



УКРАЇНА

(19) UA (11) 43826 (13) C2

(51) 6 C12N15/12, C07K14/00, 14/72, 16/26,  
A61K38/16, 39/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ІСТОТНО ЧИСТИЙ ПОЛІПЕПТИД, ЩО ЗДАТЕН РОЗПІЗНАВАТИ ТА ВИБІРКОВО ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З ФОЛІКУЛОСТИМУЛЮВАЛЬНИМ ГОРМОНОМ (FSH) ЛЮДИНИ, ВИДІЛЕНА ДНК, РЕКОМБІНАНТНИЙ ЕКСПРЕСУЮЧИЙ ВЕКТОР, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЗНИЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЕНДОГЕННОГО FSH, СПОСІБ АНАЛІЗУ FSH ЛЮДИНИ, СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЕНДОГЕННОГО FSH У ПАЦІЄНТА

1

2

(21) 93004376

(22) 02 01 1992

(24) 15 01 2002

(46) 15 01 2002, Бюл. № 1, 2002 р

(86) PCT/US92/00122, 02 01 1992

(31) 07/670,085

(32) 15 03 1991

(33) US

(72) Келтон Крісті Енн, US, Ченг Шірлей В'ю, MY,  
Нугент Норін Патрис, US, Швайкхардт Рене Лінн,  
US(73) Аплайд Резеч Системз APC Холдінг Н В, NL  
(56) 1 WO, A, 9 013 643 (GENENTECH, INC (USA))  
15 November 19902 MOLECULAR ENDOCRINOLOGY vol 4, no 4,  
1990, pages 525-530(57) 1 Существенно чистый полипептид, способ-  
ный распознавать и избирательно связываться с  
фолликуло-стимулирующим гормоном ((FSH) че-  
ловека, который не вызывает иммунного ответа у  
человека, причем указанный полипептид имеет  
последовательность, выбранную из группы после-  
довательностей

(a) рецептора FSH человека, имеющего аминокислотную последовательность

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

(13) C2

(11) 43826

(19) UA

Ser His Cys Cys Ala Phe Ala Asn Trp Arg Arg Gln Ile Ser Glu Leu  
260 265 270

His Pro Ile Cys Asn Lys Ser Ile Leu Arg Gln Glu Val Asp Tyr Met  
275 280

Thr Gln Thr Arg Gly Gln Arg Ser Ser Leu Ala Glu Asp Asn Glu Ser  
290 295 300

Ser Tyr Ser Arg Gly Phe Asp Met Thr Tyr Thr Glu Phe Asp Tyr Asp  
305 310 315

Leu Cys Asn Glu Val Val Asp Val Thr Cys Ser Pro Lys Pro Asp Ala  
320 325 330 335

Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asn Ile Leu Arg Val Leu  
340 345 350

Ile Trp Phe Ile Ser Ile Leu Ala Ile Thr Gly Asn Ile Ile Val Leu  
355 360 365

Val Ile Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Lys Leu Thr Val Pro Arg Phe Leu  
370 375 380

Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Leu Cys Ile Gly Ile Tyr Leu Leu  
385 390 395

Leu Ile Ala Ser Val Asp Ile His Thr Lys Ser Gln Tyr His Asn Tyr  
400 405 410 415

Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ala Gly Cys Asp Ala Ala Gly Phe Phe  
420 425 430

Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu Thr Ala Ile Thr  
435 440 445

Leu Glu Arg Trp His Thr Ile Thr His Ala Met Gln Leu Asp Cys Lys  
450 455 460

Val Gln Leu Arg His Ala Ala Ser Val Met Val Met Gly Trp Ile Phe  
465 470 475

Ala Phe Ala Ala Ala Leu Phe Pro Ile Phe Gly Ile Ser Ser Tyr Met  
480 485 490 495

Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Ile Asp Ser Pro Leu Ser Gln  
500 505 510

Leu Tyr Val Met Ser Leu Leu Val Leu Asn Val Leu Ala Phe Val Val  
515 520 525

Ile Cys Gly Cys Tyr Ile His Ile Tyr Leu Thr Val Arg Asn Pro Asn  
530 535 540

Ile Val Ser Ser Ser Ser Asn Thr Arg Ile Ala Lys Arg Met Ala Met  
545 550 555

Leu Ile Phe Thr Asp Phe Leu Cys Met Ala Pro Ile Ser Phe Phe Ala  
560 565 570 575

Ile Ser Ala Ser Leu Lys Val Pro Leu Ile Thr Val Ser Lys Ala Lys  
580 585 590

Ile Leu Leu Val Leu Phe His Pro Ile Asn Ser Cys Ala Asn Pro Phe  
595 600 605

Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Asn Phe Arg Arg Asp Phe Phe Ile Leu  
610 615 620

Leu Ser Lys Cys Gly Cys Tyr Glu Met Gln Ala Gln Ile Tyr Arg Thr  
625 630 635

Glu Thr Ser Ser Thr Val His Asn Thr His Pro Arg Asn Gly His Cys  
640 645 650 655

Ser Ser Ala Pro Arg Val Thr Asn Gly Ser Thr Tyr Ile Leu Val Pro  
660 665 670

Leu Ser His Leu Ala Gln Asn  
675

или

(б) мутеина, который отличается от последовательности, охарактеризованной в (а), заменами, делениями или инсерциями, затрагивающими не более десяти аминокислот, или

- (в) аминоконцевой внеклеточной части рецептора FSH человека, имеющей аминокислотную последовательность 1-349, представленную в (а), или

(г) мутеина, который отличается от последовательности, охарактеризованной в (в), заменами, делениями или инсерциями, затрагивающими не более десяти аминокислот, или

(д) фрагмента (в), который содержит существенную часть указанной аминоконцевой внеклеточной

части рецептора FSH человека и который сохраняет, по существу, такие же FSH-связывающие характеристики, как и полная внеклеточная часть, или

(е) мутеина, который отличается от последовательности, охарактеризованной в (д), заменами, делениями или инсерциями, затрагивающими не более десяти аминокислот, и который сохраняет, по существу, такие же FSH-связывающие характеристики, как и указанная полная аминоконцевая внеклеточная часть рецептора FSH человека

2 Существенно чистый полипептид по п 1, отличающийся тем, что имеет последовательность, содержащую последовательность рецептора FSH человека, имеющего аминокислотную последовательность 1-678, представленную в п 1

3 Существенно чистый полипептид по п 1, отличающийся тем, что имеет последовательность, содержащую последовательность аминоконцевой внеклеточной части рецептора FSH человека, имеющую аминокислотную последовательность 1-349, представленную в п 1

4 Существенно чистый полипептид по п 1, отличающийся тем, что имеет последовательность, содержащую последовательность фрагмента аминоконцевой внеклеточной части рецептора FSH человека, причем указанная внеклеточная часть имеет аминокислотную последовательность 1-349, представленную в п 1, причем указанный фрагмент содержит существенную часть указанной аминоконцевой внеклеточной части рецептора FSH человека и сохраняет, по существу, такие же FSH-связывающие характеристики, как и полная внеклеточная часть

5 Выделенная ДНК, кодирующая полипептид, охарактеризованный в любом из пп 1-4

6 Выделенная ДНК по п 5, отличающаяся тем, что содержит нуклеотидную последовательность

TGT CAT CAT GGG ATG TGT CAC TGC TCT AAC AGG Cys His His Arg Ile Cys His Cys Ser Asn Arg 1 5 10	158
GTT TTT CTC TGC GAA GAG ACC AAG CTC ACA GAG ATT CCT TCT GAC CTC Val Phe Leu Cys Gln Glu Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Ser Asp Leu 15 20 25	206
CCG ACG AAT GCC ATT GAA CTG ACG TTT GTC CTC ACC AAG CTT CGA CTC Pro Arg Asn Ala Ile Glu Leu Arg Phe Val Leu Thr Lys Leu Arg Val 30 35 40	214
ATC CAA AAA GGT GCA TTT TCA CGA TTT GGG CAC CTC GAG AAA ATA GAG Ile Gln Lys Gly Ala Phe Ser Gly Phe Gly Asp Leu Glu Lys Ile Glu 45 50 55	302
ATC TCT CAG AAT GAT CTC TTC GAG CTC ATA CAG CCA GAT CTC TTC TCC Ile Ser Gln Asn Asp Val Leu Glu Val Ile Glu Ala Asp Val Phe Ser 60 65 70 75	350
AAC CTT CCC AAA TTA CAT GAA ATT AGA ATT GAA AAG CCC AAC AAC CTC Asn Leu Pro Lys Leu His Glu Ile Arg Ile Glu Lys Ala Asn Asn Leu 80 85 90	398

CTC TAC ATC AAC CCT GAG GCC TCC AAC CTT CCC AAC CTT CAA TAC  
Leu Tyr Ile Asn Pro Glu Ala Phe Gln Asn Leu Pro Asn Leu Gln Tyr  
95 100 105

CTG TTA ATA TCC AAC ACA GGT ATT AAG CAC CTT CCA GAT GTT CAC AAG  
Leu Ile Ile Ser Asn Thr Gly Ile Lys His Leu Pro Asp Val His Lys  
110 115 120

ATT CAT TCT CTC CAA AAA GTT TTA CTT GAC ATT CAA GAT AAC ATA AAG  
Ile His Ser Leu Gln Lys Val Leu Leu Asn Ile Gln Asp Asn Ile Asn  
125 130 135

ATC CAC ACA ATT CAA AGA AAT TCT TTC CTG GCG CTG AGC TTT GAA AGT  
Ile His Thr Ile Ile Glu Arg Asn Ser Phe Val Gly Leu Ser Phe Glu Ser  
140 145 150 155

CTG ATT CTA TCG CTG AAT AAG AAT GCG ATT CAA GAA ATA CAC AAC TGT  
Val Ile Leu Trp Leu Asn Lys Asn Gly Ile Gln Glu Ile His Asn Cys  
160 165 170

GCA TTC AAT GGA ACC CAA CTA GAT GAG CTG AAT CTA AGC GAT AAT AAT  
Ala Phe Asn Gly Thr Gln Leu Asp Glu Leu Asn Leu Ser Asp Asn Asn  
175 180 185

AAT TTA GAA GAA TTG CCT AAT GAT GTT TTC CAC GGA GCG TCT GGA CCA  
Asn Leu Glu Leu Pro Asn Asp Val Phe His Gly Ala Ser Gly Pro  
190 195 200

CTC ATT CTA CAT ATT TCA AGA ACA AGG ATC CAT TCG CTG GCT AGC TAT  
Val Ile Leu Asp Ile Ser Arg Thr Arg Ile His Ser Leu Pro Ser Tyr  
205 210 215

GCG TTA GAA AAT CTT AAG AAG CTG AGC GCG AGG TCG ACT TAC AAC TTA  
Gly Leu Glu Asn Leu Lys Lys Leu Arg Ala Arg Ser Thr Tyr Asn Leu  
220 225 230 235

AAA AAG CTG CCT ACT CTG GAA AAG CTT GTC GCG CTC ATG GAA GCG ACC  
Lys Lys Leu Pro Thr Leu Glu Lys Leu Val Ala Leu Met Glu Ala Ser  
240 245 250

CTC ACC TAT CCC AGC CAT TCC TGT GCG TTT GCA AAC TGG AGA GCG CAA  
Leu Thr Tyr Pro Ser His Cys Cys Ala Phe Ala Asn Trp Arg Arg Gln  
255 260 265

ATC TCT GAG CTT CAT CCA ATT TGC AAC AAA TCT ATT TTA AGG CAA GAA  
Ile Ser Glu Leu His Pro Ile Cys Asn Lys Ser Ile Leu Arg Gln Glu  
270 275 280

GTG GAT TAT ATG ACT CAG ACT AGG GGT CAG AGA TCC TCT CTG GCA GAA  
Val Asp Tyr Met Thr Gln Thr Arg Gly Gln Arg Ser Ser Leu Ala Glu  
285 290 295

GAC AAT CAG TCG AGC TAC AGC AGA GGA TTT GAC ATG ACG TAC ACT GAG  
Asp Asn Glu Ser Ser Tyr Ser Arg Gly Phe Asn Met Thr Tyr Thr Glu  
300 305 310 315

TTT GAC TAT GAC TTA TGC AAT GAA GTG GTT GAC CTG ACC TGC TCC CTT  
Phe Asp Tyr Asp Leu Cys Asn Glu Val Val Asp Val Thr Cys Ser Pro  
320 325 330

AAC GCA GAT GCA TTC AAC GCA TGT GAA GAT ATC ATG GGG TAC AAC ATC  
Lys Pro Asp Ala Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asn Ile  
335 340 345

CTC AGA GTC CTG ATA TGG TTT ATC AGC ATC CTG GCC ATC ACT GGG AAC  
Leu Arg Val Leu Ile Trp Phe Ile Ser Ile Leu Ala Ile Thr Gly Asn  
350 355 360

ATC ATA GTG CTA GTG ATC CTA ACT ACC AGC CAA TAT AAA CTC ACA CTC  
Ile Ile Val Leu Val Ile Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Lys Leu Thr Val  
365 370 375

CCC AGG TTC CTT ATG TGC AAC CTG GCG TTT GCT GAT CTC TGC ATT CGA  
Pro Arg Phe Leu Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Leu Cys Ile Gly  
380 385 390 395

ATC TAC CTG CTG CTC ATT GCA TCA GTT GAT ATC CAT ACC AAG AGC CAA  
Ile Tyr Leu Leu Leu Ile Ala Ser Val Asp Ile His Thr Lys Ser Gln  
400 405 410

TAT CAC AAG TAT GCG ATT GAG TGG CAA ACT GGG GCA GCG TGT GAT GCT  
Tyr His Asn Tyr Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ala Gly Cys Asp Ala  
415 420 425

GCT GCG TTT TTC ACT CTC TTT GCG AGT GAG CTG TCA CTC TAC ACT CTG  
Ala Gly Phe Phe Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu  
430 435 440

ACA GGT ATC ACC TTG GAA AGA TGG CAT ACC ATC ACC GAT GCG ATG CAG  
Thr Ala Leu Thr Leu Glu Arg Trp His Thr Ile Thr His Ala Met Gln  
445 450 455

CTG CAC TGC AAG GTG CAG CTC CCG CAT GCT GCG AGT CTC ATG CTG ATC  
Leu Asp Cys Lys Val Gln Leu Arg His Ala Ala Ser Val Met Val Met  
460 465 470 475

GCG TCG ATT TTT GCT TTT GCA GCT GCG CTC TTT CCG ATC TTT GCG ATC  
Gly Trp Ile Phe Ala Phe Ala Ala Leu Phe Pro Ile Phe Gly Ile  
480 485 490

ACC AGC TAC ATG AAG CTG AGC ATC TCG CTC CCG ATG GAT ATT GAC AGC  
Ser Ser Tyr Met Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Ile Asp Ser  
495 500 505

CCT TTG TCA GAG CTG TAT GTG ATG TCC CTC CTT GTG CTC AAC GTG CTC  
Pro Leu Ser Gln Leu Tyr Val Met Ser Leu Leu Val Leu Asn Val Leu  
510 515 520

GCG TTT GTC GTC ATC TCT GCG TCG TAT ATC CAC ATC TAC CTC ACA CTC  
Ala Phe Val Val Ile Cys Gly Cys Tyr Ile His Ile Tyr Leu Thr Val  
525 530 535

CGG AAC CCG AAC ATC CTG TCC TCT AGT GAC ACC AGG ATC GCC AAG  
Arg Asn Pro Asn Ile Val Ser Ser Ser Ser Asp Thr Arg Ile Ala Lys  
540 545 550 555

GCG ATG GCG ATG CTC ATC TTC ACT GAC TTC CTC TGC ATG GCA CCC ATT  
Arg Met Ala Met Leu Ile Phe Thr Asp Phe Leu Cys Met Ala Pro Ile  
560 565 570

TCT TTC TTT GCG ATT TCT GCG TCG CTC AAG GTG CCG CTC ATC ACT GTG  
Ser Phe Phe Ala Ile Ser Ala Ser Leu Lys Val Pro Leu Ile Thr Val  
575 580 585

TCC AAA GCA AAG ATT CTG CTG GTT CTG TTT CAC GCG ATC AAC TCC TGT  
Ser Lys Ala Lys Ile Leu Leu Val Leu Phe His Pro Ile Asn Ser Cys  
590 595 600

GCG AAC CCG TTC CTC TAT GCG ATG TTT ACC AAA AAC TTT CCG ACA GAT  
Ala Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Asn Phe Arg Arg Asp  
605 610 615

TTC TTC ATT CTC CTG AGC AAG TGT GCG TCG TAT GAA ATG CAA GCC CAA  
Phe Phe Ile Leu Leu Ser Lys Cys Gly Cys Tyr Glu Met Gln Ala Gln  
620 625 630 635

ATT TAT AGG ACA GAA ACT TCA TCG ACT CTC CAC AAC ACC CAT CCA AGG  
Ile Tyr Arg Thr Glu Thr Ser Ser Thr Val His Asn Thr His Pro Arg  
640 645 650

AAT GCG CAC TCG TCT TCA GCT CCC AGA GTC ACC AAT GGT TCC ACT TAC  
Asn Gly His Cys Ser Ser Ala Pro Arg Val Thr Asn Gly Ser Thr Tyr  
655 660 665

ATA CTT GTC CCT CTA AGT CAT TTA GCG CAA AAC TAAACACAA TGTGAAATG  
Ile Leu Val Pro Leu Ser His Leu Ala Gln Asn  
670 675

7 Рекombинантный экспрессирующий вектор, включающий ДНК, охарактеризованную в п 5 или 6

8 Фармацевтическая композиция для снижения биологической активности эндогенного FSH, содержащая в качестве активного ингредиента эффективную концентрацию рекомбинантного полипептида, который избирательно связывается с FSH человеками фармацевтически приемлемый носитель, отличающаяся тем, что указанный рекомбинантный полипептид представляет собой полипептид, охарактеризованный в любом из пп 1-4

9 Способ анализа FSH человека с использованием рецептора FSH, отличающийся тем, что включает следующие стадии

экспрессия полипептида, охарактеризованного в любом из пп 1-4 в клетке-хозяине, взаимодействие указанной клетки-хозяина с FSH человека и анализ FSH человека с использованием любых подходящих методик и наборов

10 Способ по п 9, отличающийся тем, что указанный полипептид -представляет собой рецептор FSH человека, имеющий аминокислотную последовательность 1-678, представленную в п 1

11 Способ по п 9, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит фрагмент рецептора FSH человека, причем указанный фрагмент содержит аминоконцевой внеклеточный домен рецептора FSH человека или его существенную часть, обладающую, по существу, такими же FSH-связывающими характеристиками

12 Способ снижения биологической активности эндогенного FSH у пациента, отличающийся тем, что указанному пациенту вводят эффективное количество полипептида, охарактеризованного в любом из пп 1-4

Настоящее изобретение относится к рецептору фолликулостимулирующего гормона человека и его синтезу с использованием техники рекомбинантных ДНК

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) представляет собой гетеродимерный гликопротеиновый гормон, вырабатываемый гипофизом и имеющий структуру, сходную со структурой лютеинизирующего гормона (ЛГ), тиреотропного гормона (ТТГ), оба из которых также секретируются гипофизом, и хронического гонадотропина (ХГ), который продуцируется в плаценте. Эти гормоны являются относительно крупными (28 - 38 кДа) и состоят из нековалентно связанной  $\alpha$ -субъединицы, которая является одинаково для всех указанных гормонов, и  $\beta$ -субъединицы, которая у всех гормонов является разной, и которая ответственна за специфичность связывания с рецептором

Известно, что клеточные рецепторы для этих гормонов принадлежат к классу белок G-связанных мембранных рецепторов, которые при активации способны стимулировать увеличение активности аденилициклазы. Это приводит к повышению уровня вторичного посредника - аденозин 3', 5'-монофосфата (цАМФ), который в свою очередь, способствует увеличению уровня синтеза и секреции стероидов. Диаграммы гигроскопичности аминокислотных последовательностей указанных рецепторов выявили три главных области:

1) гидрофильную аминоконцевую область называемую аминоконцевым внеклеточным доменом,

2) семь гидрофобных сегментов с длиной, составляющей ширину мембраны, называемых трансмембранным доменом,

3) карбокси-концевую область, содержащую потенциальные сайты фосфорилирования (сериновый, треониновый и тирозиновый остатки), и называемую карбокси-концевым внутриклеточным или ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИМ доменом. Это семейство рецепторов гликопротеиновых гормонов отличается от других белок G-связанных рецепторов (таких, как  $\beta$ 2-адренергический, родопсиновый рецептор и рецептор субстанции К) большими размерами своих гидрофильных аминоконцевых доменов, которые участвуют в связывании гормонов

Рецептор ФСГ экспрессировали на клетках Сертоли яичка и зернистых клетках яичника. Хотя необходимость получения, в основном, чистого рецептора ФСГ человека совершенно очевидна, однако, очистка природных препаратов является практически невыгодной процедурой, и к тому же маловероятно, что такая очистка окажется достаточной для определения аминокислотной последовательности. Недавно, одной группой исследователей была клонирована к ДНК, кодирующая рецептор крысиного ФСГ, выведена аминокислотная последовательность этого рецептора, который был экспрессирован в клетках млекопитающего

(Sprengel, Mol Endocrinol 4 525, 1990). Другой группой исследователей, предпринимавших попытки клонировать ФСГ-рецептор, была также, по-видимому, клонирована и идентифицирована часть трансмембранной области рецептора чел. ФСГ (Parmentier, Science 246 1620, 1989)

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к, в основном, чистому рецептору человеческого ФСГ, или его фрагменту или мутанту, способному связывать ФСГ, а также к ДНК, кодирующей указанный рецептор, его фрагмент, или мутант, к векторам экспрессии, содержащим указанную ДНК, к клеткам, трансфицированным указанными векторами экспрессии, и к способам продуцирования указанного рецептора, его фрагмента, или мутанта путем культивирования указанных трансфицированных клеток. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанный рецептор, его фрагмент, или мутант, и к способам лечения пациентов с использованием таких композиций в целях снижения биоактивности эндогенного ФСГ. В настоящей заявке также раскрывается улучшенный анализ чел. ФСГ с использованием рецептора, его фрагмента или мутанта настоящего изобретения

Краткое описание рисунков

На рис 1 представлена карта клонов к ДНК для рецептора ФСГ человека. На рис показана частичная карта рестрикции, которая была построена путем объединения данных о ДНК-последовательностях, полученных от частей каждого из пяти клонов. На карте отмечено увеличение в размере на каждые 0,2 тысяч пар оснований (кв). Области, которым соответствуют клоны, показаны сплошными линиями ниже рестрикционной карты. Обозначения и приблизительные размеры клонов (в кв) указаны слева и справа от каждой сплошной линии, соответственно. Пунктирными стрелками, выше рестрикционной карты, показано приблизительное расположение аминоконцевого внутриклеточного домена, трансмембранного домена, и карбокси-концевого внутриклеточного домена кодированного белка. Положение инсерции (вероятно, интрон или часть интрона) в клоне 5 - 10 показано рамкой

На рис 2А и 2В показана стратегия, использованная для конструирования кДНК "полного" ФСГ-рецептора человека в целях экспрессии кодированного белка в клеточной линии млекопитающего

На рис 3 представлена диаграмма плазмидного вектора экспрессии, использованного для получения клеточных линий СНО-ДИКХ, стабильно трансфицированных чел. ФСГ-рецептором

На рис 4 представлена диаграмма плазмидного вектора экспрессии, использованного для получения клеточных линий VI, стабильно трансфицированных чел. ФСГ-рецептором

На рис 5 проиллюстрированы уровни внутриклеточного цАМФ, измерение в СНО-ДИКХ - кле-

точной линии СНОНГ ЕР 40-13, после обработки различными дозами либо ФСГ (кружки), либо ЛГ (треугольники). Каждая точка представляет среднее значение. Стандартные ошибки показаны вертикальными черточками.

На рис 6 проиллюстрированы уровни прогестерона, измеренные в культуральной среде VI – клеточной линии V1HFSHR4 - 38, после обработки различными дозами ФСГ. Вертикальными черточками обозначены стандартные погрешности (ср кв ош) при измерениях прогестерона для каждой дозы ФСГ.

Подробное описание изобретения

Рассматриваемые в настоящем описании рецептор чел ФСГ, и его ФСГ-связывающие фрагменты или мутанты представляют собой полипептиды, обладающие способностью распознавать и селективно связываются с чел ФСГ, а также продуцировать незначительный иммунологический ответ у человека. Таким образом, настоящее изобретение относится к рецептору чел ФСГ, имеющему аминокислотную последовательность, изображенную в SEQ ID №2, а также к его ФСГ-связывающим фрагментам или мутантам, сохраняющим высокую степень гомологии (по крайней мере, 95% идентичности) с указанной аминокислотной последовательностью или, по крайней мере, ее внеклеточной частью. Объем настоящего изобретения включает в себе такие фрагменты чел ФСГ-рецептора, которые остаются после делеции цитоплазматического и/или трансмембранного доменов из полного полипептида. Особенно предпочтительным фрагментом настоящего изобретения является аминоконцевая внеклеточная часть, содержащая приблизительно аминокислоты 1 - 349 аминокислотной последовательности чел ФСГ-рецептора, показанной в SEQ ID №2. Некоторые из петлевых фрагментов, которые простираются по всей ширине трансмембранных областей (указаны в SEQ ID №2, в разделе "отличительный особенности") являются также внеклеточными, и они могут быть сшиты (посредством соответствующих спейсерных молекул) с фрагментом, содержащим аминоконцевую внеклеточную область, для улучшения связывания. Этот полипептид может быть частично или полностью депгликозилирован.

Кроме того, предполагается, что из вышеописанной аминоконцевой внеклеточной области, лишь ее часть может быть эффективно использована для ФСГ-связываний, поскольку вероятность того, что для этой цели не требуется полный внеклеточный домен, очень велика. Таким образом, фрагмент, который является короче, чем 349 аминокислот полного внеклеточного домена, может быть легко продуцирован и проанализирован на эффективное связывание с ФСГ. Поскольку область ФСГ-связывания внеклеточного домена целиком сохраняется, то полная длина используемого фрагмента не является критической величиной. По этой причине, можно также ожидать, что-либо к концу внеклеточного домена, либо в его ФСГ-связывающему фрагменту могут быть также добавлены аминокислоты, не оказывающие неблагоприятного воздействия на способность полипептида к связыванию. В соответствии с этим,

настоящее изобретение относится к фрагменту чел ФСГ-рецептора, который включает в себя, в основном, часть внеклеточного домена, и который, в основном, сохраняет такую же способность к ФСГ-связыванию, что и полный внеклеточный домен.

Объем настоящего изобретения также включает в себя мутантные формы вышеописанного рецептора и его фрагментов. Такие мутанты могут быть получены с помощью консервативных замещений в 1 - 10 аминокислотных остатках, причем, локализацию и природу этих замещений выбирают таким образом, чтобы они не оказывали неблагоприятного воздействия на ФСГ-связывающие свойства модифицируемого рецептора или его фрагмента.

В основном, чистый чел ФСГ-рецептор, или его фрагмент, или мутант получают путем выделения и клонирования ДНК, кодирующей указанный рецептор, его фрагмент, или мутант, из кДНК или геномной библиотеки, с последующим лигированием этой ДНК в вектор, трансфекцией клеток-хозяев этим вектором, культивированием трансфектированных хозяйских клеток в условиях, благоприятствующих экспрессии рецептора, фрагмента или мутанта, и выделением рецептора, фрагмента или мутанта из культуры.

ДНК, используемая для получения векторов экспрессии, может быть геномной ДНК или кДНК, кодирующей рецептор чел ФСГ, и может содержать области, которые способствуют усилению экспрессии, такие, как интроны, промоторы, энхансеры, и т.п. Эта ДНК может быть легко модифицирована путем замещения, делеции или инсерции нуклеотидов (например, путем сайт-специфического мутагенеза) таким образом, чтобы эти мутации не оказывали неблагоприятного воздействия на биологическую активность или способность к ФСГ-связыванию экспрессированного белка. Например, консервативные замещения (мутации), которые вносят изменения в 1 - 10 аминокислотах, могут быть осуществлены без неблагоприятного воздействия на полную структуру и активность экспрессируемого белка (мутгена). Кроме того, некоторые части ДНК, например, части, которые кодируют цитоплазматический и/или трансмембранный домены, могут быть делетированы таким образом, чтобы экспрессировался лишь один фрагмент белка, такой, как растворимый внеклеточный домен. Рецептор чел ФСГ или ФСГ-связывающий его фрагмент или мутант могут быть также экспрессированы в виде гибридного белка. Один из таких гибридных белков может содержать полипептид в карбокси-конце, который обладает свойствами, облегчающими очистку белка, или иммобилизацию очищенного белка на твердом субстрате в целях его использования в анализах ФСГ или в процедурах очистки ФСГ. Другой такой гибридный белок может содержать отщепляемый полипептид у аминоконца, который будет способствовать облегчению экспрессии.

Рецептор чел ФСГ, продуцируемый в соответствии с настоящим изобретением, является, в основном, чистым, а это означает, что он, в основном, не содержит нежелательных биологических

включений, обычно ассоциирующихся с ФСГ-рецептором, экстрагированным, обычно ассоциирующихся с ФСГ-рецептором, экстрагированным из натуральных источников, таких, как бактерии, вирусы, и другие белки. Указанный рецептор может быть включен в фармацевтическую композицию путем смешивания с подходящими фармацевтическими приемлемыми носителями, хорошо известными специалистами.

Вообще говоря, фармацевтические композиции могут быть составлены для перорального, парентерального (подкожно, внутримышечно, и внутривенно), вагинального, ректального, буккального (например, подязычно), трансдермального или внутриносового введения. Композиции для парентерального введения обычно изготавливают в виде жидкого раствора, дисперсии или эмульсии, предпочтительно, в виде изотонического раствора, для вагинального или ректального введения — в виде кремов или суппозитория, для перорального или буккального введения — в виде порошка, капель для пускания в нос, или аэрозолей. При этом, могут быть использованы лекарственные формы с пролонгированным высвобождением, например, имплантат, или инъекционные формы. Активный компонент может быть также введен в полимерные матрицы, липосомы и микросферы в целях регулирования доставки лекарственного средства к нужным тканям или органам.

Эти композиции могут быть введены в виде разовых лекарственных форм, которые могут быть получены в соответствии с традиционной фармацевтической техникой. Композиции для парентерального введения могут содержать в качестве наполнителей стерильную воду или солевой раствор, алкиленгликоли, такие, как пропиленгликоль, полиангликоли, такие, как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрогенизированные нафталины и т.п. Композиции для вагинального или ректального введения, например, суппозитории, могут содержать в качестве наполнителей, например, полиаллилгликоли, вазелин, какао-масло, и т.п. Композиции для введения через нос, изготовленные в виде порошков, могут в качестве наполнителей содержать лактозу или декстран, либо они могут быть изготовлены в виде водных или масляных растворов и введены через нос в виде капель или дозируемого распыляемого раствора. Для трансбуккального введения, стандартными растворителями являются сахар, стеарат кальция, крахмал, набухающий в холодной воде, и т.п. К раствору или порошкообразной композиции могут быть добавлены кислоты или соли поверхностно-активных веществ. Подходящими фармацевтическими приемлемыми солями поверхностно-активных веществ (ПАВ) являются такие соли, которые сохраняют способность к повышенной абсорбции пептида, и свойства ПАВ, а также не оказывают нежелательного воздействия на композицию, и не имеют других нежелательных свойств.

Дозы вводимых активных ингредиентов, а также способ и режим введения зависят от конкретных данных пациента, его состояния и нужного терапевтического эффекта, и могут быть определены лечащим врачом.

Фармацевтические композиции, содержащие рецептор чел. ЦСГ, либо его ФСГ-связывающие фрагменты или мутанты, могут быть введены пациенту в дозах, являющихся терапевтически эффективными для связывания с эндогенными циркулирующим в организме пациента фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ), в целях регулирования приемлемого уровня биоактивного ФСГ. Так, например, фармацевтические композиции настоящего изобретения могут быть эффективно использованы для снижения эндогенной ФСГ-биоактивности. Например, женщинам может быть назначено лечение с использованием вышеуказанных композиций в целях предупреждения роста и созревания фолликулов, и тем самым предупреждения беременности мужчинам, такое лечение может быть назначено для предупреждения сперматогенеза. Особенно предпочтительная фармацевтическая композиция, которая может быть использована в вышеуказанных целях, включает в себя фрагмент рецептора человеческого ФСГ, содержащий аминоконцевой внеклеточный домен или его значительную часть, и обладающий, в основном, такой же способностью ФСГ-связыванию, что и полный рецептор.

В основном, чистый рецептор цел. ФСГ может быть также с успехом использован в стандартном анализе для ФСГ, который, например, описан Reichert в *Endocrinology* 84: 483, 1974. Замещения в чистом рецепторе настоящего изобретения, или в его фрагменте, способном к ФСГ-связыванию, позволят значительно усовершенствовать проведение указанных анализов. Фрагмент, содержащий аминоконцевой внеклеточный домен или его ФСГ-связывающую часть и/или гибриды может быть также аффинно связан с колонкой в целях выделения ФСГ из жидкостей, экстрактов и т.п.

Указанный рецептор может быть введен в стабильную клеточную линию, предпочтительно линию эукариотических клеток, а наиболее предпочтительно линию клеток млекопитающего, которая способна продуцировать обнаружимый биологический ответ при стимулировании рецептора. Измерение клеточного ответа в присутствии ФСГ при проведении анализа (например, в сыворотке, плазме, культуральной среде, тканевых гомогенатах) будет служить указанием на биоактивность, и тем самым на значительную ценность диагностического анализа. Указанная клеточная линия может быть также использована для скрининга химических библиотек в целях оценки веществ, которые могут взаимодействовать с ФСГ-рецептором, или испытываемых пептидов, или небольших белков на их способность связываться с ФСГ-рецептором в скринирующей системе с высокой продуктивностью. Примером такой высокопродуктивной скринирующей системы является система, в которой связывание лиганда с рекомбинантным ФСГ-рецептором способствует продуцированию или блокированию образования оцениваемого продукта, такого, как cAMP или прогестерона. Кроме того, указанная система может быть усилена путем соответствующего связывания легко обнаружимого маркера, например, биолюминесцирующего агента (напр., ген люциферазы), с сигнал-трансдуцирующим участком

рецептора (например, с использованием элемента cAMP-ответа)

В основном, чистый рецептор чел ФСГ или его ФСР-связывающие фрагменты или мутанты могут быть также использованы в кристаллографическом рентгеновском анализе для разработки молекулярных моделей. Такие модели могут быть использованы при определении третичной структуры гормон-связывающих доменов чел ФСР-рецептора. Полученная таким образом информация внесла бы значительный вклад в изучение структуры важных областей, осуществляющих взаимодействие между ФСГ и его рецептором, что позволило бы конструировать пептиды, обладающие ФСГ-агонистической или ФСГ-антагонистической активностью.

Рекомбинантная техника, используемая для продуцирования белков и ДНК настоящего изобретения, и включающая в себя способы идентификации соответствующих мутаций, векторы, хозяйские клетки, условия культивирования, и т.п., является хорошо известной специалистам, и адекватно описана, например, в патенте СКА 4 761 371 и WO 88/09819, раскрытие которых вводится в настоящее описание посредством ссылки. Экспериментальные схемы, бактериальные и бактериофаговые культуральные среды, и химические растворы, используемые в приведенных ниже Примерах (если это не оговорено особо), подробно описаны Sambrook в "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2-ое изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

**Пример 1. Выделение и характеристика кДНК-клонов рецептора чел ФСГ**

**Скрининг библиотеки**

кДНК-клон рецептора крысиного ФСГ, аналогичный описанному Sprengel в "Mol. Endocrinol." 4:525, 1990, получили от Dr. William Moyle, University of Medicine and Dentistry of New Jersey-Robert Wood Johnson Medical School. Этот кДНК-клон инсертировали в поздней экспрессирующий вектор pSVL SV40 (Pharmacia LKB, номер продукта 27-4500-01) и полученный вектор обозначили pSVL FHR 2.1-кв - фрагмент ДНК, содержащий область соответствующую области, кодирующей полный рецептор крысиного ФСГ, вырезали из плазмиды с использованием сайтов рестрикации эндонуклеаз Xba I и BamHI. Переваренную ДНК фракционировали по размерам с помощью гелевого электрофореза, и 2.1-кв - фрагмент рецептора крысиного ФСГ очищали с помощью электроэлюции с геля. Этот очищенный ДНК-фрагмент использовали в качестве пробы для скрининга библиотеки в целях идентификации кДНК-клонов рецептора чел ФСГ.

кДНК - библиотеку лямбда - gt11, сконструированную из РНК, экстрагированной из яичка человека, получали Clontech, Palo Alto, CA (кат. номер HIL 101 об), и до ее использования амплифицировали 20 аликвот амплифицированной библиотеки, что соответствует приблизительно  $7,5 \times 10^4$  бляшкообразующих единиц (БОЕ), были адсорбированы. Примерно в 0,5 мл суспензии для культивирования штамма V1088 *E. coli*. Эту суспензию получали путем культивирования ночной культуры V1088 при 37°C в NZYM или LB-

среде, дополненной 0,2% мальтозой и 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, и осаждения клеток с последующим их ресуспендированием в 10 мМ MgSO<sub>4</sub> до  $0,11 \times 10^8$  = 0,5. Затем к каждой суспензии фага/клетки добавляли около 6,5 мл расплавленной верхней NZYM-агарозы (0,7%) при температуре 48°C, и полученную смесь выливали в одну из 20 чашек (150 мл) с NZYM-агаром предварительно нагретом до 42°C. Общее число фага, пассированного для первичного скрининга, составляло около  $1,5 \times 10^6$ . После 4-часового инкубирования при 42°C с последующим охлаждением при 4°C в течение нескольких часов, для каждой чашки генерировали слои бляшек на дубликатных интроцеллюлозных фильтрах (Millipore) в соответствии с процедурами, описанными Benton и Davies (Science 196:180, 1977). С помощью процедуры праймирования с использованием олигонуклеотида, описанной Pelberd и Yagelstein (Anal. Biochem. 137:268, 1983), из фрагмента-матрицы ДНК рецептора крысиного ФСГ, описанного в предыдущем параграфе, генерировали <sup>32</sup>P-меченную пробу со специфической активностью 1 -  $2 \times 10^6$  им/мин/микрограмм (мкг). Предгибридизацию фаговых слоев на нитроцеллюлозных фильтрах проводили в буфере, содержащем 50% формамида, 5 x SSC 1 x SSC = 0,15 М хлорида натрия, 0,015 М цитрат натрия, 20 мМ фосфатно-натриевого буфера (pH 7,2), 10 x реагент Денкардта (50 x реагент Денкардта = 1% Фиколл, 1% полифинилпирролидон, и 1% альбумин бычьей сыворотки), и 100 мкг/мл tPHK при 37°C. Примерно в течение 6 часов. Гибридизацию фильтров осуществляли в том же буфере, за исключением того, что пробу ДНК крысиного ФСГ-рецептора добавляли при концентрации около  $3 \times 10^6$  им/мин на мл буфера. После гибридизации при 37°C в течение 16-24 часов, избыток пробы промывали с фильтром в 2 x SSC, 0,1% ДСН при комнатной температуре в течение 30 минут, а затем в 0,2 x SSC, 0,1% ДСН при 37°C в течение 60 минут. Затем фильтры экспонировали с рентгеновской пленкой (XAR Kodak) в течение ночи при -70°C. 6 дубликатных позитивов идентифицировали исходя из первичного скрининга библиотеки. Широким концом пастеровской пипетки, бляшко-содержащие агаровые слои удаляли из 150 мм - чашек в тех местах, где располагались позитивные клоны. Фаг элюировали путем погружения этих слоев в SM. Суспендированный фаг затем снова засеивали на 150 мм - чашки с NZYM-агаром, как описано выше для первичного скрининга. Чашки, содержащие около 500 БОЕ/чашка отбирали для вторичного скрининга. Процедуры, используемые для получения фильтров и их гибридизации для вторичного скрининга, были аналогичны процедурам, описанным выше для первичного скрининга.

После вторичного скрининга, 5 предполагаемых чел ФСГ-рецептор - позитивных клонов идентифицировали и выделяли в виде очищенных клонов бактериофага  $\lambda$ gt11. Эти клоны обозначали 1 - 5, 5 - 10, 11 - 11, 13 - 9 и 15 - 6.

**Определение ДНК - последовательностей предполагаемых кДНК-клонов рецептора чел ФСГ**

Фаговую ДНК получали от каждого изолята

кДНК $\lambda$ gt11 с использованием метода лизаса в чашках, описанного Sambrook в "Molecular Cloning A Laboratory Manual" 2-ое изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, стр. 2118. Фаговую ДНК переваривали рестриктивирующей эндонуклеазой EcoRI, а затем фракционировали по размерам в агарозном геле для очистки инсерционных фрагментов кДНК. Очищенный кДНК-вставки субклонировали в EcoRI-сайт pVC18 в целях облегчения последующих манипуляций по клонированию и секвенированию. Двухцепочную плазмидную ДНК очищали из 5мл культуры штамма-хозяина E. coli, MC1066 с использованием метода мелкокомасштабного щелочного лизаса (Sambrook, там же, см. выше, стр. 1,25), а затем очищали путем пропускания через Elutip-d-колонки (Schlacher, e Schuet Keene, NH) в соответствии с инструкцией изготовителей. После этого, половину плазмидной ДНК, полученной от каждого препарата денатурировали в 0,2н NaOH 0,2мМ EDTA в объеме 20мкл, при комнатной температуре, в течение 10 минут. Денатурированную плазмидную ДНК нейтрализовали, и осаждали этанолом путем добавления 7,5мкл 7,5М ацетата аммония и 110мкл 100% этанола, после чего смесь охлаждали в жидком азоте. ДНК-приципитат осаждали в течение 10 минут на микроцентрифуге. ДНК-осадок промывали в 70% этаноле и осушали. Реакции секвенирования осуществляли с использованием ДНК-полимеразы T7 (United States Biochemical) в соответствии с инструкцией изготовителей. Предварительные реакции секвенирования осуществляли с использованием прямого и обратного секвенирующих праймеров (Pharmacia LKB) для полипинкерной области pVC18. Данные, полученные в результате предварительного секвенирования, использовали для конструирования чел. ФСГ-рецептор - специфических секвенирующих праймеров. Эти праймеры либо синтезировали на ДНК-синтезаторе модели 391 Applied Biosystem либо заказывали в National Biosciences Inc, Hamel, MN. Некоторые данные о ДНК-последовательности были получены путем субклонирования более мелких рестрикционных фрагментов исходных клонов в pVC18 и повторного секвенирования с использованием прямого и обратного праймеров.

Предварительные данные секвенирования показали, что ни один из пяти кДНК-изолятов не представляет область, кодирующую полный чел. ФСГ-рецептор, однако, объединенные данные секвенирования по пяти клонам могут быть использованы для вывода полной последовательности белка. Схематическая диаграмма относительного расположения каждого из пяти клонов по отношению к полной кДНК-последовательности, кодирующей чел. ФСГ-рецептор, представлена (см. ниже) на рис. 1. кДНК-последовательность полного чел. ФСГ-рецептора, полученная путем объединения данных секвенирования, проводимого в соответствии с компьютерной программой сборки фрагментов (Genetic Computer Group (GCG)), изображена в SEQ ID №2. Анализ ДНК-последовательности чел. ФСГ-рецептора позволил идентифицировать длинную открытую рамку считывания из 2085 нуклеотидов, которая кодирует

белок 695 аминокислот. Рецептор человеческого ФСГ на 3 аминокислоты длиннее, рецептора крысиного ФСГ. Полный % сходства между ДНК крысиного и человеческого ФСГ и белковыми последовательностями, который был определен с использованием программы GCG Bestfit, составлял 87% и 90%, соответственно. По проведенным оценкам, внеклеточная аминоконцевая гидрофильная часть рецептора чел. ФСГ составляет в длину 349 аминокислот, и имеет 87% сходства с соответствующей областью крысиного ФСГ. Семь трансмембранных областей двух видов, которые связаны мостиковой связью тремя внеклеточными и тремя внутриклеточными петлями, имеют идентичность 95%, а карбокси-концевые внутриклеточные области имеют лишь 81% идентичности. Частичная аминокислотная последовательность, опубликованная Parmentier, Science 246: 1820 - 1022, 1989, соответствует аминокислотам 399 - 525 в SEQ ID №2.

Клон 5 - 10 был мутантным и имел инсерцию 0,25кв после нуклеотида Т в положении 448 в SEQ ID №1. ДНК-последовательность инсерции не имеет сходства с какой-либо частью ДНК-последовательности крысиного ФСГ- или человеческого ФСГ-рецептора, а также не похожа на какую-либо известную последовательность в Банке генов или базах данных ДНК-последовательностей в EMBL. Соответствующая область в клоне 11 - 11 не содержит указанной инсерции. кДНК-клоны рецептора LH, выделенные из кДНК-библиотеки щеточной железы человека, содержат аналогичные мутации (Prasler, Mol. Endocrinol. 4: 1264 - 1276, 1990). Эти мутации, очевидно, происходят в результате неполного и/или aberrантного сплайсинга РНК-молекул. Это объяснение подтверждается присутствием 3'-сплассируемого консенсуса (CAG/G) в 3'-области соединения инсерции 5-10.

Плазмиды pVC18, содержащие кДНК-вставки 10 - 11 (обозначенная pHFSH R 11 - 11), 15 - 6 (обозначенная pHFSHR 15 - 6), и 5 - 10 (обозначенная pHFSHR 5 - 10), были депонированы Американской коллекцией типовых культур (ATCC, Роквилл, МД), 1 марта 1991, и имеют следующие номера допуска: ATCC68538, ATCC68500, и ATCC68539, соответственно. Указанное депонирование было осуществлено в соответствии со всеми требованиями Будапештского соглашения.

Пример 2. Конструирование векторов для экспрессии полного рецептора чел. ФСГ в клетках млекопитающего.

Стратегия конструирования ДНК, кодирующей рецептор чел. ФСГ, для экспрессии в клетках млекопитающих показаны на рис. 2А и 2В. На рис. 2А, NsiI-BmnHI-фрагмент из 5'-691 пар оснований (по), содержащий старт-АТС, выделяли из pHFSHR 11 - 11 и субклонировали в pVC18, переваренную PstI и BamHI. Полученную плазмиду, pHFSHR 11 - 11 nb, линейаризовали с помощью SphI. Концы затупляли путем обработки фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I (New England Biolabs, Beverly, MA) с тупыми концами плазмиды, смесь переваривали XhoI и BamHI и 5'-фрагмент рецептора чел. ФСГ, составляющий приблизительно 700 по, очищали. Фрагмент из срединной



области кДНК чел ФСГ-рецептора выделяли рHFSHR 11 - 11 путем переваривания BamHI и SphI и проводили гель-очистку фрагмента прилб в 734 п о 3'-фрагмент чел ФСГ-рецептора, содержащий стоп-кодон TAA, выделяли из рHFSHR15-6 сначала путем переваривания плазмиды ферментом DraIII, а затем затупления концов в реакции с ДНК-полимеразой T4 Xho-линкеры лигировали в тупые концы, полученную смесь переваривали SphI и XhoI, а 3'-Sphe-XhoI-фрагмент приблизительно 690 п о

На рис 2В, 5' - 700 п о - XhoI - BamHI - и срединный 734 п о BamHI - SphI - фрагменты кДНК чел рецептора ФСГ субклонировали в pVC18-XhoI (созданного в лаборатории путем превращения SmaI-сайта в полилинкере pVC18 в XhoI-сайт с использованием XhoI-линкеров), переваренного XhoI и SphI. Полученную плазмиду (рHFSHR 14XS) переваривали XhoI и SphI. Переваренную ДНК фракционировали по размерам с помощью электрофореза в 5-6% полиакриламидном геле, и фрагмент (Примерно 1400 п о), содержащий 5'- и срединную области кДНК чел ФСГ-рецептора, вырезали и очищали путем электроэлюирования 3'-SphI-XhoI-фрагмент, содержащий стоп-кодон TAA, субклонировали в pVC18-XhoI, переваренный SphI и XhoI. Полученную плазмиду переваривали SphI и EcoRI. Переваренную ДНК фракционировали в 5 - 6% полиакриламидном геле, и кусок приблизительно 700 п о вырезали и очищали путем электроэлюирования. Затем осуществляли сборку области, кодирующей полный чел ФСГ-рецептор, объединяя 5' - 1400 п о - XhoI - SphI-фрагмент с 3'-700 п о - SphI - EcoRI-фрагментом при лигировании с pVC18 - XhoI, переваренным XhoI и EcoRI. Правильность сборки конструкции, обозначенной рHFSHRX, проверяли путем переваривания рестриктирующими эндонуклеазами и ДНК-секвенирования. Полностью сконструированный 2,1кв - XhoI-фрагмент чел ФСГ-рецептора, который содержит приблизительно 18 п о 5' - не кодирующей последовательности и 12 п о 3' - не кодирующей последовательности в дополнение к области, кодирующей полный чел ФСГ-рецептор, вырезали из рHFSHRX путем XhoI-переваривания. Переваренную ДНК фракционировали по размерам с помощью электрофореза в 0,7% агарозном геле 2,1кв - фрагмент вырезали из геля, очищали путем электроэлюирования в Little Blue Tank<sup>TM</sup> (ISCO) с использованием процедуры, рекомендованной изготовителями, и вставляли в XhoI-сайты клонирования плазмидного вектора для экспрессии в клетке млекопитающего. Плазмиды, содержащие вставку в соответствующей ориентации для транскрипции мРНК чел ФСГ-рецептора, отбирали путем рестрикционного анализа. Перед введением в клетки млекопитающих, плазмидную ДНК вектора экспрессии очищали либо с помощью двух последовательных процедур высокоскоростного центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия, либо с помощью плазмидного набора maxi-kit (Qiagen, Chatsworth, CA) в соответствии с инструкцией изготовителя.

Для экспрессии чел ФМГ-рецептора может быть использован любой подходящий экспрессирующий вектор клетки млекопитающего. Плаз-

мидный вектор имеет следующие необходимые компоненты: эукариотический промотор, такой, как промотор мышинового металпотионина 1 (ММГ-I), промотор вируса саркомы Рауса, либо ранний или поздний промотор обезьяньего вируса SV40, для запуска транскрипции мРНК чел ФСГ-рецептора, маркерный ген, такой, как ген резистентности к неомицину (нес), ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), или ген кодирующий множественную лекарственную устойчивость (MDR), для селекции трансфицированных клеток, сигнал полиаденилирования (поли А), такой, как ранний участок полиаденилирования SV40 для 3'-процессинга РНК-транскрипта рецептора, и бактериальную область репликации и гена устойчивости к антибиотику, такую, как *ori* рBP322 и ген резистентности к ампициллину, присутствие этих компонентов необходимо для роста и размножения плазмидного вектора в соответствующей штамме *E. coli*. Для некоторых клеточных линий может оказаться необходимым введение интрона в область, которая транскрибируется в мРНК, кодирующей чел ФСГ-рецептор. Этот интрон предпочтительно поместить между промотором и кДНК-вставкой чел ФСГ-рецептора, что соответствует его локализации в 5'-нетранслированной области РНК-транскрипта чел ФСГ-рецептора. В этих целях может быть использован любой подходящий интрон. В данных экспериментах, в качестве интрона была использована XbaI - Iste - часть (2кв) интрона А в гене  $\alpha$ -субъединицы человеческого гликопротеина (Fiddes, J Mol Appl Genet 1 13, 1981). В векторах экспрессии, эту часть интрона вставляли между областью промотора ММГ-I и кДНК - фрагментом чел ФСГ-рецептора. Усеченный интрон сохранял акцептор эндогенного сплайсированного фрагмента, но донор сплайсированного фрагмента поставлялся синтетическим олигонуклеотидом.

Диаграмма экспрессирующего вектора чел ФСГ-рецептора, используемого для трансфекции CHO-клеток, а именно hDcHPSHRX (чел ФСГ-рецептор в CLH3AXSY2DHFRh IVS), показана на рис 3, а диаграмма экспрессирующего вектора чел ФСГ-рецептора, используемого для стабильной трансфекции VI-клеток, а именно рNcHFSHRX (чел ФСГ-рецептор в CLH3AXSV2 NEOh IVS) показана на рис 4. Последовательность MMT-I-гена (нуклеотиды 4542 - 7514 на рис 3, и нуклеотиды 5192 - 8164 на рис 4), включающие в себя проторную область, аналогичны последовательностям, показанным "вверх по течению" от XhoI-сайта в конструкции CLH3X (Reddy, ДНК, 6 461, 1987). Фрагмент интрона А гена  $\alpha$ -субъединицы чел гликопротеина, описанный в предыдущем абзаце, расположен между нуклеотидами 7514 и 9514 на рис 3 и между нуклеотидами 8164 - 10164 на рис 4. "Вниз по течению" от XhoI-сайта, MMT-I-интроны и последовательности сигнала полиаденилирования удаляли и заменяли ранним участком полиаденилирования SV40 (нуклеотиды 11614 - 11857 на рис 3, и нуклеотиды 12264 - 12508 на рис 4). Транскриптон гена DHFR (нуклеотиды 1 - 1925 на рис 3), который включает в себя кДНК мышинной DHFR и область раннего просмотра SV40, небольшой Т-интрон, и последовательности

ранней области полиаденилирования, соответствует PVUII – BamHI – фрагменту в pSV2DHFR (Subramani, Mol. Cell. Biol., 1 854, 1981) PVUII-сайт превращали в BamHI-сайт перед введением этого фрагмента в плазмидный вектор экспрессии. Транскриптон гена *neo* (нуклеотиды 1 - 2575 на рис 4) синтезировали путем замены кДНК НГР (нуклеотиды 342 - 1077 на рис 3) HindIII-SmaI-фрагментом (1885 п.о.) происходящим от pSV2-*neo* (Suothern, J. Mol. Appl. Genet., 1 327, 1982) SmaI-сайт – превращали в BamHI-сайт введением этого фрагмента в экспрессирующий плазмидный вектор.

Для трансфекции большинства стабильных клеточных линий млекопитающих может быть использована плазида pNshFSHRX, которая была депонирована в ATCC 19 ноября 1991 года под номером допуска ATCC68838. Это депонирование было осуществлено в соответствии со всеми требованиями Будапештского договора. Плазида pNshFSHRX является наиболее подходящей для трансфекции клеточных линий, в которых отсутствует активность дигидрофолатредуктазы (DHFR).

Техника клонирования и конструирования ДНК может быть использована любым специалистом в целях модифицирования экспрессирующей конструкции ДНК чел. ФСГ-рецептора, так, чтобы кодировались фрагменты ФСГ-связывания. Эти модифицированные ДНК-фрагменты могут быть вставлены в векторы экспрессии аналогично тому, что как было описано выше, и использованы для трансфекции клеток млекопитающего в целях получения линий, секретирующих растворимые фрагменты ФСГ-связывания чел. ФМГ-рецептора, такие, как аминоконцевой внеклеточный демент или его ФСГ-связывающий фрагмент.

Пример 3. Получение клеточных линий млекопитающего, которые стабильно экспрессируют функциональный рекомбинантный чел. ФСГ-рецептор или его ФСГ-связывающий фрагмент или мутант.

Подходящими клеточными линиями млекопитающих для экспрессии рекомбинантного чел. ФСГ-рецептора и его производных являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), мышинной аденокарциномы VI, крысиного гипофиза CH<sub>3</sub>, карциномы молочной железы человека MCF7, и клетки первичной почки человека 293. В этом Примере, описано использование клеток VI и CHO.

Клетки VI представляют собой штамм клоногенных стероид-секретирующих клеток, полученных от опухоли мышинного коркового вещества надпочечника (Yasumura, Cancer Res. 26 523 - 536, 1966). Для данного эксперимента, эти клетки были получены из банка клеток ATCC (ATCC CCL 79) а затем, они были культивированы в среде Ham F 10, дополненной 15% лошадиной сывороткой (HS), 2,5%-FBS, и 1%-L-глутамином (среда роста для VI).

CHO-DUKX - клетки представляют собой клоногенные мутантные клетки ЯИЧНИКА китайского хомячка, в которых отсутствует активность дигидрофолатредуктазы (Orlaub G. и Chasin LA 7 4216 - 4220, 1980). Эти клетки выдерживали в минимальной поддерживающей среде - альфа (MEM -

α), дополненной 10% FBS и 1% L-глутамином (среда роста для CHO).

Культивирование всех клеток осуществляли при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в условиях влажности.

Трансфекция с использованием фосфата кальция.

Схема трансфекции, используемая в настоящем эксперименте, представляла собой модификацию опубликованного метода (Graham, Virology, 52 456, 1973). Приблизительно за 24 часа до трансфекции, клетки засеивали на чашки диаметром 100 мм при плотности  $7 \times 10^5$  клеток на чашку (CHO-DUKX) или  $1 \times 10^6$  клеток на чашку (VI). Для трансфекции, к 0,5мл трансфекционного буфера добавляли 10мкг ДНК плазмидного вектора (pDHFSHRX для клеток CHO-DUKX, и pNshFSHRX для клеток VI). Трансфекционный буфер получали путем смешивания 4грамма (г) NaCl, 0,185 и KCl, 0,05 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5г декстрозы, в 2,5г HEPES в стерильной дистиллированной воде, и доведения объема до 500мл, а pH до 7,5. К смеси трансфекционного буфера и ДНК добавляли 31мкл 2М CaCl<sub>2</sub>. Полученный раствор смешивали с помощью вибрационного смесителя, и на 45 минут при комнатной температуре для осаждения ДНК. После удаления культуральной среды, осажденную ДНК наносили поверх клеток. После выдерживания при комнатной температуре в течение 20 минут, добавляли 5Мл соответствующей среды роста и культивировали в течение 6 часов. Затем среду удаляли, и клетки встряхивали в течение 3,5 минут в 3 - 4мл трансфекционного буфера, содержащего 15% глицерина. После этого, клетки дважды промывали фосфатно-буферным раствором, а затем добавляли 10мл среды роста. Приблизительно через 48 часов после трансфекции, клетки CHO-DUKX субкультивировали при индексе разведения 1:10, а затем добавляли селекционную среду. После трансфекции, клетки VI культивировали в течение 72 часов, а затем субкультивировали при индексе разведения 1:5 в селективной среде. Селективная среда для клеток VI содержала среду роста для клеток VI с 80мкг/мл C418. МТХ-резистентные колонии клеток CHO-DUKX и G418-резистентные колонии клеток VI, образовавшиеся. Примерно через 2 - 3 недели, собирали отдельно, и культивировали до тех пор, пока число клеток, не будет достаточным для криоконсервации и оценки на реактивность гормона.

Иллюстрация биореактивности рекомбинантного чел. ФСГ-рецептора в стабильно трансфекцированных клетках CHO.

Чтобы определить может ли кДНК-конструкция чел. ФСГ-рецептора продуцировать биологически функциональный белок в стабильно трансфекцированных клетках CHO, колонии МТХ - резистентных клеток CHO обрабатывали рекомбинантным чел. ФСГ, и измеряли уровни внутриклеточного cAMP. Для анализа на уровне cAMP, клетки субкультивировали в 12-луночных планшетах при плотности  $2,5 \times 10^4$  клеток на лунку в селективной среде для клеток CHO. Через 72-часового культивирования, каждую лунку промывали 1,5мл теплой ростовой среды. Затем, в каждую промытую лунку добавляли 300мкл бессыворотной рос-

товой среды, содержащей 0,1мМ –изобутил-1-метилксантина (Sigma) После 15-минутного культивирования, к среде в каждой лунке добавляли рекомбинантный чел ФСГ так, чтобы конечная концентрация составляла приблизительно 335нг (2413мМЕ) на мл После 30-минутного культивирования, анализ завершали тем, что клетки подвергали четырем циклам быстрого замораживания - оттаивания 50мкл аликвоту от каждого клеточного лизата вводили в 1,5мл пробирку для определения содержания белка К каждому оставшемуся образцу лизата добавляли холодный этанол (300мкл), а затем образцы переносили в отдельные 1,5мл-пробирки Все образцы лизатов центрифугировали 15 минут при 13000 x g для удаления клеточного дебриса Определение содержания полного растворимого белка осуществляли с использованием набора для анализа белков, полученного от Bio-Rad (кат №500 - 0002) в соответствии с инструкцией изготовителей Обработанные этанолом образцы лизатов лиофилизовали в аликвотах 5 - 100мкл, и ресуспендировали в 100мкл буфера для анализа, полученного в виде набора для анализа цАМР Dupont/NEW (Medical Product, кат № NEK - 033) Содержание кАМР в образцах ресуспендированных лизатов определяли в соответствии со схемой радиоиммуноанализа методом ацетилирования, которая прилагается к набору Для этого анализа, образцы не разводили В боль инстве клеточных линий CHO, трансфецированных чел ФСГ-рецептором, более высокие уровни внутриклеточного цАМР обнаруживались В клетках после ФСГ-стимулирования, чем в контрольных клетках (не-трансфецированных клетках CHO-DUKX и клетках CHO-DUKX, трансфецированных CLN3AX SV2DHFRhd1VS) В среднем, ответ в этих клетках Примерно в 16 раз превышал ответ в контрольных клетках

Для анализа эффекта дозы использовали одну неклональную клеточную линию, CHCHFSHR 4Q-13 При этом повторяли процедуру, описанную в предыдущем абзаце, за исключением того, что клетки обрабатывали либо рекомбинантным чел ФСГ, либо ЛГ в концентрации порядка 0 - 10000мМЕ/мл Каждую дозу анализировали в трех дубликатах Количество продуцируемого внутриклеточного цАМР выражали в наномолях (нМ) на миллиграмм (мг) растворимого белка, а кривую зависимости ответа от дозы для ФСГ и ЛГ Эти кривые зависимости ответа от дозы для ФСГ и ЛГ показаны на рис 5 Полученные результаты показали, что CHO-клеточная линия CHCHFSHR 4Q-13 обнаруживала насыщаемое увеличение внутриклеточного цАМР в ответ на ФСГ-стимуляцию, но в ответ на ЛГ-стимуляцию этого увеличения не наблюдалось 50% от максимального ФСГ-стимулирования ( $ED_{50}$ ) имело место при дозе 144мМЕ/мл ФСГ Поэтому, к ДНК чел ФСГ-рецептора может быть использована для продуцирования биологически функционального чел ФСГ-рецептора в CHO-клетках, которые опосредуют специфический цАМР-ответ на ФСГ, и не реагируют на ЛГ

Содержание ФСГ-рецептора в клеточной линии CHCHFSHR 4Q-13 или в аналогичной линии,

которая продуцирует рекомбинантный чел ФСГ-рецептор или его ФСГ-связывающие фрагменты или мутанты, может быть увеличено путем постепенного увеличения МТХ-концентрации Это приводит к амплификации числа копий кДНК DHFR вместе с присоединенными последовательностями, которые включают в себя кДНК чел ФСГ-рецептора, что косвенно способствует синтезу кодированных белков Это может быть также осуществлено, если необходимо, для повышения чувствительности биоанализа Кроме того, клетки млекопитающего, которые экспрессируют высокие уровни чел ФСГ-рецептора или его ФСГ-связывающих фрагментов или мутантов, могут быть также использованы для получения больших количеств белка чел ФСГ-рецептора для терапевтических целей, либо для радиоиммуноанализа рецепторов

Линия CHCHFSHR 4Q-13 или аналогичная линия, может быть также использована в анализе для оценки *in vitro* биоактивности фармацевтических препаратов, содержащих ФСГ, или ФСГ-подобные вещества Ген-"репортер", такой, как люцифераза, может быть соответствующим образом сшит с элементом, ответственным за цАМР-ответ, и увеличение цАМР-уровней может быть косвенно измерено с использованием нерадиоактивного метода, например, с использованием биoluminesценции, в целях определения ФСГ-биоактивности

Линия CHCHFSHR 4Q-13 была депонирована в ATCC 19 ноября 1991 года под номером допуска ATCC CRL 10021 Это депонирование было осуществлено в соответствии с требованиями Будапештского договора

Иллюстрации биоактивности рекомбинантного чел ФСГ-рецептора в стабильно трансфецированных клетках VI мышинного надпочечника

Чтобы определить, что может ли кДНК-конструкция чел ФСГ-рецептора продуцировать биологически функциональный белок в стабильно трансфецированных клетках VI, колонии 0418 безистентных клеток VI обрабатывали рекомбинантным чел ФСГ, и культуральную среду анализировали на содержание прогестерона Для анализа на прогестерон, клетки субкультивировали в 6-луночных планшетах (35мм диаметром каждая лунка) при плотности  $4 \times 10^5$  клеток на лунку в селективной среде для VI-клеток После 2-дневного культивирования, селективную среду удаляли и заменяли 3мл среды HamF10, дополненной 5% лошадиной сывороткой, 0,8% околородной бычьей сывороткой (FBS), 1% L-глутамином, и 80мкг/мл G418 (среда для анализа) В это время оценивали среднее число клеток на лунку для каждой клеточной линии путем удаления и подсчета клеток по трем тестируемым лункам Затем клетки культивировали в течение 4 часов в 1мл аналитической среды, содержащей 100мМЕ/мл человеческого рекомбинантного ФСГ После инкубирования, чашки с культурой помещали на лед, а культуральную среду из каждой лунки переносили в отдельные стеклянные лабораторные пробирки (12 x 75) Пробирки, содержащие культуральную среду, помещали на 10 минут в баню с кипящей водой, а затем центрифугировали при 1100 x g при

4°C Супернатанты переносили в чистые стеклянные лабораторные пробирки (12 x 75) и хранили в течение ночи при -20°C. После этого определяли уровни прогестерона с использованием готового продукта Serono Diagnostics Progesterone MAIA, №12274, поставляемого Ciba Corning Medfield, MA. Анализ проводили в соответствии с инструкциями производителей, за исключением того, что образцы культуральной среды и прогестерона для стандартной кривой разводили в фосфатно-буферном растворе, содержащей 0,1% альбумин бычьей сыворотки и 0,6% азида натрия (вместо разведенного буфера, предлагаемого в наборе). Прогестерон для построения стандартной кривой получали от Cal Biochem (кат. №5341), и перед использованием разводили до концентрации 15мкг/мл в 100% этаноле. Маточный раствор хранили при -70°C. Конечные концентрации в разведениях прогестерона для стандартной кривой были такими, как рекомендовано в аналитическом наборе. Стандарты разведенного прогестерона были стабильными при 4°C в течение недели.

Несколько ФСГ-обработанных линий VI, стабильно трансфецированных чел. ФСГ-рецептором, секретируют повышенные уровни прогестерона по сравнению с контрольными клетками (также клеточная линия, но не обработанная ФСГ, нетрансфецированные клетки VI, клетки VI, трансфецированные CLH3AXSV2NEOhD1VS). Одну неклональную линию, VHFHS HR4-38, выбрали для анализа зависимости ответа от дозы. В этом случае, повторяли процедуру, описанную в предыдущем абзаце, за исключением того, что клетки обрабатывали разными концентрациями ФСГ, 0 - 100МЕ/мл. Каждую дозу дублировали. Количество прогестерона, продуцированного ФСГ-стимулированными клетками VI, нормализовали для  $1 \times 10^6$  клеток, и строили кривые зависимости ответа от концентрации ФСГ. Эти кривые представлены на рис. 6. В данном эксперименте, 25-кратное увеличение прогестеронового активностного наблюдалось при дозе 20МЕ/мл чел. рекомбинантного ФСГ. Линейный диапазон ФСГ составлял от 2,5 до 20МЕ/мл ФСГ, а  $ED_{50} = 6,4$  МЕ/мл ФСГ. Полученные результаты показали, что в клетках VI, стабильно трансфецированных рекомбинантным чел. ФСГ-рецептором, наблюдается ФСГ-дозозависимое увеличение секреции прогестерона. Следовательно, при экспрессии в клетках VI мышинного надпочечника, рецептор чел. ФСГ является функционально активным.

Популяции клеток, происходящих от CHO/HFSHR 4Q-13, или VHF HR4-38-линий, или от аналогичных клеточных линий могут быть использованы для разработки чувствительных *in vitro* анализов для ФСГ или ФСГ-подобных веществ. Другие *in vitro* анализы ФСГ, используемые в настоящее время, например, такие, как биоанализ ароматизации зернистых клеток и анализ ароматизации клеток Сертоли, требуют получения первичных клеточных культур от крыс при проведении каждого анализа. Тогда, как для биоанализов с применением новых клеток VI и CHO используются трансформированные стабильные клеточные линии. Благодаря этому, новые методы осуществления *in vitro* биоанализов явно превосходят из-

вестные в настоящее время методы по простоте, точности и надежности.

#### Список последовательностей

Данные последовательности SEQ ID №1

Характеристики последовательности

(A) Длина 2179

(B) Тип нуклеинокислотная

(C) Цепочность двухцепочечная

(D) Топология линейная

Тип молекулы кДНК-мРНК

Источник происхождения

(A) Организм Homo Sapiens (человек)

(F) Тип ткани яичники

Непосредственный источник

(A) Библиотека  $\lambda$ gt11-кДНК-библиотека, ClOntech#HL1010

(B) Клон pHFS HR 11 - 11, pHFSHR 15 - 6

Отличительная черта

(A) Название "Ключ" область, кодирующая белок

(B) Локализация 75 - 2159

Описание последовательности SEQ ID №1

TGTGGAGCTT CTGAGATGTC TGGACGTTT TGTGTGCAAA TGCAGGAAGA AATCAGGTGG	60
ATGGATGCAAT AATT ATG GCG CTC CTC CTC CTC TGT TTG GCG GCA TTC CTC	110
Met Ala Leu Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Leu	
-15 -10	
AGC TTG GGC TGA GGA TGT CAT CAT CGG ATC TGT CAC TCC TCT AAC AGG	158
Sec Leu Gly Ser Gly Cys His His Arg Ile Cys His Cys Ser Asn Arg	
-5 1 5 10	
GTT TTT CTC TGC CAA GAG AGC AAG CTC ACA CAG ATT CCT TCT GAC CTC	206
Val Phe Leu Cys Gln Glu Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Ser Asp Leu	
15 20 25	
CCG AGG AAT GCG ATT GAA CTC AGG TTT GTC CTC AGC AAG CTT CGA GTC	254
Pro Arg Asn Ala Ile Glu Leu Arg Phe Val Leu Thr Lys Leu Arg Val	
30 35 40	
ATC CAA AAA GGT GGA TTT TCA GGA TTT GGG GAG CTC GAG AAA ATA GAG	302
Ile Gln Lys Gly Ala Phe Ser Gly Phe Gly Asp Leu Glu Lys Ile Glu	
45 50 55	
ATC TCT CAG AAT CAT CTC TTC CAG CTC ATA CAG GCA GAT CTC TTC TCC	350
Ile Ser Gln Asp Asp Val Leu Glu Val Ile Glu Ala Asp Val Phe Ser	
60 65 70 75	
AAC CTT GCG AAA TGA CAT CAA ATT AGA ATT CAA AAG GCG AAC AAG CTC	398
Asn Leu Pro Lys Leu His Glu Ile Arg Ile Glu Lys Ala Asn Asp Leu	
80 85 90	
CTC TAC ATC AAC CCT GAG GCG TTC CAG AAC CTT CCG AAC GTT CAA TAT	446
Leu Tyr Ile Asn Pro Glu Ala Phe Glu Asp Leu Pro Asn Leu Gln Tyr	
95 100 105	
CTG TTA ATA TCC AAC ACA GGT ATT AAG CAC CTT CCA GAT GTT CAC AAG	494
Leu Le Ile Ser Asn Thr Gly Ile L s His Leu Pro Phe Val His L s	
110 115 120	
ATT GAT TCT CTA CAA AAA GTT TTA CTT GAC ATT CAA GAT AAC ACA AAG	542
Ile His Ser Leu Gln Lys Val Leu Leu Asp Ile Gln Asp Asn Ile Asn	
125 130 135	
ATC CAC ACA ATT GAA AGA AAT TCT TTC C C GGG CTC AGC TTT GAA ACT	590
Ile His Thr Ile Glu Arg Asn Ser Phe Val Gly Leu Ser Phe Glu Ser	
140 145 150 155	
CTG ATT CTA TGG CTG AAT AAG AAT GGG ATT CAA GAA ATA CAC AAC TGT	638
Val Ile Leu Trp Leu Asn Lys Asn Gly Leu Leu Glu Ile His Asn Cys	
160 165 170	
GCA TTC AAT GGA AGC CAA CTA GAT GAG CTC AAT CTA AGC GAT AAT AAT	686
Ala Phe Asn Gly Thr Gln Leu Asp Glu Leu Ser Asp Asn Asp	
175 180 185	
AAT TTA CAA GAA TGG CTT AAT GAT CTT TTC CAG GGA GGC TGT GGA CCA	734
Asn Leu Glu GLu Leu Pro Asn Asn Val Phe His Gly Ala Ser Gly Pro	
190 195 200	
CTC ATT CTA GAT ATT TCA AGA ACA AGG ATC CAT TCC CTC CTT AGC TAT	782
Val Ile Leu Asp Ile Ser Arg Thr Arg Ile His Ser Leu Pro Ser Tyr	
205 210 215	
GCG TTA GAA AAT CTT AAG AAG CTC AGG GCG AGG TCG ACT TAC AAC TTA	830
Gly Ileu Glu Asn Leu Lys Lys Leu Arg Ala Arg Ser Thr Tyr Asn Leu	
220 225 230 235	
AAA AAG CTC CTT ACT CTC GAA AAG CTT CTC GCG CTC ATG GAA GCG AGC	878
Lys Lys Leu Pro Thr Leu Glu Lys Leu Val Ala Leu Met Glu Ala Ser	
240 245 250	
CTC ACC TAT CCG AGC CAT TGC TGT GCG TTT CCA AAC TCG AGA GCG CAA	926
Leu Thr Tyr Pro Ser His Cys Cys Ala Phe Ala Asn Trp Arg Arg Glu	
255 260 265	

ATC TCT GAG CTT CAT GCA ATT TGG AAC AAA TCT ATT TTA AGG CAA GAA 974  
 Ile Ser Glu Leu His Pro Ile Cys Asn Lys Ser Ile Leu Arg Gln Glu 270 275 280

GTT GTC TAT ATG ACT CAG ACT AGC GGT CAG AGA TCC TCT CTG GCA GAA 1322  
 Val Asp Tyr Met Thr Gln Thr Arg Gly Gln Arg Ser Ser Leu Ala Glu 285 290 295

GAC AAT GAG TCC AGC TAC AGC AGA GGA TTT GAC ATG ACG TAC ACT CAG 1070  
 Asp Asn Glu Ser Ser Tyr Ser Arg Gly Phe Asp Met Thr Tyr Thr Glu 300 305 310 315

TTT GAC TAT GAC TTA TGC AAT GAA GTG GTT GAC GTG ACC TGC TCC CCT 1118  
 Phe Asp Tyr Asp Leu Cys Asn Glu Val Val Asp Val Thr Cys Ser Pro 320 325 330

AAG CCA GAT GCA TTC AAC CCA TGT GAA GAT ATG ATG GGG TAC AAC ATC 1166  
 Lyr Pro Asp Ala Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asn Ile 335 340 345

CTC AGA CTC CTG ATA TGG TTT ATC AGC ATC CTG GCC ATC ACT GCG AAC 1214  
 Leu Arg Val Leu Ile Trp Phe Ile Sec Ile Leu Ala Ile Thr Gly Asn 350 355 360

ATC ATA CTC CTA GTG ATC CTA ACT ACC AGC CAA TAT AAA CTC ACA CTC 1262  
 Ile Ile Val Leu Val Ile Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Lys Leu Thr Val 365 370 375

CCC AGG TTC CTT ATG TGG AAC CTG GCC TTT GCT GAT CTC TGG ATT GGA 1310  
 Pro Arg Phe Leu Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Leu Cys Ile Gly 380 385 390

ATC TAC CTC CTC CTC ATT GCA TCA GTT GAT ATC CAT ACC AAG ACC CAA 1358  
 Ile Tyr Leu Leu Leu Ile Ala Ser Val Asp Ile His Thr Lys Ser Gln 400 405 410

TAT CAC AAC TAT GGC ATT GAC TGG CAA ACT GGG GCA GGC TGT GAT GCT 1406  
 Tyr His Asn Tyr Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ala Gly Cys Asn Ala 415 420 425

GCT GGC TTT TTC ACT CTC TTT GGC ACT GAG CTG TCA GTC TAC ACT CTG 1454  
 Ala Gly Phe Phe Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu 430 435 440

ACA GCT ATC ACC TTC GAA AGA TGG CAT ACC ATC ACC CAT GGC ATG CAG 1502  
 Thr Ala Ile Thr Leu Glu Arg Trp His Thr Ile Thr His Ala Met Gln 445 450 455

CTG GAC TCC AAG CTC CAG CTC GAC CAT GGT GGC AGT GTC ATG GTC ATG 1550  
 Leu Asp Cys Lys Val Gln Leu Arg His Ala Ala Ser Val Met Val Met 460 465 470 475

GGC TGG ATT TTT GCT TTT GCA GCT GGC CTC TTT GGC ATC TTT GGC ATC 1598  
 Gly Trp Ile Phe Phe Ala Ala Ala Leu Phe Pro Ile Phe Gly Ile 480 485 490

AGC AGC TAC ATG AAC GTC AGC ATC TGC CTG CCC ATG GAT ATT GAC AGC 1646  
 Ser Ser Tyr Met Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Ile Asp Ser 495 500 505

CCG TTG TCA CAG CTC TAT GTC ATG TCC CTC CTT GTG CTC AAT GTC CTC 1694  
 Pro Leu Ser Gln Leu Tyr Val Met Ser Leu Leu Val Leu Asn Val Leu 510 515 520

GCC TTT GTG GTC ATC TGT GGC TGC TAT ATG CAG ATC TAC CTC ACA GTG 1742  
 Ala Phe Val Val Ile Cys Gly Cys Tyr Ile His Ile Tyr Leu Thr Val 525 530 535

CSG AAC CCC AAC ATC CTC TCC TCC TCT AGT GAC ACC AGG ATG GGC AAG 1790  
 Arg Asn Pro Asn Thr Val Ser Ser Ser Ser Asp Thr Arg Ile Ala Lys 540 545 550

CGC ATG GGC ATG CTC ATC TTC ACT GAC TTC CTC TGC ATG GCA CCC ATT 1838  
 Arg Phe Ala Met Leu Ile Phe Thr Asp Phe Leu Cys Met Ala Pro Ile 560 565 570

TCT TTC TTT GGC ATT TCT GGC CTC TCC AAC GTG GGC CTC ATC ACT CTG 1886  
 Ser Phe Phe Ala Ile Ser Ala Ser Leu Lys Val Pro Leu Ile Thr Val 575 580 585

TGC AAA GCA AAG ATT CTC CTG GTT CTC TTT CAC GGC ATC AAC TCC TGT 1934  
 Ser Lys Ala Lys Ile Leu Leu Val Leu Phe His Pro Ile Asn Ser Cys 590 595 600

GCC AAC CCC TTC CTC TAT GGC ACC TTC ACC AAA AAC TTT CTC ACA GAT 1982  
 Ala Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Asn Phe Arg Arg Asp 605 610 615

TTC TTC ATT CTC CTG ACC AAG TGT GGC TGC TAT GAA ATG CAA GCC CAA 2030  
 Phe Phe Ile Leu Leu Ser Lys Cys Gly Cys Tyr Gln Met Gln Ala Gln 620 625 630 635

ATT TAT AAG ACA GAA ACT TCA TCC ACT GTC CAG AAC ACC CAT CCA AGC 2078  
 Ile Tyr Arg Thr Glu Thr Ser Ser Thr Val His Asn Thr His Pro Arg 640 645 650

AAT GGC CAG TGC TCT TCA GCT CCC AGA GTC ACC AAT GGT TCC AGT TAC 2126  
 Asn Gly His Cys Ser Ser Ala Pro Arg Val Thr Asn Gly Ser Thr Tyr 655 660 665

ATA CTT GTC CTT CTA AGT CAT TTA GGC CAA AAC TAAACACAA TGTGAAATG 2179  
 Ile Leu Val Pro Leu Ser His Leu Ala Gln Asn 670 675

Данные последовательности SEQ ID №2

Характеристики последовательности

(A) Длина 695

(B) Тип аминокислотная

(D) Топология линейная

Тип молекулы белок

Отличительная особенность

(A) Название "Ключ" сигнальная последовательность

(B) Локализация от -17 до -1

(C) Метод идентификации гидрофобная

Отличительная особенность

(A) Название "Ключ" предполагаемый аминоконцевой внеклеточный домен

(B) Локализация 1 - 349

(C) Метод идентификации сходство с другими внеклеточными доменами димерного гликопротеинового рецептора, гидрофильная

Отличительная особенность

(A) Название "Ключ" трансмембранный домен

(B) Локализация 350 - 613

(C) Метод идентификации сходство с другими трансмембранными доменами G-белок - связанного рецептора

Отличительная особенность

(A) Название "Ключ" предполагаемый трансмембранная область

(B) Локализация 350 - G70

(C) Метод идентификации сходство с другими трансмембранными областями белок G-связанного рецептора, гидрофобная, длина около 20 - 23 аминокислот

Отличительная особенность

(A) Название "Ключ" предполагаемая трансмембранная область II

(B) Локализация 382 - 404

(C) Метод идентификации сходство с другими трансмембранными областями белок G-связанного рецептора, гидрофобная, длина около 20 - 23 аминокислот

Отличительная особенность

(A) Название "Ключ" предполагаемая трансмембранная область III

(B) Локализация 427 - 448

(C) Метод идентификации сходство с другими трансмембранными областями белок G-связанного рецептора, гидрофобная, длина около 20 - 23 аминокислот

Отличительная особенность

(A) Название "Ключ" предполагаемая трансмембранная область IV

(B) Локализация 469 - 491

(C) Метод идентификации сходство с другими трансмембранными областями белок G-связанного рецептора, гидрофобная, длина около 20 - 23 аминокислот

Отличительная особенность

(A) Название "Ключ" предполагаемая трансмембранная область V

(B) Локализация 512 - 533

(C) Метод идентификации сходство с другими трансмембранными областями белок G-связанного рецептора, гидрофобная, длина около 20 - 23 аминокислот

Отличительная особенность

(A) Название "Ключ" предполагаемая трансмембранная область VI

(B) Локализация 557 - 580

(C) Метод идентификации сходство с другими трансмембранными областями белок G-связанного рецептора, гидрофобная, длина около 20 - 23 аминокислот

Отличительная особенность

(A) Название "Ключ" предполагаемая трансмембранная область VI

(B) Локализация 557 - 580

(C) Метод идентификации сходство с другими трансмембранными областями белок G-связанного рецептора, гидрофобная, длина около 20 - 23 аминокислот

Отличительная особенность

(А) Название "Ключ" предполагаемая транс-  
мембранная область VII

(Б) Локализация 592 - 613

(С) Метод идентификации сходство с другими  
трансмембранными областями белок G-  
связанного рецептора, гидрофобная, длина около  
20 - 23 аминокислот

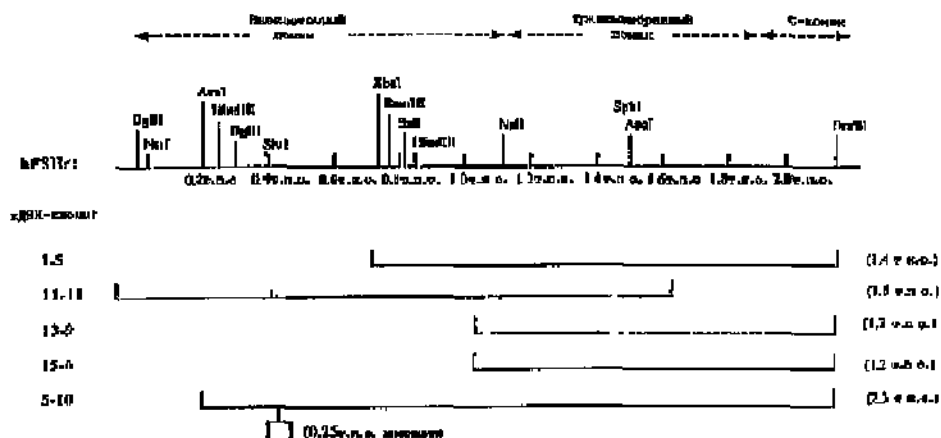
Отличительная особенность

(А) Название "Ключ" предполагаемый карбок-  
си-концевой внутриклеточный домен

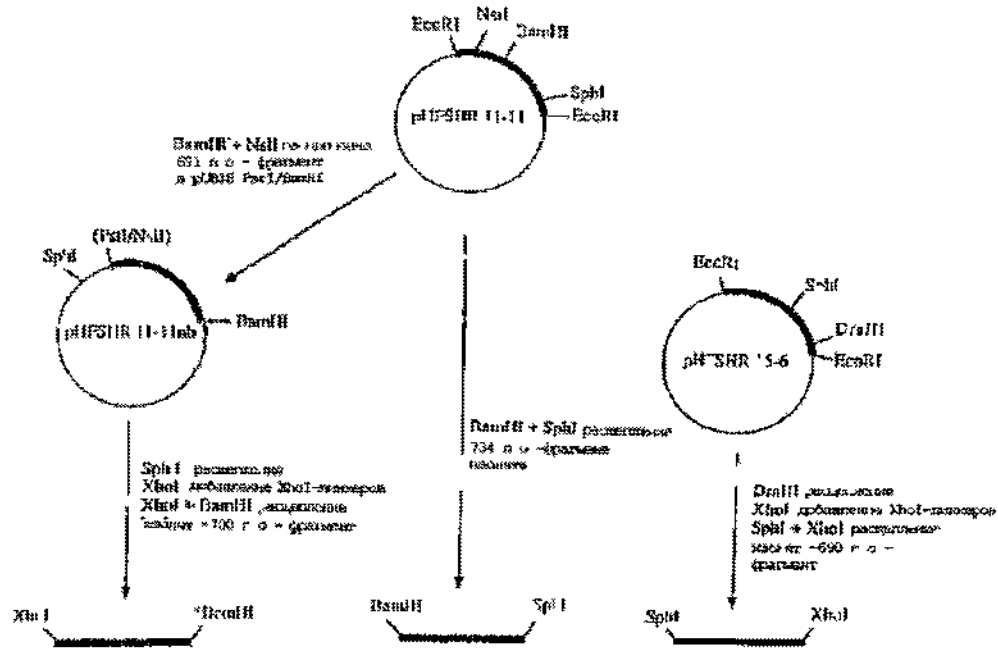
(Б) Локализация 614 - 678

Met Ala Leu Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Leu Ser Leu G y Ser  
-15 -10 -5  
Gly Cys His His Arg Ile Cys His Cys Ser Asn Arg Val Phe Leu Cys  
1 3 10 15  
Gln Glu Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Ser Asn Leu Pro Arg Asn Ala  
20 25 30  
Ile Glu Leu Arg Phe Val Leu Thr Lys Leu Arg Val Ile Gln Lys Gly  
35 40 45  
Ala Phe Ser Gly Phe Gly Asn Leu Glu Lys Ile Glu Ile Ser Gln Asn  
50 55 60  
Asp Val Leu Glu Val Ile Glu Ala Asp Val Phe Ser Asn Leu Pro Lys  
65 70 75  
Leu His Glu Ile Arg Ile Glu Lys Ala Asn Asn Leu Leu Tyr Ile Asn  
80 85 90 95  
Pro Glu Ala Phe Gln Asn Leu Pro Asn Leu Glu Tyr Leu Leu Ile Ser  
100 105 110  
Asn Thr Gly Ile Lys His Leu Pro Asp Val His Lys Ile His Ser Leu  
115 120 125  
Gln Lys Val Leu Leu Asp Ile Gln Asp Asn Ile Asn Ile His Thr Ile  
130 135 140  
Glu Arg Asn Ser Phe Val Gly Leu Ser Phe Glu Ser Val Ile Leu Trp  
145 150 155  
Leu Asn Lys Asn Gly Ile Gln Glu Ile His Asn Cys Ala Phe Asn Gly  
160 165 170 175  
Thr Gln Leu Asp Glu Leu Asn Leu Ser Asp Asn Asn Asn Leu Glu Glu  
180 185 190  
Leu Pro Asn Asp Val Phe His Gly Ala Ser Gly Pro Val Ile Leu Asp  
195 200 205  
Leu Ser Arg Thr Arg Ile His Ser Leu Pro Ser Tyr Gly Leu Glu Asn  
210 215 220  
Leu Lys Lys Leu Arg Ala Arg Ser Thr Tyr Asn Leu Lys Lys Leu Pro  
225 230 235  
Thr Leu Glu Lys Leu Val Ala Leu Met Glu Ala Ser Leu Thr Tyr Pro  
240 245 250 255  
Ser His Cys Cys Ala Phe Ala Asn Trp Arg Arg Gln Ile Ser Glu Leu  
260 265 270

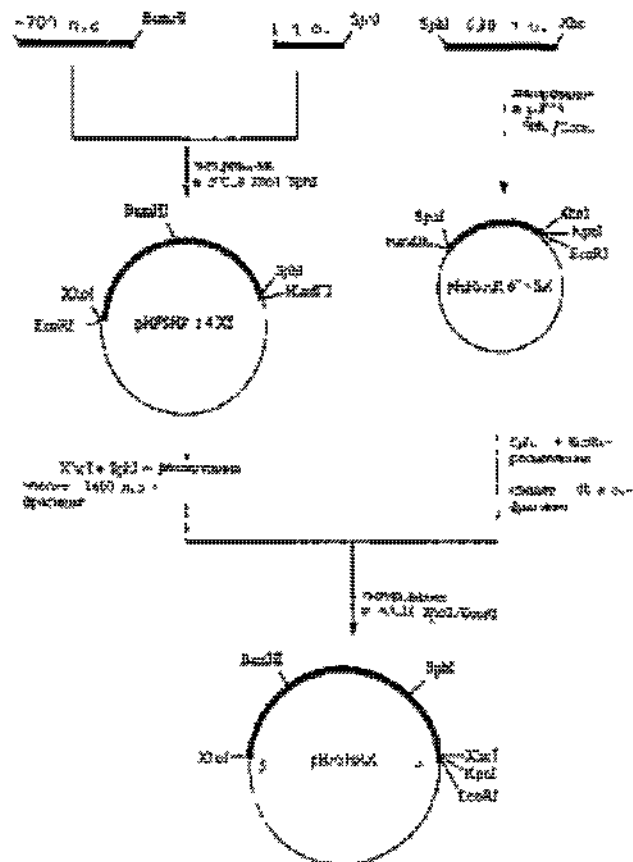
His Pro Ile Cys Asn Lys Ser Ile Leu Arg Gln Glu Val Asp Tyr Met  
275 280 285  
Thr Glu Thr Arg Glu Glu Arg Ser Ser Leu Ala Glu Asp Asn Cys Se  
290 295 300  
Ser Thr Ser Arg Gly Phe Asp Val Thr Tyr Thr Glu Phe Asn Tyr Asp  
305 310 315  
Leu Cys Asn Glu Val Val Asp Val Thr Cys Ser Pro Lys Pro Asp Asn  
320 325 330 335  
Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asn Ile Leu Arg Val Leu  
340 345 350  
Ile Trp Phe Ile Ser Ile Leu Ala Ile Thr Gly Asn Ile Ile Val Leu  
355 360 365  
Val Ile Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Lys Leu Thr Val Pro Arg Phe Leu  
370 375 380  
Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Leu Cys Ile Gly Ile Tyr Leu Leu  
385 390 395  
Leu Ile Ala Ser Val Asp Ile His Thr Lys Ser Gln Tyr His Asn Tyr  
400 405 410 415  
Ala Ile Asp Trp Glu Thr Gly Ala Gly Cys Asp Ala Ala Gly Phe Phe  
420 425 430  
Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu Thr Ala Ile Thr  
435 440 445  
Leu Glu Arg Trp His Thr Ile Thr His Ala Met Cys Leu Asp Cys Lys  
450 455 460  
Val Gln Leu Arg His Ala Ala Ser Val Met Val Met Gly Trp Ile Phe  
465 470 475  
Ala Phe Ala Ala Ala Leu Phe Pro Ile Phe Gly Ile Ser Ser Tyr Met  
480 485 490 495  
Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Ile Asp Ser Pro Leu Ser Gln  
500 505 510  
Leu Tyr Val Met Ser Leu Leu Val Leu Asn Val Leu Ala Thr Val Val  
515 520 525  
Ile Cys Glu Cys Tyr Ile His Ile Tyr Leu Thr Val Arg Asn Pro Asn  
530 535 540  
Ile Val Ser Ser Ser Ser Ser Thr Arg Ile Ala Lys Arg Met Ala Me  
545 550 555  
Leu Ile Phe Thr Asp Phe Leu Cys Met Ala Phe Ile Ser Phe Phe Ala  
560 565 570 575  
Ile Ser Ala Ser Leu Lys Val Pro Leu Ile Thr Val Ser Lys Ala Lys  
580 585 590  
Ile Leu Leu Val Leu Phe His Pro Ile Asn Ser Cys Ala Asn Pro Phe  
595 600 605  
Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Asn Phe Arg Arg Asp Phe Phe Ile Leu  
610 615 620  
Leu Ser Lys Cys Gly Cys Tyr Glu Met Gln Ala Gln Ile Tyr Arg Trp  
625 630 635  
Glu Thr Ser Ser Thr Val His Asn Thr His Pro Arg Asn Gly His Cys  
640 645 650 655  
Ser Ser Ala Pro Arg Val Thr Asn Gly Ser Thr Tyr Ile Leu Val Pro  
660 665 670  
Leu Ser His Leu Ala Gln Asn  
675



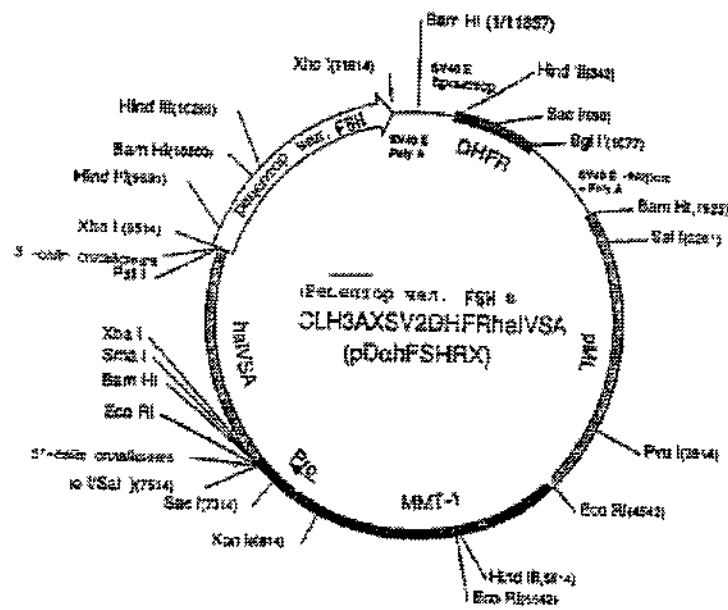
Фиг. 1



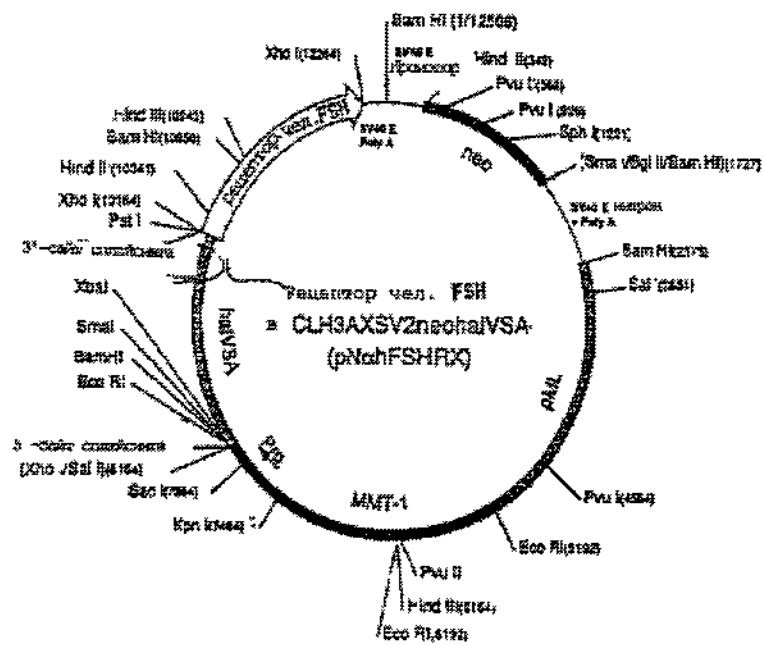
Фиг. 2A



Фиг. 2B

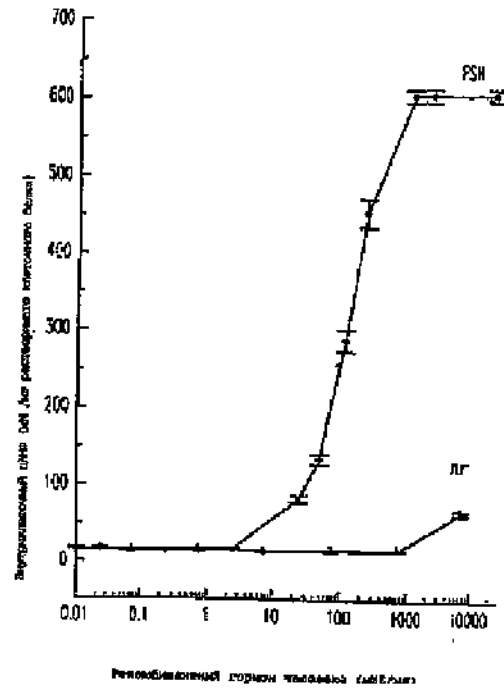


Фиг. 3

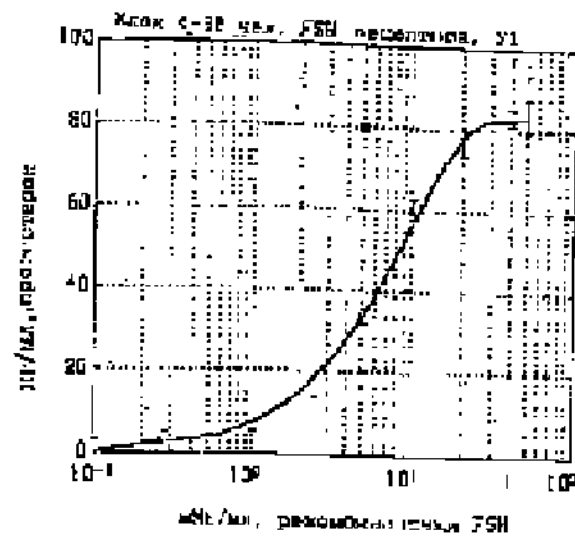


Фиг. 4





Фиг. 5



Фиг. 6