



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 45349

(13) C2

(51) 6 A01N63/00, C12P21/06, C12N15/11,
C12N15/63, C12N15/85МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) СПОСІБ ПРИГНІЧЕННЯ ВІЛ-ІНФІКОВАНИХ КЛІТИН ССАВЦЯ, ТРАНСФОРМОВАНА КЛІТИНА,
БІЛКОВИЙ РЕКОМБІНАНТНИЙ РЕЦЕПТОР, ДНК, ВЕКТОР

1

2

(21) 97020482
(22) 26 07 1995
(24) 15 04 2002
(86) PCT/US95/09468, 26 07 1995
(31) 08/284,391
(32) 02 08 1994
(33) US
(31) 08/394,388
(32) 24 02 1995
(33) US
(46) 15 04 2002, Бюл. № 4, 2002 р.
(72) Сід Брайен, US, Банапоур Бабак, US, Ромео Чарльз, US, Коланус Вальдемар, DE
(73) ДЗЕ ДЖЕНЕРАЛ ХОСПІТАЛ КОРПОРЕЙШН, US
(56) Chao B H et al "A 113-amino acid fragment of CD4 produced in *Escherichia coli* blocks human immunodeficiency virus-induced cell fusion" J. Biological Chemistry, V 264, N10, p 5812-5817
(57) 1. Способ подавления ВИЧ-инфицированных клеток млекопитающего, который предусматривает введение указанному млекопитающему эффективного количества терапевтических клеток, причем указанные терапевтические клетки экспрессируют мембраносвязанный белковый рекомбинантный рецептор, содержащий внеклеточный участок, который содержит фрагмент CD4, включающий, по крайней мере, аминокислоты 1-200 последовательности № 31

MYRCVPRRL LLVQLALLP AATQGNKVL GKKGDTVELT CTASQKKSIG 51
FMKNSNQIK ILGQGGSLT KQPEKLNDR DSRRLNDQC NFPLIIRNLK 101
IEDSDTYICE VEDQKEEVQL LVFGLTANSO THLLQGGSLT LTLESPPGSS 151
PSVQCRSPRG KNIQGGKTLV VSQLELQDSG TWTCVTLQNG KXVEFKIDIV 201
VLA (Последовательность № 31)

который способен специфично распознавать и связывать ВИЧ или ВИЧ-инфицированную клетку, но который не опосредует ВИЧ-инфекцию

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный фрагмент CD4 состоит из аминокислот 1-394 последовательности № 29

MYRCVPRRL LLVQLALLP AATQGNKVL GKKGDTVELT CTASQKKSIG 51
FMKNSNQIK ILGQGGSLT KQPEKLNDR DSRRLNDQC NFPLIIRNLK 101
IEDSDTYICE VEDQKEEVQL LVFGLTANSO THLLQGGSLT LTLESPPGSS 151
PSVQCRSPRG KNIQGGKTLV VSQLELQDSG TWTCVTLQNG KXVEFKIDIV 201
VLA (Последовательность № 29)

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фрагмент CD4 отделен от мембраны указанной терапевтической клетки расстоянием, по крайней мере, в 48 ангстрем или, по крайней мере, в 72 ангстрема

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный рецептор дополнительно включает трансмембранный участок CD7, имеющий аминокислотную последовательность PRASALPAPP TGSALPDQPQT ASALPDPPAA SALPAALAVI SFLGLGLGV ACV-LARTR, трансмембранный участок CD5, имеющий аминокислотную последовательность AGLAAGTVASIIALVLLVLLVVCGLAY, или трансмембранный участок CD34, имеющий аминокислотную последовательность LIALVTSGAL-LAVLGITGYFLM

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный фрагмент CD4 отделен от мембраны указанной терапевтической клетки одной или несколькими белковыми альфа-спиралями

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные терапевтические клетки выбраны из группы, состоящей из Т-клеток, В-клеток, нейтрофилов или дендритных клеток

7. Трансформированная клетка, экспрессирующая белковый, связанный с мембраной рекомбинантный рецептор, содержащий внеклеточный участок, который содержит фрагмент CD4, включающий, по крайней мере, аминокислоты 1 - 200 последовательности № 31

MYRCVPRRL LLVQLALLP AATQGNKVL GKKGDTVELT CTASQKKSIG 51
FMKNSNQIK ILGQGGSLT KQPEKLNDR DSRRLNDQC NFPLIIRNLK 101
IEDSDTYICE VEDQKEEVQL LVFGLTANSO THLLQGGSLT LTLESPPGSS 151
PSVQCRSPRG KNIQGGKTLV VSQLELQDSG TWTCVTLQNG KXVEFKIDIV 201
VLA (Последовательность № 31)

который способен специфично распознавать и связывать ВИЧ или ВИЧ-инфицированную клетку, но который не опосредует ВИЧ-инфекцию

8. Клетка по п. 7, отличающаяся тем, что указанный фрагмент CD4 состоит из аминокислот 1-394 последовательности № 29

MYRCVPRRL LLVQLALLP AATQGNKVL GKKGDTVELT CTASQKKSIG 51
FMKNSNQIK ILGQGGSLT KQPEKLNDR DSRRLNDQC NFPLIIRNLK 101
IEDSDTYICE VEDQKEEVQL LVFGLTANSO THLLQGGSLT LTLESPPGSS 151
PSVQCRSPRG KNIQGGKTLV VSQLELQDSG TWTCVTLQNG KXVEFKIDIV 201
VLA (Последовательность № 29)

(13) C2

(11) 45349

(19) UA

9 Клетка по п 7, отличающаяся тем, что указанный фрагмент CD4 отделен от мембраны клетки расстоянием, по крайней мере, в 48 ангстрем или, по крайней мере, в 72 ангстрема

10 Клетка по п 7, отличающаяся тем, что указанный рецептор дополнительно включает трансмембранный участок CD7, имеющий аминокислотную последовательность PRASALPAPP TGSALPDPQT ASALPDPPAA SALPAALAVI SFLGLGLGV ACVLARTR, трансмембранный участок CD5, имеющий аминокислотную последовательность AGLAAGTVASIILALVLLVLLVVCGLAY, или трансмембранный участок CD34, имеющий аминокислотную последовательность LI-ALVTSGALLAVLGITGYFLM

11 Клетка по п 7, отличающаяся тем, что указанный фрагмент CD4 отделен от мембраны указанной клетки одной или несколькими белковыми альфа-спиралями

12 Клетка по п 7, отличающаяся тем, что она выбрана из группы, состоящей из Т-клеток, В-клеток, нейтрофилов или дендритных клеток

13 Белковый рекомбинантный рецептор, содержащий внеклеточный участок, который содержит фрагмент CD4, включающий, по крайней мере, аминокислоты 1 - 200 последовательности № 31

```

HNRGVFFRHL LLVLQALLP AATQGNKVL GKQDTVELT STASQKRSIQ 51
PRKXNSHQIA ILGNQGSFLP KCPSELNDRA DSRRLNDQC NPFLIKNLK 101
LEDSSTYICE VEDQKEEVOL LVVGLTANSD THLQOQSILF LTLESPPGSS 151
PSVQCSPPKQ KHIQGGKILS VSGLELQSGG TMTCTVLQHQ KVEFRIDIV 201
VLAQKASST VYKQSDQVE PSRLATVE KLTSCILNW QARPAASBS 251
VETFLKKEE VSVKVTQSP KLDKQKLEL CHTLPQALPQ YAGSCHETLA 301
LEAKTCKLQ KYLVVVRAT QIQKHLTCEV NGPTSRKLM SIKLENKEK 351
VSKREKPVVY LNPFLAGHOC ILSDSGQVLL ESNIKVLPW STPVHADP
(Последовательность № 31)

```

который способен специфично распознавать и связывать ВИЧ или ВИЧ-инфицированную клетку,

но который не опосредует ВИЧ-инфекцию

14 Рецептор по п 13, отличающийся тем, что указанный фрагмент CD4 состоит из аминокислот 1-394 последовательности № 29

```

HNRGVFFRHL LLVLQALLP AATQGNKVL GKQDTVELT STASQKRSIQ 51
PRKXNSHQIA ILGNQGSFLP KCPSELNDRA DSRRLNDQC NPFLIKNLK 101
LEDSSTYICE VEDQKEEVOL LVVGLTANSD THLQOQSILF LTLESPPGSS 151
PSVQCSPPKQ KHIQGGKILS VSGLELQSGG TMTCTVLQHQ KVEFRIDIV 201
VLAQKASST VYKQSDQVE PSRLATVE KLTSCILNW QARPAASBS 251
VETFLKKEE VSVKVTQSP KLDKQKLEL CHTLPQALPQ YAGSCHETLA 301
LEAKTCKLQ KYLVVVRAT QIQKHLTCEV NGPTSRKLM SIKLENKEK 351
VSKREKPVVY LNPFLAGHOC ILSDSGQVLL ESNIKVLPW STPVHADP
(Последовательность № 29)

```

15 Рецептор по п 13, отличающийся тем, что указанный фрагмент CD4 отделен от мембраны клетки-хозяина расстоянием, по крайней мере, в 48 ангстрем или, по крайней мере, в 72 ангстрема

16 Рецептор по п 13, отличающийся тем, что дополнительно содержит трансмембранный участок CD7, имеющий аминокислотную последовательность PRASALPAPP TGSALPDPQT ASALPDPPAA SALPAALAVI SFLGLGLGV ACVLARTR, трансмембранный участок CD5, имеющий аминокислотную последовательность AGLAAGTVASIILALVLLVLLVVCGLAY, или трансмембранный участок CD34, имеющий аминокислотную последовательность LIALVTSGALLAVLGITGYFLM

17 Рецептор по п 13, отличающийся тем, что указанный фрагмент CD4 отделен от мембраны указанной терапевтической клетки одной или несколькими белковыми альфа-спиралями

18 ДНК, кодирующая связанный с мембраной белковый рекомбинантный рецептор по п 13

19 Вектор, содержащий ДНК по п 18

Настоящее изобретение относится к рецепторам, содержащим фрагменты CD4, связывающие ВИЧ, но не делающие клетку-хозяина восприимчивой к ВИЧ-инфекции. Таким образом, настоящее изобретение дает новое и эффективное средство против ВИЧ-инфекции.

Предшествующий уровень

В основе ряда иммунных явлений лежит распознавание Т-клетками антигенов при помощи Т-клеточных рецепторов с Т-клетки управляют системой, которая называется клеточным иммунитетом. Ее действие состоит в том, что клетки иммунной системы уничтожают чужеродные ткани или зараженные клетки. Существуют различные типы Т-клеток: хелперы и супрессоры, которые модулируют иммунный ответ, и цитотоксические клетки (или киллеры), которые уничтожают аномальные клетки непосредственно.

Т-клетка, распознавшая и связавшая уникальный антиген, проявившийся на поверхности другой клетки, становится активной, она приобретает способность размножаться и, если это цитотоксическая клетка, она может уничтожить связанную клетку.

ВИЧ и иммунопатогенез

В 1984 году было выяснено, что ВИЧ является этиологическим фактором СПИДа. С тех пор определение СПИДа несколько раз пересматривалось в отношении того, какие критерии следует

включать в диагноз. Однако, несмотря на непостоянство диагностических параметров, простым общим знаменателем СПИДа является заражение ВИЧ с последующим развитием стойких генерализованных симптомов и болезней, определяющих СПИД: вторичных инфекций, новообразований и неврологических расстройств. Harrison's Principles of Internal Medicine, 12 th ed., McGraw Hill (1991).

ВИЧ - это ретровирус человека из группы лентивирусов. Четыре известных ретровируса человека принадлежат к двум различным группам, это Т-лимфотропные (лейкозные) ретровирусы человека HTLV-1 и HTLV-2 и вирусы иммунодефицита человека, ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Вирусы первой группы - трансформирующие, а вирусы второй группы - цитопатические.

ВИЧ-1 считается наиболее распространенным причинным фактором СПИДа в мире. Гомология последовательностей между ВИЧ-2 и ВИЧ-1 составляет около 40%, ВИЧ-2 состоит в более тесном родстве с некоторыми членами группы вирусов иммунодефицита обезьян (SIV). См. Curran, J et al., Science, 329: 1357 - 1359 (1985), Weiss, R et al., Nature, 324: 572 - 575 (1986).

В репликации и других биологических действиях ВИЧ участвуют обычные ретровирусные гены (env, gag и pol) и еще шесть генов. Как сказано выше, общим знаменателем СПИДа является сильное подавление иммунитета, преимущест-

венно, клеточного. Это подавление иммунитета приводит к возникновению различных заболеваний - к поражению условно-патогенными микроорганизмами и развитию новообразований.

Основной причиной ослабления иммунитета при СПИДе является количественный и качественный дефицит в подгруппе Т4 лимфоцитов вилочковой железы (Т-лимфоцитов). Фенотипически клетки этой подгруппы определяются как клетки с поверхностной молекулой CD4, которая как оказалось, является клеточным рецептором ВИЧ. Dalglish et al, *Nature* 312 763 (1984). Вирус иммунодефицита человека поражает в основном клетки типа Т4, но в принципе любая клетка, на поверхности которой экспрессируется молекула CD4, способна связаться с ВИЧ и заразиться им.

Обычно клеткам CD4⁺ Т приписывают роль хелперов/индукторов, так как они подают сигнал об активации клеткам В или побуждают клетки Т с соответствующим маркером CD8 к цитотоксическому/супрессорному действию. Reinherz and Schlossman, *Cell* 19 821 - 827 (1980), Goldstein et al, *Immunol Rev* 68 5 - 42 (1982).

ВИЧ связывается специфически и с высокой аффинностью, при помощи последовательности аминокислот вирусной оболочки (gp120), с частью фрагмента VI молекулы CD4, расположенного у ее аминоконца. После связывания вирус сливается с мембраной клетки-мишени и интернализируется. Оказавшись внутри клетки, он при помощи фермента обратной транскриптазы проводит транскрипцию своей геномной РНК в ДНК, которая интегрируется в ДНК клетки, где существует на протяжении жизни клетки как "провирус".

Провирус может оставаться в латентном состоянии, но может активироваться, транскрибировать мРНК и геномную РНК, синтезировать и собрать белок, образовать новый вирион и размножиться на поверхности клетки. Хотя точный механизм уничтожения клетки вирусом неизвестен, считается, что основным механизмом ее уничтожения является активное размножение вируса на ее поверхности, приводящее к разрушению плазматической мембраны и нарушению осмотического равновесия.

В ходе заражения организм-хозяин вырабатывает антитела к вирусным белкам, в том числе к главным гликопротеинам оболочки gp120 и gp41. Несмотря на действие гуморального иммунитета, болезнь прогрессирует и заканчивается летальным подавлением иммунитета, которое характеризуется множественными вторичными инфекциями, паразитемией, слабоумием и гибелью. Неспособность антител хозяина остановить прогрессирование болезни является самой досадной и грозной ее особенностью и не дает оснований надеяться на успех вакцинации, проводимой с использованием традиционных способов.

Действенность гуморального ответа на заражение вирусами иммунодефицита может зависеть от двух факторов. Во-первых, как и другие РНК-вирусы (в частности, как ретровирусы), вирусы иммунодефицита сильно мутируют в ответ на иммунный контроль со стороны хозяина. Во-вторых, гликопротеины вирусной оболочки сами по себе являются сильно гликозилированными молекула-

ми и на них мало эпитопов, подходящих для высокоаффинного связывания с антителами. Таким образом, оболочка вируса представляет собой плохую антигенную мишень, и хозяин не имеет возможности ограничить распространение вирусной инфекции за счет выработки специфических антител.

Клетки, зараженные вирусом иммунодефицита человека, экспрессируют на поверхности гликопротеин gp120. Gp120 опосредствует слияние клеток CD4⁺, происходящее аналогично слиянию вируса с клеткой и приводящее к образованию недолговечных многоядерных гигантских клеток. Образование синцитиев зависит от непосредственного взаимодействия гликопротеина оболочки gp120 и белка CD4. Dalglish et al, там же, Klatzman, D et al, *Nature* 312 763 (1984), McDougal, J S et al, *Science* 231 382 (1986), Sodroski, J et al, *Nature* 322 470 (1986), Lifson, J D et al, *Nature* 323 725 (1986), Sodroski, J et al, *Nature* 412 (1986).

К сведениям, говорящим в пользу того, что заражение вирусом клеток-носителей антигена CD4 обусловлено связыванием CD4-gp120, относится то обстоятельство, что между gp120 и CD4 образуется специфический комплекс. McDougal et al, там же. Другие исследователи утверждают, что клеточные линии, невосприимчивые к ВИЧ-инфекции, были преобразованы в восприимчивые к ней линии путем трансфекции геном человека кДНК CD4 с последующей экспрессией этого гена. Maddon et al, *Cell* 46 333 - 348 (1986).

Несколько исследовательских коллективов (Deen et al, *Nature* 331 82 - 84 (1988), Fisher et al, *Nature* 331 76 - 78 (1988), Hussey et al, *Nature* 331 78 - 81 (1988), Smith et al, *Science* 238 1704 - 1707 (1987), Trautnecker et al, *Nature* 331 84 - 86 (1988)) предложили и успешно продемонстрировали в лабораторных условиях ряд терапевтических программ, предусматривающих использование растворимого CD4 в качестве пассивного средства противодействия адсорбции вируса и передаче его через синцитии, впоследствии были получены слитые белки из иммуноглобулина CD4 с более продолжительным временем полужизни и скромной биологической активностью (Capon et al, *Nature* 337 525 - 531 (1989), Trautnecker et al, *Nature* 339 68 - 70 (1989), Byrn et al, *Nature* 344 667 - 670 (1990), Zettlmeissl et al, *DNA Cell Biol* 9 341 - 353 (1990)).

Хотя конъюгаты, или слитые белки, иммунотоксина CD4 в лабораторных условиях обладают сильной цитотоксичностью в отношении зараженных клеток (Chaundhary et al, *Nature* 5 369 - 372 (1988), Till et al, *Science* 242 1166 - 1168 (1988)), скрытый характер синдрома иммунодефицита не позволяет надеяться на то, что какое-то одно лекарственное средство будет эффективным в облегчении бремени инфекции, а антигенные свойства чужеродных слитых белков, скорее всего, ограничат их приемлемость для стратегий лечения, требующих их неоднократного применения. Исследования с обезьянами, пораженными вирусом иммунодефицита обезьян, показали, что растворимый CD4, если вводить его обезьянам, у которых не наблюдается явный дефицит клеток

CD4, может снизить титр вируса иммунодефицита (SIV) и улучшить миелоидный потенциал в лабораторных условиях (Watanabe et al, *Nature* 337 267 - 270 (1989)). Однако, по окончании лечения количество вирусов быстро восстанавливалось, а это говорит о том, что для предотвращения выхода иммунной системы из строя может потребоваться пожизненное применение лекарства.

Т-клеточные рецепторы и рецепторы Fc

Экспрессия на поверхности клетки наиболее распространенной формы Т-клеточных антигенных рецепторов (TCR) возможна за счет совместной экспрессии по меньшей мере 6 различных полипептидных цепей (Weiss et al, *J Exp Med* 160 1284 - 1299 (1984), Orloffhashi et al, *Nature* 31 606 - 609 (1985), Berkhout et al, *J Biol Chem* 263 8528 - 8536 (1988), Sussman et al, *Cell* 52 85 - 95 (1988)), цепей, связывающих антигены α/β , трех полипептидов комплекса CD3 и ζ . Если одна из этих цепей отсутствует, стабильная экспрессия остальных составляющих комплекса не состоится, ζ является критическим полипептидом для поверхностной экспрессии всего комплекса (Sussman et al, *Cell* 52 85-95 (1988)) и считается, что она опосредствует хотя бы часть программ клеточной активации, запускаемых в результате распознавания лиганда рецептором (Weissman et al, *EMBO J* 8 3651-3656 (1989), Frank et al, *Science* 249 174 - 177 (1990)). ζ - это интегральный полипептид мембраны, гомодимер I типа с молекулярной массой 32 килодальтона, имеющий внеклеточный домен из 9 остатков, на котором нет участков для присоединения N-связанного гликана, и внутриклеточный домен из 112 (у мышей) или 113 (у человека) остатков (Weissman et al, *Science* 2 1018 - 1020 (1988), Weissman et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 5 9709 - 9713 (1988)). В клетках, экспрессирующих упомянутый антигенный рецептор, в небольших количествах присутствует изоформа полипептида ζ , названная η (Baniyash et al, *J Biol Chem* 263 9874 - 9878 (1988), Orloff et al, *J Biol Chem* 264 14812 - 14817 (1989)), которая образуется при изменении порядка сплайсинга мРНК (Jin et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 87 3319 - 3323 (1990)). Считается, что гетеродимеры ζ - η опосредствуют образование инозитфосфатов, а также провоцируемую рецептором, программируемую гибель клеток, называемую апоптозом (Mercer et al, *Science* 242 571 - 574 (1988), Mercer et al, *Science* 246 1162 - 1165 (1989)).

Подобно цепям ζ и η , цепь γ , связанная с рецептором Fc, экспрессируется на поверхности клеток в комплексе с дополнительными полипептидами, часть которых опосредствует распознавание лиганда, а функция другой части не установлена. Гомодимерная структура цепи γ (гамма) и вся ее организация имеет сильное сходство со структурой ζ и является составной частью как высокоаффинного рецептора IgE тучных клеток/базофилов - рецептора Fc ϵ RI, - который состоит по меньшей мере из трех различных полипептидных цепей (Blank et al, *Nature* 337 187 - 189 (1989), Ra et al, *Nature* 241 752 - 754 (1989)), так и одного из низкоаффинных рецепторов IgG,

представленного у мышей типом Fc γ RIIIa (Ra et al, *J Biol Chem* 24 15323 - 15327 (1989)), а у человека подтипом CD16, который экспрессируется макрофагами и естественными клетками-киллерами, CD16TM (CD16, трансмембранный) (Lanier et al, *Nature* 342 803 - 805 (1989), Anderson et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 87 2274 - 2278 (1990)) и полипептидом с неустановленной функцией (Anderson et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 87 2274 - 2278 (1990)). Недавно появилось сообщение о том, что γ экспрессируется линией мышиных Т-клеток (CTL) и образует гомодимеры и гетеродимеры γ - ζ и γ - η (Orloff et al, *Nature* 347 189 - 191 (1990)).

Рецепторы Fc опосредствуют фагоцитоз иммунных комплексов, трансцитоз и серологически типизируемую клеточную цитотоксичность (Ravetch and Kinet, *Annu Rev Immunol* 9 457 - 492 (1991), Unkeless et al, *Annu Rev Immunol* 6 251 - 281 (1988), Mellman, *Curr Opin Immunol* 1 16 - 25 (1988)). Недавно обнаружилось, что одна из изоформ мышиного низкоаффинного рецептора Fc, Fc γ RIIB1, опосредствует интернализацию покрытых Ig мишеней в покрытые клатрином ячейки и что другой низкоаффинный рецептор, Fc γ RIIA, опосредствует серологически типизируемую клеточную цитотоксичность за счет связи с одним или несколькими членами небольшого семейства молекул - "инициаторов" (Miettinen et al, *Cell* 513 317 - 327 (1989), Hunziker and Mellman, *J Cell Biol* 109 3291 - 3302 (1989)). Эти молекулы-инициаторы, Т-клеточный рецептор, цепь ζ , цепь η Т-клеточного рецептора и цепь γ рецептора Fc взаимодействуют с доменами распознавания лиганда, принадлежащими различным рецепторам иммунной системы, и при агрегации могут самостоятельно запускать клеточные процессы, в том числе лизис клеток (Samelson et al, *Cell* 43 223 - 231 (1985), Weissman et al, *Science* 239 1018 - 1020 (1988), Jin et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 87 3319 - 3323 (1990), Blank et al, *Nature* 337 187 - 189 (1989), Lanier et al, *Nature* 32 805 - 807 (1989), Kurosaki and Ravetch, *Nature* 342 805 - 807 (1989), Hibbs et al, *Science* 246 1608 - 1611 (1989), Anderson et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 8 2274 - 2278 (1990), and Irving and Weiss, *Cell* 164 891 - 901 (1991)).

При проведении параллелей между семействами рецепторов Fc человека и мышей стало ясно, что изоформы Fc γ RIIA и C человека не имеют мышиных аналогов. Отчасти поэтому их функция еще не определена.

Поскольку гуморальные агенты, основанные только на CD4, в живом организме могут оказаться лишь ограниченно полезными, изучалась возможность усиления клеточного иммунитета к ВИЧ. Были получены препараты белковых химер, в которых внеклеточный домен CD4 был слит с трансмембранными и/или внутриклеточными доменами Т-клеточного рецептора, рецептора IgG Fc или элементами В-клеточного рецептора, проводящими сигналы (U S S N 07/847566 и 07/685961, включенные в настоящий документ посредством ссылки). Цитолитические Т-клетки, экспрессирующие химеры, в которых присутствует внеклеточный домен CD4, оказывают сильное, не зависящее от главного комплекса гистосовместимости,

разрушительное воздействие на клеточные мишени, экспрессирующие белки оболочки ВИЧ. Исключительно важным и новым компонентом этого подхода явилось выделение отдельных цепей Т-клеточного рецептора, рецептора Fc и В-клеточного рецептора, агрегации которых достаточно, чтобы инициировать клеточный ответ. Одним из особенно полезных вариантов осуществления этого подхода явилось изобретение химер CD4 с ζ , η или γ , которые направляют цитолитические Т-лимфоциты на распознавание и уничтожение клеток, экспрессирующих gp120 ВИЧ (U S S N 07/847566 и 07/665961, включенные в настоящий документ посредством ссылки).

Сущность изобретения

В целом настоящее изобретение представляет собой способ нацеливания клеточного иммунного ответа на ВИЧ-инфицированную клетку в организме млекопитающего. Этот способ предусматривает введение в организм млекопитающего эффективного количества лечебных клеток, экспрессирующих связанный с мембраной белковый химерный рецептор, который включает (а) внеклеточную часть, содержащую фрагмент CD4, способный специфически распознавать и связывать ВИЧ-инфицированные клетки, но неспособный опосредствовать ВИЧ-инфекцию, и (b) внутриклеточную часть, которая способна подать лечебной клетке сигнал уничтожить связанную с рецептором ВИЧ-инфицированную клетку.

Один из аспектов настоящего изобретения рассматривает клетку, экспрессирующую связанный с мембраной белковый химерный рецептор, включающий (а) внеклеточную часть, содержащую фрагмент CD4, который способен специфически распознавать и связывать ВИЧ-инфицированную клетку, но не опосредует ВИЧ-инфекцию, и (b) внутриклеточную часть, способную подать лечебной клетке сигнал уничтожить связанную с рецептором ВИЧ-инфицированную клетку.

Второй аспект освещает способ лечения ВИЧ у млекопитающего, предусматривающий введение млекопитающему эффективного количества лечебных клеток, экспрессирующих связанный с мембраной белковый химерный рецептор, включающий внеклеточную часть, содержащую фрагмент CD4, который способен специфически распознавать и связывать ВИЧ-инфицированную клетку, но не опосредует ВИЧ-инфекцию.

Еще один аспект, связанный с предыдущими, освещает клетку, экспрессирующую связанный с мембраной белковый химерный рецептор, включающий внеклеточную часть, содержащую фрагмент CD4, который способен специфически распознавать и связывать ВИЧ-инфицированную клетку, но не опосредует ВИЧ-инфекцию.

В предпочтительных вариантах осуществления обоих (первого и второго) аспектов фрагмент CD4 образован аминокислотами 1 - 394 или 1 - 200 последовательности CD4, этот фрагмент CD4 отделен от внутриклеточной части трансмембранным доменом CD7, изображенным на фиг. 26, или центральным доменом и доменами CH2 и CH3 молекулы IgG1 человека, показанными на фиг. 25, и фрагмент CD4 отделен от лечебной клетки расстоянием по меньшей мере в 48 ангстрем (и пред-

почтительно по меньшей мере в 72 ангстрема). В предпочтительном варианте осуществления первого аспекта внутриклеточная часть - это часть белка Т-клеточного рецептора (например, ζ), В-клеточного рецептора или рецептора Fc, способная проводить сигналы, лечебные клетки выбираются из числа (a) Т-лимфоцитов, (b) цитотоксических Т-лимфоцитов, (c) естественных клеток-киллеров, (d) нейтрофилов, (e) гранулоцитов, (f) макрофагов, (g) тучных клеток, (h) клеток HeLa и (i) стволовых клеток зародыша (ES).

В других соответствующих аспектах настоящего изобретения рассматривается ДНК, кодирующая химерный рецептор, соответствующий настоящему изобретению, и вектор, содержащий эту ДНК химерного рецептора.

В приведенном варианте осуществления настоящего изобретения речь идет о химере CD4 и дзета, но для достижения упомянутых здесь целей может быть использована любая рецепторная цепь, действие которой сходно с действием этих молекул, например, цепь из гранулоцитов или В-лимфоцитов. К характерным признакам молекулы-инициатора деятельности иммунной клетки относятся способность экспрессироваться самостоятельно (т.е. в виде отдельной цепи), способность сливаться с внеклеточным доменом CD4 таким образом, чтобы полученная химера находилась на поверхности лечебной клетки, и способность запускать клеточные эффекторные процессы при встрече и агрегации с лигандом-мишенью.

В настоящее время наиболее удобным способом доставки химер к клеткам иммунной системы является использование приемов генотерапии. Однако, доработка клеток иммунной системы химерными рецепторами за счет смешивания клеток с подходящим образом растворенным и очищенным химерным белком приведет также к образованию популяции сконструированных клеток, способных реагировать на ВИЧ-инфицированные мишени. Подобные подходы использовались, например, для введения молекулы CD4 в эритроциты в лечебных целях. В этом случае популяция сконструированных клеток неспособна к самостоятельному воспроизведению.

Настоящее изобретение относится к функциональным и упрощенным химерам фрагментов CD4 с подъединицами Т-клеточного рецептора, В-клеточного рецептора и рецептора Fc, способным нацеливать иммунные клетки на распознавание и лизис ВИЧ-инфицированных клеток. Способ управления клеточным ответом в организме млекопитающего включает введение в организм млекопитающего эффективного количества лечебных клеток (например, цитотоксических Т-лимфоцитов), способных распознавать и уничтожать ВИЧ-инфицированные клетки.

Настоящее изобретение также касается белков химерных рецепторов, направляющих цитотоксические Т-лимфоциты на распознавание и лизис ВИЧ-инфицированных клеток, клеток, трансформированных при помощи вектора, содержащего химерные рецепторы, и антител к химерным рецепторам.

Эти и другие варианты осуществления настоящего изобретения, не исчерпывающие его

сущности, станут очевидными для специалистов по прочтении нижеследующего подробного описания изобретения

В нижеследующем подробном описании мы будем ссылаться на различные методики, известные специалистам в области молекулярной биологии и иммунологии. Публикации и другие материалы, в которых изложены эти известные методики и на которые мы будем ссылаться, включаются в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте, как если бы приводились целиком

К общеизвестным работам, в которых изложены общие принципы технологии рекомбинантных ДНК, относятся Watson et al, *Molecular Biology of the Gene*, Volumes I and II, the Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, publisher, Menlo Park, CA (1987), Darnell et al, *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, Inc, Publisher, New York, N.Y. (1986), Lewin, *Genes II*, John Wiley & Sons, publishers, New York, N.Y. (1985), Old et al, *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*, 2d edition, University of California Press, publisher, Berkeley, CA (1981), Maniatis et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed Cold Spring Harbor Laboratory, publisher, Cold Spring Harbor, NY (1989), and Ausubel et al, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Press, New York, NY (1989)

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Под "клонированием" подразумевается использование в лабораторных условиях методов рекомбинации для осуществления вставки определенного гена или другой последовательности ДНК в векторную молекулу

Под "кДНК" подразумевается комплементарная ДНК, или ДНК-копия, собранная на матрице - РНК за счет действия зависящей от РНК ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы). Так "клон кДНК" обозначает двойную последовательность ДНК, комплементарную нужной молекуле РНК, содержащуюся в векторе клонирования

Под "библиотекой кДНК" подразумевается коллекция рекомбинантных молекул ДНК, содержащих вставки кДНК, включающие ДНК-копии мРНК, экспрессируемых клеткой в период создания библиотеки кДНК. Такую библиотеку кДНК можно получить при помощи способов, известных специалистам и описанных, например, у Ausubel et al, смотри выше и Maniatis et al, смотри выше

Обычно сначала из организма, из генома которого нужно клонировать какой-либо ген, выделяют РНК. Для достижения целей настоящего изобретения лучше использовать линии лимфоцитов млекопитающих, в частности, человека. В настоящее время предпочтительным вектором для этого является штамм VVR вируса осповакцины

Под "вектором" подразумевается молекула ДНК, полученная, например, из плазмиды, бактериофага, вируса млекопитающих или насекомых, в которую могут быть вставлены, или клонированы, фрагменты ДНК. Вектор содержит один или несколько сайтов рестрикции и может быть способным к самостоятельной репликации в определенном организме-хозяине (носителе), тогда воз-

можно воспроизводство клонированной последовательности. Так, под "вектором экспрессии ДНК" подразумевается любой самостоятельный элемент, способный управлять синтезом рекомбинантного пептида. К таким векторам экспрессии ДНК относятся бактериальные плазмиды и фаги, а также плазмиды и вирусы млекопитающих и насекомых

Под "практически чистым" подразумевается соединение, например, белок, полипептид или антитело, которое практически не содержит компонентов, которые характерны для него в естественных условиях. Обычно вещество считается практически чистым, если по меньшей мере 60%, а предпочтительно по меньшей мере 75%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% материала, взятого в качестве образца, - это требуемое соединение. Чистоту можно определить любым подходящим способом, например, при помощи хроматографии на колонке, электрофореза на полиакриламидном геле или жидкостной хроматографии высокого разрешения. Если речь идет о нуклеиновых кислотах, то "практически чистыми" называются последовательности, сегменты или фрагменты, не сопряженные непосредственно (т.е. не связанные ковалентной связью) ни с одной из кодирующих последовательностей, с которыми они непосредственно сопряжены (т.е. связаны с одной на конце 5', а с другой на конце 3') в естественных условиях в геноме организма, из которого получена ДНК, соответствующая настоящему изобретению

"Фрагментом" молекулы, такой как любая из последовательностей кДНК, соответствующих настоящему изобретению, называется любая подгруппа нуклеотидов молекулы, связанных друг с другом. "Аналогом" молекулы называется искусственная молекула, в основном подобная исходной молекуле или ее фрагменту. Молекула называется "в основном подобной" другой молекуле, если последовательности аминокислот в обеих молекулах в основном одинаковы. В частности, "в основном подобная" последовательность аминокислот по меньшей мере на 50%, предпочтительно на 85% и наиболее предпочтительно на 95% совпадает с природной или эталонной последовательностью аминокислот и/или отличается от природной или эталонной последовательности лишь незначительными заменами аминокислот. В основном подобные аминокислотные молекулы обладают подобной биологической активностью. В настоящем документе молекула называется "химическим производным" от другой молекулы, если содержит химические группы, не содержащиеся в исходной молекуле в естественных условиях. Эти группы могут повышать растворимость молекулы, абсорбцию, продлевать время полужизни и т.д. Иногда такие группы уменьшают токсичность молекулы, устраняют или ослабляют нежелательные побочные действия и т.д. Группы, обладающие такими свойствами, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences/ 16th ed, Mack Publishing Co., Easton, Penn (1980)

"Функциональное производное" гена химерного рецептора, предложенного настоящим изобретением, должно содержать "фрагменты" или "ана-

логи" этого гена, "в основном подобные" ему по последовательности нуклеотидов "В основном подобные" нуклеиновые кислоты кодируют в основном подобные последовательности аминокислот (определенные выше) и могут также включать любую последовательность нуклеиновых кислот, способную к гибридизации с природной или эталонной последовательностью нуклеиновых кислот при соответствующих условиях гибридизации (см., напр., Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Press, New York, NY (1989), о подходящих условиях жесткости для гибридизации)

"В основном подобный" химерный рецептор обладает активностью, подобной активности Т-клеток дикого типа, В-клеток или химер рецептора Fc. Предпочтительно, производное сохраняет 40%, более предпочтительно - 70% и наиболее предпочтительно 90% активности химеры рецептора дикого типа. Активность функционального производного от химерного рецептора состоит в специфическом связывании (при помощи внеклеточного участка CD4) с ВИЧ-инфицированной клеткой и в последующем разрушении этой клетки, кроме того, химерный рецептор не сообщает несущей его клетке восприимчивость к заражению ВИЧ. Активность химерного рецептора можно протестировать любым из описанных в настоящем документе способов.

Последовательность ДНК, кодирующая химеру рецептора CD4, соответствующую настоящему изобретению, или функциональные производные этой химеры, может быть рекомбинирована с векторной ДНК в соответствии с традиционной технологией, предусматривающей сшивание по тупым или ступенчатым концам, переваривание рестрикционными ферментами для получения соответствующих концов, осуществление вставки "липких" концов в нужные места, обработку щелочной фосфатазой для предупреждения возникновения нежелательных связей и использование для сшивания соответствующих лигаз. Технология проведения таких процедур описана у Maniatis et al., см. выше, и хорошо известна специалистам.

Молекула нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, считается "способной экспрессировать" полипептид, если она содержит последовательности нуклеотидов, в свою очередь содержащие информацию, необходимую для управления транскрипцией и трансляцией, и эти последовательности "оперативно связаны" с последовательностями нуклеотидов, кодирующими полипептид. Оперативная связь - это связь, при которой управляющие последовательности ДНК и те последовательности, которые нужно экспрессировать, соединены таким образом, что экспрессия гена является возможной. Характер управляющих участков, необходимых для экспрессии гена, изменяется от организма к организму, но в общем случае к ним относится промоторный участок, в который в прокариотических организмах включается и промотор (инициирующий транскрипцию РНК), и последовательности ДНК, которые после транскрипции в РНК подадут сигнал о начале синтеза белка. Обычно на таких участках находятся 5'-некодирующие последовательности, участвующие в запуске транскрипции и трансляции, такие как

блок TATA, кэп, последовательность СААТ и т.п.

Если нужно, то при помощи описанных выше способов можно получить некодирующий участок 3' для геной последовательности, кодирующей белок. Этот участок может быть сохранен с целью использования последовательностей, управляющих окончанием транскрипции, например, терминацией и полиаденилированием. Так, сохранение 3'-конечного участка, в естественных условиях примыкающего к последовательности ДНК, кодирующей белок, обеспечивает сигналы терминации. Если эти сигналы терминации трансляции неудовлетворительно работают в клетке-хозяине, то можно заменить функциональный 3'-участок в клетке-хозяине.

Две последовательности ДНК (такие как последовательность промоторного участка и последовательность, кодирующая химеру рецептора CD4) считаются оперативно связанными, если характер связи между этими двумя последовательностями ДНК (1) не приводит к мутации со сдвигом рамки, (2) не ослабляет способность последовательности промоторного участка управлять транскрипцией геной последовательности химерного рецептора и (3) не ослабляет способность геной последовательности химерного рецептора транскрибироваться под управлением последовательности промоторного участка. Промоторный участок будет оперативно связан с последовательностью ДНК, если промотор будет способен осуществить транскрипцию этой последовательности ДНК. Таким образом, чтобы экспрессировать белок, необходимы сигналы транскрипции и трансляции, распознаваемые соответствующим хозяином.

Настоящее изобретение предусматривает экспрессию белка химеры рецептора CD4 (или его функционального производного) в прокариотических или эукариотических клетках, хотя предпочтительной является экспрессия в эукариотических клетках (в частности, в лимфоцитах человека).

Антитела, соответствующие настоящему изобретению, могут быть приготовлены различными способами. Например, клетки, экспрессирующие белок химеры рецептора CD4 или функциональное производное этого белка, можно ввести животному, чтобы спровоцировать выработку сыворотки, содержащей поликлональные антитела, способные связывать химеру.

В предпочтительном случае антитела, соответствующие настоящему изобретению, являются моноклопальными. Такие моноклональные антитела можно приготовить, используя технологию гибридом (Kohler et al., *Nature* 256 495 (1975), Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6 511 (1976), Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6 292 (1976), Hammerling et al., в книге *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y., pp. 563 - 684 (1981)). В общем случае такая процедура предусматривает иммунизацию животного антигеном химеры рецептора CD4. У животного изымают спленоциты и сливают их с подходящей миеломной клеточной линией. В рамках настоящего изобретения может быть использована любая подходящая миеломная клеточная линия. Полученные в результате слияния гибридомные клетки избирательно выдерживают в

среде ГАТ (гипоксантин-аминоптеринтимидиновой среде), а затем клонируют путем предельного разбавления, как описано у Wands et al., (Gastroenterology 80 225 - 232 (1981)). Гибридомные клетки, полученные в результате такого отбора, подвергаются анализу с целью выявления клонов, вырабатывающих антитела, способные связывать химеру.

Антитела, соответствующие настоящему изобретению, могут также быть поликлональными или, предпочтительно, регион-специфическими поликлональными антителами.

Антитела против химеры рецептора CD4, соответствующие настоящему изобретению, можно использовать для определения количества химерных рецепторов (количества клеток-носителей химерных рецепторов) в организме. Такие антитела очень удобны для использования в стандартном иммунодиагностическом анализе, хорошо известном специалистам и включающим такие иммунометрические приемы, или приемы сэндвич-анализа, как прямой, обратный и одновременный сэндвич-анализ. Антитела можно использовать в любом количестве комбинаций. Специалист сумеет это определить и без излишнего экспериментирования провести иммуноанализ приемлемой специфичности, чувствительности и точности.

К общеизвестным работам, в которых изложены общие принципы иммунологии, относятся Roitt, *Essential Immunology*, 6th ed., Blackwell Scientific Publications, Publisher, Oxford (1988), Kimball, *Introduction to Immunology*, 2d ed., Macmillan Publishing Co., Publisher, New York (1986), Roitt et al., *Immunology*, Gower Medical Publishing Ltd., Publisher, London, (1985), Campbell, "Monoclonal Antibody Technology," в Burdon et al., eds., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 13, Elsevier, Publisher, Amsterdam (1984), Klein, *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination*, John Wiley & Sons, Publisher, New York (1982), и Kennett et al., eds., *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Press, Publisher, New York (1980).

Под "регистрацией" подразумевается установление наличия или отсутствия вещества или определение количества вещества. Таким образом, этот термин относится к использованию материалов, составов и способов, предлагаемых настоящим изобретением для качественных и количественных оценок.

Антитела и практически чистый антиген, предлагаемые настоящим изобретением, идеально подходят для оформления в набор. Такой набор может состоять из упаковки, поделенной на отсеки, в которые впритирку входят сосуды (флаконы, ампулы и т.п.) с материалами для анализа.

Типы анализов, материалы для которых можно оформить в виде набора, многочисленны. К ним относятся, например, конкурентный и неконкурентный типы анализа. Типичными примерами анализа, в котором можно использовать антитела, предложенные настоящим изобретением, служат радиоиммуноанализ, иммуноферментный анализ, твердофазный иммуноферментный анализ и иммунометрический, или сэндвич-анализ.

Под терминами "иммунометрический анализ"

или "сэндвич-анализ" подразумевается одновременный, прямой и обратный сэндвич-анализ. Специалисты хорошо понимают эти термины. Специалисты поймут также, что антитела, соответствующие настоящему изобретению, будут полезными для проведения других видов и форм анализов, известных в настоящее время или тех, что будут разработаны в дальнейшем. Они также будут отнесены к настоящему изобретению.

Выражение "специфически распознает и связывает" означает, что антитело распознает и связывает полипептид химерного рецептора, но практически не распознает и не связывает не относящиеся к нему молекулы препарата, например, биологического препарата.

Выражение "лечебная клетка" обозначает клетку, трансформированную химерой рецептора CD4, соответствующей настоящему изобретению, и благодаря этому способную распознавать и уничтожать ВИЧ-инфицированные клетки, предпочтительными лечебными клетками являются клетки кроветворной системы.

Выражение "внеклеточный" означает, что хотя бы часть молекулы выступает на поверхность клетки. Термин "внутриклеточный" означает, что хотя бы часть молекулы находится в цитоплазме лечебной клетки. Термин "трансмембранный" означает, что хотя бы часть молекулы пронизывает плазматическую мембрану. Под "внеклеточной частью", "внутриклеточной частью" и "трансмембранной частью" могут подразумеваться и боковые аминокислотные последовательности, которые заходят в прилегающие отделы клетки.

Слово "олигомеризовать" означает соединять с другими белками с целью получения димеров, тримеров, тетрамеров или олигомеров более высокого порядка. Эти олигомеры могут быть гомо- или гетероолигомерами. "Олигомеризующий участок" - это участок молекулы, управляющий образованием комплекса (олигомера).

Слово "цитолитический" означает способный уничтожать клетки (например, ВИЧ-инфицированные клетки) или способный уничтожать возбудителей инфекции (например, вирусы иммунодефицита человека).

Под "вирусом иммунодефицита" подразумевается ретровирус, который в форме дикого типа способен поражать клетки T4 в организме хозяина-примата и характеризуется морфогенезом и морфологией, свойственными подсемейству лентивирусов. Этот термин относится, без каких-либо ограничений, ко всем разновидностям вирусов иммунодефицита человека и обезьян, в том числе к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и к вирусам иммунодефицита обезьян SIVmac, SIVagm, SIVmnd, SIVsmm, SIVman, SIVmand и SIVspz.

Выражение "независимый от ГКГС" означает, что клеточный цитолитический ответ имеет место и в отсутствие антигена ГКГС класса II на поверхности клетки-мишени.

Выражение "функциональное производное, способное проводить цитолитический сигнал" обозначает функциональное производное (см. определение, данное выше), способное осуществить по меньшей мере 40%, более предпочтительно 70% и наиболее предпочтительно по меньшей

мере 90% биологической активности молекулы дикого типа. Объекты, называемые в настоящем документе "функциональными производными", способными проводить цитолитический сигнал", могут действовать путем непосредственной подачи лечебной клетке сигнала об уничтожении связанной с рецептором клетки или агента (напр., как в случае внутриклеточной части химерного рецептора) или косвенно - тогда они способствуют олигомеризации с белками лечебной клетки, проводящими цитолитический сигнал (как в случае трансмембранного домена). Эффективность таких производных можно испытать при помощи описанных в настоящем документе способов лабораторного анализа.

Под выражением "функциональное производное, связывающее оболочку ВИЧ" подразумевается функциональное производное (см. определение, данное выше), способное связать любой белок оболочки ВИЧ. Функциональные производные могут быть идентифицированы при помощи описанных в настоящем документе способов лабораторного анализа.

ПРИМЕНЕНИЕ В ЛЕЧЕБНЫХ ЦЕЛЯХ

Трансформированные клетки, предложенные настоящим изобретением, используются в лечебных целях при заражении вирусом иммунодефицита. К способам применения таких трансформированных клеток, практикуемым в настоящее время, относятся адоптивная терапия или терапия переносом клеток. Эти способы позволяют возвращать трансформированные клетки иммунной системы в кровь. Rosenberg, *Sci Am* 2 (May 1990), Rosenberg et al., *N Engl J Med* 323 (9) 570 (1990).

Фармацевтические составы, соответствующие настоящему изобретению, можно вводить любому животному, которому могут принести пользу соединения, предложенные настоящим изобретением. На первом месте среди таких животных стоит человек, хотя возможность применения настоящего изобретения не ограничивается человеком.

Подробное описание

Сначала дадим пояснение к фигурам.

Краткое описание иллюстративных материалов.

Фиг. 1А - изображение аминокислотной последовательности в окрестности участка слияния между CD4 (остатки 1 - 369) и различными рецепторными цепями (последовательности № 38 - 41). Подчеркнутая последовательность - это место расположения аминокислот, закодированных участком VamH1 и участвующих в слиянии. Начало трансмембранного домена отмечено вертикальной чертой. Последовательность η на аминоконце идентична последовательности ζ , но отличается от нее на карбоксильном конце (Jin et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 87 3319 - 3323 (1990)).

Фиг. 1В представляет данные проточного цитометрического анализа поверхностной экспрессии CD4, CD4 ζ , CD4 η и CD4 γ в клетках CV1. Клетки были заражены вирусом, экспрессирующим химеры CD4 или CD16_{TM}, выдержаны 9 часов при 37°C и окрашены антителами MAb Leu3A к CD4, конъюгированными с фикоэритрином.

Фиг. 2 представляет поверхностную экспрессию CD16_{TM} после заражения только CD16_{TM} (час-

тые точки) или CD16_{TM} совместно с вирусом, экспрессирующим CD4 γ (штрихи) или CD4 ζ (непрерывная линия). Редкие точки соответствуют клеткам, зараженным только CD4 ζ и окрашенным 3G8 (Fleit et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 7 3275 - 3279 (1982)) (антитела MAb к CD16).

Фиг. 3 показывает поверхностную экспрессию CD16_{TM} после заражения вирусом, экспрессирующим CD16_{TM}, совместно с вирусами, экспрессирующими следующие химеры ζ CD4 ζ (жирная линия), CD4 ζ C11G (непрерывная линия), CD4 ζ (штриховая линия), CD4 ζ C11G/D15G (частые точки), и после заражения только CD16_{TM} (редкие точки). Клетки были выдержаны с антителами к CD16 MAb 3G8) и козьими антителами Fab'2 к мышиному IgG, конъюгированными с фикоэритрином. Уровень экспрессии химер ζ был практически идентичным для различных мутантов, а совместное заражение клеток вирусами, экспрессирующими CD16_{TM} и химеры ζ , не повлияло в значительной степени на экспрессию химер.

Фиг. 4А-Д показывает повышение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция после перекрестного связывания мутантных химер ζ в Т-клеточной линии. Клетки Jurkat Е6 (Weiss et al., *J Immunol* 133 123 - 128 (1984)) были заражены рекомбинантными вирусами осповакцины и проанализированы методом проточной цитометрии. Результаты, отображенные на фигуре, относятся только к популяции CD4⁺, прошедшей дискриминацию, т.е. к тем клеткам, которые экспрессируют соответствующий химерный белок. Среднее отношение фиолетовой к голубой (краситель Индо-1) флуоресценции отражает внутриклеточную концентрацию свободного кальция в популяции в целом, а процентная доля ответивших клеток показывает у какой части клеток это отношение превышает заранее заданный порог (установленный таким образом, что 10% необработанных клеток дают положительный результат).

Фиг. 4А и 4В представляют экспрессию в клетках Jurkat белков CD4 ζ (непрерывная линия) или CD16 ζ (штриховая линия), обработанных антителами MAb Leu3A к CD4 (конъюгат с фикоэритрином), с последующим перекрестным связыванием с козьими антителами к мышиному IgG. Пунктирной линией обозначен ответ незараженных клеток на MAb OKT3 к CD3. На фиг. 4С и 4Д показана экспрессия в клетках Jurkat белков CD4 ζ D15G (непрерывная линия), CD4 ζ C11G/D15G (штрихи) или CD4 ζ C11G (точки) в результате обработки и анализа, описанных в пояснении к фиг. 4А и 4В.

Фиг. 5А-С показывает, что рецепторы CD4 ζ , CD4 η и CD4 γ позволяют цитолитическим Т-лимфоцитам уничтожать мишени, экспрессирующие gp120/41 ВИЧ-1. Фиг. 5А закрашенные кружки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4 ζ и выдержанные с клетками HeLa, экспрессирующими gp120/41, незакрашенные кружки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4 ζ и выдержанные с незараженными клетками HeLa, закрашенные квадраты - незараженные цитолитические Т-лимфоциты, выдержанные с клетками HeLa, экспрессирующими gp120/41, незакрашенные квадраты - незараженные цитолитические Т-лимфоциты, выдержанные с

незараженными клетками HeLa. Фиг. 5B закрашенные кружки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4 η и выдержанные с клетками HeLa, экспрессирующими gp120/41, незкрашенные кружки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4 γ и выдержанные с клетками HeLa, экспрессирующими gp120/41, незкрашенные квадраты - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие химеру CD4 ζ с двойной мутацией C11G/D15G и выдержанные с клетками HeLa, экспрессирующими gp120/41. Фиг. 5C проточный цитометрический анализ экспрессии CD4 в цитолитических Т-лимфоцитах, упомянутых в связи с фиг. 5B. Для коррекции отношений мишень-эффектор, процентные доли клеток, экспрессирующих химеру CD4, определяли путем вычитания отрицательной (незараженной) популяции, представленной в соответствующем масштабе, при помощи наложения гистограмм, для сравнения на этой фигуре незараженным клеткам поставлен в соответствие произвольный порог, дающий приблизительно те же доли положительных ответов в других популяциях, что и вычитание гистограмм.

Фиг. 6A-B иллюстрируют специфичность цитолиза, управляемого CD4. Фиг. 6A закрашенные кружки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4 ζ и выдержанные с клетками HeLa, экспрессирующими CD16_{RI}, незкрашенные кружки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4 и выдержанные с клетками HeLa, экспрессирующими gp120, закрашенные квадраты - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD16 ζ и выдержанные с клетками HeLa, экспрессирующими gp120/41, незкрашенные квадраты - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD16_{RI} и выдержанные с клетками HeLa, экспрессирующими gp120/41. Фиг. 6B закрашенные кружки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4 ζ и выдержанные с клетками Raji (ГКГС, класс II⁺), незкрашенные кружки - незараженные цитолитические Т-лимфоциты, выдержанные с клетками RJ2 2.5 (Raji - мутанты, класс II⁺ ГКГС), закрашенные квадраты - незараженные цитолитические Т-лимфоциты, выдержанные с клетками Raji (класс II⁺ ГКГС), незкрашенные квадраты - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4 ζ и выдержанные с клетками RJ2 2.5 (класс II⁺ ГКГС). Шкала на ординате растянута.

Фиг. 7A-B - характеристика химерного рецептора CD16 ζ . Фиг. 7a - схематическое изображение слитого белка CD16. Внеклеточная часть фосфатидилинозит-связанной формы мономерного CD16 была присоединена к димерному ζ сразу за трансмембранным доменом. Последовательность аминокислот на месте слияния приведена внизу (последовательности № 42, 43). Фиг. 7B представляет проточный цитометрический анализ мобилизации кальция после перекрестного связывания химеры CD16 в клеточных линиях, положительных или отрицательных в отношении Т-клеточных рецепторов. Показано среднее отношение флуоресценции к голубой флуоресценции (мера относительной концентрации ионов кальция) в популяциях клеток, обработанных антителами в момент времени 0. Закрашенные квадраты - ответ

клеток Jurkat на антитела MAb OKT3 к CD3, закрашенные треугольники - ответ CD16 ζ на антитела MAb 3G8 к CD16 с перекрестным связыванием в мутантных клетках REX33A TCR, незкрашенные квадраты - ответ на перекрестное связывание CD16 ζ в мутантной линии JRT3 T3.5 клеток Jurkat TCR, незкрашенные треугольники - ответ на перекрестное связывание CD16 ζ в клетках Jurkat, крестики - ответ на нехимерные CD16 в клетках Jurkat, точки - ответ на нехимерные CD16 в клеточной линии REX33A TCR.

Фиг. 8A-B иллюстрирует делеционный анализ цитолитического потенциала. Фиг. 8A иллюстрирует расположение конечных точек делеции ζ . Здесь, как и везде, мутации ζ представлены формулой исходный остаток-место-мутантный остаток, так что D66*, например, обозначает замещение Asp-66 стоп-кодом. На фиг. 8B представлены результаты оценки цитолиза для неделетированного CD16 ζ и характерных делеции ζ . Гибридные клетки, экспрессирующие на поверхности антитела к CD16, были нагружены 51Cr и выдержаны с различным (возрастающим) количеством цитолитических Т-лимфоцитов человека, зараженных рекомбинантами осповакцины, экспрессирующими химеры CD16 ζ . Процентная доля высвобожденного 51Cr вычерчена как функция отношения эффектора (цитолитических лимфоцитов) к мишени (гибридным клеткам). Закрашенные кружки - цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими CD16 ζ (среднекратный прирост 18,7), закрашенные квадраты - цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими CD16 ζ Asp66* (среднекратный прирост 940,2), незкрашенные квадраты - цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими CD16 ζ Glu60* (среднекратный прирост 16,0), незкрашенные кружки - цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими CD16 ζ Tyr51* (среднекратный прирост 17,4), закрашенные треугольники - цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими CD16 ζ Phe34* (среднекратный прирост 17,8), незкрашенные треугольники - цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими нехимерный CD16 (среднекратный прирост 591). Хотя в этом эксперименте экспрессия CD16 ζ Asp66* не соответствовала экспрессии других слитых белков, цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими CD16 ζ на эквивалентных уровнях, в том же эксперименте дап результаты, практически идентичные тем, которые были получены для клеток, экспрессирующих CD16 ζ Asp66*.

Фиг. 9A-D показывает, что элиминация потенциала трансмембранных взаимодействий открывает короткий сегмент ζ , способный опосредствовать цитолиз. Фиг. 9A - это схематическое изображение мономерных двухчастных и трехчастных химер. Сверху изображена конструкция CD16 ζ , усеченная на остатке 65, в которой отсутствуют трансмембранные остатки Cys и Asp. Ниже изображены конструкции CD16 CD5 ζ и CD16 CD7 ζ и соответствующие контрольные конструкции. Пептидные последовательности внутриклеточных доменов приведены внизу (последовательности № 45 - 47). Фиг. 9B иллюстрирует

цитолитическую активность делеционных мутаций мономерных химер Цитолитическая активность клеток, экспрессирующих CD16 ζ (закрашенные кружки, среднекратный прирост 495), сравнивалась с активностью клеток, экспрессирующих CD16 ζ Asp66* (закрашенные квадраты, среднекратный прирост 527), или мутантов CD16 ζ Cys11Gly/Asp15Gly/Asp66* (незакрашенные квадраты, среднекратный прирост 338) и CD16Cys11Gly/Asp15Gly/Glu60* (закрашенные треугольники, среднекратный прирост 259), Фиг 9С иллюстрирует цитолитическую активность, опосредствованную трехчастными слитыми белками. Закрашенные треугольники CD16 ζ Asp66*, незакрашенные квадраты - CD16 ζ (48 - 65), закрашенные квадраты - CD16 7 ζ (48 - 65), незакрашенные треугольники - CD16 7 ζ (48 - 59), незакрашенные кружки - CD16 5, закрашенные кружки - CD16 7. Фиг 9D иллюстрирует мобилизацию кальция мутантными и трехчастными химерами в мутантной клеточной линии Jurkat JRT3 T3 5, отрицательной в отношении Т-клеточных рецепторов. Незакрашенные кружки - ответ клеток, экспрессирующих димерные CD16 ζ Asp66*, закрашенные квадраты - ответ клеток, экспрессирующих CD16 ζ Cys11Gly/Asp15Gly/Asp66*, незакрашенные квадраты - ответ клеток, экспрессирующих CD16Cys11Gly/Asp15Gly/Glu60*, закрашенные треугольники - ответ клеток, экспрессирующих CD16 7 ζ (48 - 65), незакрашенные треугольники - CD16 ζ (48 - 59).

Фиг 10А-Е иллюстрирует вклад отдельных аминокислот в активность участка из 18 остатков, проводящего цитолитический сигнал. Фиг 10А и 10В иллюстрируют цитолитическую активность, а Фиг 10С - мобилизацию ионов кальция, опосредствованную химерами с точечными мутациями в окрестности карбоксиконечного тирозина (Y62). Фиг 10А и 10В представляют данные о клетках, экспрессирующих малые и большие количества, соответственно, слитых белков CD16 ζ . На обоих фигурах использованы одинаковые обозначения и буквенные коды, помещенные справа. Закрашенные кружки - клетки, экспрессирующие CD16 ζ (среднекратный прирост А - 21, В - 376), закрашенные квадраты - клетки, экспрессирующие CD16 7 ζ (48 - 65) (среднекратный прирост А - 31, В - 82), незакрашенные квадраты - CD16 7 ζ (48 - 65)Glu60Gln (среднекратный прирост А - 33, В - 92), крестики - CD16 7 ζ (48 - 65)Asp63Asn (среднекратный прирост А - 30, В - 74), закрашенные треугольники - CD16 7 ζ (48 - 65)Tyr62Phe (среднекратный прирост А - 24, В - 88), незакрашенные кружки - CD16 7 ζ (48 - 65)Glu61Gln (среднекратный прирост А - 20, В - 62), незакрашенные треугольники - CD16 7 ζ (48 - 65)Tyr62Ser (среднекратный прирост В - 64). Фиг 10D и 10Е иллюстрируют цитолитическую активность, а Фиг 10F - мобилизацию ионов кальция, опосредствованную химерами с точечными мутациями в окрестности аминоконечного тирозина (Y51). На графиках цитолитической активности и мобилизации кальция использованы одинаковые обозначения, расшифрованные справа. Закрашенные кружки - клетки, экспрессирующие CD16 ζ (среднекратный прирост D - 21,2, E - 672), закрашенные квадраты

- клетки, экспрессирующие CD16 7 ζ (48 - 65) (среднекратный прирост D-31,3, E-179), закрашенные треугольники - CD16 7 ζ (48 - 65)Asn48Ser (среднекратный прирост D - 22,4, E - 209), незакрашенные квадраты - CD16 7 ζ (48 - 65)Leu50Ser (среднекратный прирост D - 25,0, E - 142), незакрашенные треугольники - CD16 7 ζ (48 - 65)Tyr51Phe (среднекратный прирост D - 32,3, E - 294).

На Фиг 11А-В дан сравнительный анализ структуры внутренних повторов ζ и сравнение их способности обеспечивать цитолиз. Фиг 11А - это схематическое изображение химер, образованных путем деления внутриклеточного домена ζ на трети и присоединения их к трансмембранному домену химеры CD16 7. Последовательности внутриклеточных доменов приведены ниже (последовательности № 48 - 50), общие остатки заключены в рамки, а родственные остатки отмечены звездочками. На Фиг 11В проиллюстрирована цитолитическая способность этих трех субдоменов ζ . Закрашенные кружки - клетки, экспрессирующие CD16 ζ (среднекратный прирост 476), закрашенные квадраты - клетки, экспрессирующие CD16 7 ζ (33 - 65) (среднекратный прирост 68), незакрашенные квадраты - CD16 7 ζ (71 - 104) (среднекратный прирост 114), закрашенные треугольники - CD16 7 ζ (104 - 138) (среднекратный прирост 104).

Фиг 12 - схематическое изображение химер CD16 FcRyII.

Фиг 13А-В иллюстрируют мобилизацию кальция после перекрестного связывания химер CD4 FcRyII и CD16 FcRyII. Фиг 13А представляет соотношение фиолетовой и голубой флуоресценции клеток, нагруженных чувствительным к кальцию красителем Индо-1, в виде функции от времени, прошедшего с момента перекрестного связывания внеклеточного домена CD16 с антителами. На Фиг 13В приведены результаты подобного анализа роста отношения фиолетовой флуоресценции к голубой для клеток, несущих химеры CD4 FcRyII, после перекрестного связывания с антителами.

Фиг 14А-В иллюстрируют анализ цитолитических свойств химер CD4 FcRyII и CD16 FcRyII. На Фиг 14А показана процентная доля ^{51}Cr , высвобожденного гибридомными против-CD16 клетками (мишенями) при их взаимодействии с возрастающим количеством цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих химеры CD16 FcRyII (эффекторов). На Фиг 14В проиллюстрирован аналогичный анализ цитотоксичности, опосредствованной химерами CD4 FcRyII, по отношению к клеткам-мишеням, экспрессирующим гликопротеины оболочки ВИЧ.

На Фиг 15А-Е показана идентификация остатков в хвосте А FcRyII, которые имеют большое значение для цитолиза. Фиг 15А - это схематическое изображение делеционных конструкций. Фиг 15В и 15С иллюстрируют мобилизацию кальция и цитолиз, опосредствованные вариантами химеры CD16 FcRyIIA с делециями на карбоксильном конце. Фиг 15D и 15Е иллюстрируют мобилизацию кальция и цитолиз, опосредствованные трехчаст-

ными химерами, у которых постепенно укорачивался аминоконец внутриклеточного хвоста CD16 FcRγII A

Фиг 16 (последовательность № 24) представляет последовательность аминокислот белка рецептора CD3-дельта, в рамку заключен предпочтительный участок для передачи цитопитического сигнала

На фиг 17 (последовательность № 25) представлена последовательность аминокислот белка рецептора T3-гамма, в рамку заключен предпочтительный участок для передачи цитопитического сигнала

На фиг 18 (последовательность № 26) представлена аминокислотная последовательность белка рецептора mβ1, в рамку заключен предпочтительный для передачи цитопитического сигнала участок

На фиг 19 (последовательность № 27) представлена аминокислотная последовательность белка рецептора B29, в рамку заключен предпочтительный для передачи цитопитического сигнала участок

На фиг 20 дано схематическое изображение химер CD4. Молекула A - CD4(D1 - D4) Ig CD7, молекула B - CD4(D1, D2) Ig CD7, молекула C - CD4 (D1 - D4) Ig CD7, молекула D - CD4 (D1, D2) Ig CD7 ζ и молекула E - CD4 ζ. Внеклеточный домен молекулы CD4 человека, соответствующий аминокислотам 1 - 394 предшественника, был соединен через сайт BamHI к центральному домену и доменам CH2 и CH3 IgG1 человека, как описано ранее (Zettlmeissl et al, DNA Cell Biol 9:347 (1990)), с той лишь разницей, что для экспрессии в рекомбинантных вирусах осповакцины использовалась кДНК последовательностей Ig человека. Двухдоменные версии химер CD4 получили путем осуществления вставки "переходника" BamHI в уникальный сайт NheI (соответствующий аминокислоте 200) кДНК предшественника CD4. Последовательности связывания с мембраной состояли из 22 остатков из первого экзона IgG1 человека, связанного с мембраной, за которыми следовали остатки 146 - 203 CD7. Аминокислоты 55 - 163 ζ служили в четырехчастных конструкциях (C и D) иницирующим участком. В четырехчастных конструкциях, содержащих цепь ζ, внутриклеточная экспрессия ζ регистрировалась при помощи анти-теп к внутриклеточному домену, имеющихся в продаже (Coulter).

На фиг 21 проиллюстрирован лизис клеток-мишеней, экспрессирующих гликопротеин оболочки ВИЧ-1, опосредствованный Т-клеточным клоном WH3, экспрессирующим различные химеры CD4 в качестве эффекторных молекул. Для испытания цитотоксичности линию WH3 Т-клеток человека с рестрикциями CD8⁺ CD4 HLA B44 выдержали в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков (IMDM), дополненной 10% человеческой сывороткой, как описано выше. Клетки подвергли стимуляции при помощи гамма-облученных (3000 рад) одноклеточных клеток-носителей B44 и фитогемагглютина в концентрации 1мкг/мл. Через день фитогемагглютинин развели до 0,5мкг/мл путем добавления свежей среды, через 3 дня среду полностью заменили

Перед использованием в анализе цитотоксичности клетки выращивали не менее 10 дней. Клетки были заражены соответствующими рекомбинантными вирусами осповакцины, как описано в настоящем документе для VPE16. Инфекцию оставили развиваться в полной среде в течение 3 - 4 часов, после чего клетки отобрали путем центрифугирования и снова взвесили в концентрации 1×10^7 /мл. В каждую ячейку U-образного титрационного микропланшета, содержащую 100мкл полной среды, добавили по 100мкл и разбавили в 2 раза последовательными шагами. Две ячейки для каждого образца не содержали лимфоцитов, чтобы можно было измерить спонтанное высвобождение хрома и суммарное поглощение хрома. Клетки, служащие мишенями, сублинию S3 HeLa (HeLa-S3, Американская коллекция типовых культур) заразили vPE16 в 10-сантиметровых чашках, как описано выше. 10^6 зараженных клеток отделили при помощи фосфатно-солевого буфера и 1мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, центрифугировали и взвесили в 100мкл натрия хромата (⁵¹Cr, 1мКи/мл в фосфатно-солевом буфере) на 1 час при 37°C, затем три раза промыли фосфатно-солевым буфером. В каждую ячейку добавили 100мкл меченых клеток-мишеней. Титрационный микропланшет вращали в течение 1 минуты при 750 x g и в течение 4 часов выдерживали при 37°C. После этого клетки в каждой ячейке снова взвесили путем осторожного пипетирования, один образец отобрали, чтобы определить общее количество клеток, и вращали планшет при 750 x g в течение минуты. Порции (100мкл) супернатанта отбирали и анализировали в счетчике гамма-сцинтилляций. К отношению эффектор-мишень была сделана поправка на процент зараженных клеток, определенный при помощи проточной цитометрии.

Фиг 22 иллюстрирует репликацию ВИЧ-1 в трансфицированных клеточных линиях. Клеточные линии, стабильно экспрессирующие CD4 дикого типа и различные рекомбинантные химеры, были получены из сублинии линии 293 почечных клеток зародыша человека. Штамм культуры IIIB ВИЧ-1 был приготовлен с титром инфицирующих частиц $\approx 10^6$ /мл, измеренным при помощи титрования в конечной точке с использованием Т-клеточной линии C8166 в качестве индикатора. Заражение проводилось с множественностью заражения около 1 в течение 8 - 12 часов при 37°C. На следующий день клетки трижды промыли фосфатно-солевым буфером, обработали трипсином, пересадили в другие чашки, а супернатант культуры проверили на титр p24 (результат датировали днем 0). После этого с промежутками в 3 - 4 дня отбирали супернатанты клеточной культуры для анализа на p24. Клеткам давали свежую среду, содержащую гидрокортизон В в концентрации 100мкг/мл. Анализ супернатантов культуры проводили с использованием серийного набора для регистрации антигена p24 ВИЧ-1, основанного на твердофазном иммуноферментном анализе (Coulter), в соответствии с инструкцией изготовителя. Представлены результаты двух независимых экспериментов одинаковой длительности.

На фиг 23 приведены последовательности

нуклеиновых (последовательность № 28) и аминокислот (последовательность № 29) для доменов D1 - D4 CD4 (CD4 Bat)

На фиг 24 приведены последовательности нуклеиновых (последовательность № 30) и аминокислот (последовательность № 31) для доменов D1 - D2 CD4 (CD4 Nhe)

На фиг 25 приведены последовательности нуклеиновых (последовательность № 32) и аминокислот (последовательность № 33) центрального домена и доменов CH2 и CH3 IgG1(Igh23 Bam) человека

На фиг 26 приведены последовательности нуклеиновых (последовательность № 34) и аминокислот (последовательность № 35) для трансмембранного домена CD7 (TM7 Bam Mlu)

На фиг 27 приведены последовательности нуклеиновых (последовательность № 36) и аминокислот (последовательность № 37) для внутриклеточного домена дзета (Zeta Mlu Not)

На фиг 28 приведены последовательность ДНК (последовательность № 51) и первичная последовательность аминокислот (последовательность № 52) для синтетической альфа-спирали

Пример 1

Конструирование химер IgG1 и рецептора человека

Последовательности тяжелой цепи IgG1 человека получили путем присоединения последовательности домена CH3 к фрагменту кДНК, полученному из конца 3' трансмембранной формы мРНК антител. Фрагмент конца 3' был получен посредством цепной полимеразной реакции с использованием в качестве субстрата библиотеки кДНК миндалин и олигонуклеотидов, имеющих такие последовательности

CGC GGG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC (последовательность № 7) и

CGC GGG GAT CCG TCG TCC AGA GCC CGT CCA GCT CCC CGT CCT GGG CCT CA (последовательность № 8),

которые соответствовали концам 5' и 3' нужных фрагментов ДНК, соответственно. Олигонуклеотид 5' комплементарен одному из сайтов домена CH1 IgG1 человека, а олигонуклеотид 3' комплементарен сайту, следующему в направлении 5' сразу за последовательностями, кодирующими домен, пересекающий мембрану. Продукт цепной полимеразной реакции переварили при помощи BstXI и BamHI и вшили между сайтами BstXI и BamHI полусинтетического гена антитела IgG1, имеющего переменные и постоянные участки. После осуществления вставки фрагмента между BstXI и BamHI амплифицированные части конструкции были заменены до сайта SmaI в домене CH3 путем обмена рестрикционными фрагментами, так что из продуктов цепной полимеразной реакции остался только участок между сайтом SmaI и олигонуклеотидом 3'

Чтобы получить химерный рецептор IgG1 человека, ген тяжелой цепи, заканчивающийся на сайте BamHI, присоединили к сайту BamHI химеры ζ, описанной ниже, так что последовательности антитела оказались во внеклеточной части. Проточная цитометрия клеток COS, трансфицированных плазмидами, кодирующими химеру, показала

высокий уровень экспрессии детерминант антител для клеток, дополнительно зараженных плазмидами, кодирующими кДНК легкой цепи, и умеренную экспрессию детерминант антител для клеток, в которых не было плазмид, экспрессирующих легкую цепь

Подобные химеры, состоящие из IgG1 человека, слитого с η или γ (см. ниже) или с любым другим участком белка Т-клеточного рецептора или Fc-рецептора, способным проводить сигнал, могут быть сконструированы в общем как описано выше, с использованием стандартных методов молекулярной биологии

Чтобы получить единый блок транскрипции, который обеспечивал бы экспрессию и тяжелой, и легкой цепей из одного промотора, создали плазмиду, кодирующую двухцистронную мРНК, из последовательностей, кодирующих тяжелую и легкую цепи, и нетранспированного 5'-конечного участка мРНК, кодирующей белок в 78 килодальтон, регулируемый глюкозой, известный также как grp78, или BiP. Последовательности grp78 были получены при помощи цепной полимеразной реакции с геномной ДНК человека и с затравками, имеющими такие последовательности

CGC GGG CGG CCG CGA CGC CGG CCA AGA CAG CAC (последовательность № 9) и

CGC GTT GAG GAG CAG CCA GTT GGG CAG CAG CAG (последовательность № 10) -

на концах 5' и 3', соответственно. Цепные полимеразные реакции с этими олигонуклеотидами проводились в присутствии 10% диметилсульфоксида. Фрагмент, полученный в результате цепной полимеразной реакции, переварили при помощи NotI и HincII и вставили между сайтами NotI и HpaI вслед за последовательностями, кодирующими IgG1 человека. Затем, вслед за лидерной последовательностью grp78, используя сайт HincII и еще один сайт вектора, вставили последовательности, кодирующие кДНК легкой цепи kappa IgG человека. Полученная в результате этих процедур экспрессионная плазида состояла из полусинтетического гена тяжелой цепи, за которыми следовали лидерные последовательности grp78, затем последовательности кДНК легкой цепи kappa, затем сигналы полиаденилирования, полученные из фрагмента ДНК SV40. Трансфекция клеток COS такими плазмидами дала заметное усиление экспрессии детерминант тяжелой цепи по сравнению с трансфекцией плазмидами, кодирующими детерминанты только тяжелой цепи

Для получения двухцистронного гена, включающего в себя химеру тяжелая цепь/рецептор и легкую цепь, передние последовательности тяжелой цепи можно заменить любым геном химеры тяжелая цепь/рецептор из описанных в настоящем документе

Пример II

Конструирование химер рецептора CD4

кДНК ζ человека (Weissman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8:9709 - 9713 (1988b)) и γ (Kuster et al., J. Biol. Chem. 265:8448 - 8452 (1990)) были выделены при помощи цепной полимеразной реакции из библиотек, приготовленных из опухолевой клеточной линии HPE-ALL (Aruffo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8573 - 8577 (1987b)) и из

естественных клеток-киллеров человека, а КДНК η (Jin et al, Proc Natl Acad Sci USA 87 3319 - 3323 (1990)) была выделена из библиотеки мышиных тимоцитов. КДНК ζ , η и γ присоединяли к внеклеточному домену перестроенной формы CD4, в которой сайт BamHI располагался непосредственно перед доменом, пересекающим мембрану (Aruffo et al, Proc Natl Acad Sci USA 84 8573 - 8577 (1987b)), Zettlmeissl et al, DNA Cell Biol 347 - 353 (1990)), внеклеточный домен был присоединен к сайту BamHI, в естественных условиях расположенному в КДНК ζ и η в подобной позиции - на несколько остатков впереди домена, пересекающего мембрану (последовательности №№ 1, 3, 4, и 6). Для получения белков, слитых с γ , сайт BamHI вставляли в последовательность приблизительно в том же месте (Фиг. 1, последовательности № 2 и № 5). Слитые гены вводили в экспрессионные плазмиды вируса осповакцины с геном gpt E coli в качестве селектируемого маркера и вставляли в геном штамма WR осповакцины путем гомологичной рекомбинации и селекции по росту в микрофенольной кислоте (Falkner et al, J Virol 62 1849 - 1854 (1988), Bayle et al, Gene 85 123 - 128 (1988)). Проточный цитометрический анализ показал, что рекомбинанты осповакцины вызывают обильную выработку слитых белков CD4 ζ и CD4 γ на поверхности клеток, а экспрессия CD4 η происходит значительно слабее (фиг. 1B). Последнее наблюдение подкреплено недавним сообщением о том, что трансфекция линии мышиных гибридных клеток плазмидами экспрессии КДНК η дает гораздо менее сильную экспрессию, чем трансфекция сравнимыми плазмидами экспрессии ζ (Clayton et al, J Exp Med 172 1243 - 1253 (1990)). Иммунопреципитация клеток, зараженных рекомбинантами осповакцины, показала, что слитые белки образуют ковалентные димеры, в отличие от антигена CD4 в естественном виде. Были определены молекулярные массы мономерных слитых белков CD4 ζ и CD4 γ и нативного CD4 63, 55 и 53 килодальтонов, соответственно. Большие массы слитых белков приблизительно соответствуют большим длинам внутриклеточной части, которая длиннее, чем у нативного CD4, на 75 (CD4 ζ) или на 5 (CD4 γ) остатков.

Пример III

Химеры CD4 могут соединяться с цепями других рецепторов

Экспрессии рецептора Fc γ RIII (CD16_{TM}) макрофагов/естественных клеток-киллеров человека на поверхности трансфектантов способствует сопутствующая трансфекция мышиными (Kurosaki et al, Nature 342 805 - 807 (1989)) или человеческими (Hibbs et al, Science 246 1608 - 1611 (1989)) γ , а также ζ человека (Lanier et al, Nature 342 803 - 805 (1989)).

Этим сообщениям не противоречит то обстоятельство, что экспрессия химер также способствует экспрессии CD16_{TM} при одновременной трансфекции клеток-мишеней или одновременном заражении рекомбинантными вирусами осповакцины (фиг. 2). Дзета более выражено, чем гамма, способствовала поверхностной экспрессии CD16_{TM} в исследуемой клеточной линии (Фиг. 2), а

нативный CD4 не усиливал поверхностную экспрессию CD16_{TM}.

Пример IV

Аспарагиновые мутанты ζ не соединяются с Fc-рецептором

Для получения химер, которые не соединяются с существующим антигеном, или рецептором Fc, были приготовлены мутантные слитые белки ζ , в которых отсутствовал либо внутримембранный остаток Asp, либо внутримембранный остаток Cys, либо оба эти остатка. Проточная цитометрия показала, что интенсивность экспрессии на поверхности клеток для различных мутантных химер заметно не отличалась от экспрессии свободного от мутаций предшественника, а эксперименты по иммунопреципитации показали, что общая экспрессия химер сходна. Как и ожидалось, мутантные химеры, в которых отсутствовал трансмембранный цистеиновый остаток, не образовывали димеров с дисульфидными связями. Две мутантные химеры, в которых отсутствовал Asp, были неспособны обеспечить поверхностную экспрессию CD16_{TM}, а мономерные химеры без Cys, но с Asp, допускали одновременную экспрессию CD16_{TM}, но не такую эффективную, как родительский димер (фиг. 3).

Пример V

Мутантные рецепторы сохраняют способность вызывать кальциевый ответ

Чтобы определить, приводит ли перекрестное связывание слитых белков к накоплению свободного кальция в клетке, которое происходит в случае T-клеточного антигенного рецептора, линию клеток T-клеточного лейкоза человека, Jurkat E6 (ATCC Accession Number TIB 152, American Type Culture Collection (Американская коллекция типовых культур), Rockville, MD), заразили рекомбинантами осповакцины и измеряли относительную концентрацию кальция в цитоплазме после перекрестного связывания внеклеточного домена с антителами. Клетки нагрузили чувствительным к кальцию красителем Индо-1 и провели проточный цитометрический анализ (Gryniewicz et al, J Biol Chem 260 3340 - 3450 (1985), Rabinovitch et al, J Immunol 137 952 - 961 (1986)). На фиг. 4A-D представлены результаты измерений переноса кальция в клетках, зараженных CD4 ζ и мутантами ζ Asp и Cys. Перекрестное связывание химер с хорошей воспроизводимостью давало повышение внутриклеточной концентрации кальция. CD4 η и CD4 γ также вызвали накопление кальция внутри зараженных клеток. Клетки Jurkat слабо экспрессируют CD4 на поверхности, но перекрестное связывание нативного CD4 в присутствии CD16 ζ или в его отсутствие не влияет на уровень внутриклеточного кальция (фиг. 4A-B).

Пример VI

Химеры CD4 ζ , η и γ опосредствуют лизис мишеней, экспрессирующих gp120/41 ВИЧ

Чтобы определить, способны ли химерные рецепторы запускать эффекторные цитолитические программы, создали модель системы мишень-эффектор, основанной на распознавании рецептором CD4 комплекса gp120/41 оболочки ВИЧ. Клетки HeLa заразили рекомбинантными вирусами осповакцины, экспрессирующими

gp120/41 (Chakrabarti et al., *Nature* 30 535 - 537 (1986), Earl et al., *J Virol* 64 2448 - 2451 (1990)), и пометили ^{51}Cr меченые клетки выдержали с клетками линии аллогенных (CD8^+ , CD4) цитотоксических Т-лимфоцитов человека, зараженными рекомбинантами осповакцины, экспрессирующими химеры $\text{CD4}\zeta$, $\text{CD4}\eta$ или $\text{CD4}\gamma$ или химеру с двойной мутацией $\text{CD4Cys11Gly Asp15Gly}$. На фиг. 5A-C показано, что клетки HeLa, экспрессирующие gp120/41, подверглись специфическому лизису со стороны цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих химеры CD4 . Незараженные клетки HeLa не подверглись воздействию цитотоксических Т-лимфоцитов, вооруженных химерами CD4 , а клетки HeLa, экспрессирующие gp120/41, не были распознаны незараженными цитотоксическими Т-лимфоцитами. Чтобы сравнить эффективность действия различных химер, к отношениям эффектор мишень были сделаны поправки на долю цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих химеры CD4 , и на долю клеток HeLa, экспрессирующих gp120/41, определенные при помощи проточной цитометрии. На фиг. 5C проиллюстрирован цитометрический анализ экспрессии CD4 цитотоксическими Т-лимфоцитами, использованными в эксперименте по цитолизу, проиллюстрированном на фиг. 5A и 5B. Хотя средняя плотность поверхностной $\text{CD4}\zeta$ значительно превышала среднюю плотность поверхностной $\text{CD4}\eta$, цитолитическая активность клеток, экспрессирующих эти формы, была одинаковой. С учетом поправки на долю мишеней, экспрессирующих gp120, эффективность цитолиза, опосредованного белками $\text{CD4}\zeta$ и $\text{CD4}\eta$, сравнима с лучшими результатами, отмеченными для пар мишень эффектор со специфическим участием Т-клеточного рецептора (среднее отношение эффектор мишень для 50% высвобождения Т-клетками, экспрессирующими $\text{CD4}\zeta$, составило $1,9 \pm 0,99$, $n=10$). Слитый белок $\text{CD4}\gamma$ был менее активным, как и слитый белок $\text{CD4}\zeta$, в котором отсутствовали трансмембранные остатки Cys и Asp. Однако, в обоих этих случаях наблюдался достаточно эффективный цитолиз (фиг. 5B - 5C).

Для исключения возможности того, что заражение осповакциной способствует ложному распознаванию мишеней цитотоксическими Т-лимфоцитами, подобные цитолитические эксперименты были проведены в таких условиях, клетки-мишени были заражены рекомбинантами осповакцины, экспрессирующими фосфатидилинозит-связанную форму CD16 (CD16_{PI}), и помечены ^{51}Cr , а цитотоксические Т-лимфоциты были заражены контрольными рекомбинантами, экспрессирующими либо CD16_{PI} , либо $\text{CD16}\zeta$. На фиг. 6A показано, что Т-клетки, экспрессирующие химеры без CD4 , не распознают нативные клетки HeLa или клетки HeLa, экспрессирующие gp120/41, и что Т-клетки, экспрессирующие химеры CD4 , не распознают клетки HeLa, экспрессирующие другие поверхностные белки, закодированные в вирусах осповакцины. Кроме того, цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие нехимерные CD4 , не осуществляют в значительной степени лизис клеток HeLa, экспрессирующих gp120/41 (фиг. 6A).

Пример VII

Клетки-носители молекул II класса главного комплекса гистосовместимости не подвергаются воздействию химер.

Считается, что CD4 взаимодействует с непостоянной последовательностью, экспрессируемой антигеном II класса главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) (Gay et al., *Nature* 328 626 - 629 (1987), Sleckman et al., *Nature* 328 351 - 353 (1987)). Хотя специфическое взаимодействие между CD4 и антигеном класса II в очищенном виде никогда не наблюдалось, при определенных условиях можно продемонстрировать склеивание клеток, экспрессирующих CD4 , с клетками, экспрессирующими молекулы класса II (Doyle et al., *Nature* 330 256 - 259 (1987), Clayton et al., *J Exp Med* 172 1243 - 1253 (1990), Lamarre et al., *Science* 245 743 - 746 (1989)). Затем проверили, возможно ли уничтожение клеток-носителей молекул класса II. На фиг. 6B видно, что $\text{CD4}\zeta$ не осуществляет специфического лизиса клеток В-клеточной линии Raji, в изобилии экспрессирующих антиген класса II. Хотя наблюдается умеренный лизис ($\approx 5\%$), RJ2.5 - мутант Raji, отрицательный по классу II (Accolla, *J Exp Med* 157 1053 - 1058 (1983)), - проявляет подобную восприимчивость, как и клетки Raji, выдержанные с незараженными Т-клетками.

Пример VIII

Требования к структуре цепи дзета Т-клеточного антигена/FC-рецептора, вызывающей цитолиз.

Хотя химеры CD4 и ζ сообщают цитотоксическим Т-лимфоцитам способность убивать клетки-мишени, экспрессирующие gp120 ВИЧ, нужно было найти альтернативу CD4 , чтобы недвусмысленно сравнить свойства химер дзета, вводимых в Т-клеточные линии человека. Такие линии могут экспрессировать CD4 , затрудняя точное определение соотношения между характером или степенью мобилизации кальция и цитотоксическим потенциалом различных химер. Поэтому были созданы химеры из ζ и CD16 , в которых внеклеточный домен CD16 присоединяется к трансмембранной и внутриклеточной последовательностям ζ (фиг. 7A). Слитые гены вводились в экспрессионную плазмиду вируса осповакцины, снабженную геном *gpt* *E. coli* в качестве селектируемого маркера, и вставлялись в геном штамма WVR осповакцины путем гомологичной рекомбинации и селекции по росту в микрофенольной кислоте (Falkner and Moss, *J Virol* 2 1849 (1988), Boyle and Coupar, *Gene* 65 123 (1988)).

Т-клеточные линии были заражены рекомбинантами осповакцины и после перекрестного связывания внеклеточных доменов с антителами была измерена относительная концентрация свободных ионов кальция в цитоплазме. Клетки, меченные красителем Индо-1, подвергли и спектрофлуориметрии (всю популяцию), и проточной цитометрии (отдельные клетки) (Gryniewicz et al., *J Biol Chem* 260 3440 (1985)), Rabinovitch et al., *J Immunol* 137 952 (1986)). На фиг. 7B проиллюстрирован анализ данных, полученных для линии Jurkat клеток Т-клеточного лейкоза человека, зараженных рекомбинантами осповакцины, экспрес-

сирующими слитый белок CD16 ζ . Перекрестное связывание химер с хорошей воспроизводимостью повышало внутриклеточную концентрацию кальция, тогда как аналогичная обработка клеток, экспрессирующих нехимерные CD16, не давала эффекта или давала незначительный эффект. Когда химера экспрессировалась в мутантных клеточных линиях, в которых отсутствовал антигенный рецептор, например, в REX33A (Breitmeyer et al, J Immunol 138 726 (1987), Sancho et al, J Biol Chem 264 20760 (1989)) или в Jurkat JRT3 T3.5 (Weiss et al, J Immunol 135 123 (1984)), наблюдался сильный ответ на перекрестное связывание антителами CD16. Подобные результаты были получены для мутантной линии REX20A (Breitmeyer et al, там же (1987), Blumberg et al, J Biol Chem 265 14036 (1990)) и для мутантной линии клеток Jurkat, отрицательной по CD3/Ti, полученной в нашей лаборатории. Заражение рекомбинантами, экспрессирующими CD16 ζ , не восстанавливает ответ на антитела против CD3, следовательно, слитый белок действует не за счет спасения внутриклеточных цепей комплекса CD3.

Для оценки способности химер управлять клеточным иммунитетом цитотоксические Т-лимфоциты были заражены рекомбинантами осповакцины, экспрессирующими химеры CD16, и использованы для специфического лизиса гибридных клеток, экспрессирующих связанные с мембраной антитела к CD16. Эта реакция представляет собой расширение реакции цитотоксичности для гибридом, первоначально разработанной для анализа эффекторных механизмов клеток-носителей рецепторов Fc (Graziano and Fanger, J Immunol 138 945, 1987, Graziano and Fanger, J Immunol 139 35 - 36, 1987, Shen et al, Mol Immunol 26 959, 1989, Fanger et al, Immunol Today 10 92, 1989). Фиг. 8В показывает, что экспрессия CD16 ζ в цитотоксических Т-лимфоцитах позволяет "вооруженным" лимфоцитам уничтожать гибридные клетки 3G8 (анти-CD16, Fleit et al, Proc Natl Acad Sci USA 79 3275, 1982), а цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие фосфатидилинозит-связанную форму CD16, остаются неактивными. Цитотоксические Т-лимфоциты, вооруженные CD16 ζ , также не уничтожают гибридные клетки, экспрессирующие антитела к другим антигенам.

Чтобы определить минимальную последовательность ζ , необходимую для цитолиза, приготовили ряд делеционных мутантов, в которых от карбоксильного конца (фиг. 8А) отнимали все большие участки внутриклеточного домена ζ (последовательность № 44). Можно удалить большую часть внутриклеточного домена ζ без значительных последствий для цитотоксического потенциала, химера CD16 полной длины была настолько же активной, насколько химера, усеченная до остатка 65 - CD16 ζ Asp66* (фиг. 8В). Существенное ослабление цитотоксичности наблюдалось при укорочении ζ до остатка 59 (химера CD0016 ζ Glu60*), дальнейшее усечение до остатка 50 ослабило активность еще немного.

Однако полной потери активности не произошло, даже когда внутриклеточный домен усе-

ли вплоть до трансмембранного "якоря", состоящего из трех остатков (фиг. 8В).

Поскольку ζ - это димер с дисульфидной связью, одна из причин сохранения цитолитической активности состоит в том, что эндогенные ζ образуют гетеродимеры с урезанными последовательностями ζ , тем самым восстанавливая их активность. Для проверки этого предположения остатки 11 и 15 в последовательности ζ (Asp и Cys, соответственно) заменили на Gly (Cys11Gly/Asp15Gly) и провели иммунопреципитацию следующим образом. Приблизительно 2×10^6 клеток CV1 инфицировали в течение одного часа в бессывороточной среде Игга, модифицированной по способу Дульбекко (DME), рекомбинантами осповакцины с множественностью заражения не менее десяти. Через шесть - восемь часов после заражения клетки отобрали из чашек фосфатно-солевым буфером/1мМ этилендиаминтетрауксусной кислотой и пометили их поверхность ^{125}I 0,2мКи на 2×10^6 клеток по способу Кларка и Эйнфельда (Clark, Einfeld) с использованием лактопероксидазы и H_2O_2 (Leukocyte Typing II, pp 155 - 167, Springer-Verlag, NY, 1986). Меченые клетки собрали посредством центрифугирования и подвергли лизису в 1% NP-40, 0,1% додецилсульфате натрия, 0,15М NaCl, 0,05М трис, pH 8,0, 5мМ MgCl_2 , 5мМ KCl, 0,2М иодацетамиде и 1мМ фенолметилсульфонилфториде. Ядра отобрали посредством центрифугирования и провели реакции иммунопреципитации белка CD16 при помощи антител 3G8 (Fleit et al, см. выше, 1982, Medarex) и агарозы с мышинным анти-IgG (Cappel, Durham, NC). Образцы подвергли электрофорезу в 8% геле из полиакриламида/додецилсульфата натрия в невозстанавливающих условиях или в 10% геле в восстанавливающих условиях. Эти реакции иммунопреципитации подтвердили, что химера CD16 ζ Cys11Gly/Asp15Gly не образует димерных структур с дисульфидной связью.

Проверялась также цитолитическая активность мутантных рецепторов. Мутантная химера, усеченная до остатка 65 (CD16 ζ Cys11Gly/Asp15Gly/Asp66*) была, в зависимости от условий эксперимента, в 2 - 8 раз менее активной цитолитически, чем сравнимая химера без мутаций (CD16 ζ Asp66*), которая обычно также активна, как CD16 ζ , или в 1 - 2 раза менее активна (фиг. 9В). Снижение активности мутантных химер сравнимо со снижением активности химер CD4 аналогичной структуры (см. выше) и, скорее всего, объясняется тем, что мономеры ζ действуют менее эффективно, чем димеры. Химера с мутациями Asp и Cys, усеченная до остатка 59, вообще не проявляла цитолитической активности (фиг. 9В), что служит подтверждением гипотезы о том, что именно связь с другими цепями, опосредствованная трансмембранными остатками Cys и/или Asp, была причиной неустойчивой цитолитической активности при делециях, расположенных ближе к аминоконцу, чем остаток 65.

Проточный цитометрический анализ показал, что делеционные мутанты, в которых недостает трансмембранных остатков Asp и Cys, все же способствуют увеличению внутриклеточной концен-

трации свободных ионов кальция в ответ на перекрестное связывание с антителами в мутантной (без Т-клеточных рецепторов) клеточной линии Jurkat (фиг. 9D). Подобные результаты были получены для химер, экспрессированных родительской линией Jurkat. В случае CD16 ζ Cys11Gly/Asp15Gly/Glu60* эти результаты говорят о том, что способность опосредствовать кальциевую чувствительность можно при помощи мутации отделить от способности обеспечивать цитоллиз.

Чтобы полностью исключить возможность участия трансмембранных остатков ζ , трансмембранные остатки и 17 первых цитоплазматических остатков ζ заменили последовательностями, кодирующими трансмембранные остатки и первые 14 или 17 цитоплазматических остатков антигенов CD5 или CD7, соответственно (фиг. 9A). Полученные трехчастные слитые белки CD16 5 ζ (48 - 65) и CD16 7 ζ (48 - 65) не образовывали димеров с дисульфидными связями, в отличие от более простых химер CD16 ζ , так как не имели остатка цистеина в трансмембранном домене ζ . Обе трехчастные химеры были способны мобилизовать кальций в клетках Jurkat и в клетках Jurkat без Т-клеточных рецепторов (фиг. 9D) и вызывать цитолитический ответ в цитотоксических Т-лимфоцитах (фиг. 9C и не представленные данные). Однако, отсечение части ζ до остатка 59 в химере CD16 7 ζ (48 - 59) лишает трехчастный слитый белок способности управлять чувствительностью кальция в клетках Jurkat (с Т-клеточными рецепторами или без них) или цитолитической активностью в зрелых цитотоксических Т-лимфоцитах (фиг. 9C и 9D и не представленные данные).

Для изучения роли отдельных остатков в активности цепи из 18 остатков мы подготовили несколько мутантных вариантов путем сайто-направленного мутагенеза и оценили их способность опосредствовать направляемое рецептором уничтожение в условиях слабой (фиг. 10A и 10D) или сильной экспрессии (фиг. 10B и 10E) химерного рецептора. На фиг. 10A - F видно, что хотя ряд относительно консервативных замен (например, замещений кислотных остатков родственными им амидами или тирозина фенилаланином) на участке между остатками 59 - 63 привел к умеренному ослаблению цитолитической активности, варианты в целом сохранили способность мобилизовать кальций. Однако, в совокупности эти остатки представляют собой важный участок, так как их делеция приводит к потере цитолитической активности. Замена Tyr 62 на Phe или Ser приводила и к потере цитолитической активности, и к утрате кальциевой чувствительности. На аминоконце сегмента из 18 остатков замена Tyr 51 на Phe делала невозможной как мобилизацию кальция, так и цитолитическую активность, а замена Leu в позиции 50 на Ser делала невозможной мобилизацию кальция и лишь частично ослабляла цитолитическую способность. Не ограничивая себя рамками определенной гипотезы, мы предполагаем, что неспособность мутанта Leu50Ser мобилизовать кальций в коротких проточных цитометрических анализах не полностью отражает его

способность к опосредствованию значительного повышения внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция в течение более длительного времени, которое затрачивается на цитолитический анализ. Однако, в некоторых линиях цитолитических Т-клеток наблюдалась нечувствительная к кальцию цитолитическая активность, и мы не исключаем возможности, что подобное явление обусловило полученный результат. Замена Asn48 на Ser частично ослабила цитотоксичность в нескольких экспериментах и не дала значительного эффекта в остальных.

Для изучения потенциальной роли избыточных элементов последовательности ζ внутриклеточный домен ζ был разбит на три сегмента: остатки 33 - 65, 71 - 104 и 104 - 138. Каждый из этих сегментов присоединяли к химере CD16 CD7 при помощи сайта MluI, вводимого у дистального конца последовательности мембранного якоря внутриклеточного домена CD7 (см. ниже, фиг. 11A). Сравнение цитолитической активности трех элементов показало, что их активность практически одинакова (фиг. 11B). Сравнение последовательностей (фиг. 11A) показывает, что во втором отрезке между тирозинами находится одиннадцать остатков, а в первом и третьем - по десять.

Хотя точное объяснение процесса активации Т-клеток не найдено, ясно, что агрегация антигенных рецепторов, или химерных рецепторов, включающих в себя внутриклеточные последовательности ζ , инициирует мобилизацию кальция, высвобождение цитокинов и гранул и появление на поверхности клеток маркеров активации. При опосредствовании активации клетки активный сайт ζ , короткая линейная пептидная последовательность, скорее всего, слишком маленькая для того, чтобы обладать собственной ферментной активностью, вероятно, взаимодействует с одним или, самое большое, с несколькими белками. Ясно также, что мобилизации свободного кальция как таковой недостаточно для активации клетки, поскольку способность к опосредствованию цитолиза можно при помощи мутации отделить от способности к опосредствованию накопления кальция.

Как показано в настоящем документе, добавление 18 остатков из внутриклеточного домена ζ к трансмембранному и внутриклеточному домену двух других белков приводит к созданию химер, способных направлять цитолитическую активность против клеток-мишеней, которые связываются с внеклеточной частью слитых белков. Хотя химеры, имеющие в своем составе отрезок из 18 остатков, приблизительно в восемь раз менее активны, чем химеры, содержащие ζ целиком, уменьшение активности можно приписать потере трансмембранных взаимодействий, за счет которых обычно ζ дикого типа образует димеры с дисульфидной связью. То есть, делеционные конструкции с ζ , имеющие тот же карбоксильный конец, что и отрезок, и не имеющие трансмембранных остатков Cys и Asp, обычно проявляют несколько меньшую активность, чем химеры, содержащие только отрезок из 18 остатков.

В элементе, обеспечивающем цитолитическую компетентность, на котором мы сосредото-

чились, содержится два тирозина и не содержится ни серии, ни треонин, которые ограничивают возможный вклад фосфорилирования в активность. Мутация любого из тирозинов приводит к утрате активности, и хотя предварительные эксперименты не указывают на существенное фосфорилирование тирозина после перекрестного связывания химерных поверхностных антигенов, содержащих участок из 18 остатков, нельзя исключить возможность участия такого фосфорилирования на низком уровне. В дополнение к эффектам, отмеченным для двух тирозиновых остатков, ряд замен аминокислот на карбоксильном конце и аминоконце отрезка ослабляют активность в условиях низкой плотности рецепторов.

Последовательности, подобные активному отрезку ζ , встречаются в цитоплазматических доменах некоторых других трансмембранных белков, в том числе, в молекулах δ и γ CD3, в белках mbl и B29, связанных с поверхностным IgM, в цепях β и γ высокоаффинного рецептора IgE, Fc ϵ R1 (Reth, Nature 338 383, 1989). Хотя функция этих последовательностей точно не установлена, в случае эффективной экспрессии любая из них способна самостоятельно активировать Т-клетку, и это может быть причиной остаточной чувствительности Т-клеточных рецепторов, наблюдаемой в ζ -отрицательной мутантной клеточной линии (Sussman et al., Cell 52 85, 1988).

Сама последовательность ζ включает в себя три таких последовательности, приблизительно одинаковой длины, и грубое разбиение внутриклеточного домена на три части показывает, что каждая способна инициировать цитолитический ответ. В последовательности η , сплайсинговой изоформе ζ (Jin et al., см. выше, 1990, Clayton et al., Proc Natl Acad Sci USA 88 5202, 1991), отсутствует карбоксильная половина третьего отрезка. Поскольку удаление карбоксильной половины первого отрезка приводит к утрате активности, кажется вероятным, что биологическая активность η определяется в основном первыми двумя отрезками. Хотя при различных способах измерения η также активно, как ζ , способствует антигензависимой выработке цитокинов (Bauer et al., Proc Natl Acad Sci USA 88 3842, 1991) или нацеливанию цитолита (см. выше), η не фосфорилируется в ответ на стимуляцию рецептора (Bauer et al., см. выше, 1991). Таким образом, либо для фосфорилирования требуется присутствие всех трех отрезков, либо третий отрезок служит излюбленным субстратом для неизвестной тирозин киназы.

Пример IX

Передача цитолитического сигнала Fc-рецептором человека. Для оценки действия различных подтипов рецептора Fc человека были созданы химерные молекулы, в которых внеклеточный домен антигенов CD4, CD5 или CD16 человека присоединялся к трансмембранным и внутриклеточным доменам подтипов FcR1 γ A, B1, B2 и C (номенклатура авторов Ravetch and Kinet, Ann Rev Immunol 9 457, 1991). Говоря точнее, последовательности кДНК, соответствующие трансмембранным и цитоплазматическим доменам ранее описанных изоформ FcR1A, B1 и B2, были амплифицированы из уже существующего

клона PC23 или из библиотеки кДНК миндалин человека (составленной стандартными способами) с использованием следующих олигонуклеотидных затравок

CCC GGA TCC CAG CAT GGG CAG CTC TT (последовательность № 18, FcR1I A прямая),

CGC GGG GCG GCC GCT TTA GTT ATT ACT GTT GAG ATG GTC GTT (последовательность № 19, FcR1I A обратная),

GCG GGG GGA TCC CAC TGT CCA AGC TCC CAG CTC TTC ACC G (последовательность № 20, FcR1I B1 и FcR1I B2 прямые),

GCG GGG GCG GCC GCC TAA ATA CGG TTC TGG TC (последовательность № 21, FcR1I B1 и FcR1I B2 обратные).

Эти затравки содержали сайты расщепления для ферментов BamHI и NotI, соответственно, отстоящие на 6 остатков от конца 5'. Сразу же за сайтом NotI следовал антисмысловой стоп-кодон, либо CTA, либо TTA. Все затравки состояли из 18 или более остатков, комплементарных концам 5' или 3' нужных фрагментов. Фрагмент кДНК, соответствующий цитоплазматическому домену FcR1 γ C, который отличается от изоформы IIA только одним аминокислотным остатком (L или P в позиции 268), был получен при помощи сайто-направленного мутагенеза путем цепной полимеразной реакции с перекрыванием, с использованием таких затравок

TCA GAA AGA GAC AAC CTG AAG AAA CCA ACA A (последовательность № 22) и

TTG TTG GTT TCT TCA GGT TGT GTC TTT CTG A (последовательность № 23).

Фрагменты - продукты реакции были вставлены в векторы экспрессии на основе вируса осповакцины, содержащие внеклеточные домены CD16 или CD4, соответственно, а затем - в вирусы осповакцины дикого типа путем рекомбинации в локусе тимидин киназы, с отбором для одновременного встраивания гена *gpt* E coli, облегчающей идентификацию нужных рекомбинантов. Подлинность всех изоформ (фиг. 12) была подтверждена дидеокси методом установления первичной структуры ДНК.

Получение белков химерных рецепторов было подтверждено экспериментами по иммунопреципитации. Приблизительно 10 клеток JRT3 T3 5 инфицировали в течение одного часа в бессывороточной среде IMDM, рекомбинантами осповакцины со множественностью заражения не менее 10. Через 12 часов после заражения клетки собрали и поместили их поверхность 125 I, 0,5 мКи на 10 клеток, по способу Кларка и Эйфельда - с использованием лактопероксидазы/глюкозооксидазы (Clark and Einfeld, см. выше). Меченые клетки собрали посредством центрифугирования и подвергли лизису в 1% NP-40, 0,1 мМ MgCl $_2$, 5 мМ KCl, 0,02 мМ иодацетамиде и 1 мМ фенолметилсульфонилфториде. Ядра отобрали посредством центрифугирования и провели иммунопреципитацию слитых белков CD16 с помощью антител 4G8 и агарозы с мышинным анти-IgG. Образцы подвергли электрофорезу в восстанавливающих условиях. Все молекулы преципитированных химерных рецепторов имели ожидаемую молекулярную массу.

Для проверки способности химерных рецепто-

ров к опосредствованию роста внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция мутантную (без Т-клеточных рецепторов) линию клеток Jurkat - линию JRT3 T3 5 заразили рекомбинантными вирусами (как описано в настоящем документе) и измеряли концентрацию свободного кальция в цитоплазме клеток (как описано в настоящем документе) после перекрестного связывания внеклеточных доменов рецепторов моноклональным антителом 3G8 или Leu-3A (как описано в настоящем документе) Эти эксперименты показали, что внутриклеточные домены FcR γ A и C способны опосредствовать рост концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме после перекрестного связывания внеклеточных доменов, а внутриклеточные домены FcR γ B1 и B2 в подобных условиях остаются неактивными (фиг. 13A и 13B) Гибриды FcR γ A с CD4, CD5 и CD16 проявляли в основном одинаковую способность к возбуждению кальциевого ответа (фиг. 13A - B) Другие клеточные линии, полученные как из моноцитов, так и из лимфоцитов, были способны отвечать на сигнал, подаваемый при перекрестном связывании внеклеточных доменов

Для исследования участия внутриклеточных доменов различных форм FcR γ в цитолизе цитотоксические Т-лимфоциты человека были заражены рекомбинантами осповакцины, экспрессирующими химеры CD16 FcR γ A, B1, B2 и C Зараженные клетки культивировали совместно с гибридными клетками, нагруженными ^{51}Cr (т.е., клетками 3G8 10 - 2) и экспрессирующими поверхностные антигены к GDI 6 В этом эксперименте цитотоксические Т-лимфоциты с химерами CD16 уничтожали гибридные клетки-мишени (тем самым способствуя высвобождению ^{51}Cr), если внеклеточный домен CD16 химеры был присоединен ко внутриклеточному сегменту, способному активировать эффекторную программу лимфоцита, этот эксперимент подробно описан ниже На фиг. 14A видно, что цитотоксические Т-лимфоциты, вооруженные CD16 FcR γ A или C, но не FcR γ B1 или B2, способны осуществить лизис клеток-мишеней, экспрессирующих поверхностные антигены к CD16

Чтобы исключить возможность того, что специфический цитолиз в какой-то мере объясняется взаимодействием с группой CD16, мы провели цитолитические эксперименты, в которых внутриклеточные домены FcR γ были соединены с внеклеточным доменом CD4 В этом случае мишенями служили клетки HeLa, экспрессирующие белки оболочки ВИЧ gp120/41 (а именно, клетки HeLa, зараженные вектором осповакцины VPE16 (из СПИД-хранилища Национального института по изучению аллергических и инфекционных заболеваний - National Institute of Allergy and Infectious Disease AIDS Depository, Bethesda, MD) Как и в системе CD16, клетки-мишени, экспрессирующие оболочку ВИЧ, были восприимчивы к лизису со стороны Т-клеток, экспрессирующих химеру CD4 FcR γ A, но не FcR γ B1 или B2 (фиг. 14B)

Внутриклеточные домены FcR γ A и C не обладают значительной гомологией последовательностей с какими-либо другими белками, в том чис-

ле и с членами общего семейства FcR γ /TCR ζ Для выделения элементов последовательности, вызывающих цитолиз, были приготовлены 5'- и 3'-концевые делеции последовательностей, кодирующих внутриклеточный домен (описанные ниже и представленные на фиг. 15A), которые были испытаны на эффективность мобилизации кальция и цитолитическую активность (как описано в настоящем документе) В экспериментах, в которых удалялась аминоконечная часть внутриклеточного домена, трансмембранный домен FcR γ заменяли на трансмембранный домен чужеродного антигена CD7 - для исключения возможного влияния взаимодействий, опосредствованных трансмембранным доменом

На фиг. 15B и 15C показано, что удаление 14 остатков с карбоксильного конца, в числе которых тирозин 298, приводит к полной потере цитолитической активности и к значительному снижению потенциала мобилизации кальция Дальнейшее усеечение - вплоть до тирозина 282 - дало такой же фенотип (фиг. 15B и 15C) Усеечение внутриклеточного домена со стороны N-конца до остатка 268 не повлияло в значительной мере ни на профиль кальция, ни на цитолитическую активность, а делеция до остатка 275 заметно ослабила высвобождение кальция, но не оказала значительного влияния на цитолиз (фиг. 15D и 15E) Дальнейшее усеечение, до остатка 282, дало хвосты FcR γ , не способные ни к мобилизации кальция, ни к обеспечению цитолиза (фиг. 15D и 15E) "Активный элемент", выявленный при помощи этих грубых мер, оказался относительно большим (36 аминокислот) Он содержит два тирозина, разделенных 16 остатками

Пример X

Направленный цитолиз, осуществляемый лимфоцитами с химерными рецепторами CD4, не способствующими дальнейшему заражению

Как сказано выше, существует возможность построения эффекторных молекул, направляющих цитолитическую активность цитотоксических Т-лимфоцитов и делающих ее независимой от главного комплекса гистосовместимости Например, химера, состоящая из внеклеточного домена CD4, слитого с цепью ζ в клоне цитотоксических Т-лимфоцитов человека WH3, специфически уничтожает клетки-мишени, на поверхности которых проявляется тикопротейн оболочки ВИЧ-1, gp120 Поскольку внеклеточный домен молекулы CD4 сообщает клетке восприимчивость к ВИЧ, вооруженные цитотоксические Т-лимфоциты могут стать мишенями для вируса, что снижает их эффективность (Dalglish et al., Nature 312 787 (1984), Klatzmann et al., Nature 312 767 (1984)) Чтобы этого не случилось, на основе CD4 были разработаны химерные эффекторные молекулы, которые специфически связываются с ВИЧ-инфицированными клетками для их уничтожения, но не сообщают своей клетке восприимчивости к ВИЧ

Был создан трехчастный слитый белок - посредством генного соположения внеклеточного домена CD4 (фиг. 23) и центрального, второго и третьего константных доменов тяжелой цепи IgG1 человека (Zettlmeissl et al., DNA Cell Biol 9 347

(1990)) (фиг 25), которые в этом случае присоединялись к части первого трансмембранного экзона IgG1 человека, связанного с мембраной, за которым следовала часть антигена человека CD7, содержащая последовательности, расположенные в CD7 между единственным Ig-подобным доменом и последовательностью остановки переноса, расположенной за трансмембранным доменом (Aruffo and Seed, EMBO J 3313 (1987)) (фиг 26) Первичная последовательность аминокислот внеклеточной группы сегмента CD7 включала богатый пролином участок, стоящий торчком и отодвигающий Ig-подобный домен от поверхности клетки (Aruffo and Seed EMBO J 6 3313 (1987)) (фиг 26) Были приготовлены рекомбинантные вирусы осповакцины для экспрессии этой и родственных химер (как описано в настоящем документе) В частности, рекомбинантные вирусы осповакцины были получены путем гомологичной рекомбинации в клетках CV-1 Перед приготовлением высокие титры каждого штамма в клетках CV-1 для каждого штамма выполняли не менее двух циклов визуализации бляшек при помощи ОКТ4 или LeuSA с последующей очисткой бляшек

Трехчастная химера CD4(D1 - D4) Ig CD7 (фиг 20, молекула "A") эффективно экспрессировалась на поверхности клеток и была испытана на способность выступать в качестве рецептора ВИЧ - в ходе эксперимента по образованию синцитиев на основе осповакцины (Lifson et al, Nature 33 725 (1986), Ashorn et al, J Virol 64 2149 (1990)) Клетки HeLa, зараженные рекомбинантным вирусом осповакцины (vPE16), кодирующим гликопротеин оболочки ВИЧ-1 (Earl et al, J Virol 64 2448 (1990)) культивировали совместно с клетками HeLa, зараженными либо CD4, CD4 ζ , либо CD4(D1 - D4) Ig CD7 Шестисантиметровые чашки с клетками HeLa (ATCC, Rockville, MD - Американская коллекция типовых культур) при 50% слиянии инфицировали в течение 1 часа в бессывороточной среде с приблизительноной множественностью заражения 10 Клетки выдержали еще 5 - 6 часов в полной среде, затем отобрали в фосфатно-солевой буфер, содержащий 1мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту Клетки, экспрессирующие оболочку и химеру CD4, смешали в соотношении 1:1 и посеяли в 6-сантиметровые чашки с полной средой Синцитии подсчитали и сфотографировали через 6 - 8 часов совместного культивирования

Совместное культивирование CD4 и vPE16 привело к образованию легко обнаружимых гигантских многоядерных клеток Кроме того, химера, состоящая из внеклеточного домена CD4, слитого с цепью ζ Т-клеточного рецептора (фиг 27) (CD4 ζ) оказалась способной опосредствовать образование синцитиев, а клетки, экспрессирующие CD4(D1 - D4) Ig CD7, не проявляли признаков слияния Мы испытывали также конструкцию, экспрессирующую только первый и второй домены CD4 (фиг 24), CD4(D1, D2) Ig CD7 (фиг 20, молекула "B"), поскольку в другом контексте эти два аминоконечных домена были необходимы для создания восприимчивости к ВИЧ (Landau et al, Nature 334 159 (1988)) Эта молекула также оказалась невосприимчивой к ВИЧ-

опосредствованному образованию синцитиев Эксперименты по связыванию с растворимой gp120, меченной ¹²⁵I, показали, что и CD4(D1 - D4) Ig CD7, и CD4(D1, D2) Ig CD7 сохранили аффинность к gp120

Затем мы проверили, будут ли химерные молекулы, противодействующие образованию синцитиев, способны направлять процесс уничтожения клеток, если ввести в эти молекулы группинициатор, как описано в настоящем документе Мы слили внутриклеточный домен ζ (фиг 27) с концом 3' CD4(D1 - D4) Ig CD7 и CD4(D1, D2) Ig CD7 и приготовили соответствующие рекомбинантные вирусы осповакцины Эти конструкции - CD4(D1 - D4) Ig CD7 и CD4(D1, D2) Ig CD7 ζ (фиг 20, молекулы "C" и "D") - экспрессировались в клоне WH3 цитотоксических Т-лимфоцитов человека и проверялись на способность связывать и уничтожать клетки HeLa, экспрессирующие поверхностный гликопротеин оболочки ВИЧ (способы проверки описаны в настоящем документе) На фиг 21 показано, что внутриклеточный домен ζ , слитый с CD4(D1 - D4) Ig CD7 или с CD4(D1, D2) Ig CD7, сообщает клетке способность убивать мишень, конструкции, в которых нет цепи ζ , неспособны опосредствовать такую активность CD4 ζ , положительный контрольный объект, опосредствовал несколько более сильную цитотоксичность, а CD4(D1, D2) Ig CD7 - несколько менее сильную цитотоксичность, чем CD4(D1 - D4) Ig CD7 ζ (фиг 21), Однако понятно, что обе химеры CD4(D1 - D4) Ig CD7 ζ и CD4(D1, D2) Ig CD7 ζ обладают способностью опосредствовать специфическое уничтожение клеток, экспрессирующих на поверхности белки оболочки ВИЧ В эксперименте с осповакциной четырехчастные химеры проявили стойкую неспособность к опосредствованию образования синцитиев Мы также продемонстрировали, что одного отрезка ζ , подобно представленному на фиг 11A, достаточно для сообщения химере CD4(D1 - D4) цитолитической способности

Радиоиммунопреципитационный анализ показал, что слитые молекулы - это преимущественно, если не полностью, димеры В ходе этого анализа для преципитации растворенного экстракта метаболически меченных клеток HeLa, зараженных рекомбинантами осповакцины, экспрессирующими химеры CD4(D1 - D4) Ig CD7 и CD4(D1, D2) Ig CD7 ζ , использовались шарики протеин-A агарозы Преципитированный материал разделили на фракции посредством электрофореза на полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях В частности, приблизительно 5×10^6 клеток HeLa-S3 заразили, как описано выше, vPE16 - через соответствующий штамм вируса осповакцины Клетки метаболически поместили меткой TranS-Label (ICN Radiochemicals, Irvine, CA), 200мКи/мл, выдержав 6 - 8 часов в цистеин- и метионин-дефицитной среде, и собрали в фосфатно-солевой буфер, содержащий 1мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту Затем клетки центрифугировали и подвергли лизису в 150мМ NaCl, 50мМ трис pH 7,5, 5мМ этилендиаминтетрауксусной кислоте, 0,5% NP-40, 0,1% додецилсульфата натрия, 5мМ этилендиаминтетрауксусной кислоте, 1мМ

фенилметилсульфонилфториде

После того, как были отцентрифугированы ядра, одну пятую каждого клеточного экстракта адсорбировали в течение 2 часов при 4°C в промытые шарики агарозы, конъюгированной с протеином А. Затем шарики промыли фосфатно-солевым буфером, содержащим 1% NP-40, и элюировали в буфере для образца, содержащем додецилсульфат натрия, в присутствии или в отсутствие меркапто-этанола. Результаты этих экспериментов показали, что большая часть иммунопреципитированных химер CD4(D1 - D4) Ig CD7 и CD4(D1, D2) Ig CD7 ζ при невозстанавливающих условиях мигрирует в виде димеров с ожидаемой молекулярной массой.

Чтобы непосредственно оценить способность клеток, экспрессирующих слитые молекулы с CD4, к восприятию ВИЧ-инфекции, мы провели длительное исследование заражаемости с трансфицированными клетками, экспрессирующими CD4(D1 - D4) Ig CD7 и CD4(D1, D2) Ig CD7. Стабильные трансфектанты, экспрессирующие CD4(D1 - D4) Ig CD7, CD4(D1, D2) Ig CD7 и CD4, были приготовлены в сублинии клеток 293, легко трансфицируемой линии почечных клеток зародыша человека. Химерные молекулы субклонировали в двунаправленные векторы, в которых ген В гигромицина находился под управлением промотора тимидин киназы симплексного вируса герпеса. Десятисантиметровую чашку клеток со спянием 60 - 70% трансфицировали 10мкг ДНК этой плазмиды посредством совместной преципитации с фосфатом кальция. Перед трансфекцией плазмиды привели к линейной форме на уникальном сайте SfiI, а концы выравнивали ДНК полимеразой T4. Через 24 часа после заражения клетки разделили на четыре части, а через 48 часов после заражения их подвергли селекции с гигромицином В (Sigma, St. Louis, Mo), 400мкг/мл. Каждые 3 - 4 дня клеткам добавляли свежей среды с гигромицином.

Резистентные колонии отбирали, размножали и оценивали их экспрессию посредством непрямой иммунофлуоресценции с использованием анти-IgG Fc человека, конъюгированных с флуоресцеином (Organon Teknica, West Chester, PA), или Q4120 - антител, реагирующих с CD4 человека (Sigma), с последующей проточной цитометрией (Coulter, Hialeah, FL). Для анализов отобрали по два отдельных клона каждой конструкции, уровень поверхностного CD4 в которых был сравним с уровнем в других клеточных линиях. На фиг. 22 видно, что после взаимодействия с ВИЧ p24 обнаруживался в культурах, стабильно трансфицированных CD4, уже через три дня после заражения. Появление многоядерных гигантских клеток и характерное вспучивание наблюдалось в этих культурах через пять дней после заражения. В не-трансфицированной родительской клеточной линии и ни в одном из двух отдельно приготовленных изолятов трансфектантов CD4(D1 - D4) Ig CD7 и CD4(D1, D2) Ig CD7 через 32 дня после заражения не было зарегистрировано ни присутствие p24 в значительном количестве, ни появление многоядерных гигантских клеток (фиг. 22).

После исследования заражаемости клетки подверглись анализу на поверхностную экспрес-

сию CD4. Плотность поверхностных эпитопов CD4 значительно снизилась в зараженных культурах, экспрессирующих CD4, что соответствует характеру вирусной модуляции, но не изменилась в культурах, экспрессирующих CD4(D1 - D4) Ig CD7 и CD4(D1, D2) Ig CD7. Эти эксперименты показывают, что существует возможность создавать химерные молекулы, содержащие два верхних домена CD4, которые, слившись с цепью ζ Т-клеточного рецептора, приобретают способность специфически связывать и уничтожать ВИЧ-инфицированные клетки, но не являются восприимчивыми к ВИЧ-инфекции, опосредствуемой CD4.

Дополнительные исследования позволяют предположить, что способность сопротивляться ВИЧ-инфекции объясняется пространственным расстоянием между внеклеточным доменом молекулы CD4 и двойным липидным слоем. В первом эксперименте мы сконструировали химерную молекулу с делецией "стебля" CD7 и трансмембранного домена, за счет этой делеции был устранен богатый пролином отрезок трансмембранной части CD7. Когда этот домен соединили с внеклеточным доменом CD4, он сохранил свою способность эффективно связываться с внеклеточным доменом молекулы CD4, как показало измерение поверхностной экспрессии молекулы CD4 (описанное в настоящем документе). Однако, способность сопротивляться образованию синцитиев, вызванному действием гликопротеина оболочки ВИЧ, была утрачена. Так, делеция богатого пролином участка молекулы CD7, участка, которому свойственно иметь α -спиральную структуру, значительно сократила расстояние между внеклеточным доменом CD4 и двойным липидным слоем, тем самым лишив химеру способности сопротивляться образованию синцитиев.

Во втором эксперименте мы продемонстрировали, что способностью сопротивляться образованию синцитиев, вызванному ВИЧ-инфекцией, можно наделить химеру CD4/CD5, ранее выступавшую в роли трансмембранного якоря для внеклеточного домена CD4, но неспособную сопротивляться образованию синцитиев, вызванному ВИЧ-инфекцией. В этом эксперименте центральный домен и домены CH2 и CH3 тяжелой цепи IgG1 человека были вставлены в молекулу CD4/CD5, полученная химера противодействовала образованию синцитиев, что снова позволяет предположить, что расстояния, равного длине иммуноглобулиновых доменов, достаточно для обеспечения сопротивляемости образованию синцитиев, вызванному ВИЧ-инфекцией.

В третьем эксперименте домен CD4 отодвигали на различные расстояния от клеточной мембраны при помощи синтетических α -спиралей различной длины. В частности, были разработаны синтетические олигонуклеотиды, соответствующие повторяющимся α -спиральным участкам из остатков лизина и глутаминовой кислоты, окаймленным двумя остатками аланина (первичные последовательности нуклеотидов и аминокислот приведены на фиг. 28). В ходе предшествующих исследований выяснилось, что такие аминокислотные последовательности часто встречаются в

α -спиралях, а значит, можно предположить, что такие повторяющиеся участки принимают α -спиральную структуру и что помещение таких альфа спиралей между трансмембранным доменом и внеклеточным доменом CD4 отодвигает CD4 от клеточной мембраны. Изменяя длину α -

спирального сегмента, мы определили (на основании известных величин подъема и поворота спирали) вынос, необходимый для обеспечения сопротивляемости к проникновению ВИЧ-инфекции. Эти результаты представлены в Таблице 1

Таблица 1

	Образование синцитиев	Экспрессия Thy-1
A CD4 + H + CH2 + CH3 + CD7tm + stk	-	-
B CD4 (D1, D2) + H + CH2 + CH3 + CD7tm + stk	-	-
C CD4 + CD7tm + stk	+ / -(a)	+
D CD4 + CD7tm (длинная версия)	+	+
E CD4 + CD7tm (короткая версия)	+	+
F CD4 + CD5tm	+	+
G CD4 + CH2 + CH3 + CD5tm	-	-
H CD4 + CH3 + CD5tm	-	данных нет
I CD4 + CD34tm	+	+
J CD4 + синтетическая α -спираль (24 ангстрем) + CD34tm	данных нет	+
K CD4 + синтетическая α -спираль (48 ангстрем) + CD34tm	данных нет	+ / -(a)
L CD4 + синтетическая α -спираль (72 ангстрем) + CD34tm	данных нет	

a - значительное уменьшение количества синцитиев или клеток, экспрессирующих Thy-1

В этой таблице "CD4" обозначает CD4(D1 - D4), если не указано иное, "H", "CH2", и "CH3" обозначают центральный домен и домены CH2 и CH3 тяжелой цепи IgG1 человека, соответственно, CD7tm+stk обозначает "стебель" и трансмембранный домен CD7, "CD7tm (длинная версия)" и "CDVtra (короткая версия)" обозначают, соответственно, трансмембранный участок CD7 и трансмембранный участок CD7 без богатого пролином домена (см выше), "CD5tm" обозначает трансмембранный участок CD5, "CD34tm" обозначает трансмембранный участок CD34. В позициях J-L указана длина α -спирального участка в ангстремах, эти значения выведены на основании того, что на 1 виток α -спирали приходится 3,6 остатка, что соответствует 5,4 Å (или 1,5 Å на остаток). Следовательно, α -спираль из 16 остатков вынесет внеклеточный домен CD4 на 24 ангстрема. Альфа-спирали высотой в 48 и 72 ангстрема были получены путем последовательной конкатемеризации фрагмента BstYI в уникальный сайт BamHI на этом участке (см фиг 2B), с последующим отбором клонов нужной ориентации.

Количество образовавшихся синцитиев подсчитывали в экспериментах с совместной культивацией, в которых использовались клетки HeLa, экспрессирующие гликопротеин оболочки ВИЧ-1 из конструкции vPE16 на основе вируса осповакцины (см выше).

Экспрессию Thy-1 измеряли следующим образом. Был сконструирован живой ретровирусный вектор на основе клона hxb 2 ВИЧ-1. В этом векторе второстепенный ген nef заменили последовательностью, кодирующей крысиный thy-1 - эффективно экспрессируемую молекулу, соединенную с мембраной фосфатидилинозитной связью. Вирус, полученный из этого молекулярного клона и обозначенный hxb/thy-1, был заразным, так как давал цитопатологические эффекты и способствовал выработке p24 в супернатантах куль-

туры зараженных клеток C8168 (линия Т-клеточного лейкоза человека, Т-клетки CD4⁺). Кроме того, после обработки вирусом hxb/thy-1 и преходящей трансфекции CD4 клетки HeLa проявляли признаки экспрессии thy-1 уже через 18 часов после заражения, как и следовало ожидать для объекта, управляемого по образцу nef. Сообщения, кодируемые геном nef, обычно относятся к классу вирусных регуляторных белков, в которых происходит множественный сплайсинг и отсутствует элемент ответа rev. Эти сообщения могут накапливаться в цитоплазме в значительном количестве в виде ранних генов. Ожидалось, что сообщения thy-1 будут вести себя подобным образом, т.е. встречаться на ранних стадиях жизненного цикла вируса. Говоря вкратце, эта система облегчила проверку проникновения ВИЧ, так как экспрессия thy-1 служила его суррогатом. Проводилась преходящая трансфекция клеток HeLa различными химерами CD4 при помощи стандартных способов с использованием диэтилaminоэтил-декстрана. Трансфицированные клетки подвергали обработке hxb/thy-1 через 48 часов после трансфекции и измеряли экспрессию thy-1 через 24 - 48 часов после заражения. Результаты, представленные в Таблице 1, относятся к экспрессии thy-1, измеренной через 24 часа после заражения при помощи стандартного моноклонального антитела к thy-1 (Accurate).

На основании результатов, приведенных в Таблице 1, мы заключили, что внеклеточные домены CD4 лучше всего отодвигать от поверхности клетки по меньшей мере на 48 ангстрем, а предпочтительно по меньшей мере на 72 ангстрема, чтобы клетка могла сопротивляться ВИЧ-инфекции.

При использовании стратегии, подобной генеральной стратегии, описанной в настоящем документе, можно конструировать химеры на основе антител к оболочке ВИЧ, которые будут специфически связывать ВИЧ-инфицированные клетки. Примеры таких антител описаны у Corny et al.,

Proc Natl Acad Sci USA 6 1624 (1989) и Marasco et al, J Clin Invest 90 1467 (1992)

Пример XI

Использование вынесенных молекул CD4 в качестве приманки для ВИЧ

Как показано в настоящем описании, клетки, секретирующие домены CD4, удаленные от поверхности клетки, противостоят инвазионной способности ВИЧ. Следовательно, эти клетки, секретирующие CD4, могут быть применены в качестве приманки для связывания ВИЧ, находящегося в крови, и снижения титра вируса у ВИЧ-инфицированных лиц. В предпочтительном случае домен CD4 представляется на клетках, в естественных условиях проходящих через лимфатические узлы, можно использовать любые клетки, играющие какую-либо роль в клеточном иммунном клиренсе, а также любые другие клетки, в естественных условиях присутствующие в фолликулах лимфатических узлов. Примерами могут служить следующие, но не исключительно следующие клетки: макрофаги, Т-клетки (например, Т-хелперы), В-клетки, нейтрофилы, дендритные клетки и фолликулярные дендритные клетки.

В соответствии со способом, предложенным настоящим изобретением, можно использовать любой домен CD4, способный связывать ВИЧ, в том числе описанные в настоящем документе домены D1 - D4 и D1, D2. Хотя бы в некоторых вариантах осуществления изобретения (например, в описанных выше) части внутриклеточного и/или трансмембранного домена можно выбрать из любого белка или любой последовательности аминокислот.

Пример XII

Другие белки-инициаторы, полученные из Т-клеточного и В-клеточного рецептора

Из белков Т-клеточного рецептора CD3 дельта и T3 гамма и белков В-клеточного рецептора mbl и B29 можно получить другие внутриклеточные и трансмембранные домены, проводящие сигнал и соответствующие настоящему изобретению. Аминокислотные последовательности этих белков приведены на фиг. 16 (CD3 дельта, последовательность № 24), фиг. 17 (T3 гамма, последовательность № 25), фиг. 18 (mb1, последовательность № 26) и фиг. 19 (B29, последовательность № 27). Участки последовательностей, которых достаточно для передачи цитолитического сигнала (и поэтому их желательно включать в химерные рецепторы, соответствующие настоящему изобретению), отмечены скобками. Химерные рецепторы, содержащие эти белковые домены, конструируются и используются для осуществления способов лечения, предложенных настоящим изобретением, в общем как описано выше.

Пример XIII

Экспериментальные методы

Заражение осповакциной и радиоиммунопреципитация

Приблизительно 5×10^6 клеток CV1 инфицировали в течение одного часа в бессывороточной среде DME рекомбинантами осповакцины со множественностью заражения не меньше десяти (титр определялся по клеткам CV1). После заражения клетки поместили в свежую среду и метаболиче-

ски поместили 200мкКи/мл ^{35}S -метионина и цистеина (метка Tran ^{35}S -label, ICN, Costa Mesa, CA) в среде Игга, модифицированной по Дюльбекко и не содержащей метионина и цистеина (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY). Обработка продолжалась шесть часов. Меченые клетки отделили при помощи фосфатно-солевого буфера, содержащего 1мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту, собрали посредством центрифугирования и подвергли лизису в 1% NP-40, 0,1% додецилсульфате натрия, 0,15М NaCl, 0,05М трис pH 8,0, 5мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и 1мМ фенилметилсульфонилфториде. Ядра отобрали посредством центрифугирования, а белки CD4 иммунопреципитировали при помощи антител OKT4 и агарозы с мышинным анти-IgG (Cappel, Durham, NC). Образцы подвергли электрофорезу в 8% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия при невозстанавливающих (NR) и восстанавливающих (R) условиях. Гели, содержащие образцы, меченные ^{35}S , перед автордиографией пропитали составом En-Hance (New England Nuclear, Boston, MA). Облегченную экспрессию трансмембранной формы CD16, CD16_{TM} измеряли путем сравнения ее экспрессии в клетках CV1, зараженных только CD16_{TM}, с экспрессией в клетках, зараженных вирусами, кодирующими CD16_{TM}, и химерами ζ или γ . После заражения и выдержки в течение 6 или более часов клетки отбирали из чашек в фосфатно-солевой буфер с 1мМ этилендиаминтетрауксусной кислотой и проводили измерение экспрессии CD16_{TM} и химер способом не прямой иммунофлуоресценции и проточной цитометрии.

Анализ переноса кальция

Сублинию E6 клеток Jurkat (Weiss et al, J Immunol 133 123 - 128 (1984)) инфицировали рекомбинантными вирусами осповакцины в течение одного часа в бессывороточной среде IMDM со множественностью заражения 10 и выдерживали от трех до девяти часов в среде IMDM с 10% фосфатно-солевого буфера. Клетки отбирали центрифугированием и взвешивали в концентрации 3×10^6 клеток/мл в полной среде, содержащей 1мМ Индо-1 ацетометоксиэфир (сложный) (Grynkiewicz et al, J Biol Chem 260 3340 - 3450 (1985)) (Molecular Probes), затем выдерживали 45 минут при 37°C. Клетки, нагруженные Индо-1, центрифугировали, взвешивали в количестве 1×10^6 /мл в бессывороточной среде IMDM и хранили в темноте при комнатной температуре. Анализ на свободные ионы кальция проводили путем одновременного измерения голубой и фиолетовой флуоресценции при проточной цитометрии (Rabinovitch et al, J Immunol 137 952 - 961 (1986)). Для запуска переноса кальция к суспензии клеток в момент времени 0 добавляли либо конъюгированные с фикоэритрином (PE) антитела Leu-3A (против CD4) (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) в концентрации 1мкг/мл, затем неконъюгированные козы антигела к мышинному IgG в концентрации 10мкг/мл, либо неконъюгированные моноклональные антитела 3G8 (против CD16) в концентрации 1 мкг/мл, а затем козы антигела Fab2' к мышинному IgG, конъюгированные с фикоэритрином, в концентрации 10мкг/мл. Были собраны гистограммы отно-

шения фиолетового излучения к голубому для популяции РЕ-положительных (зараженных) клеток, которые обычно составляли 40 - 80% от всех клеток. Ответ Т-клеточного антигенного рецептора в незараженных клетках запускался антителами ОКТ3 без перекрестного связывания. В экспериментах с химерными рецепторами CD16 образцы, в которых наблюдался исходный сдвиг в сторону снижения внутриклеточной концентрации кальция (без антител), исключались из анализа. Гistogramмы анализировали путем перевода двоичных данных в коды ASCII при помощи программы Whte Hand Man (Cooper City, FL) и последующей обработки при помощи ряда программ на ФОРТРАНе (FORTRAN). Для определения исходного нормализованного отношения фиолетового излучения к голубому (приравниваемого к единице) использовали отношение, наблюдаемое перед добавлением второго реагента-антитела. Его же использовали для определения порогового отношения в покое, которое установили так, чтобы 10% популяции в покое находилось над порогом.

Анализ цитолитической активности

Т-клеточную линию WH3 человека, цитолитическую линию с рестрикциями CD8⁺, CD4⁺, HLA B44, выдерживали в среде IMDM с 10% человеческой сыворотки и с 100 ЕД/мл IL-2 и периодически стимулировали либо неспецифически, облученными (3000 рад) не соответствующими по HLA лимфоцитами периферийной крови и фитогемагглютинином в концентрации 1 мкг/мл, либо специфически, облученными одноядерными клетками с B44. Через день неспецифической стимуляции фитогемагглютинин разбавляли до 0,5 мкг/мл свежей средой, а через три дня среду сменили. Между стимуляцией и анализом цитотоксичности клетки культивировали не менее 10 дней. Клетки инфицировали рекомбинантами осповакцины множественностью заражения не менее 10 в течение одного часа в бессывороточной среде, затем выдерживали три часа в полной среде. Клетки отбирали центрифугированием и взвешивали с плотностью 1×10^6 клеток/мл. В U-образной титрационный микропланшет, в каждой ячейке которого содержалось по 100 мкл полной среды, добавляли по 100 мкл взвеси, затем разбавляли вдвое последовательными шагами. Две ячейки на каждый образец не содержали лимфоцитов, чтобы можно было измерить спонтанное высвобождение хрома и его суммарное поглощение. Клетки-мишени, взятые из сублинии HeLa S3, инфицировали в 6- или 10-сантиметровых чашках, с приблизительной множественностью заражения 10, в течение одного часа в бессывороточной среде, затем выдерживали в полной среде в течение трех часов. Затем их выделили при помощи фосфатно-солевого буфера с 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислотой и пересчитали. Порцию в 10^6 клеток-мишеней (HeLa, Raji или RJ2 2.5 для экспериментов с химерным рецептором CD4 и клеток 3G8 10 - 2, Shen et al., Mol Immunol 26 959 (1989) для экспериментов с химерным рецептором CD16) центрифугировали и взвесили в 50 мкл стерильного натрия хромата (⁵¹Cr, 1 мКи/мл, Dupont Wilmington, DE) на один час при 37°C, время от времени перемешивая, затем три раза промыли фосфатно-

солевым буфером. Сто мкл меченых клеток снова взвесили в среде с плотностью 10 клеток/мл и добавили в каждую ячейку. Клетки Raji и RJ2 2.5 мести также, как и клетки HeLa. Микропланшет вращали в течение 1 минуты при 750 x g и выдерживали 4 часа при 37°C. В конце периода инкубации клетки в каждой ячейке осторожно взвешивали посредством пипетирования, отбирали образец для подсчета и вращали микропланшет в течение 1 минуты при 750 x g. Порции по 100 мкл супернатанта отбирали и проверяли в гамма-сцинтилляционном счетчике. К проценту уничтожения была сделана поправка на долю инфицированных клеток-мишеней (обычно 50 - 90%), определенную посредством проточной цитометрии. К отношению эффектор мишень для инфицированных эффекторных клеток была сделана поправка на процент зараженных клеток (обычно 20 - 50% для экспериментов с химерным рецептором CD4 и > 70% для экспериментов с химерным рецептором CD16).

Мутагенез последовательности ζ in vitro

Для получения точечных мутаций в позициях 11 и/или 15 аминокислотной последовательности ζ были приготовлены синтетические олигонуклеотидные затравки-последовательности от сайта BamHI у начала трансмембранного домена ζ , преобразующие остаток 11 нативной ζ из Cys в Gly (C11G), или остаток 15 из Asp в Gly (D15G), или оба остатка (C11G/D15G), которые были использованы в цепных полимеразных реакциях для построения фрагментов с мутациями, которые затем вставлялись в конструкции CD4 ζ дикого типа.

Для получения делеций в последовательности ζ кДНК ζ были амплифицированы посредством цепных полимеразных реакций, в которых были использованы синтетические олигонуклеотидные затравки, сконструированные для создания стоп-кодона (UAG) после остатков 50, 59 или 65. Затравки содержали сайт расщепления для фермента NotI, отстоящий на 5 или 8 остатков от конца 5', обычно в последовательности вида CGC GGG CGG CCG CTA (последовательность № 11), где три последних остатка соответствуют стоп-антикодону 3а последовательностями NotI и стоп-антикодона шли 18 или более остатков, комплементарных требуемому концу 3' фрагмента. Полученные химеры были обозначены CD16 ζ Y51*, CD16 ζ E60* и CD16 ζ D66*, соответственно. Сайт BamHI у начала трансмембранного домена и сайт NotI использовались для генерации фрагментов, которые вставлялись в конструкции CD16 ζ дикого типа. Мономерные химеры ζ строились путем высвобождения трансмембранной и примембранной внутриклеточной последовательностей ζ за счет переваривания ферментами BamHI и Sad конструкции CD4 ζ Asp и Cys, описанной выше, и осуществления вставки этого фрагмента в конструкции CD16 ζ E60* и CD16 ζ D66*, соответственно.

Трехчастные химерные конструкции CD16 7 ζ (48 - 65) и CD16 7 ζ (48 - 59). Для приготовления конструкции 0016 ζ 066* последовательность кДНК ζ , соответствующую трансмембранному домену и 17 первым остаткам цитоплазматического домена, заменили соответствующими трансмембранным и цитоплазматиче-

ским доменами, полученными из кДНК CD5 и CD7. Фрагменты CD5 и CD7 были получены при помощи цепных полимеразных реакций с использованием олигонуклеотидов прямой последовательности, содержащих сайт рестрикционного расщепления BamHI и соответствующих участку, прилежащему "сверху" к трансмембранному домену CD5 и CD7, соответственно, и представленных ниже олигонуклеотидов обратной последовательности, перекрывающихся с последовательностями CD5 и CD7, соответственно, и последовательности ζ , содержащей сайт SacI рестрикционного расщепления

CD5- ζ : CGC GGG CTC GTT ATA GAG CTG GTT CTG GCG CTG CTT CTT

CTG (последовательность № 12)

CD7- ζ : CGC GGG GAG CTC GTT ATA GAG CTG GTT TGC CGC CGA ATT

CTT TTC CGC

(последовательность № 13)

Продукты цепной реакции CD5 и CD7 переварили BamHI и SacI и сшили с CD16 ζ E60*, переваренной ферментами BamHI и SacI. Этим фрагментом CD7 была заменена последовательность цепи ζ от BamHI до SacI. Для построения конструкций CD16 CD5 и CD16 CD7 фрагменты CD5 и CD7 готовили при помощи цепной полимеразной реакции с использованием олигонуклеотида, содержащего сайт NotI рестрикционного расщепления и кодирующий стоп-кодон (UAA) после остатков Gln416 и Ala193 CD5 и CD7 соответственно. Фрагменты CD5 и CD7 переварили при помощи BamHI и NotI и вставили в конструкцию CD16 ζ Asp66*

Мутагенез in vitro аминоконечных остатков отрезка ζ , проводящего цитолитический сигнал

Были получены синтетические олигонуклеотидные затравки с началом с сайта Sad в упомянутом отрезке ζ , преобразующие остаток 48 нативной из Asn в Ser (N48S), остаток 50 из Leu в Ser (L50S) и остаток 51 из Tyr в Phe (Y51F), и использованы в цепной полимеразной реакции для построения фрагментов, которые повторно вводились в конструкцию CD16 7 ζ (48 - 65) дикого типа

Мутагенез in vitro C-конечных остатков отрезка ζ , проводящего цитолитический сигнал

Были получены синтетические олигонуклеотидные затравки от 3'-конечного сайта NotI до стоп-кодона, преобразующие остаток 60 нативного ζ из Glu в Gln (E60Q), остаток 61 из Glu в Gln (E61Q), остаток 62 из Tyr в Phe или Ser (Y62F) или (Y62S) и остаток 63 из Asp в Asn (D63N) и использованы в цепной полимеразной реакции для построения фрагментов, которые были субклонированы в конструкцию CD16 ζ D66* дикого типа между сайтами BamHI и NotI

Химерные конструкции CD16 7 ζ (33 - 65), CD16 7 ζ (71 - 104) и CD16 7 ζ (104 - 137)

Трансмембранный фрагмент CD7, содержащий сайты MluI и NotI в месте соединения трансмембранного и внутриклеточного домена, был получен при помощи цепной полимеразной реакции с использованием олигонуклеотида такой последовательностью CGC GGG GCG GCC ACG CGT CCT CGC CAG CAC ACA (последовательность № 14). Полученный фрагмент переварили при помощи BamHI и NotI и повторно вставили в конструкцию CD16 7 ζ (48 - 65). Фрагменты ζ , кодирующие остатки с 33 по 65, с 71 по 104 и со 104 по

137, были получены при помощи цепной полимеразной реакции с использованием пар затравок, содержащих сайты MluI на конце 5' (прямые затравки) и стоп-кодона, за которыми следуют сайты NotI, также на конце 5' (обратные затравки). В каждом случае сайты рестрикции отстояли на шесть остатков от конца 5' затравки, чтобы расщепление рестрикционным ферментом было гарантированным

ζ 33: CGC GGG ACG CGT TTC AGC CGT CCT CGC CAG CAC ACA

(последовательность № 15)

ζ 71: CGC GGG ACG CGT GAC CCT GAG ATG GGG GGA AAG

(последовательность № 16) и

ζ 104: CGC GGG ACG CGT ATT GGG ATG AAA GGC GAG CGC

(последовательность № 17) Построение делеционных мутантов FcR1IA

Мутанты FcR1IA с делециями на карбоксильном конце были сконструированы при помощи цепных полимеразных реакций тем же способом, что и конструкции полной длины, с преобразованием последовательностей, кодирующих тирозин в позициях 282 и 298, в стоп-кодона (TAA). Аминоконечные делеции были получены путем амплификации фрагментов, кодирующих все меньшие части внутриклеточного домена, при помощи цепных полимеразных реакций, с использованием олигонуклеотидов, позволяющих вставлять полученные фрагменты между рестрикционными сайтами MluI и NotI ранее сконструированной экспрессионной плазмиды, кодирующей внеклеточный домен CD16, слитый с трансмембранным доменом CD7 (который заканчивается на сайте MluI - в месте соединения трансмембранного и внутриклеточного доменов)

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Приведенные выше примеры показывают, что агрегации химер ζ , η или γ , достаточно для запуска цитолитического эффекторного клеточного ответа в Т-клетках. Известный диапазон экспрессии ζ , η и γ , в который входят Т-лимфоциты, естественные клетки-киллеры, базофилы, гранулоциты, макрофаги и тучные клетки, позволяет предположить, что сохранившиеся отрезки последовательности могут взаимодействовать с сенсорным аппаратом, общим для клеток кроветворной системы, и что важная составляющая защиты, обеспечиваемой иммунной системой, может быть опосредствована агрегацией рецепторов

Сила цитолитического ответа и отсутствие ответа по отношению к клеткам-мишеням, несущим рецепторы класса II ГКГС, показывает, что химеры, основанные на ζ , η или γ , служат основой генетического вмешательства при СПИДе, которое осуществляется при помощи адоптивной иммунотерапии. Широкое распространение эндогенных ζ и γ и данные о том, что Fc-рецепторы, связанные с γ , опосредствуют цитотоксичность в клетках различных типов (Fanger et al., Immunol Today 10 92 - 99 (1989)), позволяет рассматривать возможность применения в этих целях различных клеток. Например, нейтрофильные гранулоциты, которые очень недолго (\approx 4 часа) живут в системе кровообращения и обладают очень сильной цитолитической способностью, представляют собой при-

влекательное место экспрессии таких химер. Заражение нейтрофилов ВИЧ, скорее всего, не приведет к высвобождению вируса, а обилие этих клеток (они преобладают среди лейкоцитов) должно облегчить организму-хозяину задачу защиты. Еще один привлекательный носитель химер - это зрелые Т-клетки, популяция, в настоящее время доступная ретровирусной инженерии (Rosenberg, S A Sci Am 262 62 - 69 (1990)). При помощи рекомбинантных IL-2 популяции Т-клеток сравнительно легко размножаются в культуре, и такие размноженные популяции, вернувшись в организм, обычно живут недолго (Rosenberg et al, N Engl J Med 323 570 - 578 (1990)).

При подходящих условиях распознавание ВИЧ клетками, экспрессирующими химеры CD4, должно служить также митогенным стимулом, чтобы вооруженная популяция клеток могла динамически отвечать на вирусную нагрузку. Хотя здесь мы сосредоточились на поведении сплитых белков в цитоплазматических Т-лимфоцитах, экспрессия этих химер в лимфоцитах-хелперах могла бы стать ВИЧ-стимулируемым источником цитокинов, которые противодействовали бы уничтожению подгруппы хелперов при СПИДе.

Появившиеся недавно описания схем конструирования сопротивления инфекции, проявляющегося на этапах, отличных от этапа проникновения вируса (Friedman et al, Nature 335 452 - 454 (1988), Green et al, Cell 58 215 - 223 (1989), Malim et al, Cell 58 205 - 214 (1989), Trono et al, Cell 59 113 - 120 (1989), Buonocore et al, Nature 345 625 - 628 (1990)), позволяют предположить, что клетки с химерными рецепторами CD4 можно перестроить таким образом, что они будут препятствовать выработке вируса за счет экспрессии соответствующих агентов, действующих внутри клетки.

Способность передавать сигналы Т-лимфоцитам через автономные химеры обеспечивает также способность управлять лимфоцитами, подвергшимся ретровирусной инженерии, в живом организме. Такой раздражитель как перекрестное связывание, опосредствованное, например, специфическими антителами IgM, настроенными на удаление доменов, связывающих комплемент, может позволить увеличивать количество таких лимфоцитов на месте, лечение подобными специфическими антителами IgG (например, распознающими аминокислотную вариацию, вставленную в химерную цепь) могло бы избирательно истощать сконструированную популяцию. Кроме того, антитела IgM к CD4 не требуют дополнительного перекрестного связывания для мобилизации кальция в клетках Jurkat, экспрессирующих химеры CD4. Возможность регулировать численность клеток в популяции, не прибегая к неоднократной экстракорпоральной амплификации, может значительно расширить область и увеличить эффективность применения Т-клеток, обработанных методами генной инженерии, по сравнению с настоящим моментом.

Настоящее изобретение было описано лишь в связи с отдельными вариантами его осуществления, но следует понимать, что существует возможность его модификации, и настоящая заявка

распространяется на видоизменения, другие способы использования или варианты адаптации настоящего изобретения, предусматривающие такие отклонения от изложенного выше, которые возможны в этой области деятельности, допустимы в рамках настоящего изобретения и согласуются с его основными особенностями, определенными ниже следующей формулой.

СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ

(1) ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

(i) ЗАЯВИТЕЛИ Сид, Брайен и др

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Направленный лизис ВИЧ-инфицированных клеток при помощи клеток с химерными рецепторами CD4

(iii) КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ 52

(iv) АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

(A) ПОЛУЧАТЕЛЬ Фиш энд Ричардсон П С

(B) УЛИЦА 225 Франклин Стрит

(C) ГОРОД Бостон

(D) ШТАТ МА

(E) СТРАНА США

(F) ПОЧТОВЫЙ ИНДЕКС (ЗИП) 02110 - 2804

(v) МАШИНОЧИТАЕМАЯ ФОРМА

(A) ТИП НОСИТЕЛЯ дискета 3 5", 1 44 Mb

(B) КОМПЬЮТЕР IBM PS/2, модель 50Z or 55SX

(C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА IBM PC DOS (Версия 3 30)

(D) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ Word-perfect (Версия 5 0)

(vi) СВЕДЕНИЯ О НАСТОЯЩЕЙ ЗАЯВКЕ

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ 08/394,388

(B) ДАТА ПОДАЧИ 24 февраля 1995 г

(vii) СВЕДЕНИЯ О ПРЕДЫДУЩЕЙ ЗАЯВКЕ

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ 08/284,391

(B) ДАТА ПОДАЧИ 2 августа 1994 г

(vii) СВЕДЕНИЯ О ПРЕДЫДУЩЕЙ ЗАЯВКЕ

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ 08/195,395

(B) ДАТА ПОДАЧИ 14 февраля 1994 г

(vii) СВЕДЕНИЯ О ПРЕДЫДУЩЕЙ ЗАЯВКЕ

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ 07/847,566

(B) ДАТА ПОДАЧИ 6 марта 1992 г

(viii) СВЕДЕНИЯ О ПОВЕРЕННОМ/АГЕНТЕ

(A) ИМЯ Karen F Lech, Ph D

(B) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР 35,238

(C) ССЫЛКА/НОМЕР ДЕЛА 00786/272001

(ix) ТЕЛЕКОММУНИКАЦИОННЫЕ СВЕДЕНИЯ

(A) ТЕЛЕФОН (617) 542 - 5070

(B) ТЕЛЕФАКС (617) 542 - 8906

(C) ТЕЛЕКС 200154

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 1

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА 1728 пар оснований

(B) ТИП нуклеиновая кислота

(C) Двухцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

1

53

ATGATCCGGG GAGTCCCTTT TAGGCACCTG CTCTGGGTGC TGCACCTGGC 50
 GCTCCTCCCA GCAGCCACTC AGGGAAACAA AGTGGTGGTG GGCAAAAGG 100
 GGGATACAGT GGAATGACC TGTACACCTT CCLAGAGAA GAGCATACAA 150
 TTCCACTGGA AAAACTCCAA CCAGATAAAG ATTCTGGGAA ATCAGGGCTC 200
 CTCTTAACCT AAAGTCCAT CCAGCTGGA TGATCGCGCT GACTCAAGAA 250
 GAAGCTTTG GACCAAGGA AACTTCCGCC TGATCATCAA GAATCTTAG 300
 ATAGAGACT CAGATACTTA CATCTGAGAA GTGGAGGAC AGAAGGAGGA 350
 GGTGCAATTG TAGTGTTCG GATTGACTGC CAACCTGAC ACCCACTGC 400
 TTCAGGGGCA GAGCCTGAC CTGACCTGG AGAGCCCCC TGGTAGTAGC 450
 CCTCAGTGC AATGTAGGAG TCCAGGGCT AAAAACAATAC AGCGCGGAA 500
 CACCCCTCC GTGTCTCAG TGAGCTCCA GGAAGTGGC ACTGAGCAT 550
 GCAGTGTCTT GCAGAACAG AAGAAGGGG AGTTCBAAA AGACATCTGT 600
 GTGATAGCTT TCCAGAGGG CTCCAGATA GTCTATAAGA AAGAGGGGA 650
 ACAGGTGGAG TTCTCTTCC CACTCGCTT TACAGTTGAA AAGCTGACGG 700
 GCATGCGGA GTGTGGTGG CAGGCGGAGA GGGCTTCCTC CTCAGTCT 750
 TGGATCACCT TTGACCTGAA GAACAGGAA GTGTCTGTA AAGCGCTTAC 800
 CCAGGACCTT AAGCTCCAGA TGGGCAAGAA GCTCCCGCTC CACTCAGCC 850
 TGCCTCAGG CTGCTCCAG TATG TGG T LTGGAACCT CACCCTGGC 900
 CTTGAGCTA AAGCTGGAA CTGCTCAG GACTGAACT TGGTGGTAT 950
 GAGAGCCACT CAGCTCCAGA AAAATTGAC CTGTAGGCTG TGGGAGCCA 1000
 CCTCCCTTA GTGTATCTG AGCTTCAAA TCGAGAACAA GAGGCAAGG 1050
 GTCTCGAGCT GGGAGAGCC GGTGCGGTG LTGAACCTG AGCGGGGAT 1100

GTGCTGCTG CTGCTGAGTG ACTCGGACA GGTCTGCTG GAATCCACA 1150
 TCAAGCTCTT GCTCAGCTG TCCACCTCCG TCGACCTGCA TCCCAACCTC 1200
 TGTACTTCC TGGTGGGAT CTTCTTATC TACGAGCTG TCATCAGAGC 1250
 CCTCAGCTG AGAGCAAAAT TCAGAGGAT TCGAGAGCT GCTCCCACT 1300
 TCGAGGAGCC CAGCAGCTC TCAATGAGC TCACTGAGG GCGAGAGAG 1350
 GATATGAGT TCTTGGAGAA GAGCGGGCT CGGAGCTAG AGTGGGAG 1400
 CAACAGCAG AGGAGAGGA ACCCCAGGA AGCGCTATAC AATGCACTGC 1450
 AGAAGACAA GATGCGAGAA GCTCAGCTG AGATGGGAC AAGAGCGAG 500
 AGCGGAGAG GCAGCGGCA CGATGCTTT TACAGGCA CCACTTCCA 550
 AGCATCCAG TTGCGGACT GAGAGAGAG AGAGGCTCA CATCTCAGAA 1600
 GAGCCTTGG GTAGAGGCC CGCCCAAG GTGAAGGAC CCAGCGAGT 1650
 AGCBAATCT CCGCGAGCT CTTCAGATC CCCACTCTGT GACTCCATG 1700
 GCCACCGAG AGGAGCTCC AGCTCTTA 1728

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
 № 2

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 1389 пар оснований
- (B) ТИП нуклеиновая кислота
- (C) Двухцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

2

ATGAACCGG GAGTCCCTTT TAGGCACCTG CTCTGGGTGC TGCACCTGGC 50
 GCTCCTCCCA GCAGCCACTC AGGGAAACAA AGTGGTGGTG GGCAAAAGG 100
 GGGATACAGT GGAATGACC TGTACACCTT CCLAGAGAA GAGCATACAA 150
 TTCCACTGGA AAAACTCCAA CCAGATAAAG ATTCTGGGAA ATCAGGGCTC 200
 CTCTTAACCT AAAGTCCAT CCAGCTGGA TGATCGCGCT GACTCAAGAA 250
 GAAGCTTTG GACCAAGGA AACTTCCGCC TGATCATCAA GAATCTTAG 300
 ATAGAGACT CAGATACTTA CATCTGAGAA GTGGAGGAC AGAAGGAGGA 350
 GGTGCAATTG TAGTGTTCG GATTGACTGC CAACCTGAC ACCCACTGC 400

45349

54

TTGAGGGGCA GAGCCTGAC CTGACCTGG AGAGCCCCC TGGTAGTAGC 450
 CCTCAGTGC AATGTAGGAG TCCAGGGCT AAAAACAATAC AGCGCGGAA 500
 GAGCCTCCG GTCTCTCAG TGGAGCTCA GGAAGTGGC ACTTGCAT 550
 GACTGTCTT GCAGAACAG AAGAGGTGG AGTTCBAAAT AGACATCTGT 600
 TGTGAGCTT TC AGAGGG CTCCAGCAT GTCTATAGG AAGAGGGGA 650
 ACAGGTGGAG TTCTCTTCC CACTCGCTT TACAGTTGAA AAGCTGACGG 700
 GCAGTGGCA GCTGTGGCG CAGCGGAGA GGGCTTCCCT CTCACCTCT 750
 TCGATACCT TTGACCTAA GAACAGGAA GTGTCTGTA AAGCGCTTAC 800
 CCAGGACCTT AAGCTCCAGA TGGGCAAGAA GCTCCCGCTC CACTCAGCC 850
 TGGCCAGGC CTGCTCCAG TATGCTGGCT CTGGAACCT CACCTGGCC 900
 CTTGAGGGA AAGCAGGAA GTGTGATCAG GAATGAGCT TGGTGGTAT 950
 GAGAGCCACT CAGCTCCAGA AAAATTGAC CTGTAGGCTG TGGGAGCCA 1000
 CCTCCCTTA GTGTATCTG AGCTTCAAA TCGAGAACAA GAGGCAAGG 1050
 GTCTCGAGCT GGGAGAGCC GGTGTGGTG CTCAACCTCT CCGCGGGAT 1100
 GTGGAGCTT CTGTGAGTG ACTCGGACA GGTCTCTCT GATTCAGCA 1150
 TCAAGCTCT GCTGAGTGG AGCTTGAGAC TGGAGACCA GAGGCAAGG 1200
 TGTATATCT TGGATGCTAT CCTGTTTTT TATGGTATG TCTTACCTT 1250
 GCTCTACTGT GAGCTCAGA TCGAGGCTCG AAGGCGAGC ATAGCCAGCC 1300
 GTGAGAAATC AGATGCTGT TACAGGGCC TGAACACCG GAACAGGAG 1350
 ACATATGAGA CTCTGAACA TGAAGACCA CCCCAGATC 1389

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
 № 3

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 1599 пар оснований
- (B) ТИП нуклеиновая кислота
- (C) Двухцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

3

ATGAACCGG GAGTCCCTTT TAGGCACCTG CTCTGGGTGC TGCACCTGGC 50
 GCTCCTCCCA GCAGCCACTC AGGGAAACAA AGTGGTGGTG GGCAAAAGG 100

GGATACAG* GGAAATGACC TGACAGCTT CCGAGAAGAA GAGCATACAA 150
 TTCCAGTGGG ARAACTCCAA CCGAATAAAG ATTCTGGGAA ATCRGGGCTC 200
 CTTCTTAACT ARACTGCAAT CCAACCTGAA TGATCGCCCT GACTCAAGAA 250
 GAAGCTTTG GACCAAGGA AACTTCCTC TGACATCAA GAPTCTTAAG 300
 ATAGAGACT CAGTACTTA CATCTGTGA GTGGAGGACC AGAAGGAGGA 350
 GGTGCRAFTG CTAGTGTTCG GATTGACTGC CAACCTTGAC ACCCAGCTGC 400
 TFCAGGGGCA GAGCCGACG LAGACCTTGC AGAGCCCTCC TGTATGTAGL 450
 CCTCAGTGC AATGTAGGAC TCCAGGGGT AAAACACTAC AGGGGGGGA 500
 GACCTCTCC GTGTCTGACG TGGAGCTCCA GATAGTGGC ACCTGGACAT 550
 GCACCTGCTT GCAGAACAGC AAGTAGGTGC AGTTCAAAT AGACATCTG 600
 CTGCTAGCTT TCCGAGGCG CTCAGGCTA GTCTATAGG AAGAGGGGA 650
 ACGSTGGAG TTCTCTTCC CACTGCTCT TACAGTTGAA AAGCTGACG 700
 ECAGAGGCGA GTCTGTGGG CAGGCGGAGA GGGTTCCTC CTCACATCT 750
 TGGATCTCCT TTGACCTGAA GAACAGGGA GTGTCTGTA AACGGTTAC 800
 CCAGAGCCT AAGCTCCAGA TGGGCAAGC GTCTCCGCTC CACTCAACC 850
 TGCCTCAGCC CTGCTCAGC TATGTCTGCT CTGGAACCT CACCTGAGC 900
 CTGSAAGCGA AAGCAGGAAT GTTGCATCAG AAGTGAACC TGCTGTGAT 950
 GAGAGCCACT CAGCTCCAGA AATATTGAC CTGTGPGTG TGGGACCCA 1000
 CCTLCCCTAA CTGATGCTC AGCTGGAAC TGGAGACAA GGAGGCAAG 1050
 GTCTGAGAGC GGCAGAGCC GTCTGTGGG CTGACCTTG AGCGGGGAT 1100
 GTGGCAGTGT CTGCTGAGTG ACTCCGACCA GGTCTGTCT GAATCCACA 1150
 TCAGSTTCT GGCACATGC TCCAGCCGG TGCAGCGGA TCCCAATCT 1200
 TCCAGCTGC TGCCTGGAT CCTCTGATC TATGCTGCA TTCTCACTGC 1250
 CTGTTCTCT AGAGTCAAT TACAGAGAC CCGAGGCCC CCGGCTTACC 1300
 AGCAGGGCCA GAACAGCTC TATACAGAC TCAATCTAGG ACGAGAGAG 1350
 GAGTATGATG TTTTGGACAA GAGAGCTGG CCGAGCCCTG AGATGGGGG 1400
 AAGGCCAGA AGGACATAC CTGAGGAGG CCGTTPCAAT GACTGAGGA 1450
 AAGATAAGAT GCGGAGCCC TACAGTGAAG TTGGATGAA AGGCGAGCC 1500
 CGAGGGGCA AGCGGACGA TGGCTTTAC CAGGCTCTCA GTACAGCCAC 1550
 CAGGAGACC TACGAGCCG TGLATGCA GACCTGCCC CCTLGCTAA 1599

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 4

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА 575 аминокислот

(B) ТИП аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

4

tet asn arg gly val pro phe arg his leu leu leu val leu gly leu
 1 5 10 15
 ala leu leu pro ala ala thr gln gly asn lys val val leu gly lys
 20 25 30
 lys gly asp thr val glu leu thr cys thr ala ser gln lys ser
 35 40 45
 ile gln phe his trp lys asn ser asn gln ile lys ile leu gly asn
 50 55 60
 gln gly ser phe leu thr lys gly pro ser lys leu asn asp arg ala
 65 70 75 80
 asp ser arg arg ser leu thr asp gln gly asn phe pro leu ile ile
 85 90 95
 lys asn leu lys ile glu asp ser asp thr tyr ile cys glu val glu
 100 105 110
 asp glr lys glu glu val gln leu leu val phe cly leu thr ala asn
 115 120 125
 ser asp thr his leu leu cly gly cly ser leu thr leu thr leu glu
 130 135 140
 ser pro pro gly ser ser pro ser val gln cys arg ser pro arg gly
 145 150 155
 lys asn ile gln cly gly lys thr leu ser val ser cly leu glu leu
 160 165 170
 gln asp ser cly thr thr thr cys thr val leu gln asn gln lys lys
 175 180 185
 val glu phe lys ile asp ile val val leu ala phe gln lys ala ser
 190 195 200
 ser ile val tyr lys lys glu gly cly gln val glu phe ser phe pro
 205 210 215
 leu ala phe thr val glu lys leu thr gly ser gly ala leu thr thr
 220 225 230
 glr ala glu arg ala ser ser ser lys ser pro ile thr phe asp leu
 235 240 245
 lys asn lys glu val ser val lys arg val thr gln asp pro lys leu
 250 255 260
 gln met gly lys lys leu pro leu his leu thr leu pro gln ala leu
 265 270 275
 pro c n tyr ala gly ser gly asn leu thr leu ala leu glu ala lys
 280 285 290
 thr gly lys leu his gln glu val asn leu val val met arg ala thr
 295 300 305

c n leu gln lys asn leu thr cys glu val thr gly pro thr ser pro
 310 315 320
 lys leu met leu ser leu lys leu glu asn lys glu ala lys val ser
 325 330 335
 lys arg glu lys pro val thr val leu asp pro glu ala gly met thr
 340 345 350
 cly cys leu leu ser asp ser gly gln val leu leu glu ser asn ile
 355 360 365
 lys val leu pro thr thr thr pro val his ala asp pro lys leu
 370 375 380
 cys tyr leu leu asp cly ile leu phe ile tyr gly val ile thr
 385 390 395
 ala leu tyr leu arg ala lys phe ser arg ser ala glu thr ala ala
 400 405 410
 asn leu gln asp pro asn gln leu thr asn glu leu asn leu gly arg
 415 420 425
 arg glu glu tyr asp val leu glu lys lys arg ala arg asp pro glu
 430 435 440
 met gly cly lys gln glr arg arg asp asn pro glu glr glu val tyr
 445 450 455
 asn ala leu gln lys asp lys met pro glu ala tyr ser glu ile gly
 460 465 470
 thr lys gly glu arg arg arg gly lys gly his asp cly leu thr gln
 475 480 485
 asp ser asp phe glr ala val gln phe gly asn arg arg glu arg glu
 490 495 500
 gly ser glu leu thr arg thr leu gly leu arg ala arg pro lys gly
 505 510 515
 glu ser thr gln gln ser ser gln ser cys ala ser val phe ser ile
 520 525 530
 pro thr leu thr ser pro thr pro pro ser ser ser gln leu
 535 540 545

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 5

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА 462 аминокислот

(B) ТИП аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

5

met asp arg gly val pro phe arg his leu leu leu val leu gly leu
 1 5 10 15
 ala leu leu pro ala ala thr gln asn lys val val leu gly lys
 20 25 30
 lys gly asp thr val cly leu thr cys thr ala ser gln lys lys ser
 35 40 45
 ile gln phe his trp lys asn ser asn gln ile lys ile leu gly asn
 50 55 60
 gln gly ser phe leu thr lys gly pro ser lys leu asn asp arg ala
 65 70 75 80
 asp ser arg arg ser leu thr asp glr gly asn phe pro leu ile ile
 85 90 95

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

6

7

33

8

50

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 9

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 33 основания
- (B) ТИП нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
- (II) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
- (XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

9

CGGCGCGCGC GCGGAGCGCG GCGAGACAG CAG

33

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 10

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 33 основания
- (B) ТИП нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
- (II) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
- (XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

10

CGCCTGACG AGCAGCCAGT TGGGACGCG CAG

33

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 11

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 15 оснований
- (B) ТИП нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
- (II) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
- (XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

11

CGCGGCGCGC CGCTA

15

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 12

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 42 основания
- (B) ТИП нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
- (II) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
- (XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

12

CGCGGCGCGC TTAGAGAGCT GGTCTCTCG CTCTCTCTTC TG

42

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 13

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 48 оснований
- (B) ТИП нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
- (II) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
- (XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

13

CGCGGAGAGC TCGTTATAGA GCTGCTTTC GAGGAGATTC TTATCCCG

48

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

14

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 33 основания
- (B) ТИП нуклеиновая кислота

- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
- (II) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
- (XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

14

CGGGGCGG GCGGCGCTCC TCGGCGGAG CAG

33

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 15

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 36 оснований
- (B) ТИП нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
- (II) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
- (XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

15

CGCGGAGCG GTTTCAGCG TCTCGGCGAG CAGAG

36

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 16

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 33 основания
- (B) ТИП нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
- (II) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
- (XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

16

CGCGGAGCG GTGAGCTCA GATGCGGAG AAG

33

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 17

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 33 основания
- (B) ТИП нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
- (II) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
- (XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

17

CGCGGAGCG GTATTGGGAT GAGGCGGAG CGC

33

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 18

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 26 оснований
- (B) ТИП нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
- (II) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
- (XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

18

CGCGGATCC AGCATGGGCA GCTCTT

26

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 19

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 42 основания
- (B) ТИП нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
- (II) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
- (XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

19

CCCCGGGGGG CCGCTTACG TATTACTGAT GACATGGGCG TT

43

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
№ 20

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 40 оснований
(B) ТИП нуклеиновая кислота
(C) Одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

20

GGGGGGGAT CCGACTGTC AGCTCCAG CTCTCCCG

40

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
№ 21

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 32 основания
(B) ТИП нуклеиновая кислота
(C) Одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

21

GGGGGGGCG CCGCTTAAT AGGTCTCG TC

32

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
№ 22

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 31 основание
(B) ТИП нуклеиновая кислота
(C) Одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

22

TCGAAAGAG AGACCTGAA AACACCA A

31

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
№ 23

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 31 основание
(B) ТИП нуклеиновая кислота
(C) Одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

23

TTGTTGGTTT CTTCAGGTTG TGTCTTTCTG A

31

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
№ 24

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 171 аминокислота
(B) ТИП аминокислота
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ аминокислота
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

24



(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
№ 25

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 182 аминокислота
(B) ТИП аминокислота
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ аминокислота
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

25

Met Glu S n Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser I e Lys Gly Asn His Leu Val Lys
Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asn Gly Ser Val Leu Leu Tyr Cys Asp Ala
G u Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe
Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Phe Asn Ala
Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
Leu A a Val Glu Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gly
Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
Asn Gln Leu Arg Arg Asn

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
№ 26

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 220 аминокислот
(B) ТИП аминокислота
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ аминокислота
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

26

Met Pro Gly Gly Leu Glu Ala Leu Arg Ala Leu Pro Leu Leu Leu Phe
Leu Ser Tyr Ala Cys Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala Leu Arg Val Glu
Gly Gly Pro Pro Ser Leu Thr Val Asn Leu Cys Glu Glu Ala Arg Leu
Thr Cys Glu Asn Asn Gly Arg Asn Pro Asn Ile Thr Asp Lys Phe Ser
Leu Gln Ser Asn Ile Thr Asp Pro Pro Val Pro Leu Gly Pro Gly Gln
Gly Thr Tyr Gly Glu Leu Phe Phe Pro Glu Val Asn Lys Asn Tyr Gly
Ala Cys Thr Gly Cys Gln Val Ile Glu Asn Asn Ile Leu Lys Arg Ser
Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Asn Pro Val Pro Arg Pro Phe Leu
Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile
Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly Thr Leu Leu Leu Phe Arg

Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Phe Gly Val Asp Met Pro Asp Asp Tyr
Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met
Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly Thr Tyr Gln Asp Val Gly
Asn Leu His Ile Gly Asp Ala Gln Leu Glu Lys Pro

2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

27

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА 228 аминокислот

(B) ТИП аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ аминокислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

27

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

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 28

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА 1304

(B) ТИП нуклеиновая кислота

(C) Одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

28

GGCTGTTTGA GAGGCGCCG GCGAGGAGGA GCGAGGCGCA GAGGCGCTGC 50
 GATTTCGTG GCGTACGTC GCTACGCTG GAGGCGCTG GCTGCGTCGG 100
 GAGGCGGACA ATGAGCGGGG GAGTGCCTTT TAGGCACTTG CTTCTGCTGC 150
 TGCACTGGCG GCTGCTGCCA GCGGCGCTTC AGGGAACCAA ACTGCTGCTG 200
 GCGAAAGAG GCGATGCTGT GGAAGTGGCC TGTACAGCTT CCGGAGAGAA 250
 GAGCATACAA TTGCACTGGA AAACTGCGAA GCGATAGAG ATTCTGGGAA 300
 ATGCGGCTCG CTCTTAACT AAAGTGCAT GCGAGCTGAA TGATCGGCTT 350
 GACTCAAGAA GAGGCTTTG GCGGCGAGGA AACTTCGCCC TGATCTCTCA 400
 GATTCTTAG ATAGAGACT GCGAGACTTA CATCTGTGAA GTGAGAGACC 450
 AGAGGAGGA GGTGCAATG CTAGCTTTC GATTACCTGC CAACTCTGAC 500
 AGCGACTGCG TTGAGGGGGA GAGCTGAGC GTGAGCTTGG AGAGCGCGCC 550
 TGCTATGAGC GCTGCTGCGC AACTGAGGAG TCGAGCGGCT AAAAGCATAC 600
 AGCGGCGGGA GAGGCTGCGC GTCTCTGAGC TCGAGCTGCA GATAGTGGC 650
 AACTGAGCAT GCACTCTCTT GCGAGGCGAG AGAGAGCTGG AGTTCAGAAAT 700
 AGCATCTGTC GTGCTAGCTT TCGAGAGGCG GTGAGGAGTA GTCTCTGAAA 750
 AGCAGCGGGA ACGAGTGGAG TTGCTCTTTC GACTGCTGTT TACGCTTGAA 800
 AAGCTGAGTC GCACTGCGGA GCTCTGCGCG GAGGCGGAAA GCGGCTGCTC 850
 CTGAGAGCTT TGAGTACCTT TTGAGCTGAA GAGCAGGAAA GTCTCTGAAA 900
 AAGCGGTAC GCGAGGCTCT AACTCTGCGA TGCGGAGGAA GCTGCGGCTC 950
 GAGCTGAGCC TGCGGCGGCG GTTCTGCTAG TATGCTGCTG CTGGAAGCTT 1000
 GAGGCTGCGC GTTGAAGGGA AAGCAGGAAA GTTCTGCTAG GAGTGAAGCC 1050
 TGCTGTGAGT GAGAGGACT GAGTGCAGAA AAAATTGAGC GTGAGGCTG 1100
 TGCGGCGGCA GTTCTGCTAG GTGAGGCTG AGTCTGAAGC TGAGAGGAAA 1150
 GCGAGGAGAG GTTCTGAGAG GCGAGAGGCG GTTCTGCTGCT GTGAGGCTG 1200
 ACGCGGCTAC GTGAGGCTG GTGAGGCTG AGTCTGCTGCA GTTCTGCTGCT 1250
 GATGCGGAAA TCGAGGCTG GAGGAGTGG TCGAGGCGCG TGCGGCGGAA 1300
 TCGC 1304

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 29

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА 398

(B) ТИП аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ аминокислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

29

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

Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr
 305 310 315
 Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro
 320 325 330
 Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser
 335 340 345
 Lys Arg Glu Lys Pro Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp
 350 355 360
 Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile
 365 370 375
 Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val His Ala Asp Pro
 380 385 390 395

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 30

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(A) ДЛИНА 719

(B) ТИП нуклеиновая кислота

(C) Одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

30

GGCTGTTTGA GAGGCGCCG GCGAGGAGGA GCGAGGCGCA GAGGCGCTGC 50
 GATTTCGTG GCGTACGTC GCTACGCTG GAGGCGCTG GCTGCGTCGG 100
 GAGGCGGACA ATGAGCGGGG GAGTGCCTTT TAGGCACTTG CTTCTGCTGC 150
 TGCACTGGCG GCTGCTGCCA GCGGCGCTTC AGGGAACCAA ACTGCTGCTG 200
 GCGAAAGAG GCGATGCTGT GGAAGTGGCC TGTACAGCTT CCGGAGAGAA 250
 GAGCATACAA TTGCACTGGA AAACTGCGAA GCGATAGAG ATTCTGGGAA 300
 ATGCGGCTCG CTCTTAACT AAAGTGCAT GCGAGCTGAA TGATCGGCTT 350
 GACTCAAGAA GAGGCTTTG GCGGCGAGGA AACTTCGCCC TGATCTCTCA 400
 GATTCTTAG ATAGAGACT GCGAGACTTA CATCTGTGAA GTGAGAGACC 450
 AGAGGAGGA GGTGCAATG CTAGCTTTC GATTACCTGC CAACTCTGAC 500
 AGCGACTGCG TTGAGGGGGA GAGCTGAGC GTGAGCTTGG AGAGCGCGCC 550
 TGCTATGAGC GCTGCTGCGC AACTGAGGAG TCGAGCGGCT AAAAGCATAC 600
 AGCGGCGGGA GAGGCTGCGC GTCTCTGAGC TCGAGCTGCA GATAGTGGC 650
 AACTGAGCAT GCACTCTCTT GCGAGGCGAG AGAGAGCTGG AGTTCAGAAAT 700
 AGCATCTGTC GTGCTAGCTT TCGAGAGGCG GTGAGGAGTA GTCTCTGAAA 750
 AGCAGCGGGA ACGAGTGGAG TTGCTCTTTC GACTGCTGTT TACGCTTGAA 800
 AAGCTGAGTC GCACTGCGGA GCTCTGCGCG GAGGCGGAAA GCGGCTGCTC 850
 CTGAGAGCTT TGAGTACCTT TTGAGCTGAA GAGCAGGAAA GTCTCTGAAA 900
 AAGCGGTAC GCGAGGCTCT AACTCTGCGA TGCGGAGGAA GCTGCGGCTC 950
 GAGCTGAGCC TGCGGCGGCG GTTCTGCTAG TATGCTGCTG CTGGAAGCTT 1000
 GAGGCTGCGC GTTGAAGGGA AAGCAGGAAA GTTCTGCTAG GAGTGAAGCC 1050
 TGCTGTGAGT GAGAGGACT GAGTGCAGAA AAAATTGAGC GTGAGGCTG 1100
 TGCGGCGGCA GTTCTGCTAG GTGAGGCTG AGTCTGAAGC TGAGAGGAAA 1150
 GCGAGGAGAG GTTCTGAGAG GCGAGAGGCG GTTCTGCTGCT GTGAGGCTG 1200
 ACGCGGCTAC GTGAGGCTG GTGAGGCTG AGTCTGCTGCA GTTCTGCTGCT 1250
 GATGCGGAAA TCGAGGCTG GAGGAGTGG TCGAGGCGCG TGCGGCGGAA 1300
 TCGC 1304

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 31

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 203
(B) ТИП аминокислота
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ аминокислота
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

31

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

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 32

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 768
(B) ТИП нуклеиновая кислота
(C) Одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

32

```
CTACGACAG AGCAATCTT GTGACAAAC TACGACATCC CCAAGCTCCC
50
CAGCAGCTCA ACTCTCTGGG GAGGCTGAG TCTCTCTCTT CCCCCAATA
100
CCCAAGACCA CCGCTATGAT CTCCCGACC CTCGAGCTCA CATCTCTGCT
150
CTGCACTGT ACCGACAGG AGCTCTAGCT CAGCTTCAAC TGTATCTAG
200
AGGCGCTGCA CTCGATATAT CCGACAGCA AGCGCGGCA GAGCAGTAC
250
AAGACAGCT AGCGGTAT CTGCTCTG CCGCTCTCC AGCGGACTG
300
GCTGAATGCC AAGGACTACA ATCTCAGCT CTCACAAA CCGCTCCAG
350
CCCGATCA GAAAGCATC TCGAAAGCC AAGGCGGCG CCGAAACCA
400
CACTCTTCA CCGTCCCGG ATCGCGGAT GAGTACCA AAGAGAGCT
450
CAGCTCAGC TCGCTGCTA AAGCTCTGA TCGACCGAC ATCGCTTGA
500
ATGCGAGAG CAGTGGGCA CCGGAGACA ACTAGAGAG CAGCGCTCC
550
CTCTGAGCT CCGAGAGCC CTCTCTGTC TACGACAGC TCGCTGCGA
600
CAGAGCAGG TCGACAGAG CAAAGCTTT CTCTCTCTC GTATGCTAG
650
AGGCTCTCA CAGAGTAC AGCGAGACA CCGCTGCTT CTCTCTGCG
700
CTGAGCTCC ACGAGAGCT TCTGAGGCG CAGGAGGCG AGCTGAGCG
750
CTCTGAGCG AGGATCC
768
```

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 33

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 254
(B) ТИП аминокислота
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ аминокислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 33

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

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 34

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 174
(B) ТИП нуклеиновая кислота
(C) Одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ нуклеиновая кислота
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

34

```
CCAGCGGCT CTGCGCTGCG TCGCGGACCG AAGGCTGCG CCGTCTCTGA
50
CGCGGAGACA GGTCTGCGCG TCGCTGACCG CCGAGAGGCG TCTGCGCTCC
100
CTCGCGGCT GCGCTGATC TCTCTCTGCG TCGGCTGCG CCGAGAGCTG
150
CGCTCTCTCC TCGCGGAG CGCT
174
```

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 35:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 58
(B) ТИП: аминокислота
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: аминокислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 35:

```
Pro Arg Ala Ser Ala Leu Pro Ala Pro Pro Thr Gly Ser Ala Leu Pro
1 5 10 15
Asp Pro Gln Thr Ala Ser Ala Leu Pro Asp Pro Pro Ala Ala Ser Ala
20 25 30
Leu Pro Ala Ala Leu Ala Val Ile Ser Phe Leu Leu Gly Leu Gly Leu
35 40 45
Gly Val Ala Cys Val Leu Ala Arg Thr Arg
50 55
```

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 36:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 345
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) Одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 36:

```
AGGCTTTCA CAGAGAGCG AAGCGCGCG CCGTACAGC AGGCGAGAA
50
CGGCTCTAT AAGAGCTCA ATGAGAGCG AAGAGAGAG TACGATCTT
100
TGGAGAGAG AGTGGCGCG GAGCTTGGA TCGCGGAAA CCGAGAGAG
150
AAGAGCTTC AAGAGAGCT GTACATGAA CTCAGAGAG ATAGATGCG
200
```

GGAGGCGCTAC AGTGGAGATTG GCGATGAAAGG GCGAGCGCGCG AGCGGCGAGAG 250
 GCGAGCGATGG OCTTTAGGAG OCTGTGAGTA GCGCGAGCGA GCGAGCGCTAC 300
 GAGCGCGATTG ACATGCGGGG CCGCGCGCGCT OCTAGAGCG GCGCG 345

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 37

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 111
 (B) ТИП аминокислота
 (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ аминокислота
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

37

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

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№38

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 16 аминокислот
 (B) ТИП аминокислота
 (C) Вид цепочки не существует
 (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

38

Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly
 1 5 10 15

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 39

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 19 аминокислот
 (B) ТИП аминокислота
 (C) Вид цепочки не существует
 (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

39

Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val His Ala Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu
 1 5 10 15

Leu Asp Gly

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 40

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 12 аминокислот
 (B) ТИП аминокислота
 (C) Вид цепочки не существует
 (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

40

Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala
 1 5 10

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 41

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 19 аминокислот
 (B) ТИП аминокислота
 (C) Вид цепочки не существует

- (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

41

Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val His Ala Asp Pro Gln Leu Cys Tyr Ile
 1 5 10 15

Leu Asp Ala

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 42

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 16 аминокислот
 (B) ТИП аминокислота
 (C) Вид цепочки не существует
 (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

42

Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly
 1 5 10 15

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 43

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 16 аминокислот
 (B) ТИП аминокислота
 (C) Вид цепочки не существует
 (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

43

Phe Ser Pro Pro Gly Ala Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly
 1 5 10 15

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 44

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 142 аминокислоты
 (B) ТИП аминокислота
 (C) Вид цепочки не существует
 (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

44

Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly
 1 5 10 15

Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val
 20 25 30

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 35 40 45

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 50 55 60

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 65 70 75 80

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 85 90 95

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 100 105 110

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 115 120 125

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 130 135 140

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 45

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 35 аминокислот
 (B) ТИП аминокислота
 (C) Вид цепочки не существует
 (D) ТОПОЛОГИЯ линейная
 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

45

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu
35

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 46

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 32 аминокислоты
(B) ТИП аминокислота
(C) Вид цепочки не существует
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

46

Lys Lys Leu Val Lys Lys Phe Arg Gln Lys Lys Gln Arg Gln Asn Gln
1 5 10 15
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
20 25 30

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 47

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 35 аминокислот
(B) ТИП аминокислота
(C) Вид цепочки не существует
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

47

Arg Thr Gln Ile Lys Lys Leu Cys Ser Trp Arg Asp Lys Asn Ser Ala
1 5 10 15
Ala Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu
35

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 48

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 35 аминокислот
(B) ТИП аминокислота
(C) Вид цепочки не существует
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 48

Arg Thr Arg Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu
35

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 49

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 36 аминокислот
(B) ТИП аминокислота
(C) Вид цепочки не существует
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

49

Arg Thr Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
1 5 10 15
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
20 25 30
Tyr Ser Glu Ile
35

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 50

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 38 аминокислот
(B) ТИП аминокислота
(C) Вид цепочки не существует
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

50

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

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 51

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- (A) ДЛИНА 63 пары оснований
(B) ТИП нуклеиновая кислота
(C) Одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ ДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 51

CGATCCGAG CGGAGCTAA AGCGGAGAG CGGAGAGCGG AGGCTAGAG CGGAGAGAGT 60
CTG 63

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№ 52

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

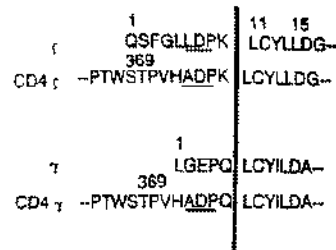
- (A) ДЛИНА 20 аминокислот
(B) ТИП аминокислота
(C) Вид цепочки не существует
(D) ТОПОЛОГИЯ линейная
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ белок

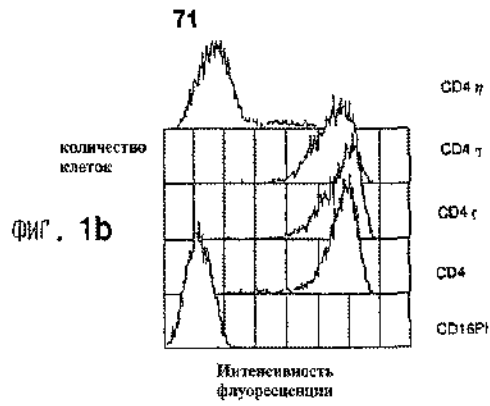
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ №

52

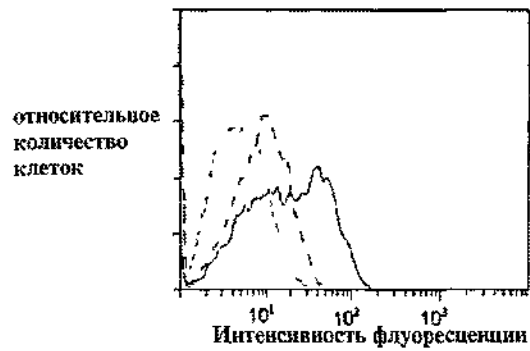
Asp Pro Lys Ala Glu Ala Lys Ala Glu Ala Lys Ala Glu Ala Lys Ala
1 5 10 15
Glu Ala Asp Leu
20

ФИГ. 1а

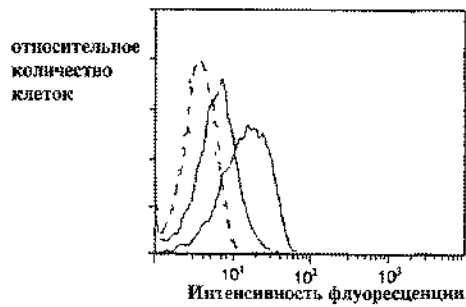




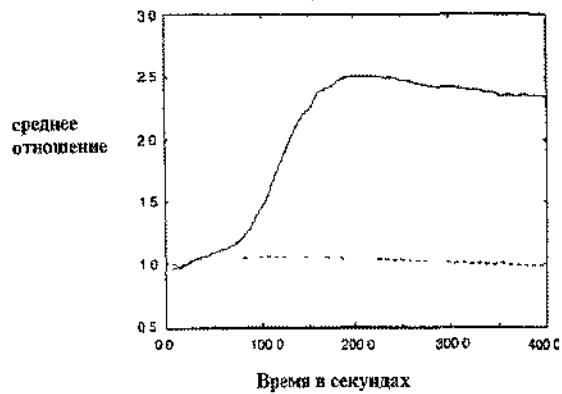
ФИГ. 2



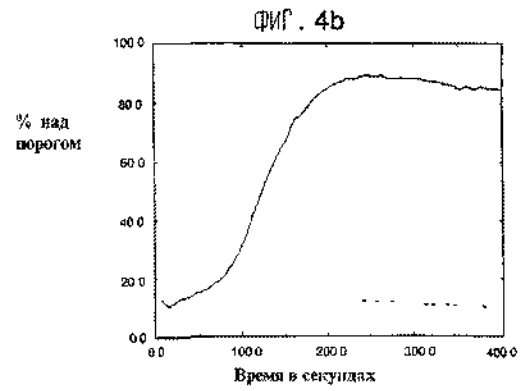
ФИГ. 3



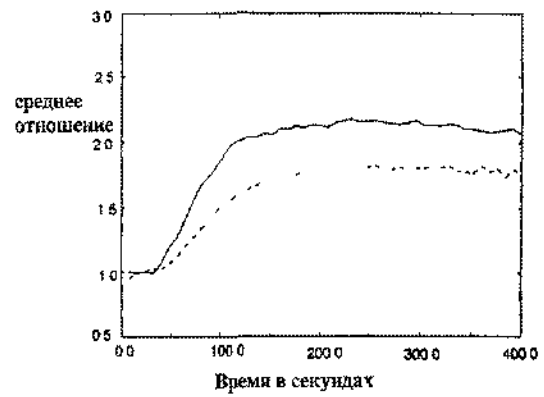
ФИГ. 4a



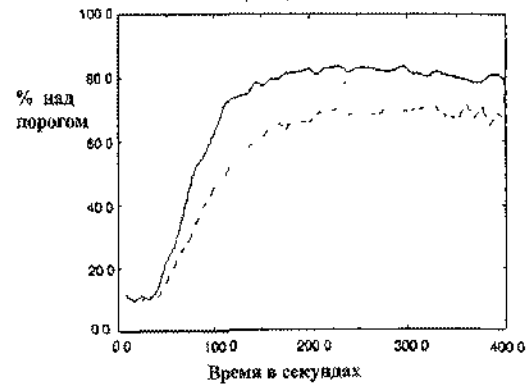
72



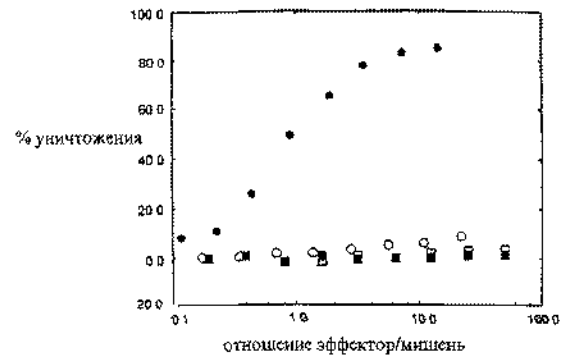
ФИГ. 4c



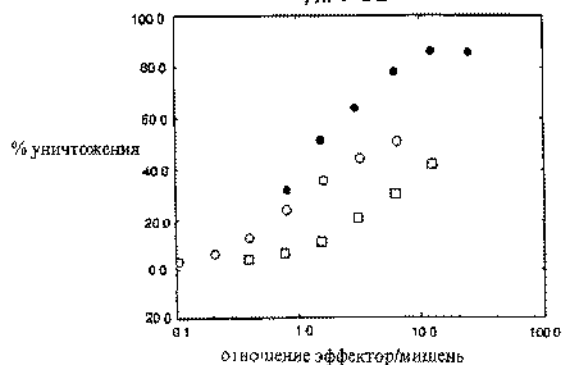
ФИГ. 4d



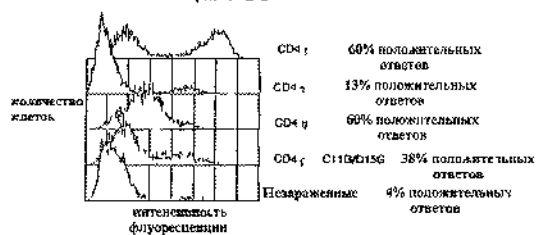
ФИГ. 5a



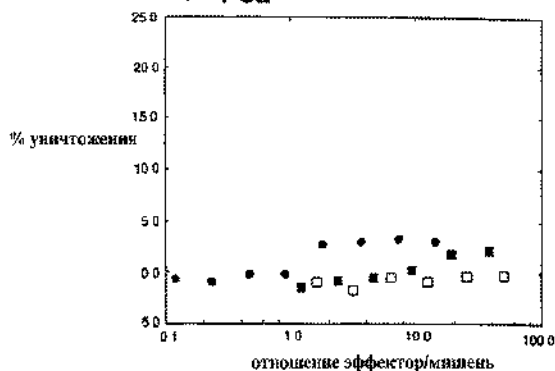
ФИГ. 5b



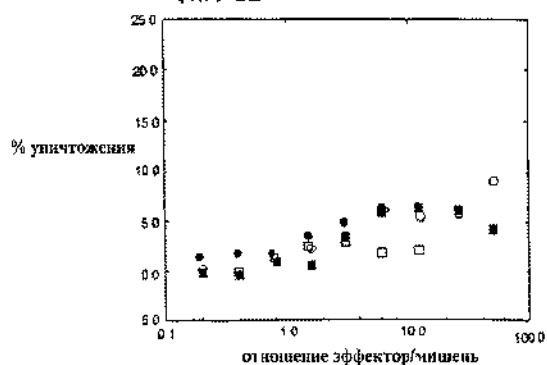
ФИГ. 5c



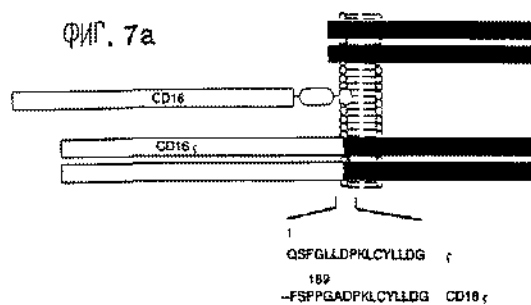
ФИГ. 6a



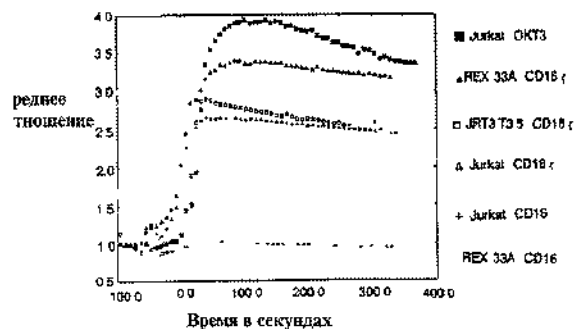
ФИГ. 6b



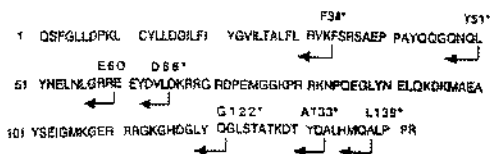
ФИГ. 7a



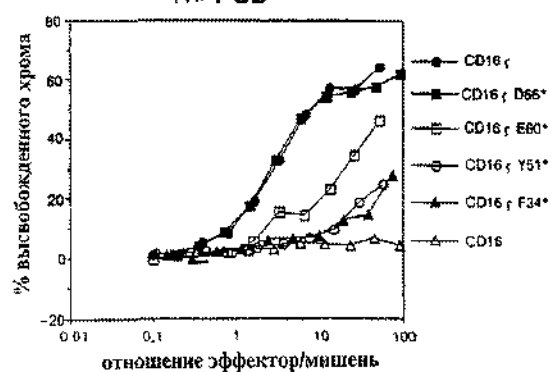
ФИГ. 7b

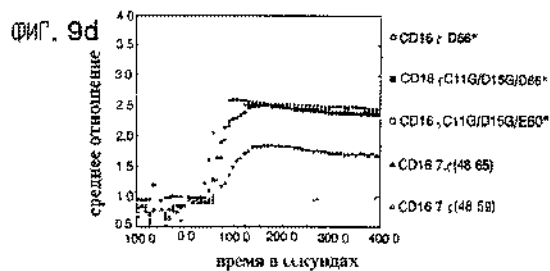
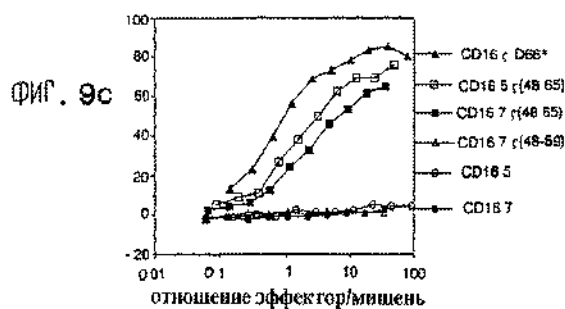
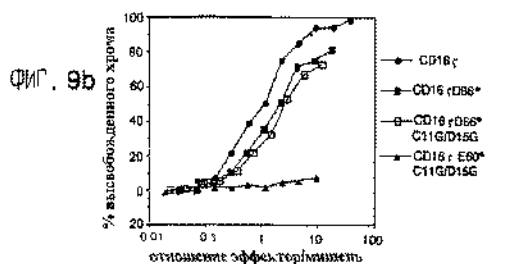
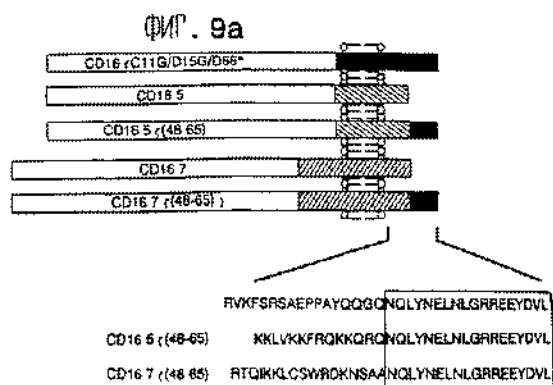


ФИГ. 8a

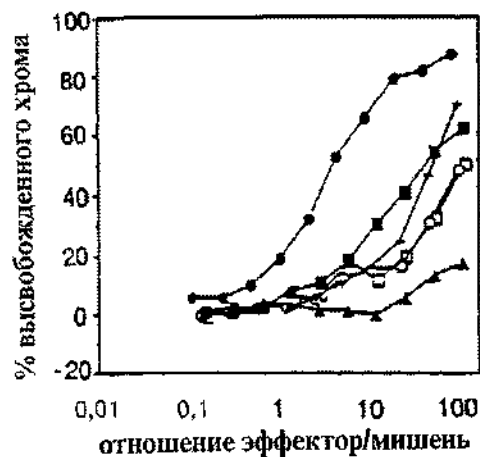


ФИГ. 8b

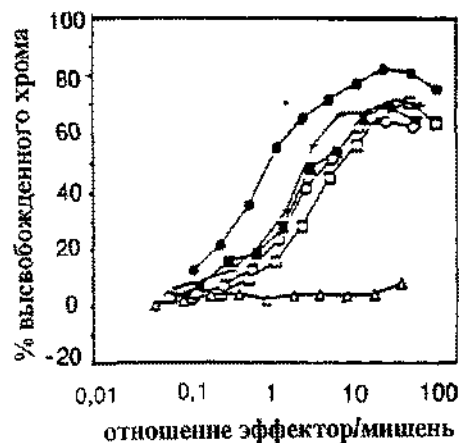




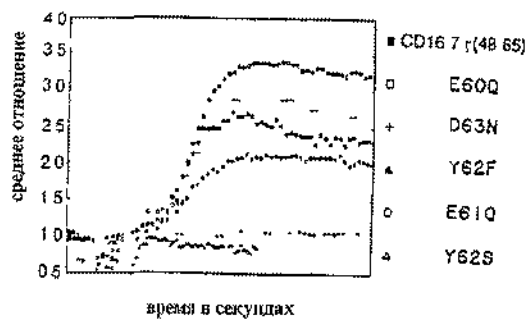
ФИГ. 10a



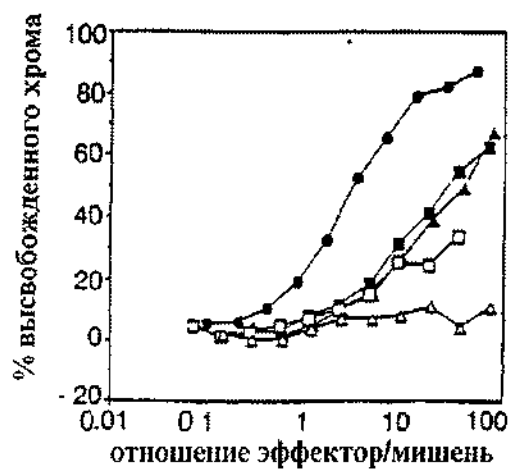
ФИГ. 10b



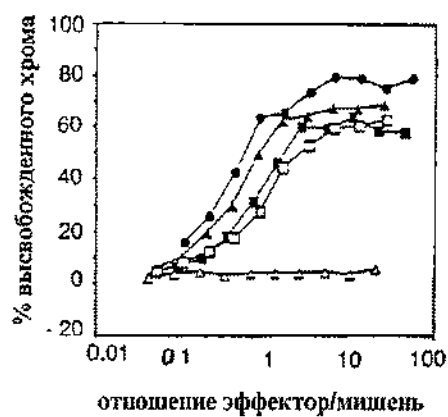
ФИГ. 10c



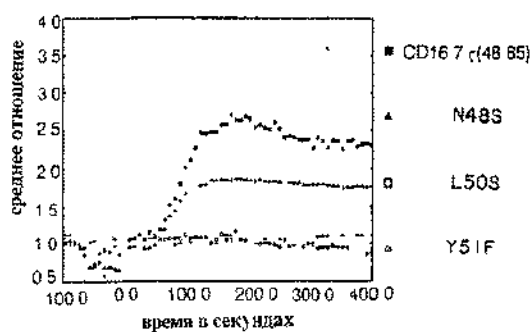
ФИГ. 10d



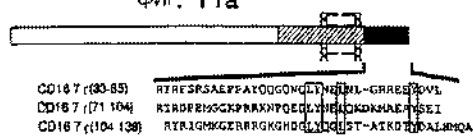
ФИГ. 10e



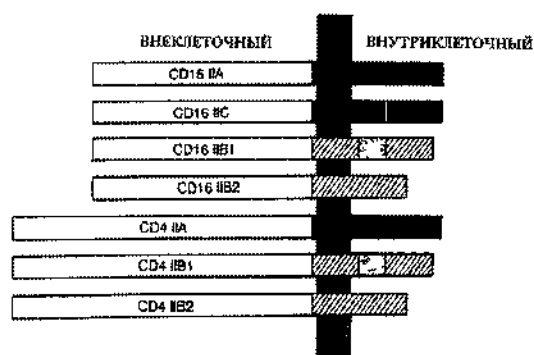
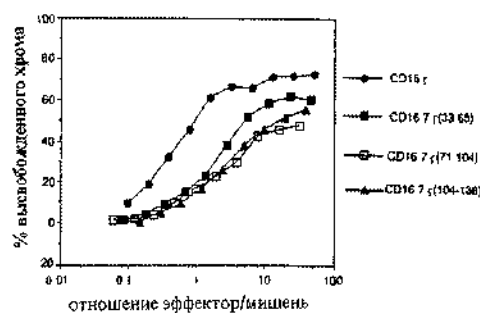
ФИГ. 10f



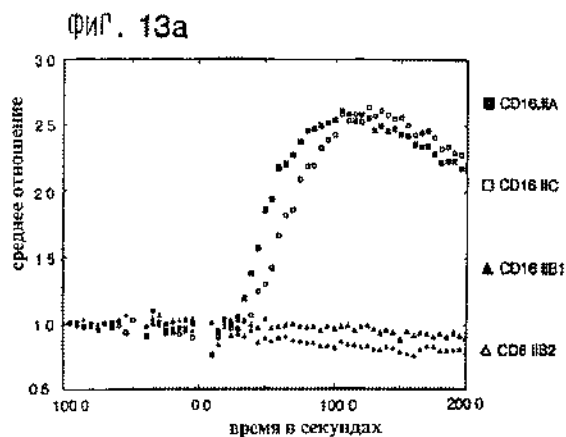
ФИГ. 11a



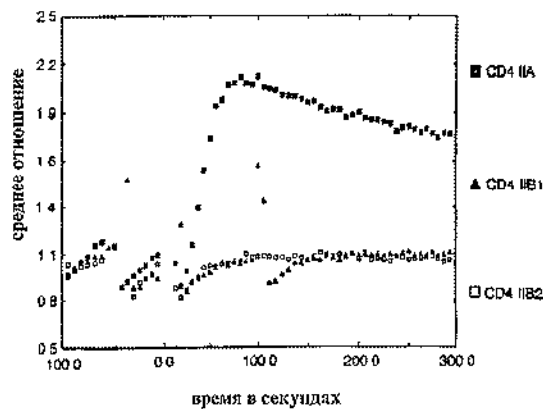
ФИГ. 11b



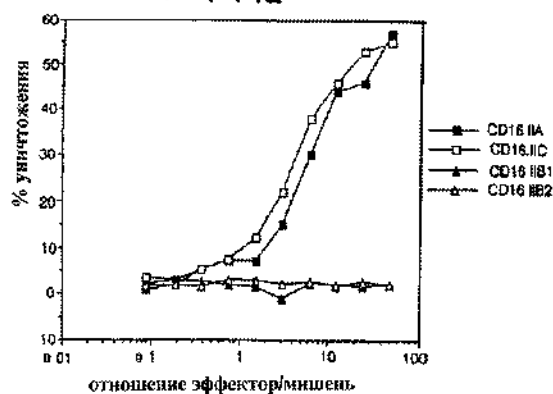
ФИГ. 12



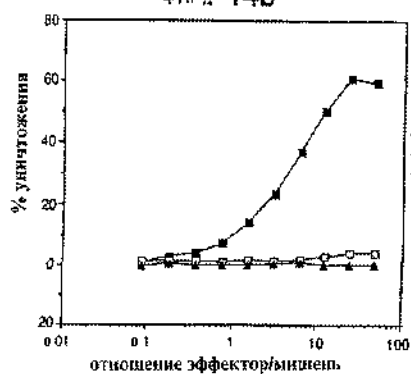
ФИГ. 13b



ФИГ. 14а

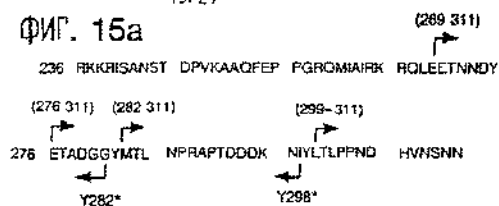


ФИГ. 14b

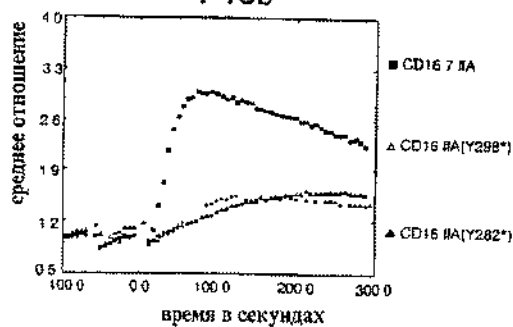


19/27

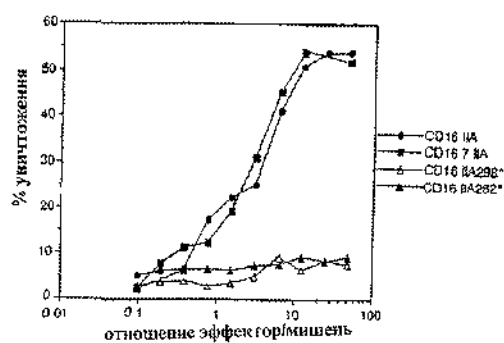
ФИГ. 15а



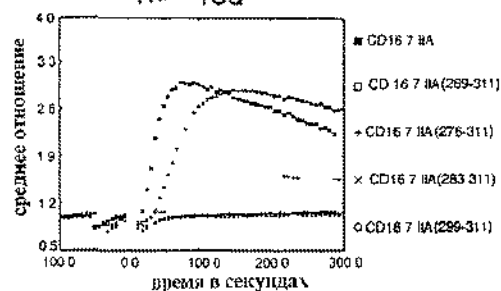
. 15b



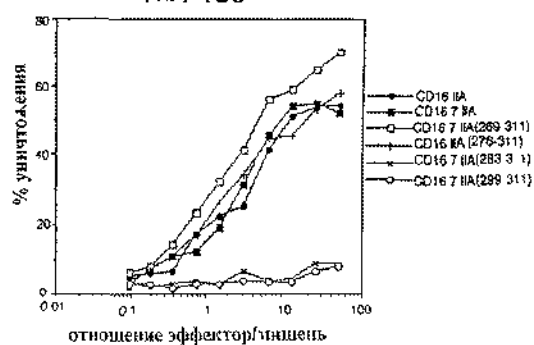
ФИГ. 15с



ФИГ. 15d



ФИГ. 15е



ФИГ. 16 (последовательность № 24)

1 MEHSTFLSGL VLATLLSQVS PFKIPFELLE DRVFVNCNTS ITNVECTVGT
 51 LLSDTIRLDL GRKILDFRCI YRCNCTDIYK DKESTVQVHY RMCQSCVILD
 101 PATVAGIYVT DVIATLLAL GVPCFACRET QLSGAADTQ ALLRNGGVYQ
 151 PLRDRDRAQV SHLGCVWNRN *

ФИГ. 17 (последовательность № 25)

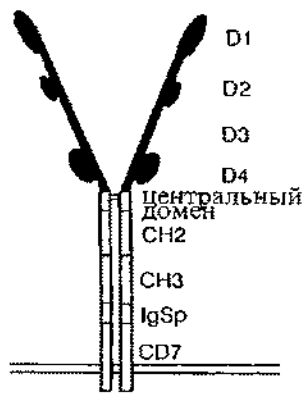
1 MEQCKCLAVL ILAIIILQGT LAOSIKGNHL VFVYDQEDG SVLLTCDAEA
 51 KHITWFDGK NIGFLTEDNK KWHLGSHAKD PRGHYQCKGS QMKEXPLQYV
 101 YRMCCNIEL NAATISGFLF AEIVSIFVLA VGUVFLACQD GVPRGRASLK
 151 QTLFWDQLY QFLDREDDQ YSHLQGNHRL RNN

ФИГ. 18 (последовательность № 26)

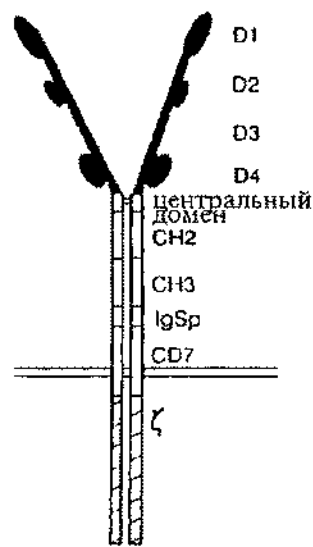
1 MPCCLEALRA LPILLFLSYA CLCPGQCALR VEGCPPSLTV NIGSEARLTC
 51 ENNGRNPHIT WNPGLQSNIT WNPVPLPGQ GTTCQLFFPE VNKATGACTG
 101 CQVIENNILK RSCCTYLVRV NPVPRPFLOH CEGTKRRIIT AEGIILLFCA
 151 VVPETLLFR NWQNERFGV DMEDDYEDFY LYEGNLDDC SMVEDISRL
 201 QCTYQDVGNL NIGDAQLKFP *

ФИГ. 19 (последовательность № 27)

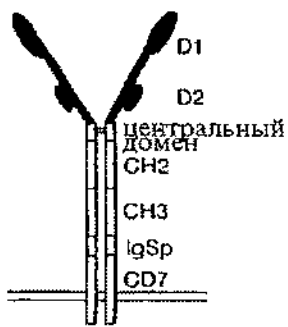
1 MATLVLSMP CHMLFLLL FSGEPVPANT SSDLPINFQ SPSCQIWQHP
 51 RFAAKRSEM VEPHCYTHS GALWFRXRG SQGQQLYSE ESRIVQIQNG
 101 SVYTLTIQMI QYEDNGLYFC KQKCDANHN VTDSCGTELL VLQFSTLDQL
 151 KRNTLKDGI ILIQTLLIIL FIIVPIFLL DMDDGLACME EDHTYEGINT
 201 DDATVYEDIV TLRICEVWS UGEPGQGE



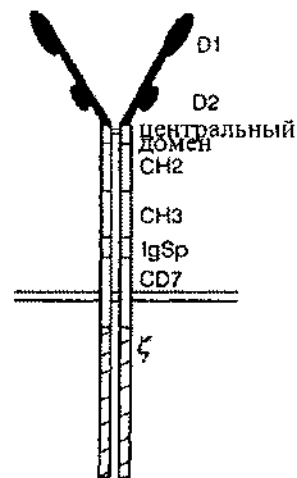
ФИГ. 20a



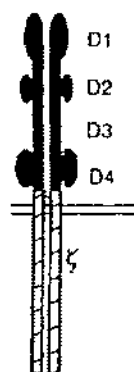
ФИГ. 20c



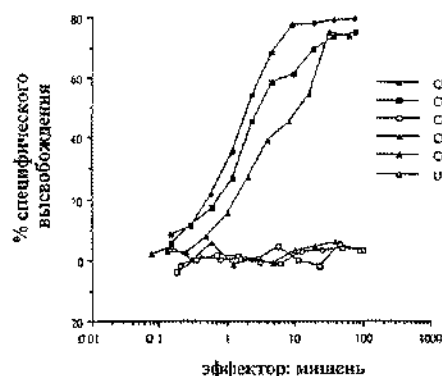
ФИГ. 20b



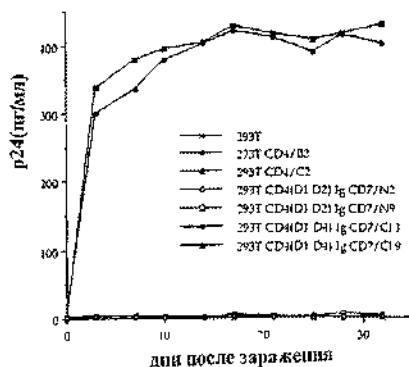
ФИГ. 20d



ФИГ. 20e



ФИГ. 21



ФИГ. 22

D1-D4 на CD4

Последовательность нуклеиновых кислот

GGCTGTTTGA	GAAGCAGCGG	GCAGAGAAAG	GCAGAGCCCA	GAGGCGCTGC	51
CATTCTCTTG	GGCTCAGGTC	CGTACTGGCT	CAGGCGCGTC	CGTCTCTGCG	101
CAAGGCTACA	ATGAAACGGG	GAGTCCCTTT	TAGGCACTTC	CTTCTCTGCG	151
TGCAACTTGC	GGTCTCTCCA	GGAGCGAGTC	AGGGAACCAA	AGTGTGTGTC	201
GCAGAGAAAG	GGAGTCTGCT	GCAGCTGCTC	TGTCCTCTTT	CGCAGAAAG	251
GAAGCTACAA	TTCTACTGCA	AAAGCTCCAA	CGAGTAAAG	ATCTCTGCAA	301
ATGAGCGCTC	CTTCTTAACT	AAAGCTCCAT	CGAGCTGAA	TGATCGCGCT	351
GAATCTAAGA	GAAGCGTTTG	GGAGCAAGGA	AACTTCCGCC	TGATCATCAA	401
GAATCTAAGA	ATAGAGAGCT	CAGATATCTA	CACTCTGAAA	GTGAGAGAGC	451
AGAGGAGAGA	GGTGCATTTG	CTAGTCTTCC	GAATGACTGC	CAACTCTGAC	501
AGGAGCTTGC	TTGAGGAGCA	GAGCTGAGCT	CTGACTTTGC	AGAGCGCGCC	551
TGCTACTAGC	GGTCTCTTCC	GAAGCTGAGC	TGAGAGGGGT	AAAGAGCTAC	601
AGGAGGAGAA	GAAGCTCTCT	CTCTCTGAGC	TGAGCTGCA	GAATCTGAGC	651
AGCTCTGAGC	GAAGCTCTCT	GCAGAGAGAG	AGAGAGCTGC	AGCTCTCAAA	701
AGAGAGCTCT	GTCTCTGCTT	TGAGAGAGAG	CTGAGAGATA	GTCTCTCAAA	751
AGAGAGGAGA	AGAGCTGAGC	TTCTCTCTCT	CACTCTGCTT	TGATCTGAAA	801
AGCTCTGAGC	GAAGCTGAGC	GGTCTCTGTC	GGAGGAGAGA	GGGCTCTGTC	851
CTGAGAGCTCT	TGAGCTGAGC	TTCTCTGAGC	GAAGAGAGAA	GGTCTCTGAA	901
AGCTCTGAGC	GGAGAGAGCT	AGCTCTGAGC	TGAGAGAGAA	GGTCTCTGAA	951
CACTCTGAGC	TGAGAGAGCT	CTTCTCTGAG	TGATCTGAGC	CTGAGAGAGC	1001
CACTCTGAGC	CTTCTCTGAG	AAAGAGAGAA	GTCTCTGAGC	GAATCTGAGC	1051
TGAGAGAGCT	GGAGAGAGCT	CACTCTGAGC	AAAGAGAGAA	GTCTCTGAGC	1101
TGAGAGAGCT	CTTCTCTGAG	GGTCTCTGAG	AGCTCTGAGC	TGAGAGAGAA	1151
GAAGAGAGAG	GTCTCTGAGC	GGAGAGAGCT	GGTCTCTGAG	CTGAGAGAGC	1201
AGCTCTGAGC	CTGAGAGAGC	AGCTCTGAGC	CTGAGAGAGC	AGCTCTGAGC	1251
GAAGAGAGCT	TGAGAGAGCT	GGAGAGAGCT	TGAGAGAGCT	TGAGAGAGCT	1301

Аминокислотная последовательность

MRGVRFFNL	LVVLQALLP	AAAGGKVVV	GGGKVVVLT	CFAGKVVLT	51
MRGVRFFNL	LVVLQALLP	AAAGGKVVV	GGGKVVVLT	CFAGKVVLT	101
YEDDTYICE	VEDQKIEVQL	LVVLQALLP	GGGKVVVLT	CFAGKVVLT	151
PSVQCRPRG	KNIQGGKTL	VSLQGLQGG	TWCTVLIQD	KVETKIDIV	201
VLAQGRSSSI	VYKGGKVE	FSFLPVE	KVETKIDIV	CFAGKVVLT	251
WTFDLKQKE	VYKGGKVE	KVETKIDIV	KVETKIDIV	CFAGKVVLT	301
LEAKTKIKL	KVETKIDIV	KVETKIDIV	KVETKIDIV	CFAGKVVLT	351
VSKRERFVNL	LVEAGHMC	LLSDGGVLL	ESNKKVLPW	STPMADP	401

(Последовательность # 29)

ФИГ. 23

D1-D2 на CD4

Последовательность нуклеиновых кислот

GGCTGTTTGA	GAAGCAGCGG	GCAGAGAAAG	GCAGAGCCCA	GAGGCGCTGC	51
CATTCTCTTG	GGCTCAGGTC	CGTACTGGCT	CAGGCGCGTC	CGTCTCTGCG	101
CAAGGCTACA	ATGAAACGGG	GAGTCCCTTT	TAGGCACTTC	CTTCTCTGCG	151
TGCAACTTGC	GGTCTCTCCA	GGAGCGAGTC	AGGGAACCAA	AGTGTGTGTC	201
GCAGAGAAAG	GGAGTCTGCT	GCAGCTGCTC	TGTCCTCTTT	CGCAGAAAG	251
GAAGCTACAA	TTCTACTGCA	AAAGCTCCAA	CGAGTAAAG	ATCTCTGCAA	301
ATGAGCGCTC	CTTCTTAACT	AAAGCTCCAT	CGAGCTGAA	TGATCGCGCT	351
GAATCTAAGA	GAAGCGTTTG	GGAGCAAGGA	AACTTCCGCC	TGATCATCAA	401
GAATCTAAGA	ATAGAGAGCT	CAGATATCTA	CACTCTGAAA	GTGAGAGAGC	451
AGAGGAGAGA	GGTGCATTTG	CTAGTCTTCC	GAATGACTGC	CAACTCTGAC	501
AGGAGCTTGC	TTGAGGAGCA	GAGCTGAGCT	CTGACTTTGC	AGAGCGCGCC	551
TGCTACTAGC	GGTCTCTTCC	GAAGCTGAGC	TGAGAGGGGT	AAAGAGCTAC	601
AGGAGGAGAA	GAAGCTCTCT	CTCTCTGAGC	TGAGCTGCA	GAATCTGAGC	651
AGCTCTGAGC	GAAGCTCTCT	GCAGAGAGAG	AGAGAGCTGC	AGCTCTCAAA	701
AGAGAGCTCT	GTCTCTGCTT	TGAGAGAGAG	CTGAGAGATA	GTCTCTCAAA	751

Аминокислотная последовательность

MRGVRFFNL	LVVLQALLP	AAAGGKVVV	GGGKVVVLT	CFAGKVVLT	51
MRGVRFFNL	LVVLQALLP	AAAGGKVVV	GGGKVVVLT	CFAGKVVLT	101
YEDDTYICE	VEDQKIEVQL	LVVLQALLP	GGGKVVVLT	CFAGKVVLT	151
PSVQCRPRG	KNIQGGKTL	VSLQGLQGG	TWCTVLIQD	KVETKIDIV	201

(Последовательность # 31)

ФИГ. 24

Центральный домен и домены CH2, CH3 IgG человека

Последовательность нуклеиновых кислот

GTCTACAGAG	CGGAAAGCTT	CTGCAAGAAC	TGAGAGAGTC	CGAGCTGAGC	51
CAAGAGCTGA	AGCTCTGAGC	GGAGCTGAGC	CTTCTCTGCT	CGGAGAGAGC	101
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	151
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	201
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	251
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	301
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	351
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	401
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	451
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	501
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	551
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	601
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	651
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	701
CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	CGGAGAGAGC	751

Аминокислотная последовательность

EPKSCDKTHT	CFPAPAEELL	GGPSVPLFP	KPKDLMISR	TFEVCVVVD	51
YEDDTYICE	VEDQKIEVQL	LVVLQALLP	GGGKVVVLT	CFAGKVVLT	101
YEDDTYICE	VEDQKIEVQL	LVVLQALLP	GGGKVVVLT	CFAGKVVLT	151
YEDDTYICE	VEDQKIEVQL	LVVLQALLP	GGGKVVVLT	CFAGKVVLT	201

(Последовательность # 33)

ФИГ. 25

Трансмембранный домен CD1

Последовательность нуклеотидных кислот

CCAGGGGCGT CCGGGCTGGC TGGGGGAGG AGAGGGGCGG GCGTGGTGA 51
 CCGGAGACA GCGTGTGGC TGGGTAGGC GCGAGGAGG TGTGGGGTC 101
 CCGGGGCGT GCGGTGATC TCGTCTGTC TGGGGGAGG CCGGGGGTG 151
 GCGTGTGTC TGGGGAGGAC GGT (Последовательность № 34)

Аминокислотная последовательность

PRASALFPP TGSALPDPQF ASALPDPPLA SALPAALAVI SPLGLGLGV 51
 ACVLARTH (Последовательность № 35)

Фиг. 26

Внутриклеточный домен дна

Последовательность нуклеотидных кислот

ACGCTTTTCA GCGAGAGCGG AGAGCGCGCC GCGTACGAGC AGGGCGGAA 51
 CCGCTGTGAT AACGAGTCA CTCAGGAGC AAGAGAGGG TACGATGTTT 101
 TGGACAGAG AGCTGGCGCG GACCTGTAGA TGGGGGAAA GCGAGGAGG 151
 AAGAACCTTC AGGAGGCGCT GTACATGAA CTCAGAGAG ATAGAGTGGC 201
 GAGGGCTTAC AGTGACATTG GGTGAAAGG CAGGCGCGG AGGGCGAGG 251
 GGCAGGATGG CGTTACGAG GGTGTAGTA CAGGCCACCA GGCACCTAC 301
 GAGCGCTTTC ACATGGAGCG CTTGGCGCT GCGTAAAGCG GCGC
 (Последовательность № 36)

Аминокислотная последовательность

TRYSSAEFF AYQGGQWLY CHNLGRRZ YGVLEKRRGF DPEGGCKPK 51
 KHFQGLYNE LGNDHARAY SLGNKGERR RKGNHMLIQ GLSLATKDTY 101
 DALMAGALFF R (Последовательность № 37)

Фиг. 27

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сім'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71