высокого уровня очистки в связи с лучшей растворимостью при концентрациях сульфата аммония, превышающих 1,5 М. В качестве первого этапа во многих схемах очистки применяют осаждение сульфатом аммония для удаления значительных количеств загрязняющих белков. Чем выше концентрации сульфата аммония, тем лучше, если целью является получение белка высокой чистоты, но при этом белок подвергается большему воздействию из-за высокой ионной силы сульфата аммония. Таким образом, чем большей является устойчивость белка к воздействию, тем выше может быть концентрация сульфата аммония

и соответственно тем более высокой будет чистота белка. Более конкретно, посредством добавления космотропного сульфата аммония осаждают побочные продукты, такие как несвернутые и неправильно свернутые молекулы, а также примеси, происходящие из клеток-хозяев, например компоненты клеточной стенки и белки. С повышением концентрации осаждающего средства эффективность осаждения будет повышаться, и в результате получают высокоочищенный препарат белка при условии, что белок, представляющий интерес, является устойчивым к осаждению при таких высоких концентрациях сульфата аммония. Как уже сказано, оказалось, что описанный в данном документе белок FcR является сильно-растворимым при концентрациях сульфата аммония, равных или превышающих 1,5 М. Это было неожиданным, поскольку белки FcR, известные из предшествующего уровня техники, характеризовались различным поведением, как показано в примерах, и не существовало никаких доступных руководств по модификации белка FcR таким образом, чтобы он характеризовался такими же поведением и свойствами, как и белок FcR, который предусматривается в настоящем изобретении. Как уже говорилось, оказалось, что описанные в данном документе белки в действительности являются устойчивыми к высоким концентрациям сульфата аммония, что, тем самым, обеспечивает возможность надлежащей очистки в сравнении с белками FcγRIIB, известными из предшествующего уровня техники, такими как белки FcγRIIB, описанные в WO 00/32767 или WO 03/043648.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей Fc-гамма-рецептор IIB (FcγRIIB) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор FcγRIIB с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. Кроме того, настоящее изобретение также относится к рецептору FcγRIIB, полученному посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей рецептор FcγRIIB с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, или вектора по настоящему изобретению в клетке-хозяине, предпочтительно в прокариотической клетке-хозяине, более предпочтительно в клетке *E. coli*.

В дополнение, настоящее изобретение также относится к рецептору FcγRIIB, кодируемому указанной нуклеиновой кислотой.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей рецептор FcγRIIB, полученный посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей рецептор FcγRIIB с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, или вектора по настоящему изобретению в клетке-хозяине.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рецептор FcγRIIB с последовательностью SEQ ID NO: 2 и/или 3. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит рецептор FcγRIIB с последовательностью SEQ ID NO: 4 и/или 5. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению характеризуется количеством рецептора FcγRIIB с последовательностью SEQ ID NO: 2, которое превышает количество рецептора FcγRIIB с последовательностью SEQ ID NO: 3.

В другом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению характеризуется количеством рецептора FcγRIIB с последовательностью SEQ ID NO: 2, которое превышает количество рецептора FcγRIIB с последовательностью SEQ ID NO: 3, и количеством рецепторов FcγRIIB с последовательностью SEQ ID NO: 2 и 3, которое превышает количество рецепторов FcγRIIB с последовательностью SEQ ID NO: 4 и/или 5.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей указанную нуклеиновую кислоту, кодирующую рецептор FcγRIIB с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, или к клетке-хозяину, содержащей вектор по настоящему изобретению, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты по п.1 формулы изобретения.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин по настоящему изобретению представляет собой прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина.

В другом варианте осуществления по настоящему изобретению прокариотическая клетка-хозяин является клеткой *E. coli*, предпочтительно *E. coli* BL21, как, например, BL21 (DE3).

Графические материалы

Фиг. 1. а) Кристаллическая структура sFcγRIIB (идентификатор в базе PDB: 2FCB). Инвариантная структура сердцевин, представленная аминокислотной последовательностью варианта 1 (SEQ ID NO: 7), которая является идентичной для всех вариантов sFcR, тестируемых в данном исследовании, показана темно-серым, петли, которые предположительно являются важными для связывания с IgG, показаны светло-серым, а N- и C-концевые удлинения показаны черным. Два дисульфидных мостика изображены в виде шаростержневой модели. Идентичность структуры сердцевин у всех тестируемых вариантов также видна из выравнивания последовательностей, показанного на фиг. 1b;

б) выравнивание последовательностей вариантов sFcR 1-4 (сокращенно "вар."), применяемое в данном исследовании. SEQ ID NO: был сокращен до SEQ.

Фиг. 2. Результаты анализа осаждения FcR. Варианты FcR 1-4 инкубировали в течение 1 ч при 25°C

при указанных рН и концентрации сульфата аммония. После центрифугирования определяли содержание FcR в надосадочной жидкости путем измерения при OD280, и строили график его зависимости от концентрации сульфата аммония.

Последовательности.

Следующие последовательности представляют собой обзор использованных в данном документе последовательностей.

SEQ ID NO: 1 (иногда в данном документе обозначается как "вариант 3")

MAPPKAVLKL EPQWINVLQE DSVTLTCRGT HSPESDSIQW FHNGNLIPTH
TQPSYRFKAN NDSGEYTCQ TGQTSLSDPV HLTVLSEWLV LQTPHLEFQE
GETIVLRCHS WKDKPLVKVT FFQNGKSKKF SRSDPNFSIP QANHSMSGDY
HCTGNIGYTL YSSKPVTITV QAPSSSP

SEQ ID NO: 2

APPKAVLKLE PQWINVLQED SVTLTCRGTH SPESDSIQWF HNGNLIPHTH
QPSYRFKANN NDSGEYTCQT GQTSLSDPVH LTVLSEWLV LQTPHLEFQEG
ETIVLRCHSW KDKPLVKVTF FQNGKSKKFS RSDPNFSIPQ ANHSMSGDYH
CTGNIGYTLY SSKPVTITVQ APSSSP

SEQ ID NO: 3

PPKAVLKLEP QWINVLQEDS VTLTCRGTHS PESDSIQWFH NGNLIPHTHTQ
PSYRFKANNN DSGEYTCQTG QTSLSDPVHL TVLSEWLV LQTPHLEFQEGE
TIVLRCHSWK DKPLVKVTF FQNGKSKKFSR SDPNFSIPQA NHSMSGDYHC
TGNIGYTLYS SKPVTITVQA PSSSP

SEQ ID NO: 4

PKAVLKLEPQ WINVLQEDSV TLTCRGTHSP ESDSIQWFHN GNLIPTHTQP
SYRFKANND SGEYTCQTGQ TSLSDPVHLT VLSEWLV LQTPHLEFQEGET
IVLRCHSWKD KPLVKVTF FQNGKSKKFSR DPNFSIPQA NHSMSGDYHCT
GNIGYTLYSS KPVITITVQAP SSSP

SEQ ID NO: 5

AVLKLEPQWI NVLQEDSVTL TCRGTHSPES DSIQWFHNGN LIPTHTQPSY
RFKANNDSDG EYTCQTGQTS LSDPVHLTVL SEWLV LQTPHLEFQEGETIV
LRCHSWKDKP LVKVTF FQNGKSKKFSR DPNFSIPQA NHSMSGDYHCTGN
IGYTLYSSKP VTITVQAPSS SP

SEQ ID NO: 6

atggcaccgc cgaagcagct tctgaaactg gaaccgcagct ggattaacgt tctgcaggaa gatagcggtta
ccctgacctg tcgtggcacc catagcccgga aaagcagatg cattcagctgg ttccacaacg gcaatctgat
tccgaccat acccagccga gctatcggtt taaagcgaac aacaacgata gcggcggaata tacctgtcag
accggtcaga ccagcctgag cgatccggtt catctgaccg ttctgagcga atggctggtt ctgcagacc
cgcatctgga attcaggaa ggcgaaccca ttgttctcgc ttgccacagc tggaaagata aaccgctggt
taaagttacc ttctccaga acggcaaaag caaaaaattc agccgtagcg atccgaatt tagcattccg
caggcgaatc atagccatag cggcgattat cattgtaccg gcaacattgg ctataccctg tatagcagca
aaccggtgac cattaccgtt caggcgccga gcagcagccc gtaa

SEQ ID NO: 7 (иногда в данном документе обозначается как "вариант 1", данная последовательность раскрыта под SEQ ID NO: 1 в WO 03/043648)

MAVLKLEPQW INV LQEDSVTL TCRGTHSPE SDSIQWFHNG NLIPTHTQPS
YRFKANNDSD GEYTCQTGQT SLSDPVHLTV LSEWLV LQTPHLEFQEGETI
VLRCHSWKDK PLVKVTF FQNGKSKKFSRSD PNFSIPQANH SHSGDYHCTG
NIGYTLYSSK PVTITV

SEQ 8 (иногда в данном документе обозначается как "вариант 2", данная последовательность раскрыта под SEQ ID NO: 3 в WO 00/32767)

MGTAAAPPKA VLKLEPQWIN VLQEDSVTLT CRGTHSPESD SIQWFHNGNL
IPTHTQPSYR FKANNNDSDGE YTCQTGQTS SLPVHLTVLS EWLVLQTPHL
EFQEGETIVL RCHSWKDKPL VKVTF FQNGKSKKFSRSDPN FSIPQANHS
SGDYHCTGNI GYTLYSSKPV TITVQAPSS PMGII

SEQ ID 9 (иногда в данном документе обозначается как "вариант 4")

MTPAAPPKAV LKLEPQWINV LQEDSVTLTC RGTHSPESD SIQWFHNGNL
PTHTQPSYR FKANNDSDGEY TCQTGQTSLS DPVHLTVLSE WLV LQTPHLE
FQEGETIVLR CHSWKDKPLV KVTF FQNGKSKKFSRSDPN FSIPQANHS
GDYHCTGNIG YTLYSSKPV ITVQAPSSSP MGI

Подробное описание изобретения

Следует отметить, что используемые в данном документе формы единственного числа предусматривают определяемые объекты во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Таким

образом, например, ссылка на "реагент" включает один или несколько таких различных реагентов, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные этапы и способы, известные специалисту в данной области, которые могут быть модифицированы или заменены способами, описанными в данном документе.

Все публикации и патенты, упоминаемые в данном раскрытии, включены посредством ссылки во всей их полноте. В тех случаях, когда материал, включенный посредством ссылки, противоречит или не соответствует данному описанию, данное описание будет превалировать над любым таким материалом.

Если не указано иное, выражение "по меньшей мере", предшествующее ряду элементов, следует понимать как ссылку на каждый элемент в данном ряду. Специалисты в данной области признают или будут способны выявить с помощью всего-навсего обычных экспериментов многие эквиваленты для конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что подобные эквиваленты охватываются настоящим изобретением.

Во всем данном описании и следующей за ним формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа, или этапа, или группы целых чисел или этапов, но не исключение какого-либо другого целого числа, или этапа, или группы целых чисел или этапов. При использовании в данном документе выражение "содержащий" можно заменять выражением "включающий в себя" или иногда при использовании в данном документе выражением "имеющий".

При использовании в данном документе "состоящий из" исключает какой-либо элемент, этап или ингредиент, не указанный в элементе пункта формулы изобретения. При использовании в данном документе "состоящий главным образом из" не исключает материалы или этапы, которые существенно не влияют на основные и новые признаки пункта формулы изобретения.

В каждом случае в данном документе какое-либо из выражений "содержащий", "состоящий главным образом из" и "состоящий из" может быть заменено любым из двух других выражений.

Некоторые документы упоминаются во всем тексте данного описания. Каждый из документов, упоминающихся в данном документе (в том числе все патенты, заявки на патенты, научные публикации, технические требования производителя, инструкции и т.д.) выше или ниже, настоящим включен в данное описание посредством ссылки в своем полном объеме. В данном документе ничто не следует истолковывать как признание того, что настоящее изобретение не может быть противопоставлено такому раскрытию в качестве более раннего изобретения.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок SEQ ID NO: 1.

Используемые в данном документе выражения "нуклеиновые кислоты" и "нуклеотидные последовательности" или "последовательность нуклеиновой кислоты" включают молекулы ДНК (например, кДНК или геномной ДНК), молекулы РНК (например, мРНК), комбинации молекул ДНК и РНК или гибридные молекулы ДНК/РНК и аналоги молекул ДНК или РНК. Такие аналоги могут быть созданы с использованием, например, аналогов нуклеотидов, которые включают, без ограничения, инозин или тритилированные основания. Такие аналоги могут также включать молекулы ДНК или РНК, содержащие модифицированные остовы, которые придают благоприятные свойства молекулам, такие как, например, устойчивость к нуклеазам или повышенная способность к преодолению клеточных мембран. Нуклеиновые кислоты или нуклеотидные последовательности могут быть одноцепочечными, двухцепочечными, могут содержать как одноцепочечные, так и двухцепочечные участки, а также могут содержать трехцепочечные участки, но предпочтительно представляют собой двухцепочечную ДНК.

Можно осуществлять разнообразные модификации по отношению к ДНК и РНК; поэтому выражение "молекулы нуклеиновых кислот" или "последовательность нуклеиновой кислоты" охватывает формы, модифицированные химическим, ферментативным или метаболическим путем. Например, молекулы нуклеиновых кислот или последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть подвергнуты посттрансляционным или посттранскрипционным модификациям.

Последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует белок SEQ ID NO: 1. Последовательность кодируемого полипептида SEQ ID NO: 1 может быть модифицирована посредством посттрансляционных или посттранскрипционных модификаций в зависимости от клетки-хозяина, в которой экспрессируется кодируемый полипептид SEQ ID NO: 1.

При использовании в данном документе "белок SEQ ID NO: X", где X равен 1, 2, 3, 4, 5 или 9, означает белок с аминокислотной последовательностью, показанной или приведенной под SEQ ID NO: X, где X равен 1, 2, 3, 4, 5 или 9.

При использовании в данном документе выражение "полипептид" или "белок" означает пептид, белок или полипептид, которые используются взаимозаменяемо и которые охватывают аминокислотные цепи определенной длины, где аминокислотные остатки соединены ковалентными пептидными связями. Тем не менее, также охвачены настоящим изобретением пептидомиметики таких белков/полипептидов, где аминокислота (аминокислоты) и/или пептидная связь (пептидные связи) были замещены функциональными аналогами, а также аминокислоты, отличные от 20 аминокислот, кодируемых генетическим кодом, такие как селеноцистеин. Пептиды, олигопептиды и белки могут называться полипептидами. Как

было упомянуто, в данном документе выражения "полипептид" и "белок" часто используются взаимозаменяемо. Выражение "полипептид" также относится к модификациям полипептида и не исключает их. Модификации включают гликозилирование, ацетилирование, ацилирование, фосфорилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гемового фрагмента, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидных связей, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование ГФИ-якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, добавление аминокислот к белкам, опосредованное транспортной РНК, такое как аргинилирование и убиквитинирование; см., например, PROTEINS STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983), pgs. 1-12; Seifter, Meth. Enzymol. 182 (1990); 626-646, Rattan, Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992); 48-62.

Белки по настоящему изобретению приведены под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 9. Таким образом, настоящее изобретение предлагает белки, приведенные под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 9.

Выражение "экспрессия" или "экспрессия последовательности нуклеиновой кислоты" означает транскрипцию конкретной нуклеиновой кислоты или конкретного генетического конструкта. В частности, выражение "экспрессия" или "экспрессия нуклеиновой кислоты" означает транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты или генетического конструкта, такого как вектор, содержащий нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 1, в структурную РНК (рРНК, тРНК) или мРНК с дальнейшей трансляцией или без дальнейшей трансляции последней в белок. Белок предпочтительно затем подвергается трансляции. Процесс включает транскрипцию ДНК и процессинг полученного в результате мРНК-продукта. Затем мРНК транслируется в полипептидные цепи, которые в конечном итоге сворачиваются в конечные полипептиды/белки. Экспрессия белков широко используется исследователями в области протеомики для обозначения определения наличия или распространенности одного или нескольких белков в конкретной клетке или ткани. Экспрессию белка в клетке можно определять посредством различных способов. Например, с помощью иммуногистохимического анализа или вестерн-блот-анализа. В данном случае полученные результаты можно оценить путем сравнения клетки, трансфицированной вектором, содержащим нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, с ложнотрансфицированной клеткой. Клетка с более высокой экспрессией (клетка-хозяин) демонстрирует окрашивание, интенсивность которого является повышенной, например, по сравнению с контрольной клеткой (ложная трансфекция) в тех же условиях. Также можно измерить экспрессию мРНК, например, с помощью ОТ-ПЦР. Специалист в данной области владеет различными методиками определения экспрессии определенного белка или мРНК в клетке. Также предусматриваются белки, полученные в результате посттранскрипционных или посттрансляционных модификаций.

"Вариант" полипептида охватывает полипептид, где имеет место замена, предпочтительно консервативная замена, одного или нескольких аминокислотных остатков по сравнению с указанным полипептидом, и где указанный вариант предпочтительно способен к связыванию с Fc-частью антител (см. связывание FcγR) и, возможно, с лимфоцитами. Такие варианты содержат делеции, вставки, инверсии, повторы и замены, выбранные согласно основным правилам, известным в данной области техники. Например, руководство относительно осуществления фенотипически "молчащих" аминокислотных замен приведено в Bowie, Science 247: (1990) 1306-1310, где авторы указывают, что существуют две основные стратегии изучения устойчивости аминокислотной последовательности к изменению. Предпочтительные варианты FcγRIIB, приведенные под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 9, причем FcγRIIB приведен под SEQ ID NO: 1, являются предпочтительными.

Выражение "Fc-гамма-рецептор" используется в данном документе взаимозаменяемо с "FcγR", или "FcγR-рецептором", или "FcγR" и включает как мембранные FcγR, так и растворимые (например, внеклеточную часть FcγR-рецептора) FcγR. Fc-гамма-рецепторы относятся к надсемейству белков-иммуноглобулинов и были выявлены на многих ростках кроветворения. Как указывает их название, Fc-рецепторы распознают Fc-часть антител (кристаллизуемый фрагмент), т.е. фрагмент, соответствующий двум C-концевым доменам обеих тяжелых цепей антитела и, как правило, взаимодействующий с эффекторными молекулами и клетками, и связываются с ней.

Предпочтительно, если белок SEQ ID NO: 1 представляет собой FcγR. Аналогично, предпочтительно, если белок SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 или 9 представляет собой FcγR. Также предпочтительно, если белок SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 9 как таковой является растворимым в подходящей жидкости, такой как вододержащая жидкость.

FcγR распознают антитела IgG. У человека существует четыре подкласса IgG, называемые в порядке их распространенности в сыворотке крови (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, при этом IgG1 является наиболее распространенным типом IgG). У человека существует три класса FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и

FcγRIIIA (CD16). Кроме того, FcγR встречаются в различных изоформах, т.е. включают функционально сходные Fc-гамма-рецепторы, которые имеют сходную, но не идентичную аминокислотную последовательность. Указанные изоформы включают FcγRIA, B1, B2, C; FcγRIIA1-2, B1-3, C и, помимо этого, несколько аллельных вариантов (FcγRIIa1-HR, -LR; FcγRIIb-NA1, -NA2) (van de Winkel and Capel, Immunol. Today 1993, 14:215-221). Различные классы и изоформы FcγR могут отличаться по их аффинности к IgG и, в частности, к различным подклассам IgG. Как правило, FcγR встречаются в виде трансмембранных белков типа I или в виде растворимых форм, но также существует форма FcγRIII (FcγRIIIB) с гликозил-фосфатидилинозитоловым якорем.

"Растворимые FcγR" также обозначают как "sFcγR". Используемое в данном документе выражение "растворимый FcγR-рецептор" и аналогичные выражения относятся к внеклеточной части FcγR-рецептора. Такая часть может быть растворена в жидкости. В целом, растворимые формы любых класса, изоформы или аллельного варианта FcγR можно идентифицировать по предшествующей "s", например sCD32 или sFcγRII относится к растворимому Fc-гамма-рецептору RII. Как правило, в отличие от мембранного (т.е. мембраносвязанного) FcγR, растворимый FcγR не содержит трансмембранный участок или внутрицитоплазматический "хвост".

FcγR по настоящему изобретению предпочтительно происходит от человека или представляет собой FcγR человека. Выражение "происходящий от человека" следует истолковывать в самом широком смысле. В целом, оно означает, что FcγR (или его участок или фрагмент) имеет сходство или подобие с FcγR человека (т.е. данный белок выявлен в организме человека) по аминокислотной последовательности и/или структуре.

В качестве альтернативы FcγR, "происходящий от человека", может быть рекомбинантным FcγR, полученным путем экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, например, как описано у Sondermann and Jacob (1999), Biol. Chem. 380(6), 717-721. Вкратце, ген, представляющий интерес, получают из организма и вводят в вектор, например плазмиду или вирус, который затем применяют для переноса гена в клетку-хозяина, в которой экспрессируется рекомбинантный ген и вырабатывается рекомбинантный белковый продукт. Специалист в данной области без труда поймет, какую клетку-хозяина выбрать для того, чтобы получить FcγR, который, например, является подходящим для получения фармацевтической композиции. Например, в некоторых вариантах осуществления может требоваться негликозилированный FcγR. Затем специалист в данной области может выбрать прокариотическую клетку-хозяина для экспрессии FcγR, лишенную ферментативного аппарата, необходимого для гликозилирования белка. В одном варианте осуществления FcγR можно экспрессировать у прокариот и в дальнейшем очищать и подвергать рефолдингу в соответствии с описанием в WO 00/32767.

В другом варианте осуществления можно легко и недорого получать FcγR высокой чистоты в эукариотических системах экспрессии. Пригодные системы включают клетки эукариот со специализированным аппаратом для выработки внеклеточных белков, например В-клетки. Другие возможные эукариотические системы экспрессии включают, без ограничения, клетки CHO или HEK. Следовательно, указанный растворимый FcγR является рекомбинантным, растворимым и гликозилированным FcγR.

FcγR, как указано в данном документе, дополнительно охватывает FcγR, которые по сравнению с FcγR дикого типа были модифицированы или изменены по аминокислотной последовательности и включают, например, дополнительные сайты гликозилирования и т.п. Тем не менее, также предусмотрены негликозилированные формы FcγR, и они представляют предпочтительный вариант осуществления FcγR.

Fcγ-рецептор по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну из аминокислотных последовательностей, приведенную под SEQ ID NO: 1 (аминокислотную последовательность SM101, также обозначенную в данном документе как вариант 3). FcγR по настоящему изобретению кодируется по меньшей мере одной из последовательностей нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 6 (последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей SM101, также обозначенную в данном документе как вариант 3). Данные последовательности можно клонировать в вектор экспрессии для получения соответствующего FcγR путем рекомбинантной экспрессии.

Настоящее изобретение относится к вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SEQ ID NO: 1. Такой вектор может представлять собой, например, плазмиду, космиду, вирус, бактериофаг или другой вектор, традиционно используемый, например, в генной инженерии, и может содержать дополнительные гены, такие как маркерные гены, которые обеспечивают возможность отбора и/или репликации указанного вектора в подходящей клетке-хозяине и в подходящих условиях. В предпочтительном варианте осуществления указанный вектор представляет собой вектор экспрессии, в котором молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению функционально связана с последовательностью (последовательностями), контролирующей (контролирующими) экспрессию, что обеспечивает возможность экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, описанных в данном документе. Используемое в данном контексте выражение "функционально связанный" относится к связи между одной или несколькими последовательностями, контролирующими экспрессию, и к кодирующему участку в полинуклеотиде, подлежащем экспрессии, таким образом, чтобы экспрессия осуществлялась в условиях, соответствующих для последовательности, контролирующей

экспрессию.

Таким образом, молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут быть встроены в несколько коммерчески доступных векторов.

Неограничивающие примеры включают плазмидные векторы, совместимые с клетками млекопитающих, такие как pUC, pBluescript (Stratagene), pET (Novagen), pREP (Invitrogen), pCRTopo (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1 neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pUCTag, pIZD35, pLXIN и pSIR (Clontech), а также pIRES-EGFP (Clontech). Молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению предпочтительно встраивают в вектор "pET" под контролем промотора T7, индуцируемого IPTG. Бакуловирусные векторы, такие как pBlueBac, бакуловирусная система экспрессии BacPacz (CLONTECH), а также бакуловирусная система экспрессии MaxBacTM, клетки насекомых и протоколы (Invitrogen) являются коммерчески доступными и также могут применяться для получения биологически активного белка с высоким выходом (см. также Miller (1993), Curr. Op. Genet. Dev., 3, 9; O'Reilly, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, p. 127). Кроме того, прокариотические векторы, такие как pcDNA2, и дрожжевые векторы, такие как pYes2, являются неограничивающими примерами других векторов, доступных для применения в настоящем изобретении.

Другими предпочтительными векторами экспрессии согласно настоящей заявке являются таковые, которые используют для экспрессии белков в клетках *Drosophila*, хорошо известных в данной области, такие как векторы серии DES2 от Invitrogen. Указанным вектором экспрессии в клетках *Drosophila* предпочтительно является pMTBiP/V5-His B (Invitrogen). Вектор pMT/BiP/V5-His предоставляет следующие дополнительные свойства. Он характеризуется малым размером (3,6 т.п.о.) для улучшения выходов ДНК и повышения эффективности субклонирования, он имеет С-концевую эпитопную метку V5 для быстрого выявления с помощью антитела к V5, и он имеет С-концевую метку 6×His для простой очистки рекомбинантных белков слияния с использованием системы никель-хелатообразующая смола.

В отношении методик модификации векторов см. Sambrook and Russel (2001), loc. cit. Векторы могут содержать одну или несколько систем репликации и наследования для клонирования или экспрессии, один или несколько маркеров для отбора у хозяина, например маркер устойчивости к антибиотикам, и одну или несколько кассет экспрессии.

Кодирующие последовательности, встраиваемые в вектор, можно синтезировать с помощью стандартных способов, выделять из природных источников или получать в виде гибридов. Лигирование кодирующих последовательностей с элементами, регулирующими транскрипцию (например, с промоторами, энхансерами и/или инсульторами) и/или с другими последовательностями, кодирующими аминокислоты, можно осуществлять с использованием общепринятых способов.

Кроме того, помимо последовательностей нуклеиновых кислот по настоящему изобретению векторы могут содержать элементы, контролирующие экспрессию, что обеспечивает возможность надлежащей экспрессии кодирующих участков у подходящих хозяев. Такие контролирующие элементы известны специалисту в данной области и могут включать промотор, кодон инициации трансляции, сайт инициации трансляции и встраивания или участки внутренней посадки рибосомы (IRES) (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476) для введения вставки в вектор. Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению предпочтительно функционально связана с указанными последовательностями, контролирующими экспрессию, что обеспечивает возможность экспрессии в эукариотических или прокариотических клетках.

Контролирующие элементы, обеспечивающие экспрессию в эукариотических и прокариотических клетках, хорошо известны специалистам в данной области. Как упомянуто выше, обычно они содержат регуляторные последовательности, обеспечивающие инициацию транскрипции, и необязательно сигналы поли-А, обеспечивающие терминацию транскрипции и стабилизацию транскрипта. Дополнительные регуляторные элементы могут включать транскрипционные, а также трансляционные энхансеры и/или связанные в естественных условиях или гетерологичные промоторные участки. Возможные регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в, например, клетках-хозяевах млекопитающих, включают в себя промотор гена тимидинкиназы CMV-HSV, SV40, промотор RSV (вируса саркомы Рауса), промотор гена фактора элонгации трансляции 1-альфа человека, энхансер CMV, промотор гена киназы CaM или энхансер SV40.

Для экспрессии в прокариотических клетках было описано множество промоторов, в том числе, например, tac-lac-промотор, lacUV5- или trp-промотор. Помимо элементов, которые отвечают за инициацию транскрипции, такие регуляторные элементы могут также включать в себя сигналы терминации транскрипции, как, например, сайт поли-А SV40 или сайт поли-А гена tk, ниже полинуклеотида. В данном контексте из уровня техники известны подходящие векторы экспрессии, как, например, вектор экспрессии кДНК по методу Окаямы-Берга pcDV1 (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-VitroGene, применяемый, помимо прочего, в прилагаемых примерах), pSPORT1 (GIBCO BRL) или pGEMHE (Promega), или векторы экспрессии у прокариот, такие как лямбда gt11.

Вектор экспрессии согласно настоящему изобретению, по меньшей мере, способен управлять репликацией и предпочтительно экспрессией нуклеиновых кислот и белков по настоящему изобретению.

Подходящие точки начала репликации включают, например, Col E1, точки начала репликации вируса SV40 и M 13. Подходящие промоторы включают, например, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор lacZ, промотор gal10 и промотор гена полиэдрина вируса множественного ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcMNPV). Подходящие терминирующие последовательности включают, например, последовательность гена гормона роста крупного рогатого скота, SV40, lacZ и сигналы полиаденилирования гена полиэдрина AcMNPV. Примеры селективных маркеров включают ген устойчивости к неомицину, ампициллину и гиромоцину и т.п., предпочтительно к канамицину. Специально сконструированные векторы обеспечивают возможность челночного переноса ДНК между различными клетками-хозяевами, как, например, между клетками бактерий и дрожжей, или клетками бактерий и животных, или клетками бактерий и грибов, или клетками бактерий и беспозвоночных животных.

Помимо молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению вектор может дополнительно содержать последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие сигналы секреции. Такие последовательности, кодирующие сигналы секреции, хорошо известны специалисту в данной области. Кроме того, в зависимости от используемой системы экспрессии к кодирующей последовательности молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению можно добавлять лидерные последовательности, способные направлять экспрессируемый полипептид в клеточный компартмент, и они хорошо известны в данной области техники. Лидерная (лидерные) последовательность (последовательности) в соответствующей фазе собираются в комплекс с последовательностями инициации и терминации трансляции, и предпочтительно лидерная последовательность способна направлять секрецию транслируемого белка или его части, помимо прочего, во внеклеточную мембрану. Гетерологичная последовательность необязательно может кодировать белок слияния, содержащий C- или N-концевой сигнальный пептид, придающий требуемые характеристики, например стабильность или облегченную очистку экспрессируемого рекомбинантного продукта. После внедрения вектора в геном соответствующего хозяина данного хозяина поддерживают в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей, и при необходимости после этого можно осуществлять сбор и очистку белков, антигенных фрагментов или белков слияния по настоящему изобретению. Разумеется, вектор также может содержать регуляторные участки от патогенных организмов.

Данный вектор предпочтительно может представлять собой индуцируемый вектор экспрессии, например вектор, индуцируемый IPTG.

Кроме того, указанный вектор может также представлять собой, помимо вектора экспрессии, вектор для переноса генов и/или для направленного воздействия на гены. Генная терапия, которая основывается на введении терапевтических генов (например, для вакцинации) в клетки посредством методик *ex vivo* или *in vivo*, представляет собой один из наиболее важных путей применения переноса генов. Подходящие векторы, системы векторов и способы для генной терапии *in vitro* или *in vivo* описаны в литературе и известны специалисту в данной области; см., например, Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957; Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640 или Verma, *Nature* 389 (1997), 239-242 и упоминаемые в данном документе литературные источники.

Молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению и векторы, описанные в данном документе выше, могут быть предназначены для непосредственного введения или введения посредством липосом или вирусных векторов (например, аденовирусных, ретровирусных) в клетку. Дополнительно, бакуловирусные системы или системы на основе вируса осповакцины или вируса леса Семлики можно использовать как системы экспрессии у эукариот для молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. В дополнение к получению рекомбинантным путем фрагменты белка, белок слияния или антигенные фрагменты по настоящему изобретению можно получать посредством прямого синтеза пептидов с использованием твердофазных методик (см. Stewart et al. (1969) *Solid Phase Peptide Synthesis*; Freeman Co, San Francisco; Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963), 2149-2154). Синтез белка *in vitro* можно проводить с помощью ручных методик или в автоматическом режиме. Автоматизированный синтез может выполняться с использованием, например, синтезатора пептидов Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Фостер-Сити, Калифорния) в соответствии с инструкциями, предоставленными производителем. Различные фрагменты можно синтезировать химическим путем по отдельности и вместе, используя химические способы получения молекулы полной длины.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SEQ ID NO: 1, или к вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SEQ ID NO: 1.

Указанный "хозяин" может быть получен путем введения указанного вектора или нуклеотидной последовательности в клетку-хозяина, которые при их наличии в клетке опосредуют экспрессию белка, кодируемого нуклеотидной последовательностью по настоящему изобретению, или содержит нуклеотидную последовательность или вектор согласно настоящему изобретению, где нуклеотидная последовательность и/или кодируемый полипептид являются чужеродными для клетки-хозяина. При использовании в данном документе выражение "хозяин" включает клетки-хозяева.

Под "чужеродным" подразумевается, что нуклеотидная последовательность и/или кодируемый полипептид либо являются гетерологичными по отношению к хозяину, что означает, что они происходят из клетки или организма с иным геномным окружением, либо являются гомологичными по отношению к хозяину, но находятся в иной геномной среде, чем встречающийся в природе аналог указанной нуклеотидной последовательности. Это означает, что если нуклеотидная последовательность является гомологичной по отношению к хозяину, то она не находится в ее естественном местоположении в геноме указанного хозяина, в частности, она окружена другими генами. В данном случае нуклеотидная последовательность может либо находиться под контролем ее собственного промотора, либо находиться под контролем гетерологичного промотора. Местоположение введенной молекулы нуклеиновой кислоты или вектора может определить специалист в данной области с помощью методик, хорошо известных специалисту в данной области, например Саузерн-блоттинга. Вектор или нуклеотидная последовательность согласно настоящему изобретению, присутствующие у хозяина, либо могут интегрироваться в геном хозяина, либо могут сохраняться в качестве определенного внехромосомного элемента. При этом следует также понимать, что нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению можно применять для восстановления или создания мутантного гена посредством гомологичной рекомбинации.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SEQ ID NO: 1, или вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SEQ ID NO: 1, является прокариотической или эукариотической клеткой-хозяином. Прокариотическая клетка-хозяин предпочтительно является клеткой *E. coli*, более предпочтительно *E. coli* BL21, как, например, BL21 (DE3).

Подходящими прокариотическими/бактериальными клетками являются таковые, обычно используемые для клонирования, такие как клетки *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* или *Bacillus subtilis*. Указанный эукариотический хозяин может представлять собой клетку млекопитающего, клетку земноводного, клетку рыбы, клетку насекомого, грибную клетку, растительную клетку или бактериальную клетку (например, штаммов HB101, DH5a, XL1 Blue, Y1090 и JM101 *E. coli*). Прокариотические рекомбинантные клетки-хозяева являются предпочтительными, при этом клетка *E. coli* является наиболее предпочтительной.

Дополнительные примеры эукариотических клеток-хозяев включают, без ограничения, клетки дрожжей, например клетки *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* или *Pichia pastoris*, линии клеток, полученные от человека, коров, свиней, обезьян и грызунов, а также клетки насекомых, в том числе, без ограничения, клетки насекомого *Spodoptera frugiperda* и клетки насекомого, полученные от *Drosophila*, а также клетки данио-рерио. Подходящие для применения и коммерчески доступные линии клеток, полученные от млекопитающих, включают, без ограничения, клетки L, клетки CV-1, клетки COS-1 (ATCC CRL 1650), клетки COS-7 (ATCC CRL 1651), клетки HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26) и MRC-5 (ATCC CCL 171).

Указанные клетки, полученные от *Drosophila*, могут представлять собой клетки *Drosophila* S2 (ATCC CRL-1963), которые предпочтительно применяются для гетерологичной экспрессии белка в системах экспрессии у *Drosophila*, например в системе экспрессии у *Drosophila* DES®.

Подходящие для применения и коммерчески доступные линии клеток, полученные от видов млекопитающих, включают, без ограничения, клетки L, клетки CV-1, клетки COS-1 (ATCC CRL 1650), клетки COS-7 (ATCC CRL 1651), клетки HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26) и MRC-5 (ATCC CCL 171).

В другом более предпочтительном варианте осуществления указанная клетка земноводного представляет собой ооцит. В еще более предпочтительном варианте осуществления указанный ооцит является ооцитом лягушки, особенно предпочтительным является ооцит *Xenopus laevis*.

В более предпочтительном варианте осуществления хозяин согласно настоящему изобретению представляет собой трансгенный организм, отличный от человека. Указанный организм, отличный от человека, может представлять собой млекопитающее, земноводное, рыбу, насекомое, гриб или растение. Особенно предпочтительными трансгенными животными, отличными от человека, являются виды *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, виды *Xenopus*, данио-рерио, *Spodoptera frugiperda*, *Autographa californica*, мыши и крысы. Трансгенные растения включают, без ограничения, пшеницу, табак, петрушку и *Arabidopsis*. Трансгенные грибы также хорошо известны из уровня техники и включают, помимо прочего, дрожжи, такие как *S. pombe* или *S. cerevisiae*, или виды *Aspergillus*, *Neurospora* или *Ustilago*, или виды *Pichia*.

Настоящее изобретение также относится к белку, полученному или получаемому посредством экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок SEQ ID NO: 1, или вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SEQ ID NO: 1, в клетке-хозяине, предпочтительно в прокариотической клетке-хозяине, более предпочтительно в клетке *E. coli*, наиболее предпочтительно в клетке *E. coli* BL21, такой как *E. coli* BL21 (D3).

В данном документе описан способ получения полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включающий культивирование/выращивание хозяина по настоящему изобретению и выделение полученного полипептида.

В данной области существует большое количество способов, подходящих для получения полипептидов в соответствующих хозяевах. Если хозяин является одноклеточным организмом или клеткой млекопитающего или насекомого, специалист в данной области может обратиться к различным условиям культивирования, которые могут быть в дальнейшем оптимизированы без излишних трудозатрат. Обычно получаемый белок собирают из культуральной среды или из выделенных (биологических) телец-включений с помощью общепринятых методик. Кроме того, получаемый полипептид можно выделить непосредственно из клетки-хозяина. Указанная клетка-хозяин может быть частью организма-хозяина или может быть получена из части организма-хозяина, например, указанная клетка-хозяин может быть частью ткани, например ЦНС, кожи и т.д., животного или пригодной для заготовки части растения. Дополнительно, получаемый полипептид можно выделить из жидкостей, полученных от указанного хозяина, таких как кровь, молоко или спинномозговая жидкость.

Дополнительно, настоящее изобретение также относится к полипептидам, кодируемым последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок SEQ ID NO: 1 по настоящему изобретению.

Полипептид по настоящему изобретению может соответственно быть получен посредством микробиологических способов или с помощью трансгенных млекопитающих. Также предполагается, что полипептид по настоящему изобретению извлекают из трансгенных растений. В качестве альтернативы полипептид по настоящему изобретению может быть получен синтетическим или полусинтетическим путем.

Например, можно применять химический синтез, как, например, твердофазный метод, описанный Houghton в Proc. Natl. Acad. Sci. USA (82) (1985), 5131-5135. Другим способом является трансляция мРНК *in vitro*. Предпочтительный способ включает рекомбинантное получение белка в клетках-хозяевах, как описано выше. Например, последовательности нуклеиновых кислот, содержащие всю или часть любой из нуклеотидных последовательностей согласно настоящему изобретению, можно синтезировать с помощью ПЦР, встроить в вектор экспрессии, а клетку-хозяина трансформировать вектором экспрессии. Затем клетку-хозяина культивируют для получения желаемого полипептида, который выделяют и очищают. Выделение и очистка белка могут быть выполнены с помощью любой из нескольких известных методик; например, без ограничения, ионообменной хроматографии, гель-фильтрационной хроматографии и аффинной хроматографии, жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC), обращенно-фазовой HPLC, препаративного дискового гель-электрофореза. В дополнение к этому, для получения полипептидов по настоящему изобретению можно применять бесклеточные системы трансляции. Подходящие бесклеточные системы экспрессии для применения согласно настоящему изобретению включают лизат ретикулоцитов кролика, экстракт зародышей пшеницы, микросомальные мембраны из клеток поджелудочной железы собак, экстракт *E. coli* S30 и системы транскрипции, сопряженной с трансляцией, такие как система TNT (Promega). Данные системы обеспечивают возможность экспрессии рекомбинантных полипептидов или пептидов при добавлении клонирующих векторов, фрагментов ДНК или последовательностей РНК, содержащих кодирующие участки и соответствующие промоторные элементы. Как упомянуто выше, методики выделения/очистки белка могут требовать модификации белка по настоящему изобретению с применением стандартных способов. Например, к белку можно добавить гистидиновую метку для обеспечения возможности очистки на колонке для никель-хелатной хроматографии. Другие модификации могут обуславливать более высокую или более низкую активность, обеспечивать получение белка на более высоких уровнях или упрощать очистку белка. Другие метки также включают FLAG-метку. Такие метки предпочтительно применяют для эукариотических хозяев.

Белок по настоящему изобретению предпочтительно имеет аминокислотную последовательность, кодируемую молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, как описано в данном документе, или является полученным или получаемым посредством экспрессии указанной последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. Соответственно векторы, содержащие SEQ ID NO: 1, как, например, векторы экспрессии, также можно использовать для обеспечения экспрессии белка, полученного или получаемого посредством экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1.

Например, штаммы *E. coli* BL21 (DE3) можно использовать для опосредования экспрессии белка SEQ ID NO: 1 или вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SEQ ID NO: 1. Конструкция вектора, например, для экспрессии под контролем промотора T7, индуцируемого IPTG, известна в данной области техники. Электрокомпетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) можно трансформировать плазмидной ДНК, например, вектором экспрессии, описанным выше. Обработанные клетки затем выращивают в питательной среде. После культивирования клетки собирают путем центрифугирования или могут быть подвергнуты непосредственному лизису, например, с помощью ультразвуковой обработки, а суспензию затем центрифугируют или обрабатывают согласно проиллюстрированному в примере. Осадок, т.е. неочищенные тельца-включения, можно затем ресуспендировать в буфере, например в лизирующем буфере. Влажные тельца-включения затем солибилизируют. После еще одного центрифугирования можно получить белок, представляющий интерес, или перед этим белок можно подвергнуть рефолдингу, например, согласно проиллюстрированному в примере. Экспрессию белка, разрушение клеток, извлечение телец-включений и рефолдинг телец-включений, как правило, осуществляют таким образом, как это известно в данной области техники, и, например, описано в дан-

ном документе в разделе "Примеры".

Один способ очистки белка включает осаждение сульфатом аммония, который представляет собой способ, применяемый для очистки белков путем изменения их растворимости. Это частный случай более общей методики, известной как высаливание. Сульфат аммония широко применяют из-за того, что его растворимость настолько высока, что допускается возможность использования солевых растворов с высокой ионной силой. Растворимость белков варьирует в зависимости от ионной силы раствора и, следовательно, в зависимости от концентрации солей. Наблюдают два различных эффекта: при низких концентрациях солей растворимость белка повышается с увеличением концентрации солей (т.е. с увеличением ионной силы), этот эффект называется всаливанием. По мере того как концентрация солей (ионная сила) повышается еще больше, растворимость белка начинает уменьшаться. При достаточно высокой ионной силе белок будет практически полностью осажден из раствора (высаливание).

Поскольку белки существенно различаются по их растворимости при различной ионной силе, высаливание представляет собой весьма эффективную процедуру, которая способствует очистке определенного белка. Посредством добавления космотропного сульфата аммония осаждают побочные продукты сворачивания, такие как несвернутые и неправильно свернутые молекулы, а также примеси, происходящие из клеток, например компоненты клеточной стенки и белки. С повышением концентрации осаждающего средства эффективность осаждения будет повышаться, и в результате получают высокоочищенный препарат FcR при условии, что вариант FcR является устойчивым к осаждению при таких высоких концентрациях сульфата аммония. Поэтому желательным является получение варианта FcR, который является сильнорастворимым при концентрациях сульфата аммония, равных или даже превышающих 1,5 M.

Затем осажденный белок удаляют путем центрифугирования, и тогда концентрацию сульфата аммония повышают до значения, при котором будет осаждаться большая часть белка, представляющего интерес, тогда как максимальное количество загрязняющих белков останется в растворе. Осажденный белок, представляющий интерес, извлекают путем центрифугирования и растворяют в свежеприготовленном буфере для следующей стадии очистки.

Белок по настоящему изобретению предпочтительно характеризуется высокой растворимостью при концентрациях сульфата аммония, равных или превышающих 1,5 M.

Настоящее изобретение дополнительно относится к белку, кодируемому последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6.

Белок SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 или 9 может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6, где:

(i) первый кодон (ATG) исключен из SEQ ID NO: 6, что обуславливает получение белка SEQ ID NO: 2,

(ii) первый (ATG) и второй (GCA) кодоны исключены из SEQ ID NO: 6, что обуславливает получение белка SEQ ID NO: 3,

(iii) первый (ATG), второй (GCA) и третий (CCG) кодоны исключены из SEQ ID NO: 6, что обуславливает получение белка SEQ ID NO: 4,

(iv) первый (ATG), второй (GCA), третий (CCG), четвертый (CCG) и пятый (AAA) кодоны исключены из SEQ ID NO: 6, что обуславливает получение белка SEQ ID NO: 5,

(v) кодоны, кодирующие аминокислоты TPA в направлении от N- до C-конца, добавляют между первым (ATG) и вторым (GCA) кодонами SEQ ID NO: 6, а кодоны, кодирующие аминокислотную последовательность MGI, добавляют в направлении 3' от предпоследнего кодона (CCG) SEQ ID NO: 6, что обуславливает получение белка SEQ ID NO: 9.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая содержит белок, полученный или получаемый посредством экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок SEQ ID NO: 1, или вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую белок SEQ ID NO: 1, или белок, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6.

Используемое в соответствии с настоящим изобретением выражение "композиция" относится к

(a) композиции (композициям), которая (которые) содержит (содержат) по меньшей мере один белок, полученный или получаемый посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белок SEQ ID NO: 1;

(b) или к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 9;

(c) или к белку, кодируемому последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6;

(d) или к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 9.

Предусматривается, что композиции по настоящему изобретению, описанные в данном документе ниже, содержат упомянутые выше белки в любой комбинации. Они необязательно могут содержать дополнительные молекулы, способные связываться с другими белками, например антитела или лимфоциты. Композиция может быть в твердой, жидкой или газообразной форме и может быть, помимо прочего, в форме порошка (порошков), таблетки (таблеток), раствора (растворов), аэрозоля (аэрозолей), гранул, пилюль, суспензий, эмульсий, капсул, сиропов, жидкостей, эликсиров, экстрактов, настойки или жидких

экстрактов или в форме, которая является особенно подходящей для перорального, или парентерального, или местного введения.

Другой предпочтительной композицией по настоящему изобретению является фармацевтическая композиция, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель. Указанная фармацевтическая композиция содержит, помимо прочего, последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или полипептид по настоящему изобретению, который может быть соединен с другим полипептидом, например с антителом, или другим белком, присутствующим в сыворотке крови.

Как описано в данном документе, фармацевтическую композицию можно вводить пациенту с физиологически приемлемым носителем. В конкретном варианте осуществления выражение "фармацевтически приемлемый" означает одобренный органом контроля или другим общепризнанным органом фармаконадзора для применения у животных и, конкретнее, у людей.

Выражение "носитель" относится к разбавителю, вспомогательному средству или растворителю, вместе с которым вводят фармацевтическую композицию. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода или масла. Вода представляет собой предпочтительный носитель при внутривенном введении фармацевтической композиции. Физиологические растворы и водные растворы декстрозы и глицерина можно также использовать в качестве жидких носителей, в частности для инъекционных растворов.

Подходящие фармацевтические наполнители включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, ион натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. При необходимости композиция также может содержать незначительные количества увлажняющих или эмульгирующих средств или буферных средств для поддержания pH. Данные композиции могут быть в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Композиции могут быть составлены в виде суппозитория с использованием общепринятых связующих веществ и носителей, таких как триглицериды. Составы для перорального применения могут включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахаринат натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.д. фармацевтической степени чистоты. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" под ред. E.W. Martin. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество упомянутых выше соединений, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить, таким образом, форму для надлежащего введения субъекту. Состав должен соответствовать способу введения.

В другом предпочтительном варианте осуществления композицию составляют в соответствии с общепринятыми процедурами в виде фармацевтической композиции, приспособленной для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция может также включать солиобилизирующее средство и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. В целом, ингредиенты обеспечиваются либо по отдельности, либо смешанными в виде стандартной лекарственной формы, например в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично запечатанном контейнере, таком как ампула или пакетик, с указанием количества активного средства. Если композиция подлежит введению путем инфузии, ее можно отмерять в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду фармацевтической степени чистоты или физиологический раствор. Если композицию вводят путем инъекции, то может предусматриваться ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, так что ингредиенты можно смешивать перед введением.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть составлена в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как полученные из хлористоводородной, ортофосфорной, уксусной, щавелевой, винно-каменной кислот и т.д., и соли, образованные с катионами, такими как полученные из гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Для облегчения установления оптимального диапазона доз можно необязательно использовать анализы *in vitro*. Точная доза для использования в составе будет также зависеть от пути введения, а также от тяжести заболевания или нарушения и должна быть определена на основании заключения практикующего врача и состояния каждого субъекта. Эффективные дозы можно определить путем экстраполяции кривых зависимости "доза-эффект", полученных в тестовых системах *in vitro* или в животных моделях. Фармацевтическую композицию предпочтительно вводят непосредственно или в комбинации со вспомогательным средством.

Фармацевтическая композиция может быть предназначена для применения в генной терапии. Методика генной терапии уже была описана выше применительно к клеткам-хозяевам по настоящему изобретению, и все, что было сказано там, также применимо по отношению к фармацевтической композиции. Например, молекула нуклеиновой кислоты, или белок, включающий белок, полученный или полу-

чаемый посредством экспрессии нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую белок SEQ ID NO: 1, или белок, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6, в фармацевтической композиции предпочтительно представлены в форме, которая обеспечивает возможность их введения в клетки отдельного субъекта, подлежащего лечению, экспрессии и/или стабильной интеграции в них.

Для генной терапии можно использовать различные вирусные векторы, например аденовирус, вирус герпеса, вирус осповакцины или предпочтительно РНК-содержащий вирус, такой как ретровирус. Примеры ретровирусных векторов, в которые может быть встроен отдельный чужеродный ген, включают, без ограничения, следующие: вирус мышинного лейкоза Молони (MoMuLV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV) и вирус саркомы Рауса (RSV). Ряд дополнительных ретровирусных векторов также могут включать в свой состав несколько генов. Все данные векторы могут переносить или включать в свой состав ген селективного маркера для того, чтобы клетки, подвергнутые трансформации, можно было идентифицировать и образовывать. Посредством встраивания, например, полинуклеотида, отвечающего за синтез сахара, гликолипида или белка, можно сконструировать ретровирусные векторы для направленного воздействия. Специалисту в данной области будут известны, или он может с легкостью определить без проведения излишних экспериментов, конкретные последовательности полинуклеотидов, которые могут быть встроены в геном ретровируса для обеспечения возможности направленной доставки ретровирусного вектора, содержащего встроенную последовательность полинуклеотида.

Поскольку рекомбинантные ретровирусы предпочтительно являются дефектными, они нуждаются в помощи для образования инфекционных векторных частиц. Такая помощь может быть предоставлена, например, путем использования линий клеток-хелперов, которые содержат плазмиды, кодирующие все структурные гены ретровируса под контролем регуляторных последовательностей в LTR. В данных плаزمиде отсутствует нуклеотидная последовательность, которая позволяет механизму упаковки распознавать РНК-транскрипт для капсидирования. Линии клеток-хелперов с делениями в сигнальной последовательности упаковки включают, без ограничения, например, w2, PA317 и PA12. Эти линии клеток вырабатывают пустые вирионы, поскольку геном не упакован. Если ретровирусный вектор вводят в такие клетки, в которых сигнальная последовательность упаковки является интактной, но структурные гены заменены другими генами, представляющими интерес, вектор может быть упакован, и может вырабатываться векторный вирион. В качестве альтернативы, NIH 3T3 или другие клетки культуры тканей можно непосредственно трансфицировать плазмидами, содержащими структурные гены gag, pol и env ретровирусов, путем стандартной трансфекции с использованием фосфата кальция. Эти клетки затем трансфицируют векторной плазмидой, содержащей гены, представляющие интерес. Полученные клетки высвобождают ретровирусный вектор в культуральную среду. Другой системой направленной доставки молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению является коллоидная дисперсная система. Коллоидные дисперсные системы включают макромолекулярные комплексы, нанокapsулы, микросферы, гранулы и липидные системы, в том числе эмульсии типа "масло в воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Предпочтительной коллоидной системой по настоящему изобретению является липосома. Липосомы представляют собой искусственные мембранные везикулы, которые являются применимыми в качестве средств доставки *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что в больших моноамеллярных везикулах (LUV), варьирующих по размеру от 0,2 до 4,0 мкм, может быть инкапсулировано достаточное количество водного буфера, содержащего крупные макромолекулы. РНК, ДНК и интактные вирионы могут быть инкапсулированы в водной внутренней среде и доставляться в клетки в биологически активной форме (Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Помимо клеток млекопитающих липосомы применяли для доставки полинуклеотидов в растительные, дрожжевые и бактериальные клетки. Для того чтобы липосома была эффективным средством переноса гена, должны быть в наличии следующие характерные особенности: (1) инкапсулирование генов, представляющих интерес, с высокой степенью эффективности без уменьшения их биологической активности; (2) предпочтительное и значительное связывание с целевой клеткой по сравнению с нецелевыми клетками; (3) доставка водного содержимого везикулы в цитоплазму целевой клетки с высокой степенью эффективности и (4) точная и эффективная экспрессия генетической информации (Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988). Состав липосомы обычно представляет собой комбинацию фосфолипидов, в частности фосфолипидов с высокой температурой фазового перехода, и стероидов, в частности холестерина. Можно также применять другие фосфолипиды или липиды. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и наличия двухвалентных катионов. Примеры липидов, применяемых для получения липосом, включают фосфатидиловые соединения, такие как фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, сфинголипиды, цереброзиды и ганглиозиды. Особенно применимыми являются диацилфосфатидилглицерины, в которых липидный фрагмент имеет 14-18 атомов углерода, в частности 16-18 атомов углерода, и является насыщенным. Иллюстративные фосфолипиды включают яичный фосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин и дистеарилфосфатидилхолин. Направленное воздействие липосом можно классифицировать с учетом анатомических и механических факторов. Анатомическая классификация основана на уровне избирательности, такой как, например, специфичность для органа, специфичность для клетки и

специфичность для органеллы. Различают пассивное или активное механическое направленное воздействие. При пассивном направленном воздействии используется природная склонность липосом к распространению в клетках ретикулоэндотелиальной системы (RES) органов, содержащих синусоидальные капилляры.

В контексте настоящего изобретения выражение "субъект" означает индивидуума, нуждающегося в лечении аффективного расстройства. Субъект предпочтительно представляет собой позвоночное животное, еще более предпочтительно млекопитающее, особенно предпочтительно человека. В одном варианте осуществления пациентом или индивидуумом является человек.

Выражение "вводимый" означает введение индивидууму терапевтически или диагностически эффективной дозы упомянутой выше молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по настоящему изобретению.

Используемое в данном документе "терапевтически эффективное количество" относится к количеству терапевтически активного компонента или средства, которое является достаточным для лечения или уменьшения интенсивности заболевания или нарушения, для отсрочки начала заболевания или обеспечения какого-либо терапевтического эффекта в лечении или управлении течением заболевания.

Как известно в данной области и описано выше, необходимыми могут быть корректировки в зависимости от системной или местной доставки, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола, режима питания, времени введения, взаимодействия лекарственных средств и тяжести состояния, при этом специалист в данной области определит их посредством общепринятых экспериментов. Данные способы применимы как для терапии человека, так и для применения в ветеринарии. Описанные в данном документе соединения, которые характеризуются желаемой терапевтической активностью, можно вводить пациенту в физиологически приемлемом носителе, как описано в данном документе. В зависимости от способа введения соединения можно составлять различными способами, как обсуждается ниже. Концентрация терапевтически активного соединения в составе может варьировать от приблизительно 0,1 до 100 вес.%. Данные средства можно вводить по отдельности или в комбинации с другими средствами лечения.

Введение фармацевтической композиции можно осуществлять с помощью множества путей, обсуждаемых выше, включая, без ограничения, пероральный, подкожный, внутривенный, внутриартериальный, внутриузловой, интрамедуллярный, интратекальный, внутрижелудочковый, интраназальный, эндобронхиальный, трансдермальный, интранодулярный, интаректальный, внутрибрюшинный, внутримышечный, внутрилегочный, вагинальный, ректальный или внутриглазной. В ряде случаев, например, при лечении ран и воспаления средства-кандидаты можно наносить непосредственно в виде раствора, подвергнутого распылительной сушке.

Фармацевтическую композицию предпочтительно вводят инъекционным путем. Данную инъекцию осуществляют путем внутривенных инфузий, подкожно или внутримышечно. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать другие фармацевтически приемлемые носители и/или наполнители. Выражение "фармацевтически приемлемый" означает одобренный общепризнанным органом фармаконадзора для применения у животных и, конкретнее, у людей.

Если композиция подлежит введению путем инфузии, ее можно отмерять в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду фармацевтической степени чистоты или физиологический раствор. Если композицию вводят путем инъекции, то может предусматриваться ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, так что ингредиенты можно смешивать перед введением. Кроме того, фармацевтическую композицию можно вводить в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами или антителами, такими как стероиды или иммуноглобулин для внутривенного введения, в частности кортикостероиды, глюкокортикоиды в виде пролекарств, например преднизон, IVIG, иммуноглобулин антирезус D, алкалоиды барвинка, например винкристин или винбластин, даназол, иммунодепрессанты, например азатиоприн, циклофосфамид или циклоспорин А, дапсон, тромбопоэтические средства, ритуксимаб, мофетил микофенолата, ромиплостим, элтромбопаг, мофетил микофенолата. Используемое в данном документе выражение "в комбинации" относится к применению более одного профилактического и/или терапевтического средства. Применение выражения "в комбинации" не ограничивает порядок введения пациенту профилактических и/или терапевтических средств.

Режим дозирования будет установлен лечащим врачом с учетом клинических факторов. Поскольку в области медицины хорошо известно, что дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, в том числе от габаритов пациента, площади поверхности тела, возраста, конкретного соединения, подлежащего введению, пола, времени и пути введения, общего состояния здоровья и других лекарственных средств, вводимых одновременно. Типичная доза может находиться, например, в диапазоне от 0,001 до 1000 мкг; однако также предусматриваются дозы ниже или выше данного иллюстративного диапазона, в особенности с учетом факторов, упомянутых выше.

Дозы предпочтительно дают раз в неделю, однако при прогрессе в лечении дозы можно давать с намного более длительными интервалами времени, а при необходимости можно давать с намного более короткими интервалами времени, например ежедневно. В предпочтительном случае иммунный ответ отслеживают с использованием способов, описанных в данном документе, и дополнительных способов,

известных специалистам в данной области, и дозы оптимизируют по времени, количеству и/или составу. Дозы будут варьировать, но предпочтительная доза ДНК для внутривенного введения составляет от приблизительно 10 до 10 копий молекулы ДНК. Если режимом дозирования является непрерывная инфузия, то соответственно доза также должна находиться в диапазоне от 1 мкг до 10 мг единиц на килограмм массы тела в минуту. Ход лечения можно отслеживать путем периодической оценки эффективности. Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить местно или системно. Введение будет предпочтительно парентеральным, например внутривенным. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные растворители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевые и буферные среды. Растворители для парентерального введения включают раствор, содержащий ионы натрия, раствор Рингера с декстрозой, раствор, содержащий декстрозу и ионы натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла. Растворители для внутривенного введения включают жидкость и добавки питательных веществ, добавки электролитов (как, например, лежащие в основе раствора Рингера с декстрозой) и т.п. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатообразователи и инертные газы и т.п.

Также предполагается, что фармацевтические композиции используют в подходах к комбинированной терапии с другими средствами, например, применимыми для выявления метилированной ДНК и, таким образом, например, применимыми в диагностике злокачественных новообразований, при которых может проявляться типичный паттерн метилирования.

Настоящее изобретение предусматривает набор, который можно применять в описанных выше способах. Также специалисту в данной области хорошо известно, что фармацевтическая композиция может находиться в форме набора для многократной дозировки, содержащего достаточные количества вводимых доз FcγR для эффективного лечения или предупреждения воспалительных заболеваний и/или аутоиммунных заболеваний у пациента. В одном варианте осуществления фармацевтическая упаковка или набор содержат один или несколько контейнеров, наполненных фармацевтической композицией по настоящему изобретению. Кроме того, одно или несколько дополнительных профилактических или терапевтических средств, применимых для лечения заболевания, можно также включить в фармацевтическую упаковку или набор.

В дополнение, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно применять для лечения или предупреждения нарушений или заболеваний.

Используемое в данном документе выражение "лечение" и аналогичные выражения относятся к ведению пациента и к уходу за ним и/или к борьбе с заболеванием или нарушением. Используемые в данном документе выражения "предупреждать", "предупреждающий" и "предупреждение" относятся к предупреждению рецидива или появления у субъекта одного или нескольких симптомов нарушения, происходящему в результате введения профилактического или терапевтического средства.

Применяемые в данном документе выражения "нарушение" и "заболевание" используют взаимозаменяемо по отношению к состоянию субъекта. В частности, выражение "аутоиммунное заболевание" используют взаимозаменяемо с выражением "аутоиммунное нарушение" по отношению к состоянию субъекта, характеризующемуся поражением клеток, тканей и/или органов, вызванным иммунной реакцией субъекта на его собственные клетки, ткани и/или органы. Выражение "воспалительное заболевание" используют взаимозаменяемо с выражением "воспалительное нарушение" по отношению к состоянию субъекта, характеризующемуся воспалением, предпочтительно хроническим воспалением. Аутоиммунные нарушения могут ассоциироваться или не ассоциироваться с воспалением. Кроме того, воспаление может вызываться или не вызываться аутоиммунным нарушением. Таким образом, конкретные нарушения могут характеризоваться и как аутоиммунные, и как воспалительные нарушения.

В предпочтительном варианте осуществления воспалительное заболевание, которое можно лечить с помощью способа по настоящему изобретению, представляет собой первичную иммунную тромбоцитопению (ИТП), системную красную волчанку (SLE), ревматоидный артрит (RA) или аутоиммунную гемолитическую анемию (АИНА).

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей белок SEQ ID NO: 2 и/или 3.

Выражение "композиция" означает все композиции из двух или более веществ и все смешанные вещества независимо от того, являются ли они результатом химического объединения, или механического смешивания, или биологическим продуктом. Композиция может быть образована путем смешивания двух или более ингредиентов. Смесь ингредиентов в композиции может быть получена посредством механических или химических операций или посредством биологических процессов.

Композиция может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более активных ингредиентов. Под "активным ингредиентом" подразумевают терапевтически эффективный ингредиент. Такой активный ингредиент может связываться с IgG-антителами, как описано в данном документе, и, возможно, связываться с лимфоцитами, например Т-клетками, В-клетками, естественными клетками-киллерами. Такой активный ингредиент связывается только с константной областью. В данной композиции белок по на-

стоящему изобретению предпочтительно представляет собой единственный активный ингредиент, как описано выше.

В одном варианте осуществления композиция содержит белок SEQ ID NO: 2 и 3. В другом варианте осуществления композиция содержит белок SEQ ID NO: 2 или 3. В другом варианте осуществления композиция содержит белок SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления композиция содержит белок SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит белок SEQ ID NO: 4 и/или 5. В другом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит белок SEQ ID NO: 4 и 5. В другом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит белок SEQ ID NO: 4 или 5. В другом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит белок SEQ ID NO: 4. В другом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит белок SEQ ID NO: 5.

В другом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению характеризуется тем, что количество белка SEQ ID NO: 2 превышает количество белка SEQ ID NO: 3.

В другом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению характеризуется тем, что количество белка SEQ ID NO: 3 превышает количество белка SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению характеризуется тем, что количество белка SEQ ID NO: 2 превышает количество белка SEQ ID NO: 3, а количество белков SEQ ID NO: 2 и 3 превышает количество белка SEQ ID NO: 4 и/или 5.

В одном варианте осуществления композиция содержит белок SEQ ID NO: 9.

Данная композиция является предпочтительным вариантом осуществления фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также относится к способу получения фармацевтической композиции, включающему культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии кодируемого белка, и извлечение полученной фармацевтической композиции.

Примеры

Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение. Данные примеры не подразумеваются как ограничивающие объем настоящего изобретения. Данные примеры включены с целью иллюстрации, и настоящее изобретение ограничено только формулой изобретения.

Материалы и способы.

Получение вариантов FcR.

В 75 мл среды LB, дополненной 50 мкг/мл канамицина, в конической колбе с дефлекторами на 250 мл инокулировали 5 мкл исходной культуры в глицерине и встряхивали в течение 15 ч при 37°C, 170 об/мин (Multitron Standard, Infors HT). Затем в 1 л LB в конической колбе с дефлекторами на 2 л инокулировали 10 мл суточной культуры и встряхивали при 37°C, 170 об/мин. При OD₆₀₀ 1,6 индуцировали экспрессию путем добавления 1 mM IPTG. После культивирования в течение дополнительных 3 ч при 37°C, 170 об/мин., клетки собирали путем центрифугирования (10 мин при 5000g, 4°C), однократно промывали с использованием 200 мл ледяного PBS и хранили при -20°C.

Разрушение клеток и выделение тельца-включений.

6-8 г замороженных клеток *E. coli* размораживали при комнатной температуре и ресуспендировали в 30 мл лизирующего буфера (50 mM трис/HCl, 25 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0), дополненного 100 мкг/мл лизоцима, с использованием стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком. После инкубирования в течение 15 мин на льду клетки разрушали путем ультразвуковой обработки (режим работы 6, коэффициент загрузки 30%, 30 мин, Sonifier 250, оснащенный микронаконечником, Branson), и суспензию центрифугировали (45 мин при 13000g, 4°C). Отбирали 1 мл надосадочной жидкости, а оставшуюся жидкость сливали. Осадок, т.е. неочищенные тельца-включения, ресуспендировали в 35 мл лизирующего буфера, дополненного 0,5% (об./об.) полисорбатом 20, с использованием стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком и центрифугировали (15 мин при 13000g, 4°C). После одного дополнительного этапа очистки детергентом проводили заключительный этап отмывки с использованием только лизирующего буфера. Промытые тельца-включения хранили при -20°C до использования.

Рефолдинг и очистка вариантов FcR.

Влажные тельца-включения солибилизировали при 200 мг/мл в 20 mM трис/HCl, 6 M гуанидине, 3 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 8,0 в течение 2,5 ч при 20°C при постоянном перемешивании (400 об/мин) в закрытой пробирке для центрифугирования. После центрифугирования (20000g, 10 мин, 20°C) надосадочную жидкость собирали путем декантации, и с помощью RP-HPLC на Knauer Bioselect C4 определяли содержание FcR после разбавления 1:60. Исходя из результатов анализа тельца-включения разбавляли с использованием 20 mM трис/HCl, 6 M гуанидина, 3 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 8,0 до содержания FcR 21 мг/мл, и одну часть разбавленного раствора FcR добавляли по каплям к 20 частям перемешанного (800 об/мин) буфера для рефолдинга (20 mM трис/HCl, 2 M мочевины, 0,5 M аргинина, 2 mM цистеамин, 2 mM цистамин, pH 7,7, при 6°C). После инкубирования в течение 16 ч при 10°C в герметичном контейнере без

перемешивания раствор для рефолдинга нагревали до комнатной температуры. В теплом растворе для рефолдинга концентрацию $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ доводили до 1,1 М путем добавления по каплям 3,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 7,0 при постоянном перемешивании (400 об/мин). После перемешивания в течение дополнительного 1 ч при 200 об/мин суспензию центрифугировали (20000g, 20 мин, 20°C), надосадочную жидкость фильтровали (0,2 мкм Durapore®, Millipore), и фильтрат загружали при 4 мл/мин, <4 мг белка/мл смолы в колонку с фенилсефарозой HP на 35 мл (h=6,6 см, d=2,6 см, GE Healthcare), уравновешенную с помощью 1,2 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 7,0. Колонку промывали с помощью 100 мл 1,2 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 7,0, и связанный белок элюировали с использованием 350 мл буфера при линейном градиенте от 1,2 до 0 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 20 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 7,0 при 5 мл/мин. Элюат собирали фракциями по 7,5 мл, которые затем подвергали анализу по методу RP-HPLC на Phenomenex Jupiter C4. Фракции с чистотой выше 85% в отношении требуемого варианта FcR объединяли, концентрировали приблизительно два раза и подвергали диафильтрации против 20 мМ L-гистидина, pH 6,5, путем тангенциальной поточной фильтрации (Vivaflow 50, MWCO 5 кДа, 0,01 м², поперечный поток 200 мл/мин, pIN=2 бар; Sartorius) до тех пор, пока проводимость не снижалась до приблизительно 5 мСм/см. После замены буфера раствор загружали при 2 мл/мин, ≤20 мг белка/мл смолы в колонку с SP-сефарозой HP на 9 мл (h=4,5 см, d=1,6 см, GE Healthcare), уравновешенную с помощью 20 мМ L-гистидина, pH 6,5. Колонку промывали с помощью 30 мл 20 мМ L-гистидина, 30 мМ NaCl, pH 6,5, и связанный белок элюировали при помощи 90 мл буфера при линейном градиенте от 20 до 400 мМ NaCl в 20 мМ L-гистидина, pH 6,5, при 3 мл/мин. Фракции, содержащие основной пик, объединяли, доводили по проводимости до 15,4 мСм/см с помощью 20 мМ L-гистидина, pH 6,5, концентрировали до приблизительно 20 мг/мл посредством ультрафильтрации (4000g, MWCO 5 кДа, Vivaspın 20, Sartorius) и разбавляли до 15 мг/мл с помощью 20 мМ L-гистидина, 150 мМ NaCl, pH 6,5. Разбавленный раствор FcR фильтровали (мембрана из PES на 0,45 мкм, Puradisc™ 25 мм, Whatman), разделяли на аликвоты, мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Анализ осаждения.

Концентрацию FcR доводили до 0,7 мг/мл в присутствии 20 мМ гистидина, 150 мМ NaCl и 0-2,8 М сульфата аммония путем добавления соответствующего количества ddH₂O, 10X исходного раствора гистидин/NaCl (200 мМ гистидин, 1,5 М NaCl) и исходного раствора сульфата аммония (4М в ddH₂O). pH устанавливали на уровне 6, 7 или 8 путем использования 10X исходного раствора гистидин/NaCl и исходного раствора сульфата аммония при соответствующем pH. Организацию каждого условия осуществляли в двух повторностях. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 25°C, центрифугировали (20000g, 10 мин), и 30 мкл надосадочной жидкости переносили в 384-луночный планшет (μClear®, с несвязывающей поверхностью, черный, Greiner Bio-one). Определяли поглощение при 280 нм (Spectrofluor plus, Tecan), и содержание белка рассчитывали согласно закону Ламберта-Бера, используя массовый коэффициент экстинкции 1,5625 мл×мг⁻¹×см⁻¹ и длину пробега 0,24 см. В поглощение лунки для образца вносили поправку на поглощение лунки, содержащей только буфер в виде холостой пробы.

SDS-PAGE.

Для подавления дальнейшей реакции дисульфидного обмена свободные тиоловые группы алкилировали йодацетамидом путем смешивания 18 мкл солюбилизованных IB или бульона для рефолдинга с 2 мкл 250 мМ свежеприготовленного йодацетамида в H₂O. Смесь инкубировали в течение 45 мин при 30°C, 750 об/мин. в темноте и непосредственно применяли в подготовке образцов для SDS-PAGE согласно руководству для NuPAGE® Novex® (Invitrogen). Белки разделяли в 4-12% геле на основе бис-Трис в подвижном буфере MES (оба из NuPAGE® Novex®, Invitrogen) согласно инструкциям производителя. Гели промывали три раза в ddH₂O и окрашивали с использованием Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen) в течение по меньшей мере 6 ч при комнатной температуре. В качестве маркера молекулярной массы использовали 10 мкл предварительно окрашенного стандарта SeeBlue® Plus2 (Invitrogen).

LC-MS.

Молекулярную массу интактного экспрессируемого белка определяли с помощью масс-спектрометрии в сотрудничестве с Институтом биохимии общества Макса Планка (Мартинсрид). Образцы анализировали на масс-анализаторе ESI-TOF (microTOF, Bruker), оснащенный колонкой Phenomenex Aeris™ Widepore C4 (100×2,1 мм, размер частиц 3,6 мкм, размер пор 300 Å), которую предварительно уравнивали 30% ацетонитрилом, 0,05% TFA. Образцы, содержащие FcR, вводили при 0,25 мл/мин, 20°C, и связанный белок элюировали в течение 15 мин в линейном градиенте ацетонитрила от 30 до 80%, 0,05% TFA.

Спектроскопия в УФ/видимой областях спектра.

При необходимости белковый раствор разбавляли соответствующим буфером до OD₂₈₀ 0,2-0,8. 400 мкл раствора переносили в УФ-микрокювету (УФ-микрокювета Brand). Регистрировали поглощение при 280 и 320 нм (Tidas E., J&M Analytik), и рассчитывали концентрацию белка в мг/мл согласно следующему уравнению:

$$C_{\text{белка}} = (\text{OD}_{280} - \text{OD}_{320}) \times 0,64 \text{ мг/мл}$$

Соответствующий буфер использовали в качестве холостой пробы. Анализ проводили в трех повторностях, и результаты усредняли.

Пример. Анализ осаждения.

Получение белка FcR с помощью способа на основе рефолдинга обычно включает этап осаждения сульфатом аммония. Посредством добавления космотропного сульфата аммония осаждают побочные продукты свертывания, такие как несвернутые и неправильно свернутые молекулы, а также примеси, происходящие из клеток, например, компоненты клеточной стенки и белки. С повышением концентрации осаждающего средства эффективность осаждения будет повышаться, и в результате получают высокоочищенный препарат FcR при условии, что вариант FcR является устойчивым к осаждению при таких высоких концентрациях сульфата аммония. Поэтому желательным является получение варианта FcR, который является сильнорастворимым при концентрациях сульфата аммония, равных или превышающих 1,5 М. Помимо непосредственного осаждения примесей, высокие концентрации сульфата аммония будут способствовать эффективному связыванию со смолой для НИС. Поскольку высокая способность к динамическому связыванию всегда является основной целью усовершенствования для этапа захвата при хроматографии, растворимость в присутствии высоких концентраций сульфата аммония является обязательной.

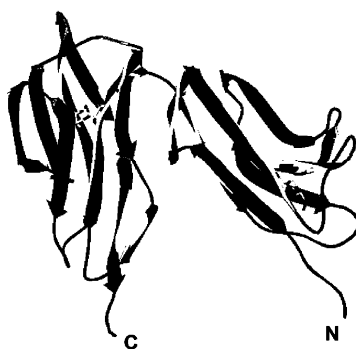
Для оценки растворимости вариантов FcR в присутствии сульфата аммония каждый вариант инкубировали с возрастающими концентрациями сульфата аммония при pH от 6 до 8. Через 1 ч при 25°C концентрацию FcR в надосадочной жидкости определяли с помощью спектроскопии в УФ/видимой областях спектра. Как показано на фиг. 2, вариант 3 является наиболее устойчивым к осаждению сульфатом аммония с полумаксимальным осаждением при 2,05-2,13 М (NH₄)₂SO₄. Наоборот, "вариант 2" (SEQ ID NO: 8) и "вариант 4" (SEQ ID NO: 9) являются менее растворимыми при высоких концентрациях сульфата аммония, демонстрируя полумаксимальное осаждение при концентрациях (NH₄)₂SO₄ в диапазоне 1,70-1,76 М. Тем не менее, "вариант 4" остается растворимым при высокой концентрации сульфата аммония. Зависимость pH от растворимости являлась незначительной для всех вариантов FcR.

Необходимо отметить, что проведение анализа осаждения и, таким образом, определение растворимости "варианта 1" при высоких концентрациях сульфата аммония является невозможным, поскольку "вариант 1" подвергается рефолдингу в недостаточной степени и, следовательно, для анализа осаждения нельзя получить растворимый белок.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота, кодирующая Fc-гамма-рецептор IIB (FcγRIIB) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.
2. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.1.
3. Рецептор FcγRIIB, полученный посредством экспрессии нуклеиновой кислоты по п.1 или вектора по п.2 в клетке-хозяине.
4. Рецептор FcγRIIB по п.3, полученный в прокариотической клетке-хозяине.
5. Рецептор FcγRIIB по п.4, полученный в клетке E. coli.
6. Рецептор FcγRIIB, кодируемый нуклеиновой кислотой по п.1.
7. Фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения воспалительных заболеваний и/или аутоиммунных заболеваний, содержащая рецептор FcγRIIB по п.3 или 4.
8. Фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения воспалительных заболеваний и/или аутоиммунных заболеваний, содержащая рецептор FcγRIIB с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 1, из которой исключен Met в позиции 1, и/или рецептор FcγRIIB с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 1, из которой исключены Met и Ala в позициях 1 и 2 соответственно.
9. Композиция по п.8, дополнительно содержащая рецептор FcγRIIB с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 1, из которой исключены Met, Ala и Pro в позициях 1, 2 и 3 соответственно, и/или рецептор FcγRIIB с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, соответствующей последовательности SEQ ID NO: 1, из которой исключены Met, Ala, Pro, Pro и Lys в позициях 1, 2, 3, 4 и 5 соответственно.
10. Композиция по п.8 или 9, в которой количество рецептора FcγRIIB с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 превышает количество рецептора FcγRIIB с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3.
11. Композиция по любому из пп.8-10, в которой количество рецептора FcγRIIB с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 и 3 превышает количество рецептора FcγRIIB с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 и/или 5.
12. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.1 или вектор по п.2.
13. Клетка-хозяин по п.12, являющаяся прокариотической или эукариотической клеткой-хозяином.
14. Клетка-хозяин по п.13, являющаяся клеткой E. coli.
15. Клетка-хозяин по п.14, являющаяся клеткой E. coli BL21.

a)



b)

```

SEQ 7: «вар. 1» -----MAVLKLEPQWINVLDQSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYR
SEQ 8: «вар. 2» NGTPAAPPPKAVLKLEPQWINVLDQSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYR
SEQ 1: «вар. 3» -----MAPPKAVLKLEPQWINVLDQSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYR
SEQ 9: «вар. 4» -----MTPAAPPPKAVLKLEPQWINVLDQSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYR
*****

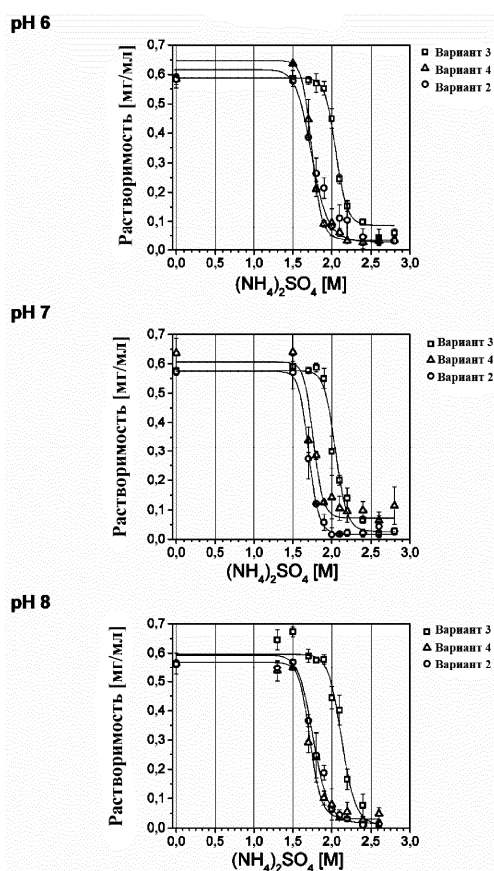
SEQ 7: «вар. 1» FKANNNDSEYTCCTGCTSLSDPVLTVLSEWLVLTQPHLEFQEGETIVLRCHSNKDKPL
SEQ 8: «вар. 2» FKANNNDSEYTCCTGCTSLSDPVLTVLSEWLVLTQPHLEFQEGETIVLRCHSNKDKPL
SEQ 1: «вар. 3» FKANNNDSEYTCCTGCTSLSDPVLTVLSEWLVLTQPHLEFQEGETIVLRCHSNKDKPL
SEQ 9: «вар. 4» FKANNNDSEYTCCTGCTSLSDPVLTVLSEWLVLTQPHLEFQEGETIVLRCHSNKDKPL
*****

SEQ 7: «вар. 1» VKVTFQNGSKKFSRSDPNFSTPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLSSKFPVTTITV-----
SEQ 8: «вар. 2» VKVTFQNGSKKFSRSDPNFSTPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLSSKFPVTTITVQAPSSS
SEQ 1: «вар. 3» VKVTFQNGSKKFSRSDPNFSTPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLSSKFPVTTITVQAPSSS
SEQ 9: «вар. 4» VKVTFQNGSKKFSRSDPNFSTPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLSSKFPVTTITVQAPSSS
*****

SEQ 7: «вар. 1» -----
SEQ 8: «вар. 2» PMGII
SEQ 1: «вар. 3» P-----
SEQ 9: «вар. 4» PMGI-

```

Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2