РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 513 697**(13) **C2**

(51) МПК
C07K 16/22 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2010122044/10, 27.10.2008**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.10.2008

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
02.11.2007 EP 07119847.7;
02.11.2007 US 61/001,741

(43) Дата публикации заявки: **10.12.2011** Бюл. № **34**

(45) Опубликовано: **20.04.2014** Бюл. № **11**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 2005/028508 A2, 31.03.2005. DATABASE:GenBank,CAD19962.1,01.01.2002 &. Annett M Jacobi, et al., "Analysis of immunoglobulin light chain rearrangements in the salivary gland and blood of a patient with Sjogrens syndrome", Available online http://arthritis-research.com/4/4/R4. CN 1429845 A, 16.07.2003. RU 2004103555 A, 20.07.2005. Yun** (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **02.06.2010**

(86) Заявка PCT:
EP 2008/064501 (27.10.2008)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2009/056509 (07.05.2009)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):
Кармен БЭРСКЕ (DE),
Штефан ФРЕНТЦЕЛЬ (DE),
Анис Кхурсо МИР (FR),
Мартин Э. ШВАБ (CH),
Алессандра ВИТАЛИТИ (CH)

(73) Патентообладатель(и):
НОВАРТИС АГ (CH),
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ЦЮРИХ (CH)

RU 2513697 C2

(54) УЛУЧШЕННЫЕ МОЛЕКУЛЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С NOGO-A И ИХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области иммунологии и медицины. Представлено антитело для восстановления центральной нервной системы, содержащее антиген-связывающий участок, который специфично связывается с полипептидом Nogo A человека или NiG человека (SEQ ID NO: 2 и 3, соответственно, приведенные в описании), где указанный антиген-связывающий участок содержит: CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO:8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO:9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO:10); и CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO:11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO:12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID

NO:13). Кроме того, описаны полинуклеотид, кодирующий указанное антитело; вектор экспрессии, содержащий указанный полинуклеотид; и клетка-хозяин, выбранная из бактерии, дрожжей или линии клеток млекопитающих, содержащей миелому, гибридому или иммортализованную В-клетку, для получения антитела по настоящему изобретению. Также описана фармацевтическая композиция для восстановления ЦНС, содержащая эффективное количество указанного антитела в смеси по меньшей мере с одним приемлемым носителем или разбавителем. Предложен способ получения указанного антитела, включающий экспрессию полинуклеотида или вектора в клетке-хозяине. Описано применение полинуклеотида, вектора экспрессии или клетки-хозяина для получения указанной фармацевтической композиции. Изобретение позволяет получить антитело против Nogo A или NiG человека, эффективное при лечении повреждений ЦНС. 10 н. и 6 з.п. ф-лы, 11 ил., 9 пр.

(56) (продолжение):
Zhang, William M. Pardridge, "Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood-brain barrier", Journal of Neuroimmunology, 114, 2001, pp. 168-172

RU 2513697 C2

RU 2513697 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 513 697** (13) **C2**

(51) Int. Cl.
C07K 16/22 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2010122044/10, 27.10.2008**

(24) Effective date for property rights:
27.10.2008

Priority:
(30) Convention priority:
02.11.2007 EP 07119847.7;
02.11.2007 US 61/001,741

(43) Application published: **10.12.2011** Bull. № **34**

(45) Date of publication: **20.04.2014** Bull. № **11**

(85) Commencement of national phase: **02.06.2010**

(86) PCT application:
EP 2008/064501 (27.10.2008)

(87) PCT publication:
WO 2009/056509 (07.05.2009)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj

(72) Inventor(s):
Karmen BEhRSKE (DE),
Shtefan FRENTTsEL' (DE),
Anis Kkhurso MIR (FR),
Martin Eh. ShVAB (CH),
Alessandra VITALITI (CH)

(73) Proprietor(s):
NOVARTIS AG (CH),
JuNIVERSITI OF TsJuRIKh (CH)

RU 2513697 C2

(54) IMPROVED NOGO-A-BINDING MOLECULES AND PHARMACEUTICAL APPLICATION THEREOF

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention refers immunology and medicine. What is presented is an antibody for the recovery of the central nervous system, comprising an antigen-binding site that specifically binds to human Nogo A polypeptide or human NiG described by (SEQ ID NO: 2 and 3, respectively, presented in the description), wherein the antigen-binding site comprises: CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO:8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) and CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO:10); and CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO:11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO:12) and CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO:13). There are also described a polynucleotide coding the above antibody; an expression vector comprising the above polynucleotide; and a host cell specified in bacterium, yeast or mammalian cell line comprising myeloma, hybridoma, or immortalised B-cell for producing the antibody according to the present invention. A pharmaceutical composition for the CNS recovery comprising an effective amount of the above antibody mixed with at least one acceptable carrier or solvent is also described. Using the polynucleotide, the expression vector or the host cell for the above pharmaceutical composition is also described. The invention enables producing the human Nogo A or NiG antibody effective in treating CNS injuries.

EFFECT: what is presented is a method for producing the above antibody involving the polynucleotide or vector expression in the host cell.

16 cl, 11 dwg, 9 ex

RU 2513697 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к улучшенным молекулам, связывающимися с Nogo-A, таким, например, как моноклональные антитела, их производные или Fab-фрагменты.

Предпосылки создания изобретения

Регенерация нейронов после травмы центральной нервной системы (ЦНС) взрослых носит ограниченный характер из-за присутствия ингибирующего миелинового слоя, который составляет оболочку аксонов, и образования рубцовой ткани. За последние пять лет достигнуты значительные успехи в исследовании молекулярных основ неспособности ЦНС к самопроизвольной регенерации после травмы. Главным препятствием на пути регенерации аксона, прежде всего непосредственно после травмы, является присутствие ингибиторов в миелине. В настоящее время установлено, что эффективными ингибиторами роста невритов являются Nogo-A, миелин-ассоциированный гликопротеин (МАГ) и миелин-олигодендтроцит-ассоциированный гликопротеин (ОМГП). Кроме того, в миелине присутствуют также другие ингибирующие компоненты, такие как хондроитинсульфатпротеогликаны. Nogo-A является членом семейства белков ретикулина и содержит по меньшей мере два биологически активных и фармакологически различных домена, обозначаемых амино-Nogo и Nogo-66. Хотя рецепторный участок первого домена пока неизвестен, установлено, что Nogo-66 подавляет рост нейронов in vitro и in vivo, воздействуя на нейронный рецептор NgR. Кроме Nogo-66 МАГ и ОМГП связываются также с NgR с высокой аффинностью и подавляют рост невритов.

Исследуются также новые подходы для усиления регенерации невритов, которые включают деградацию рубцовой ткани с использованием фермента хондроитиназы ABC, методики сшивания с использованием нейросенсорных (обонятельных) клеток и стволовых клеток, а также белковых ростовых факторов для стимулирования роста нейронов. Блокирующее действие на рост невритов создается благодаря модуляции внутриклеточных медиаторов передачи сигнала, таких как Rho, мембранная гуанозинтрифосфатаза (ГТФаза), которая является ключевым звеном в ингибировании роста аксонов. Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) может действовать в обход миелин-ассоциированного ингибирования in vitro и индуцировать регенерацию in vivo. Для индуцирования регенерации нейронов и функционального восстановления на модели крыс после повреждения спинного мозга можно использовать пептидный ингибитор рецептора NgR (NEP 1-40).

Наряду с использованием вышеописанных подходов много внимания уделяется также применению некоторых моноклональных антител для нейтрализации соединений, подавляющих рост невритов в центральной и периферической нервной системе, прежде всего нейтрализации ингибирующего действия Nogo-A на рост невритов. Таким образом, установлено, что моноклональные антитела IN-1 или Fab-фрагмент IN-1 индуцируют рост невритов in vitro и усиливают рост и регенерацию in vivo (Schwab M.E. и др., Physiol. Rev., 76, 319-370 (1996)). Альтернативные относительно IN-1 антитела описаны в WO 2004/052932 (11C7-Ab) и WO 2005/028508 (3A6-Ab). После анализа ингибирующего действия на рост невритов различных доменов Nogo-A было выявлено несколько ингибирующих доменов (Chen и др., Nature, 403, 434-439 (2000), GrandPre и др., Nature, 403, 439-444 (2000), Prinjha и др., Nature, 403, 383-384 (2000).

Природные иммуноглобулины или антитела обычно представляют собой Y-образная мультимерная молекула, содержащая антиген-связывающий участок в концевом фрагменте каждого верхнего ответвления. Остальная часть молекулы прежде всего стержень Y-образной структуры выполняет эффекторные функции иммуноглобулинов.

Антитела содержат 2 тяжелых и 2 легких цепи. Тяжелая и легкая цепи включают вариабельный домен и консервативный участок. Антиген-связывающий участок состоит из вариабельного домена тяжелой цепи, ассоциированного с вариабельным доменом легкой цепи. Вариабельные домены тяжелой и легкой цепей характеризуются одинаковой общей структурой. Более конкретно, антиген-связывающие характеристики антител по существу определяются тремя конкретными областями в вариабельном домене тяжелой и легкой цепей, которые называются гипервариабельными участками комплементарности (CDR). Указанные три гипервариабельные области чередуются с четырьмя каркасными участками (FR), которые характеризуются относительно консервативной аминокислотной последовательностью и принимают косвенное участие в связывании с антигеном. CDR образуют петли и располагаются в непосредственной близости к каркасным участкам, которые в основном образуют конформацию β-складчатого листа. CDR тяжелой цепи вместе с CDR легкой цепи главным образом составляют антиген-связывающий участок молекул антител. Состав областей FR или CDR обычно определяют сравнением аминокислотных последовательностей ряда антител, продуцируемых в одном виде животного. Общее правило идентификации областей CDR и FR известно специалистам в данной области и описано в соответствующем вебучастке.

В общем случае, в настоящее время существует необходимость в новых и улучшенных способах индуцирования регенерации нервной ткани после повреждения центральной нервной системы (ЦНС) взрослых.

Краткое изложение сущности изобретения

Изобретение относится к новым моноклональным антителам человека, которые обладают более высокой эффективностью при модулировании активности Nogo-A в экспериментах in vitro и in vivo и оказывают положительное действие на регенерацию невритов при повреждении центральной нервной системы (ЦНС) взрослых. Следовательно, в изобретении предлагаются новые молекулы, связывающиеся с белком Nogo-A или его фрагментами.

В одном варианте изобретения предлагается молекула, содержащая по меньшей мере один антиген-связывающий участок, который специфично связывается с полипептидом Nogo-A человека (SEQ ID NO: 2) или NiG человека (SEQ ID NO: 3), причем указанный антиген-связывающий участок включает:

- гипервариабельные области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где каждая из гипервариабельных областей по меньшей мере на 90% идентична гипервариабельным областям CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), соответственно, и

- гипервариабельные области CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где каждая из гипервариабельных областей по меньшей мере на 90% идентична гипервариабельным областям CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13), соответственно.

В другом варианте антиген-связывающий участок указанной молекулы по изобретению включает:

- гипервариабельные области CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), и

- гипервариабельные области CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13).

В еще одном варианте изобретения предлагаются связывающие молекулы, которые содержат

- по меньшей мере одну тяжелую цепь иммуноглобулина или ее фрагмент, который включает (1) вариабельный домен, включающий гипервариабельные области CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10) и (2) константный сегмент или фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулина человека, и

- по меньшей мере одну легкую цепь иммуноглобулина или ее фрагмент, который включает (1) вариабельный домен, включающий гипервариабельные области CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13) и (2) константный сегмент или фрагмент легкой цепи иммуноглобулина человека.

В другом варианте связывающая молекула по изобретению характеризуется константой диссоциации K_D<1000 нМ.

В альтернативном варианте связывающей молекулы по изобретению константный сегмент или фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулина человека представляет собой тип (γ4), а константный сегмент или фрагмент легкой цепи иммуноглобулина человека представляет собой тип (κ).

В другом варианте связывающая молекула по изобретению представляет собой моноклональные антитела человека или химерные или гуманизированные моноклональные антитела.

В еще одном варианте связывающая молекула по изобретению включает одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, включающей SEQ ID NO: 4 (тяжелая цепь IgG1), SEQ ID NO: 5 (легкая цепь IgG1), SEQ ID NO: 24 (тяжелая цепь IgG4) и SEQ ID NO: 25 (легкая цепь IgG4).

Кроме того, в изобретении также предлагается изолированный полинуклеотид, включающий последовательность, кодирующую связывающую молекулу по изобретению.

В некоторых вариантах указанный изолированный полинуклеотид по изобретению включает:

- по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, или

- по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19.

В других предпочтительных вариантах указанный полинуклеотид по изобретению включает:

- полинуклеотидную последовательность, включающую SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, и

- полинуклеотидную последовательность, включающую SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19.

В еще одном предпочтительном варианте указанный полинуклеотид по изобретению включает:

- полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6 и/или полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, или

- полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 26 и/или полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 28.

Кроме того, в настоящем изобретении также предлагается вектор экспрессии, включающий полинуклеотид по изобретению, указанный выше.

Кроме того, в изобретении предлагается система экспрессии, включающая вектор экспрессии, указанный выше, причем указанная система экспрессии или часть ее способна продуцировать полипептид по изобретению, указанный выше, а указанная система экспрессии или часть ее присутствует в совместимой клетке хозяина.

Кроме того, в настоящем изобретении также предлагается изолированная клетка хозяина, которая включает указанный выше вектор.

Кроме того, в настоящем изобретении также предлагается изолированная композиция, содержащая связывающую молекулу по изобретению и носитель.

Кроме того, в настоящем изобретении также предлагается изолированная композиция, содержащая полинуклеотид по изобретению и носитель.

Кроме того, в настоящем изобретении также предлагается изолированная композиция, содержащая вектор экспрессии по изобретению или клетку хозяина по изобретению.

В изобретение также предлагается способ введения связывающей молекулы по изобретению субъекту, который нуждается в лечении, для лечения заболевания периферической (ПНС) и/или центральной (ЦНС) нервной системы.

В изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая связывающую молекулу по изобретению, полинуклеотид по изобретению, вектор экспрессии или систему экспрессии по изобретению, соответственно, или клетку хозяина по изобретению, в смеси по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем. В одном из вариантов указанная фармацевтическая композиция является композицией с замедленным высвобождением.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается способ лечения заболевания периферической (ПНС) и/или центральной (ЦНС) нервной системы, заключающийся в том, что субъекту, который нуждается в таком лечении, вводят эффективное количество связывающей молекулы по изобретению, полинуклеотид по изобретению, вектор экспрессии или систему экспрессии по изобретению, соответственно, или клетку хозяина по изобретению. В предпочтительном варианте заболевание представляет собой нейродегенеративное заболевание, выбранное из группы, включающей болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз (БАС), патологическую деменцию Леви или другие виды деменции, заболевания после черепной, церебральной или спинномозговой травмы, инсульт и демиелинизирующее заболевание. В другом предпочтительным варианте демиелинизирующее заболевание выбирают из группы, включающей рассеянный склероз, монофазную демиелинизацию, энцефаломиелит, многоочаговую лейкодистрофию, панэнцефалит, болезнь Маркиафавы-Бигнами, демиелинизацию варолиева моста, адренолейкодистрофию, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера, спонгиозную дегенерацию, болезнь Александера, болезнь Канавана, метахроматическую лейкодистрофию и болезнь Краббе.

В другом варианте заболевание представляет собой дегенеративное глазное нарушение, которое может непосредственно или опосредованно включать дегенерацию клеток сетчатки или роговицы. В предпочтительном варианте дегенеративное глазное нарушение представляет собой заболевание, выбранное из группы, включающей ишемические ретинопатии, раннюю ишемическую глазную невропатию, глазной неврит, возрастную дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию, кистозный отек желтого пятна (КОП), пигментозную дистрофию сетчатки, болезнь Штаргардта, желточную макулярную дистрофию (болезнь Беста), врожденный амавроз Лебера и другие виды наследственной дегенерации сетчатки, патологическую близорукость, ретролетальную фиброплазию и наследственную глазную невропатию Лебера, побочные действия после пересадки роговицы или хирургии хрусталика и герпетический кератит. В другом варианте заболевание представляет собой психиатрическое состояние. Предпочтительно указанное психиатрическое состояние выбирают группы, включающей шизофрению и депрессию.

В указанных выше способах лечения введение предпочтительно проводят

интракраниально или интратекально.

Кроме того, в изобретении также предлагается способ получения связывающей молекулы по изобретению, который заключается в том, что проводят экспрессию полинуклеотида по изобретению в составе вектора экспрессии или в системе по изобретению с использованием технологии рекомбинантной ДНК или химического синтеза.

Кроме того, в изобретении предлагается способ введения фармацевтической композиции по изобретению местно в очаг повреждения.

Наконец, в изобретении предлагается способ введения одного или более следующих продуктов, выбранных из группы, включающей связывающую молекулу по изобретению, полинуклеотид по изобретению, вектор экспрессии или систему по изобретению, клетку хозяина по изобретению, в виде комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения при лечении заболевания периферической (ПНС) и/или центральной (ЦНС) нервной системы.

В изобретении также предлагается способ получения связывающей молекулы по изобретению и полинуклеотида, вектора экспрессии молекулы с помощью технологии рекомбинантной ДНК или химического синтеза, кодирующего такую связывающую молекулу.

В настоящем изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, включающая связывающую молекулу, полинуклеотид, вектор экспрессии или систему или клетку хозяина по настоящему изобретению в смеси по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем. Кроме того, предлагаются продукты, содержащие указанные связывающие молекулы, полинуклеотид, вектор экспрессии или систему или указанную клетку хозяина, или его фармакологически приемлемое производное, в виде комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения при лечении заболевания периферической (ПНС) и/или центральной (ЦНС) нервной системы.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается способ лечения заболевания периферической (ПНС) и/или центральной (ЦНС) нервной системы, заключающийся в том, что субъекту, который нуждается в таком лечении, вводят эффективное количество связывающей молекулы, полинуклеотида, вектора экспрессии или системы экспрессии или клетку хозяина.

В настоящем изобретении также приводятся примеры того, что фармакологические композиции и продукты можно использовать для замедленного высвобождения связывающих молекул и/или для местного депонирования связывающей молекулы в очаге поражения.

Краткое описание фигур

Фиг.1

Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO 7) и кодируемая аминокислотная последовательность (SEQ ID NO 5) вариабельных областей легкой цепи антител 6A3-IgG1. Неподчернутый сегмент соответствует лидерному пептиду (SED ID NO 22) и кодирующей его нуклеотидной последовательности (SEQ ID NO 23).

Фиг.2

Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO 6) и кодируемая аминокислотная последовательность (SEQ ID NO 4) вариабельных областей тяжелой цепи антител 6A3-IgG1. Неподчернутый сегмент соответствует пептиду (SED ID NO 20) и кодирующей его нуклеотидной последовательности (SEQ ID NO 21).

Фиг.3

Кодирующие области легкой (SEQ ID NO 28, выше) и тяжелой (SEQ ID NO 26, ниже) вариабельного сегмента 6A3-Ig4.

Фиг.4

Аминокислотные последовательности тяжелой (SEQ ID NO 24, ниже и легкой (SEQ ID NO 25, выше) цепи вариабельного и константного сегмента 6A3-Ig4. Лидерный пептид легкой (SEQ ID NO 31) и тяжелая (SEQ ID NO 30) цепи показан курсивом.

Фиг.5

Верхний ряд: аминокислотная последовательность легкой цепи антител 6A3-IgG1 (SEQ ID NO 5), включающая последовательности лидерного пептида (SEQ ID NO 22) и CDR-L1 (SEQ ID NO 11), CDR-L2 (SEQ ID NO 12) и CDR-L3 (SEQ ID NO 13).

Нижний ряд: аминокислотная последовательность тяжелой цепи антител 6A3-IgG1 (SEQ ID NO 4), включающая последовательности лидерного пептида (SEQ ID NO 20) и CDR-H1 (SEQ ID NO 8), CDR-H2 (SEQ ID NO 9) и CDR-H2 (SEQ ID NO 10).

Фиг.6

ОТ-ПЦР с использованием в качестве матрицы РНК клеток MO3.13 и специфичных праймеров Nogo-A, в результате которой получают определенный фрагмент ДНК, включающий приблизительно 200 по.

Фиг.7

Детектирование иммуноблота иммунопреицпитированного белка Nogo-A из липидной фракции клеток M03:13 с использованием антител 6A3.

После иммунопреципитации (ИП) лизатов клеток MO3.13 и иммунодетектирования антителами 6A3, специфичными в отношении Nogo-A, проявляется одна интенсивная полоса в ожидаемой области ММ (190 кДа) при проявлении антителами 6A3-IgG4 (трек 4) и антителами 11C7-IgG1 (трек 6).

Фиг.8

Fig 8a: Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток M03.13.

Fig 8б: Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток HOG.

Иммунофлуоресцентное окрашивание проницаемых клеток MO3.13 и HOG при обработке 6A3-IgG4 и меченых красителем Alexa-Fluor 488 вторичных антител, специфичных к антителам человека, приводит к интенсивному окрашиванию клеток (Фиг.8a и 8b, слева), в то время как при обработке только вторичными антителами окрашивание фактически отсутствует (справа).

Фиг.9

Концентрации в сыворотке антител 6A3, измеренная у 6 субъектов через 2 месяца.

Фиг.10

Концентрации в СМЖ антител 6A3, измеренная у 6 субъектов через 2 месяца.

Фиг.11

Лечение антителами 6A3 повреждения спинного мозга на модели обезьян улучшает скорость и степень функционального восстановления независимо от размеров повреждения.

Подробное описание изобретения

При разработке новых и улучшенных способов усиления регенерации нейронов после травмы в центральной нервной системе (ЦНС) взрослых в настоящее время неожиданно было установлено, что новые моноклональные антитела человека (6A3), которые продуцируются в HuMab-мышах™ (генетически созданные мыши, в которых гены мышиных иммуноглобулинов заменены на гены иммуноглобулинов человека, фирма Medarex Inc.), обладают высокой эффективностью при модулировании активности Nogo-A в экспериментах in vitro и in vivo. Антитела 6A3, которые вырабатываются

против NiG человека, являются изотипом IgG и обладают более предпочтительными свойствами по сравнению с антителами, специфичными в отношении Nogo-A, описанными в области техники. Таким образом, появляется возможность конструирования альтернативных молекул, связывающихся с Nogo-A, содержащих гипервариабельные области, аналогичные указанным антителам 6A3, т.е. создания новых антител, обладающих предпочтительными свойствами антител 6A3. Производные антитела 6A3-Ab, 6A3-IgG4 и 6A3-Fab распознают NiG человека с высокой аффинностью 0,14 нМ и 1,1 нМ, соответственно. Кроме того, антитела по настоящему изобретению обладают высокой стабильностью и продолжительным периодом полураспада и удерживанием in vitro и in vivo. Наконец, связывающие молекулы и антитела по изобретению характеризуются замедленным высвобождением из участка введения, что обеспечивает местное отложение связывающей молекулы в очаге повреждения. При непрерывном вливании в спинномозговой жидкости (СМЖ) поврежденного спинного мозга животных и пациентов наблюдаются высокие концентрации антител 6A3. Указанное неожиданно высокое удерживание антител 6A3-Ab и время пребывания в спинномозговой жидкости (СМЖ) позволяет использовать струйные инъекции (например, 1-3 раза в неделю, даже целесообразно с более продолжительными интервалами один раз в 2, 3 или 4 недели) вместо непрерывного вливания антител в спинномозговую жидкость. Можно также использовать повторные интратекальные струйные инъекции. В предпочтительном варианте введение проводят интратекально, например, с использованием соответствующего катетера, связанного с портативным насосом. В другом предпочтительном варианте используют интратекальную струйную инъекцию. Преимущества связывающих молекул по изобретению также описаны в разделе Примеры.

Соответственно, в изобретении предлагаются связывающие молекулы, специфичные в отношении Nogo-A или NiG (далее по тексту "связывающие молекулы по изобретению" или просто "связывающие молекулы"). Предпочтительно связывающие молекулы по изобретению связываются с белком Nogo-A человека (SEQ ID NO: 2, кодируемая последовательностью SEQ ID NO: 1) или с белком NiG человека (который является фрагментом Nogo-A (аминокислоты 186-1004 Nogo-A человека, SEQ ID NO: 3), наиболее эффективно подавляющим разрастание невритов, при этом константа диссоциации K_D составляет <1000 нМ, или K_D составляет до и включительно 100 нМ, более предпочтительно <100 нМ, или K_D составляет до и включительно 100 нМ, наиболее предпочтительно <10 нМ, или K_D составляет до и включительно 10 нМ. Реакцию связывания детектируют стандартными методами (включающими качественные и количественные методы анализа), включающими, например, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию и определение аффинности на биосенсоре (см. пример 4). Кроме того, связывание связывающих молекул по изобретению с Nogo-A человека и NiG человека и эффективность указанных связывающих молекул при функциональном анализе можно оценивать при анализе разрастания невритов, например, как описано ниже.

Таким образом, в другом предпочтительном варианте связывающая молекула по настоящему изобретению (в концентрации 100 мкг/мл, предпочтительно 10 мкг/мл, более предпочтительно 1,0 мкг/мл и наиболее предпочтительно 0,1 мкг/мл) повышают число невритов мозжечковых тучных клеток крысы на субстрате в виде белкового экстракта мозга обезьяны по меньшей мере на 20%, предпочтительно на 50%, наиболее предпочтительно на 80%, по сравнению с числом невритов мозжечковых тучных клеток

крысы, обработанных контрольными антителами, которые не связываются с полипептидом Nogo-A человека или с полипептидом NiG человека (т.е. которые характеризуются константой диссоциации >1000 нМ).

В другом варианте изобретение относится к изолированной молекуле, включающей по меньшей мере один антиген-связывающий участок, который специфично связывается с полипептидом Nogo-A человека (SEQ ID NO: 2) или с полипептидом NiG человека (SEQ ID NO: 3), причем указанный антиген-связывающий участок включает:

- по меньшей мере одну из гипервариабельных областей CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где каждая из гипервариабельных областей по меньшей мере на 90% идентична гипервариабельным областям CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), соответственно, и

- по меньшей мере одну из гипервариабельных областей CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где каждая из гипервариабельных областей по меньшей мере на 90% идентична гипервариабельным областям CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12) and CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13), соответственно.

Специфичное распознавание Nogo-A или NiG человека обеспечивается благодаря присутствию в составе связывающей молекулы по настоящему изобретению CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 или CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3. Тем не менее для специалиста представляется очевидным, что присутствие в составе связывающей молекулы только одного CDR-домена может оказаться достаточным для специфичного связывания с распознаваемой молекулой. Положение "по меньшей мере одна из гипервариабельных областей" обозначает 1 или 2 или 3 гипервариабельные области. Положение "идентичность по меньшей мере на 90%" обозначает идентичность на более 90%, предпочтительно на более 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%. Идентичность (в %) двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием компьютерной программы, которая анализирует относительную идентичность двух или более аминокислотных последовательностей, например, программы Basic Local Aliggnment Search Tool (BLAST, см. web site Национального института здоровья, Altschul и др., Nature Genetics, 6, 119-129 (1994), Altschul и др., J. Mol. Biol., 215, 403-410 (1990), Altschul и др., Nucleic Acids Research, 25, 1389-1402 (1997), Karlin и Altschul, PNAS, 87, 2264-2268 (1990), Karlin и Altschul, PNAS, 90, 5873-5868 (1993)).

Настоящее изобретение относится к изолированной молекуле, включающей по меньшей мере один антиген-связывающий участок, который специфично связывается с полипептидом Nogo-A человека (SEQ ID NO: 2) или с полипептидом NiG человека (SEQ ID NO: 3) с константой диссоциации <1000 нМ, причем указанный антиген-связывающий участок включает:

- по меньшей мере гипервариабельные области CDR-H1, CDR-H2, и CDR-H3, где каждая из гипервариабельных областей по меньшей мере на 90% идентична гипервариабельным областям CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) and CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), соответственно, и

- по меньшей мере гипервариабельные области CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3, где каждая из гипервариабельных областей по меньшей мере на 90% идентична гипервариабельным областям CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13), соответственно.

Положение "антиген-связывающий участок, включающий гипервариабельные области" относится к антиген-связывающему участку, в котором гипервариабельные области не являются смежными (не располагаются близко друг к другу). Предпочтительно указанные области в составе антител чередуются с каркасными

участками антител, или с последовательностями, которые не являются каркасными участками антител, предпочтительно с каркасными участками антител.

Согласно настоящему изобретению связывающая молекула может также включать по меньшей мере один антиген-связывающий участок, причем указанный антиген-связывающий участок включает:

- гипервариабельные области CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), или

- гипервариабельные области CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13), или

- их прямые эквиваленты, которые по меньшей мере на 90% идентичны последовательности указанных гипервариабельных областей. Положение "идентичность по меньшей мере на 90%" обозначает идентичность на более 90%, предпочтительно на более 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%.

Согласно настоящему изобретению связывающая молекула также включает:

- первый антиген-связывающий участок, содержащий гипервариабельные области CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), и

- второй антиген-связывающий участок, содержащий гипервариабельные области CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13), или

- их прямые эквиваленты, которые по меньшей мере на 90% идентичны последовательности указанных гипервариабельных областей. Идентичность по меньшей мере на 90% обозначает идентичность на более 90%, предпочтительно на более 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%.

Согласно настоящему изобретению связывающая молекула также включает:

- по меньшей мере одну тяжелую цепь иммуноглобулина или ее фрагмент, которая включает (1) вариабельный домен, включающий гипервариабельные области CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10) и (2) константный сегмент или его фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулина человека, и

- по меньшей мере одну легкую цепь иммуноглобулина или ее фрагмент, который включает (1) вариабельный домен, включающий гипервариабельные области CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13) и (2) константный сегмент или его фрагмент легкой цепи иммуноглобулина человека, или

- их прямые эквиваленты, которые по меньшей мере на 90% идентичны последовательности указанных гипервариабельных областей. Идентичность по меньшей мере на 90% обозначает идентичность на более 90%, предпочтительно на более 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%.

В связывающей молекуле по настоящему изобретению константный сегмент (или его фрагмент) тяжелой цепи иммуноглобулина человека может соответствовать типу (γ), предпочтительно типу (γ4), а константный сегмент (или его фрагмент) легкой цепи иммуноглобулина человека может соответствовать типу (λ) или предпочтительно типу (κ). Кроме того, связывающая молекула согласно настоящему изобретению может представлять собой моноклональные антитела человека, частично моноклональные антитела человека или химерные или гуманизированные моноклональные антитела.

Согласно настоящему изобретению связывающая молекула может включать одну или более полипептидных последовательностей, таких как SEQ ID NO: 4 (тяжелая цепь IgG1), SEQ ID NO: 5 (легкая цепь IgG1), SEQ ID NO: 24 (тяжелая цепь IgG4) и SEQ ID NO: 25 (легкая цепь IgG4).

В другом предпочтительном варианте связывающая молекула по настоящему изобретению включает по меньшей мере один антиген-связывающий участок, причем указанный антиген-связывающий участок включает гипервариабельные области CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 и CDR-H3-6A3, где CDR-H1-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR-H2-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, а CDR-H3-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10, и их прямые эквиваленты, которые по меньшей мере на 90% идентичны последовательности указанных гипервариабельных областей. Идентичность по меньшей мере на 90% обозначает идентичность на более 90%, предпочтительно на более 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%.

В другом варианте изобретения связывающая молекула по изобретению включает по меньшей мере:

а) первый домен, включающий гипервариабельные области CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 и CDR-H3-6A3, где CDR-H1-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR-H2-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, а CDR-H3-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10, и

б) второй домен, включающий гипервариабельные области CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 и CDR-L3-6A3, где CDR-L1-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, CDR-L2-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, а CDR-L3-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, или

в) их прямые эквиваленты, которые по меньшей мере на 90% идентичны последовательности указанных гипервариабельных областей. Идентичность по меньшей мере на 90% обозначает идентичность на более 90%, предпочтительно на более 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%.

Кроме того в изобретении также предлагается следующее связывающая молекула по изобретению, которая включает по меньшей мере один антиген-связывающий участок, содержащий:

а) вариабельную область тяжелой цепи антител 6A3 (SEQ ID NO: 4), или

б) вариабельную область легкой цепи антител 6A3 (SEQ ID NO: 5), или их прямые эквиваленты, которые по меньшей мере на 90% идентичны последовательности указанных гипервариабельных областей.

Если антиген-связывающий участок включает первый и второй домены, то такие домены могут содержаться в составе одного полипептида или предпочтительно каждый домен может содержаться в отдельной цепи, т.е. первый домен является частью тяжелой цепи иммуноглобулина или ее фрагмента, а второй домен является частью легкой цепи иммуноглобулина или ее фрагмента.

Примеры связывающих молекул по изобретению включают антитела, такие как антитела, продуцируемые B-клетками или гибридомами, и антитела человека или химерные или гуманизированные антитела или их любые фрагменты, например, F(ab')2, и Fab фрагменты, а также одноцепные или монодоменные антитела, описанные в US 20070065440 A1.

"Монодоменные антитела" представляют собой вариабельный домен, который специфично связывается с эпитопом или антигеном или лигандом независимо от другого вариабельного домена, который связывается с указанным эпитопом, антигеном или лигандом. Монодоменные антитела могут присутствовать в виде гомо- или гетеромультимера вместе с другими VH или VL доменами, причем другие домены не

являются необходимыми для связывания антигена с монодоменными антителами, т.е., монодоменные антитела связываются с антигеном независимо от дополнительных VH или VL доменов. В предпочтительном варианте монодоменные антитела включают отдельный VH домен или отдельный VL домен. Способы получения монодоменных антител, обладающих по меньшей мере некоторой специфичностью связывания, характерной для исходных интактных антител, известны в данной области техники. Например, в статье Ward и др. ("Binding Activities of a Repertoire of Single immunoglobulin Variable Domens Secreted from Escherichia coli", Nature, 341, 644-646) описан способ тестирования с целью получения вариабельной области тяжелой цепи антител (VH домена), обладающей достаточно высокой аффинностью в отношении эпитопа-мишени при связывании с эпитопом в изолированной форме.

Одноцепочечные антитела состоят из вариабельных доменов/областей тяжелой и легкой цепей антител, ковалентно связанных пептидным линкером, обычно содержащим от 10 до 30 аминокислот, предпочтительно от 15 до 25 аминокислот. Предпочтительные способы включают применение полипептидных линкеров, описанных, например, в связи с оцFv (Bird и др., Science, 242, 423-426 (1988)). Следовательно, такая структура не включает константный сегмент тяжелой и легкой цепей, и предполагается, что небольшой пептидный спейсер должен быть менее антигенным, чем полный константный сегмент. Термин "химерные антитела" обозначает антитела, в которых константные области тяжелой или легкой цепей антител или оба фрагмента получены из одного вида животного, а вариабельные области тяжелой и легкой цепей получены из другого вида животного. Предпочтительно "химерные антитела" представляют собой такие антитела, в которых константные области тяжелой и легкой цепей или оба фрагмента соответствуют иммуноглобулину человека, а вариабельные домены тяжелой и легкой цепей получены от другого вида (например, мыши, обезьяны, крысы, свиньи, цыпленка, птиц). Термин "гуманизированные антитела" обозначает антитела, в которых гипервариабельные области (CDR) получены от животных (например, мыши), а все или практически все остальные фрагменты молекулы иммуноглобулина, например, константные области и высококонсервативные участки вариабельных доменов, т.е. каркасные участки, соответствуют иммуноглобулину человека. Однако гуманизированные антитела могут содержать в сегментах каркасных участков, смежных гипервариабельными областями, несколько аминокислотных остатков из иммуноглобулина мыши.

Гипервариабельные области можно гибридизовать с каркасными участками иммуноглобулина любого вида, предпочтительно мыши или человека. Пригодные каркасные участки описаны в публикации "Sequences of Proteins of immunological interest", Kabat E.A. и др., US department of health and human services, Public health service, National Institute of Health. Предпочтительно константный сегмент тяжелой цепи (иммуноглобулина человека) связывающей молекулы может представлять собой тип IgG, более предпочтительно тип IgG4, включая подтипы, предпочтительно константный сегмент легкой цепи (иммуноглобулина человека) обозначает тип (λ) или (к), более предпочтительно тип (к).

Моноклональные антитела, специфичные в отношении природного белка, присутствующего в организме человека, можно получать в системе любого животного, например, мыши. В результате ксеногенные антитела, полученные с использованием гибридом, при введении человеку вызывают нежелательный иммунный ответ, который преимущественно опосредуется константным сегментом ксеногенного иммуноглобулина. Это обстоятельство несомненно ограничивает применение таких

антител, поскольку их нельзя вводить в течение продолжительного времени. Следовательно, прежде всего предпочтительно использовать одноцепочечные, монодоменные, химерные или гуманизированные антитела, которые вероятно не вызывают существенного аллогенного ответа при введении человеку.

В связи с вышеизложенным, связывающую молекулу по изобретению также выбирают из химерных антител, которые включают по меньшей мере:

а) одну тяжелую цепь иммуноглобулина или ее фрагмент, которая включает (1) вариабельный домен, содержащий гипервариабельные области CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 и CDR-H3-6A3 и (2) константный сегмент или его фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулина человека, где CDR-H1-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 9), а CDR-H3-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 10), и

б) одну легкую цепь иммуноглобулина или ее фрагмент, которая включает (1) вариабельный домен, содержащий гипервариабельные области CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 и CDR-L3-6A3 и (2) константный сегмент легкой цепи иммуноглобулина человека или его фрагмент, где CDR-L1-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 12), а CDR-L3-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 13), или

их прямые эквиваленты, которые включают области, которые по меньшей мере на 90% идентичны последовательности указанных гипервариабельных областей.

В другом варианте связывающую молекулу по изобретению выбирают из одноцепочечной связывающей молекулы, которая включает антиген-связывающий участок, содержащий:

а) первый домен, включающий гипервариабельные области CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 и CDR-H3-6A3, где CDR-H1-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR-H2-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, а CDR-H3-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10, и

б) второй домен, включающий гипервариабельные области CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 и CDR-L3-6A3, где CDR-L1-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, CDR-L2-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, а CDR-L3-6A3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, и

в) пептидный линкер, который присоединен к N-концевому фрагменту первого домена и к C-концевому фрагменту второго домена или к C-концевому фрагменту первого домена и к N-концевому фрагменту второго домена,

или их прямые эквиваленты, которые по меньшей мере на 90% идентичны последовательности указанных гипервариабельных областей.

Как известно, незначительные изменения в аминокислотной последовательности, такие как удаление, добавление или замена одной или нескольких аминокислот может привести к образованию аллельной формы исходного белка, которая обладает практически идентичными свойствами. Таким образом, термин "их прямые эквиваленты" обозначает любую гипервариабельную область, любой антиген-связывающий участок, любую цепь антител или ее фрагмент или любой отдельный домен связывающей молекулы по изобретению (соединения 6A3),

(1) в котором каждая из гипервариабельных областей CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3

связывающих молекул по меньшей мере на 90% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентична эквивалентным гипервариабельным областям CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), где CDR-H1 является эквивалентом CDR-H1-6A3, CDR-H2 является эквивалентом CDR-H2-6A3, CDR-H3 является эквивалентом CDR-H3-6A3, и

(2) которое способно связываться с Nogo-A человека или NiG человека, предпочтительно с константой диссоциации (K_D)<1000 нМ, более предпочтительно с K_D<100 нМ, наиболее предпочтительно с K_D<10 нМ, или

любая связывающая молекула по изобретению, содержащая по меньшей мере один, предпочтительно два домена в участке связывания (соединение 6A3),

(3) в котором каждая из гипервариабельных областей CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 по меньшей мере на 90% идентична, более предпочтительно по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентична эквивалентным гипервариабельным областям CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9), CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13), где CDR-H1 является эквивалентом CDR-H1-6A3, CDR-H2 является эквивалентом CDR-H2-6A3, CDR-H3 является эквивалентом CDR-H3-6A3, CDR-L1 является эквивалентом CDR-L1-6A3, CDR-L2 является эквивалентом CDR-L2-6A3, CDR-L3 является эквивалентом CDR-L3-6A3, и

(4) которое способно связываться с Nogo-A человека или NiG человека, предпочтительно с константой диссоциации (K_D)<1000 нМ, более предпочтительно с K_D<100 нМ, наиболее предпочтительно с K_D<10 нМ.

Таким образом, другим вариантом изобретения является, например, связывающая молекула, которая способна связываться с Nogo-A человека или NiG человека с константой диссоциации (K_D)<1000 нМ, и которая включает по меньшей мере один антиген-связывающий участок, содержащий:

- гипервариабельные области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, причем каждая из гипервариабельных областей по меньшей мере на 90%, предпочтительно на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентична гипервариабельным областям CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), соответственно, и/или

- гипервариабельные области CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, причем каждая из гипервариабельных областей по меньшей мере на 90%, предпочтительно на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентична о гипервариабельным областям CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13), соответственно.

Кроме того, связывающая молекула, описанная в тексте заявки, способна связываться с Nogo-A человека или NiG человека с константой диссоциации (K_D)<1000 нМ, и которая включает:

- первый антиген-связывающий участок, содержащий гипервариабельные области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, причем каждая из гипервариабельных областей по меньшей мере на 90%, предпочтительно на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентична гипервариабельным областям CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), соответственно, и

- второй антиген-связывающий участок, содержащий гипервариабельные области CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, причем каждая из гипервариабельных областей по меньшей мере на 90%, предпочтительно на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентична

гипервариабельным областям CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13), соответственно.

Указанную константу диссоциации определяют с использованием различных способов анализа, включающих, например, определение аффинности с использованием биосенсора (BIAcore, см. выше). Кроме того, связывание и функциональное воздействие связывающих молекул можно продемонстрировать при биоанализе, например, описанном ниже.

Константный сегмент тяжелой цепи иммуноглобулина человека относится к иммуноглобулину типа γ1, γ2, γ3, γ4, α1, α2, δ или ε, предпочтительно типа γ, более предпочтительно типа γ4, а константный сегмент легкой цепи относится к иммуноглобулину типа λ или κ (которые включают подтипы λ1, λ2, λ3 и λ4), предпочтительно типа κ. Аминокислотные последовательности всех указанных константных сегментов приводятся в публикации Kabat и др. (выше).

В объем изобретения также включены конъюгаты связывающих молекул по изобретению, например, конъюгаты с ферментом или токсином или радиоизотопом. В другом варианте композицию, содержащую молекулу, связывающую Nogo-A или NiG, стабилизируют in vivo за счет связывания или ассоциации с (не-полипептидными) полимерами, например, за счет гликозилирования в условиях in vitro или in vivo. Примеры подобного способа стабилизации описаны, например, в заявках WO 99/64460 (Chapman и др.) и EP1,160255 (King и др.), каждая из которых включена в описание в качестве ссылки. Например, в указанных публикациях описано применение синтетических или природных полимеров, таких как полиалкилен, полиалкинилены, полиоксиалкилены или полисахариды, для повышения периода полураспада полипептидов иммуноглобулина in vivo. Типичным примером стабилизирующего полимера является полиэтиленгликоль (ПЭГ) или полиалкилен. Способ связывания ПЭГ с полипептидом описан в указанных публикациях и обозначается термином "ПЭГилирование". Молекулу, связывающую Nogo-A или NiG, ПЭГилируют произвольно, например, ПЭГ присоединяют к остатку лизина или другой аминокислоты, экспонированной на поверхности полипептидной глобулы, или адресным образом, например, за счет присоединения ПЭГ к введенному в полипептид остатку цистеина на поверхности глобулы. В зависимости от свойств молекулы, связывающей Nogo-A или NiG, предпочтительно использовать адресный способ конденсации полимера с полипептидом, поскольку произвольное присоединение к антиген-связывающему участку или рядом с ним часто оказывает влияние на аффинность или специфичность полипептида в отношении антигена-мишени.

Предпочтительно, связывание с ПЭГ или другим полимером не должно оказывать влияния на антиген-связывающую аффинность или специфичность антител. Положение "не оказывает влияния на антиген-связывающую аффинность или специфичность" обозначает тот факт, что ПЭГ-полипептид, связывающий Nogo-A или NiG, характеризуется величиной IC_{50} или ND_{50}, которая на <10% превышает IC_{50} или ND_{50}, соответственно, не-ПЭГилированных молекул, связывающихся с Nogo-A или NiG, содержащих аналогичный вариабельный домен. В другом варианте положение "не оказывает влияния на антиген-связывающую аффинность или специфичность" обозначает тот факт, что ПЭГилированная форма молекулы, связывающейся с Nogo-A или NiG, сохраняет по меньшей мере 90% антиген-связывающей активности исходного полипептида.

ПЭГ или другой полимер, который можно использовать для повышения периода полураспада in vivo обычно характеризуется мол. массой приблизительно от 5000 до

50000 Да, например, приблизительно 5000 Да - 10000 Да, 5000 Да - 15000 Да, 5000 Да - 20000 Да, 5000-25000 Да, 5000-30000 Да, 5000 Да - 35000 Да, 5000 Да - 40000 Да, или приблизительно 5000 Да - 45000 Да. Выбор мол. массы полимера зависит от предполагаемого применения комплекса. Например, если необходимо, чтобы комплекс проникал в плотную ткань, например, в опухоль, предпочтительно следует использовать низкомолекулярный полимер или с мол. массой приблизительно 5000 Да. Если необходимо сохранять комплекс в кровотоке, можно использовать полимеры с мол. массой, например, от 25000 Да до 40000 Да или более.

Фармацевтические композиции по изобретению включают "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" молекулы, связывающейся с Nogo-A или Nig, по изобретению. Термин "терапевтически эффективное количество" обозначает количество, эффективное, в указанной дозе и в течение требуемого периода времени, для достижения требуемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество молекулы, связывающейся с Nogo-A или Nig, по изобретению может варьировать в зависимости от ряда факторов, таких как тяжесть заболевания, возраст, пол и масса тела пациента, и аффинность молекулы, связывающейся с Nogo-A или Nig, по изобретению, для достижения требуемой ответной реакции в организме пациента. Терапевтически эффективное количество также является таким, при котором терапевтически благоприятное действие молекулы по изобретению, связывающейся с Nogo-A или Nig, перевешивает любое токсичное или побочное действие. Термин "профилактически эффективное количество" обозначает количество, эффективное, в указанной дозе и в течение требуемого периода времени, для достижения требуемого профилактического результата.

Положение "специфично связывается", используемый в описании заявки, обозначает связывание молекулы по изобретению, связывающейся с Nogo-A или Nig, с антигеном с константой диссоциации (K_d) 1 мкМ или менее по данным измерения методом поверхностного плазменного резонанса с использованием, например, системы BIAcore (r) и оценки кинетики реакции по программе BIAcore(r).

Если не указано иное, термин "полипептид" обозначает любой пептид или белок, включающий аминокислоты, связанные пептидными связями, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая начинается с N-концевого фрагмента и заканчивается С-концевым фрагментом. Предпочтительно полипептид по настоящему изобретению представляет собой моноклональные антитела, более предпочтительно химерные (называемыми также V-привитыми) или гуманизированные (называемыми также CDR-привитые) моноклональные антитела. Гуманизированные (CDR-привитые) моноклональные антитела могут включать или не включать дополнительные мутации в каркасных участках (FR) акцепторных антител.

Функциональное производное полипептида, описанное в тексте заявки, включает молекулу, обладающую биологической активностью, характерной для полипептида по настоящему изобретению, т.е. обладающее способностью связываться с Nogo-A или NiG человека. Функциональное производное включает фрагменты и аналоги полипептида по настоящему изобретению. Фрагменты включают области в составе аминокислотной последовательности полипептида по настоящему изобретению, например, специфичную последовательность. Термин "производное" используется для обозначения аминокислотной последовательности вариантов и ковалентных модификаций полипептида по настоящему изобретению, например, специфичной аминокислотной последовательности. Функциональные производные полипептида по настоящему изобретению, например, конкретная последовательность, например,

гипервариабельная область легкой и тяжелой цепи, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 90%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентична аминокислотной последовательности полипептида по настоящему изобретению, например, конкретной последовательности, и практически сохраняет способность связываться с Nogo-A или NiG человека.

Термин "вариабельный домен", используемый в описании заявки, обозначает полипептид, характеризующийся последовательностью, полученной из V области иммуноглобулина зародышевой линии клеток млекопитающих. Последовательность "полученная из V области иммуноглобулина зародышевой линии клеток млекопитающих" обозначает последовательность, выделенную из иммуноглобулина человека, выделенную из другого животного, такого как грызуны, например мыши, причем в ответ на иммуноген организм животного вырабатываются иммуноглобулины человека, более предпочтительно в организме животного не вырабатываются эндогенные антитела, выделенную из библиотеки клонированных последовательностей гена антител человека (или библиотеки последовательностей V области антител человека), или клонированную последовательность V области антител зародышевой линии клеток человека используют для получения одной или более разнообразных последовательностей (за счет произвольного или направленного мутагенеза), которые затем отбирают по связыванию с требуемым антигеном-мишенью. Как минимум в вариабельном домене иммуноглобулина человека по меньшей мере 85% (например, 87%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% или более) аминокислотной последовательности идентична последовательности вариабельного домена природного иммуноглобулина человека.

В другом или дополнительном варианте "вариабельный домен" представляет собой вариабельный домен иммуноглобулина, который включает четыре каркасных участка (FW1-FW4) вариабельного домена иммуноглобулина, предпочтительно иммуноглобулина человека (нумерация каркасных участков указана, как описано в статье Kabat и др. (1991)). Термин "каркасные участки вариабельного домена" обозначает а) аминокислотную последовательность каркасного участка, предпочтительно человека, и б) каркасный участок, содержащий по меньшей мере непрерывную последовательность из 8 аминокислотных остатков каркасного участка иммуноглобулина человека. Вариабельный домен антител может включать аминокислотные последовательности FW1-FW4, которые аналогичны аминокислотным последовательностям соответствующих каркасных участков, кодируемых сегментом гена антител зародышевой линии клеток, предпочтительно человека, или может также включать вариабельный домен, в котором все последовательности FW1-FW4 содержат до 10 различий в аминокислотной последовательности (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различий в аминокислотной последовательности) по сравнению с аминокислотными последовательностями соответствующих каркасных участков, кодируемых сегментом гена антител зародышевой линии клеток, предпочтительно человека.

Термин "универсальный каркасный участок", используемый в описании заявки, обозначает последовательность каркасного участка антител, соответствующую консервативным последовательностям, описанным в статье Kabat и др. (1991), или соответствующую мотиву иммуноглобулина зародышевой линии клеток человека или структуре, описанной в статье Chothia и Lesk, J. Mol. Biol., 196, 910-917 (1987). В изобретении предлагается применение отдельного каркасного участка, или набора таких каркасных участков, которые, как установлено, позволяют модифицировать практически любую специфичность связывания за счет изменения только в

гипервариабельных областях. В одном варианте гипервариабельные области или CDR специфично связываются с Nogo-A и/или NiG.

Термин "ковалентная модификация" относится к модификациям полипептида по настоящему изобретению, например, конкретной последовательности, или его фрагмента, за счет взаимодействия с соответствующим агентом, за счет гибридизации с гетерологичным полипептидом или за счет пост-трансляционных модификаций. Ковалентно модифицированные полипептиды, например, с конкретной последовательностью, все еще обладают способностью связываться с Nogo-A или NiG человека при перекрестном связывании. Ковалентные модификации обычно проводят за счет взаимодействия определенных аминокислотных остатков с соответствующим агентом, который способен реагировать с конкретными аминокислотами или концевыми аминокислотными остатками, или за счет пост-трансляционной модификации в рекомбинантных клетках хозяина. Некоторые пост-трансляционные модификации являются результатом воздействия рекомбинантных клеток хозяина на экспрессированный полипептид. Остатки глутамина и аспарагина часто подвергаются деамидированию с образованием остатков глутаминовой и аспарагиновой кислоты, соответственно. В другом варианте указанные остатки деамидируются в слабокислотной среде. Другие пост-трансляционные модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серина, тирозина или треонина, метилирование α-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина, см., например, монографию T.E.Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H.Freeman & Co., San Francisco, c.c.79-86 (1983). Ковалентные модификации включают гибридные белки, содержащие полипептид по настоящему изобретению, например, конкретную последовательность и ее варианты, такие как иммуноадгезины, и N-концевые гибриды с гетерологичными сигнальными последовательностями.

Термин "идентичность" в связи с исходным полипептидом и его производным используется в описании заявки для указания доли аминокислотных остатков (в %) в производном полипептида, которые идентичны остаткам в соответствующем исходном полипептиде после формирования последовательностей и введения делеций (при необходимости) для достижения максимальной идентичности двух структур, и не относится к любым консервативным заменам. Подразумевается, что N- или C-концевые дополнения или вставки не понижают уровень идентичности. Способы и программы сопоставления структур известны в данной области, см. Altschul и др. (выше).

Термин "аминокислота (аминокислоты)" относится ко всем природным L-α-аминокислотам, например, и включает D-аминокислоты. Аминокислоты обозначают с использованием известного однобуквенного кода или трехбуквенного кода (три первые буквы в названии аминокислоты).

Термин "аминокислотная последовательность варианта" относится к соединениям, которые частично отличаются по аминокислотной последовательности от полипептида по настоящему изобретению, например, конкретной структуры. Варианты полипептида по настоящему изобретению, например, конкретной структуры, могут связываться с Nogo-A или NiG человека. Варианты, содержащие замены, обозначают модифицированные полипептиды по настоящему изобретению, например, обладающие конкретной структурой, в которых по меньшей мере одна аминокислота удалена и в то же положение введена другая аминокислота. Указанные замены являются единичными, когда заменяют только одну кислоту, или многократными, когда в той же структуре заменяют две или более аминокислоты. Варианты, содержащие вставки, обозначают модифицированные полипептиды по настоящему изобретению, например,

обладающие конкретной последовательностью, в которых одна или более аминокислот введены вблизи конкретной аминокислоты. Непосредственно вблизи конкретной аминокислоты обозначает прямую связь с α-карбокси- или α-аминогруппой конкретной аминокислоты. Варианты, содержащие делеции, обозначают модифицированные полипептиды по настоящему изобретению, например, обладающие конкретной структурой, в которых удалены одна или более аминокислот. Обычно в таких вариантах удаляют одну или две аминокислоты в конкретной области полипептида.

Связывающую молекулу по изобретению можно получать методами рекомбинантной ДНК. В общем случае, молекулы нуклеиновой кислоты и векторные конструкты, необходимые для продуцирования по настоящему изобретению конструируют и обрабатывают по методикам, описанным в лабораторных руководствах, таких как Sambrook и др., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, USA (1989). В связи с изложенным одну иди более молекул ДНК, кодирующей связывающую молекулу, конструируют, вводят соответствующие контрольные последовательности и переносят для экспрессии в пригодный организм хозяина.

В самом общем виде, в изобретении предлагаются:

(1) ДНК, кодирующие гипервариабельную область, антиген-связывающий участок, цепь антител или ее фрагмент, или отдельный домен связывающей молекулы по настоящему изобретению, и

(2) применение ряда ДНК по изобретению для получения связывающей молекулы по настоящему изобретению методами рекомбинантной ДНК.

Согласно настоящему состоянию уровня техники специалист в данной области может синтезировать ряд ДНК по изобретению с использованием информации, приведенной в описании изобретения, т.е. аминокислотных последовательностей гипервариабельных областей и последовательностей ДНК, кодирующих такие полипептиды. Способ конструирования гена вариабельного домена, например, описан в EP 239400, и в кратком виде включает следующие стадии: клонируют ген, кодирующий вариабельный домен моноклональных антител любой специфичности. Определяют сегменты ДНК, кодирующие каркасные участки и гипервариабельные области, удаляют сегменты ДНК, кодирующие гипервариабельные области, а сегменты ДНК, кодирующие каркасные участки, гибридизуют с пригодными сайтами рестрикции по местам контактов. Сайты рестрикции получают в соответствующих положениях мутагенезом ДНК по стандартным методикам. Двухцепочечные синтетические кассеты CDR получают синтезом ДНК, соответствующих последовательностям указанных выше CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3, CDR-H3-6A3, CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 и CDR-L3-6A3. Указанные кассеты содержат липкие концы, благодаря чему их можно лигировать по местам контактов с каркасным участком по стандартным протоколам с образованием ДНК, кодирующей вариабельный домен иммуноглобулина.

Кроме того, для получения конструкта ДНК, кодирующей моноклональные антитела по изобретению, необязательно располагать мРНК из линии гибридомных клеток. Таким образом, в WO 90/07861 приводятся подобные инструкции для получения моноклональных антител методами рекомбинантной ДНК, располагая лишь информацией по нуклеотидной последовательности гена.

Метод включает синтез ряда олигонуклеотидов, их амплификацию методом ПЦР и их сплайсинг с образованием требуемой последовательности ДНК.

Известно множество векторов, включающих бактериальные плазмиды, бактериофаги, искусственные хромосомы и эписомальные векторы. Известны векторы экспрессии, включающие один или более пригодных промоторов и/или генов, кодирующих тяжелую

и легкую цепь константных областей. Векторы экспрессии обычно содержат промотор, который распознается организмом хозяина и оперативно связан с кодирующей последовательностью. Такой промотор является индуцибельным или конститутивным. Термин "оперативно связанный" относится к такому порядку связывания указанных выше компонентов, который обеспечивает их нормальное функционирование. Контрольную последовательность, "оперативно связанную" с кодирующей последовательностью, лигируют таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности происходит в условиях, приемлемых для контрольных последовательностей. Таким образом, полученную ДНК по изобретению можно легко перенести в соответствующий вектор экспрессии.

ДНК, кодирующие одноцепочечные антитела, можно также получать стандартными методами, например, описанными в WO 88/1649.

В конкретном варианте изобретения рекомбинант предназначенный для получения некоторых связывающих молекул по изобретению, включает первый и второй конструкты ДНК, описанные ниже.

Первый нуклеотид может включать

- по меньшей мере одну из полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, или

- по меньшей мере одну из полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19.

Другой полинуклеотид по изобретению включает

- полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, и

- полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19.

В другом варианте полинуклеотид включает

- полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6 и/или полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, или

- полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 26 и/или полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 28.

В еще одном варианте конструкт ДНК кодирует тяжелую цепь или ее фрагмент и включает

а) первый сегмент, который кодирует вариабельный домен, включающий поочередно каркасный участок и гипервариабельные области, причем указанные гипервариабельные области включают ДНК-CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 14), ДНК-CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 15) и ДНК-CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 16), при этом указанный первый сегмент начинается с кодона, кодирующего первую аминокислоту вариабельного домена, и оканчивается кодоном, кодирующим последнюю аминокислоту вариабельного домена, и

б) второй сегмент, кодирующий константную область тяжелой цепи и или ее фрагмент, который начинается с кодона, кодирующего первую аминокислоту константной области тяжелой цепи, и оканчивается кодоном, кодирующим последнюю аминокислоту константной области тяжелой цепи или ее фрагмента, после которого следует нонсенс-кодон.

Предпочтительно второй сегмент кодирует константную область тяжелой цепи иммуноглобулина человека, более предпочтительно константную область γ4 цепи. Указанный второй сегмент может представлять собой фрагмент ДНК генома (включающий интроны) или фрагмент кДНК (не содержащий интронов).

В другом вариант конструкт ДНК кодирует легкую цепь или ее фрагмент и включает:

а) первый сегмент, который кодирует вариабельный домен, включающий поочередно каркасный участок и гипервариабельные области, причем указанные гипервариабельные области включают ДНК-CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 17), ДНК-CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 18) и ДНК-CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 19), при этом первый сегмент начинается с кодона, кодирующего первую аминокислоту вариабельного домена, и оканчивается кодоном, кодирующим последнюю аминокислоту вариабельного домена, и

б) второй сегмент, кодирующий константную область легкой цепи и/или ее фрагмент, который начинается с кодона, кодирующего первую аминокислоту константной области легкой цепи, и оканчивается кодоном, кодирующим последнюю аминокислоту константной области легкой цепи или ее фрагмента, после которого следует нонсенс-кодон.

Предпочтительно второй сегмент кодирует константную область легкой цепи иммуноглобулина человека, более предпочтительно константную область к цепи.

Конструкты ДНК по настоящему изобретению предпочтительно дополнительно включают еще один сегмент, который расположен по цепи выше описанных сегментов и который кодирует лидерный пептид. Указанный лидерный пептид необходим для секреции цепей организмом хозяина, в котором они экспрессируются, причем указанный пептид затем удаляется в организме хозяина. Предпочтительно указанный сегмент конструкта ДНК кодирует лидерный пептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, практически идентичной аминокислотной последовательности лидерной последовательности тяжелой цепи, например, SEQ ID NO: 20 (тяжелая цепь IgG1, которая начинается с аминокислоты 19 и оканчивается аминокислотой 1), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 (легкая цепь IgG1, которая начинается с аминокислоты 20 и оканчивается аминокислотой 1), содержащей аминокислотную последовательность, практически идентичную лидерной последовательности тяжелой цепи, например, SEQ ID NO: 30 (тяжелая цепь IgG4, которая начинается с аминокислоты 19 и оканчивается аминокислотой 1), или содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 (легкая цепь IgG4, которая начинается с аминокислоты 20 и оканчивается аминокислотой 1).

Каждый из конструктов ДНК находится под контролем контрольных последовательностей, прежде всего под контролем пригодного промотора. При этом можно использовать промотор любого типа, адаптированный к организму хозяина, в который предполагается переносить конструкты ДНК для последующей экспрессии. Однако, если экспрессию проводят в клетках млекопитающего, более предпочтительно использовать промотор гена иммуноглобулина.

Требуемые антитела получают в культуре клеток или в организме трансгенного животного. Пригодное трансгенное животное получают стандартными способами, которые включают микроинъекцию в яйцеклетки первого и второго конструкта ДНК под пригодными контрольными последовательностями, перенос полученных таким образом яйцеклеток в организм соответствующих ложнобеременных самок и отбор потомков, экспрессирующих требуемые антитела.

Если цепи антитела предполагается получать в клеточной культуре, конструкты ДНК сначала включают в один вектор экспрессии или в два совместимых вектора экспрессии, причем последний вариант является предпочтительным.

Соответственно, в изобретении также предлагается вектор экспрессии, способный воспроизводиться в линиях прокариотических или эукариотических клеток, который включает по меньшей мере один из вышеописанных конструктов ДНК.

Таким образом, в настоящем изобретении предлагается вектор экспрессия,

включающий полинуклеотид по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также относится к системе экспрессии, причем указанная система экспрессии или часть ее способна продуцировать полипептид по настоящему изобретению и присутствует в приемлемой клетке хозяина. Изобретение также включает изолированную клетку хозяина, содержащую систему экспрессии по изобретению.

Таким образом, описание настоящей заявки включает способ получения связывающей молекулы, полинуклеотид, вектор экспрессии, с использованием техники рекомбинантной ДНК или химического синтеза.

Таким образом, каждый вектор экспрессии, содержащий конструкт ДНК, переносят в пригодный организм хозяина. Если конструкты ДНК отдельно включают в два вектора экспрессии, то их переносят в организм хозяина отдельно, т.е. вектор одного типа в одну клетку, или переносят совместно, причем последний вариант является предпочтительным. Пригодным организмом хозяина является бактерия, дрожжи или линия клеток млекопитающих, причем последний вариант является предпочтительным. Более предпочтительно линия клеток млекопитающих включает клетки лимфоидного происхождения, например, миеломы, гибридомы или нормальные иммобилизованные В-клетки, но не экспрессирующие тяжелую или легкую цепь любых эндогенных антител.

Кроме того, предпочтительно, чтобы организм хозяина содержал в клетке большое число копий векторов, включающих один или более конструктов ДНК. Если организм хозяина представляет собой линию клеток млекопитающих, то указанная цель достигается благодаря амплификации множества копий стандартными способами. Способы амплификации заключаются в отборе на повышенную устойчивость к лекарственному средству, причем указанная устойчивость кодируется вектором экспрессии.

В другом варианте изобретения предлагается способ получения мультицепочечной связывающей молекулы по изобретению, которая включает (1) культивирование организма, трансформированного по меньшей мере одним конструктом ДНК по изобретению и (2) выделение активной связывающей молекулы изобретения из культуральной жидкости.

В другом варианте тяжелую и легкую цепи, например, выделяют отдельно и реконструируют с образованием активной связывающей молекулы после ренатурации in vitro. Способы сборки известны в области техники, примеры способов сборки прежде всего описаны в EP 120674 или в EP 125023.

Следовательно способ также включает:

(1) культивирование первого организма, трансформированного первым конструктом ДНК, кодирующим связывающую молекулу изобретения, и выделение первой связывающей молекулы из культуральной жидкости, и

(2) культивирование второго организма, трансформированного вторым конструктом ДНК, кодирующим связывающую молекулу согласно изобретению, и выделение второй связывающей молекулы из культуральной жидкости, и

(3) сборку in vitro активной связывающей молекулы согласно изобретению из первой связывающей молекулы, полученной на стадии (1), и второй связывающей молекулы, полученной на стадии (2).

При необходимости для продуцирования и сборки более одной связывающей молекулы используется более одного организма или типов клеток, например, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь.

Аналогичным образом в изобретении предлагается способ получения одной цепи или одного домена связывающей молекулы, который включает:

(1) культивирование организма, трансформированного конструктом ДНК, кодирующим одну цепь или один домен связывающей молекулы согласно изобретению, соответственно, и

(2) выделение указанной молекулы из культуральной жидкости.

Молекула по изобретению, связывающая с Nogo-A и NiG, может обладать высокой активностью при регенерации нервной ткани, например, по результатам анализа на модели разрастания неврита тучной клетки, описанного ниже.

1. Анализ разрастания невритов тучных клеток (in vitro)

Ткань мозга (коры и ствола спинного мозга) извлекали и для каждого анализа на содержание белка экстракт обрабатывали, как описано ранее (Spillmann и др., Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220), J Biol Chem., 273(30), 19283-19293 (1998, 24 июля)). Образец замороженной ткани (например, массой 0,25 г) гомогенизировали в 3-4 объемах буферного раствора (60 мМ Chaps/20 мМ трис, pH 8,0/1 мМ ЭДТУ в присутствии ингибитора протеазы (10 мкг/мл апротинин/5 мкг/мл лейпептин/1 мкг/мл пепстатин/1 мМ ПМСФ) при 4°C. Гомогенат перемешивали при вращении при 4°C в течение 30 мин, а затем центрифугировали при 100000 g в течение 45 мин при 4°C (ультрацентрифуга Beckman TL-100, ротор TLA 100.3). В супернатанте определяли концентрацию белка спектрофотометрией.

Мозжечковые тучные клетки очищали от трипсинизированной мозжечковой ткани 5-7-дневных детенышей крысы, как описано ранее (Niederost и др., Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans, J. Neurosci., 19(20), 8979-8989 (1999, 15 октября). Связывающая молекула по изобретению предварительно инкубировали в присутствии анализируемого субстрата в течение 30 мин и удаляли перед добавлением клеток. Затем добавляли мозжечковые тучные клетки и инкубировали в течение 24 ч. Реакцию останавливали при медленном добавлении в чашки Петри 2 мл 4% раствора формальдегида в буферном растворе. 4-Луночные культуральные чашки Грейнера (фирма Greiner, Nuertingen, Германия) покрывали экстрактом мембранного белка мозга обезьян, полученным, как описано выше, в течение ночи (15 мкг белка/см^2). Перед добавлением нейронов чашки трижды промывали теплым раствором Хенка. Мозжечковые тучные клетки (5-7-дневных детенышей крысы) получали, как описано выше, и добавляли до концентрации 50000 клеток/см^2. Клетки культивировали в бессывороточной среде в течение 24 ч, фиксировали и окрашивали с использованием иммунномаркера невритов мА B1b (моноклональные антитела Chemicon, 1:200). Затем протопласты окрашивали с использованием красителя ДАФИ (дигидрохлорид 4',6-диамидино-2-фенилиндола, фирма Molecular Probes). Для анализа мА анти-Nogo-A или контрольный IgG предварительно инкубировали в чашках в течение 30 мин, а затем удаляли.

В каждой лунке произвольно отмечали четыре поля на определенном расстоянии от края лунки и с использованием 40-кратного объектива подсчитывали число всех пересечений невритов с линией, проходящей через центр поля наблюдения. При этом также подсчитывали все клетки, касающиеся линии, и рассчитывали соотношение невриты/клетки для каждой лунки, как описано ранее (Simonen и др., Neuron, 38, 201-211 (2003)). Все измерения проводили слепым методом в закодированных экспериментах и представляли в виде числа невритов на число клеток. Результаты представляли в виде среднего отношения невриты/клетки.

При этом можно наблюдать усиление разрастания невритов мозжечковых тучных клеток в непермиссивном окружении экстракта спинного мозга, полученного как указано выше, после предварительной инкубации со связывающей молекулой по

изобретению.

Нейтрализующую активность молекул по изобретению можно также оценивать при измерении регенерации и разрастания невритов и функционального восстановления на модели травмы спинного мозга in vivo, как описано ниже.

2. Модели травмы спинного мозга у крыс и обезьян (in vivo)

Взрослым особям крыс Льюис наносили травму в виде микрохирургического рассечения задней половины спинного мозга билатерально на уровне 8 грудного позвонка. Ламинэктомия, анестезия и хирургия описаны в статье Schnell и Schwab, Eur. J. Neurosci., 5, 1156-1171 (1993)).

Нейроанатомический контроль

Моторный и сенсорный корково-спинномозговой путь анализировали с использованием инъекции антероградного индикатора биотинилированного декстранамина (БДА) в мозжечок со стороны, противоположной насосу или имплантату. БДА переносился в спинной мозг в течение 10-14 дней, после чего его визуализировали с использованием диаминобензидина (ДАБ) в качестве субстрата, как описано в статье Brösamle и др., J. Neurosci., 20, 8061-8068 (2000)).

Через две недели после повреждения спинного мозга наблюдалось разрушение приблизительно 40% сегмента спинного мозга Т8, главным образом в задней половине, включая оба главных цервикальных разреза спинного мозга (ЦРСМ). Наблюдение за ЦРСМ у контрольных животных свидетельствует об умеренной степени реактивного разрастания пути. Указанный феномен соответствует спонтанному разрастанию в ответ на травму, описанному в литературе. У травмированных крыс, получавших лечение связывающей молекулой по изобретению, или у крыс, которым вводили связывающую молекулу с использованием насоса, наблюдался повышенный рост в очаге повреждения и регенерация поврежденных аксонов за счет разрастания поврежденных невритов. Более того у животных наблюдалось восстановление сенсорно-моторных функций. Такие функциональные испытания описаны в литературе (Merkler и др., J. Neuroscience, 21, 3665-3673 (2001)).

3. Тканевое распределение антител в ЦНС взрослых обезьян

Связывающие молекулы по изобретению очищали в виде IgG и концентрировали в ФСБ до концентрации 3 мг/мл. В качестве контроля использовали IgG, выделенный из сыворотки мыши (фирма Chemicon Int., Temecula/CA, США) или мА против ауксина пшеницы (фирма AMS Biotechnology, Oxon/Великобритания). В испытании для интратекального вливания использовали двух взрослых самцов макак (Macaca fascicularis).

Хирургические методики

Анестезию вызывали внутримышечной инъекцией кетамина (фирма Ketalar(r), Parke-Davis, 5 мг/кг, внутримышечно). Для снижения уровня бронхиальной секреции вводили внутримышечной инъекцией атропин (0,05 мг/кг). В бедренную вену помещали катетер для непрерывного вливания смеси 1% раствора пропофола (фирма Fresenius(r)) и 4% раствора глюкозы (1:2, об./об.), что вызывало более глубокую анестезию. Затем животное помещали в стереотаксический фиксатор. В стерильных условиях делали вертикальный разрез кожи по средней линии от С2 до Th1. Фасцию (мышцу) разрезали и извлекали спинальные отростки от С2 до Th1. Паравертебральные мышцы отводили назад и рассекали тонкие пластинки С6, С7 и Th1. Затем проводили полную ламинэктомию С6 и гемиламинэктомию верхнего С7. Твердую мозговую оболочку извлекали и рассекали продольно над цервикальными спинальными сегментами 7 и 8, соответствующими ростральной зоне спинальной части, покрытой 6 цервикальным

слоем. Для доставки антител hNogo-A полиэтиленовый шланг (длиной 10 см), соединенный с осмотическим насосом (фирма Alzet(r), 2ML1, скорость потока: 50 мкг/ч), вводили под мозговую оболочку, продвигали на несколько мм ростально и фиксировали на оболочке швом. Затем устанавливали осмотический насос и закрепляли в полости, вырезанной в массе спинных мышц на несколько сантиметров ниже ламинэкстомии, на левой стороне. Шланг закрепляли в мышечной ткани вдоль его траектории швом. Мышцы и кожу зашивали, и животное выводили из состояния анестезии обычно через 15-30 мин после завершения внутривенного вливания пропофола. После операции животному вводили антибиотик (10% ампициллин, 30 мг/кг, подкожно). Дополнительные дозы карпрофена вводили ежедневно в течение одной недели.

Животных умерщвляли через 8 дней после имплантации осмотического насоса. Сначала вызывали анестезию введением кетамина, как указано выше, а затем проводили глубокую анестезию внутрибрюшинной инъекцией летальной дозы пентобарбитала (90 мг/кг). Животным проводили перфузию транскардиально 0,4 л 0,9% солевым раствором, затем 4 л фиксатора (4% раствор параформальдегида в 0,1 М фосфатном буферном растворе, pH 7,6). Перфузию продолжали с использованием 3 растворов сахарозы с возрастающей концентрацией (10% в фиксаторе, 20 и 30% в фосфатном буферном растворе).

Гистологические методы анализа, иммунофлуоресценция и - иммуногистохимия

Головной и спинной мозг животных осторожно расслаивали, замораживали в криопротекторе (30% сахароза) и получали срезы толщиной 40 мкм в криостате. Для детектирования введенных мА использовали вторичные антитела, специфичные к антителам человека (фирма Jackson Laboratories). В качестве двойной метки использовали следующие антитела: кроличьи антитела AS472 (очищенные на аффинном сорбенте), специфичные в отношении эндогенного Nogo-A (Chen, 2000), кроличьи антитела, специфичные в отношении ГФКБ астроцитов и кроличьи антитела против катепсина D (фирма DAKO) для локализации в лизосомах. Все антисыворотки визуализировали с использованием соответствующих ТРИТЦ- или ФИТЦ-меченых вторичных антител, или с использованием системы АСС/ДАБ (фирма Vector). Срезы анализировали эпифлуресценцией на флуориметре Zeiss Axiophot или конфокальной микроскопией (ZEISS LSM 410).

Срезы спинного мозга анализировали в месте вливания и на расстоянии 6 см ниже. Высокий уровень связывающей молекулы по изобретению наблюдался в месте вливания. В более низкой части спинного мозга, высокий уровень метки наблюдался в центральном канале и на поверхности мозга, тогда как в сером и белом веществе наблюдался более равномерный уровень метки, который однако специфично и явно превышал фон. Аналогичная ситуация наблюдалась в переднем мозге, т.е. высокий уровень метки на поверхности мозга и в желудочках и значительно содержание антител к Nogo-A в паренхиму.

Указанные эксперименты свидетельствуют о том, что спинальное интратекальное вливание антител, специфичных к поверхностному антигена клеток ЦНС, приводит к эффективному распределению связывающей молекулы и антител по изобретению благодаря циркуляции СПЖ во внутренней (желудочки, центральный канал) и внешней жидкой среде. Антитела IgG эффективно проникают в ткань головного и спинного мозга. В то время как в отрицательном контроле антитела IgG вымываются достаточно быстро, антитела против Nogo-A удерживаются в ткани головного и спинного мозга.

4. Испытания на восстановление нерва и функциональное улучшение при повреждении спинного мозга у обезьян

Анестезию вызывали внутримышечной инъекцией кетамина (фирма Ketalar(r), Parke-Davis, 5 мг/кг, внутримышечно). Для снижения уровня бронхиальной секреции вводили внутримышечной инъекцией атропин (0,05 мг/кг). В бедренную вену помещали катетер для непрерывного вливания смеси 1% раствора пропофола (фирма Fresenius(r)) и 4% раствора глюкозы (1:2, об./об.), что вызывало более глубокую анестезию. Затем животное помещали в стереотаксический фиксатор. В стерильных условиях делали вертикальный разрез кожи по средней линии от C2 до Th1. Фасцию (мышцу) разрезали и извлекали спинальные отростки от C2 до Th1. Паравертебральные мышцы отводили назад и рассекали тонкие пластинки C6, C7 и Th1. Затем проводили полную ламинэктомию C6 и гемиламинэктомию верхнего C7. Для доставки молекул вблизи повреждения свободный конец полиэтиленового шланга, соединенного с осмотическим насосом, фиксировали под мозговой оболочкой в нескольких мм ростарально к очагу повреждения.

Поведенческие испытания на выявление мануальной ловкости можно проводить по опубликованной методике.

Мануальную ловкость тренировали, помещая обезьян в кресло для приматов перед "доской Бринкмана" (10 см × 20 см, модификация Perspex), содержащей 50 отверстий, распределенных произвольно, 25 отверстий, ориентированных горизонтально, и 25 отверстий, ориентированных вертикально (Liu, 1999 15428 /id, Rouiller, 1998 13239 /id).

2.7. Регенерацию и разрастание волокон можно оценивать, как описано выше. В качестве антероградного индикатора, инъецированного в правую полусферу, использовали биотинилированный декстранамин (БДА, фирма Molecular Probe(r), 10% раствор в солевом растворе). В левую полусферу вводили флуоресцентный антероградный индикатор флуоресцеиндекстран (фирма Molecular Probe(r), 10% раствор в солевом растворе). Гистологический процессинг для визуализации индикаторов можно проводить, как подробно описано ранее (Rouiller, 1994 8322 /id).

Следовательно в изобретении также предлагается:

(1) применение молекул по изобретению, связывающихся с Nogo и NiG, при регенерации нерва нервной системы млекопитающего, прежде всего нервной системы человека,

(2) способ регенерации нерва нервной системы млекопитающего, прежде всего нервной системы человека, который заключается в том, что пациенту, который нуждается в таком лечении, вводят эффективное количество молекул по изобретению, связывающихся с Nogo и NiG, или

(3) фармацевтическая композиция, предназначенная для регенерации нерва нервной системы млекопитающего, прежде всего нервной системы человека, которая включает связывающие молекулы по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Следовательно, в настоящем изобретении предлагается связывающая молекула, полинуклеотид, вектор или система экспрессии, и клетка хозяина по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства. Прежде всего, указанная связывающая молекула, полинуклеотид, вектор или систему экспрессии, или клетку хозяина можно использовать при лечении заболевания периферической (ПНС) и/или центральной (ЦНС) нервной системы или для получения лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания периферической (ПНС) и/или центральной (ЦНС) нервной системы.

В настоящем изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, включающая связывающую молекулу, полинуклеотид, вектор или систему экспрессии,

или клетку хозяина по настоящему изобретению в смеси по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем. Кроме того, предлагаются изделия, содержащие указанную связывающую молекулу, полинуклеотид, вектор или систему экспрессии, или клетку хозяина или их фармакологически приемлемое производное, в качестве комбинированного препарата, предназначенного для одновременного, раздельного или последовательного применения при лечении заболевания периферической (ПНС) и/или центральной (ЦНС) нервной системы.

Настоящее изобретение также включает способ лечения заболевания периферической (ПНС) и/или центральной (ЦНС) нервной системы, который заключается в том, что субъекту, который нуждается в таком лечении, вводят эффективное количество связывающей молекулы, полинуклеотида, вектора или системы экспрессии, или клетки хозяина.

Кроме того, в настоящем изобретении в разделе Примеры показано, что фармакологические композиции и изделия можно использовать для замедленного высвобождения связывающей молекулы и/или для местного депонирования связывающей молекулы в очаге повреждения.

Термин "замедленное высвобождение" или эквивалентные термины "контролируемое высвобождение" или "пролонгированное высвобождение", используемые в описании заявки, относятся к препаратам лекарственного средства, которые высвобождают активное лекарственное средство, такое как полипептид, включая молекулу по изобретению, связывающийся с Nogo-A или NiG, такой как антитела, специфичные в отношении Nogo-A или NiG, в течение определенного периода времени после введения пациенту. Пролонгированное высвобождение полипептидных лекарственных средств, которое происходит через определенные промежутки времени, например, минуты, часы, дни, недели или более, в зависимости от состава лекарственного средства, отличается от стандартных препаратов, при введении которых практически вся стандартная доза подвергается немедленной адсорбции или немедленному распределению через кровоток. Предпочтительные препараты с пролонгированным высвобождением приводят к уровню циркулирующего лекарственного средства при однократном введении, который сохраняется, например, в течение 8 ч или более, 12 ч или более, 24 ч или более, 36 ч или более, 48 ч или более, 60 ч или более, 72 ч или более 84 ч или более, 96 ч или более, или даже, например, в течение 1 недели или 2 недель или более, например, в течение 1 месяца или более. Препараты с пролонгированным высвобождением подробно описаны в области техники и их можно выбирать в соответствии с предпочтительным профилем высвобождения антител. Пригодными полимерами являются биодеградируемые и недеградируемые материалы, такие как полимолочная/полигликолевая кислота (ПМПГ).

Термин "эпитоп", используемый в описании заявки, обозначает фрагмент структуры, обычно связываемый парой VH/VL иммуноглобулина. Эпитопы представляют собой минимальный связывающий участок, узнаваемый антителом, и следовательно является мишенью специфичного антитела. В случае монодоменных антител эпитоп представляет собой фрагмент структуры, распознаваемый одним изолированным вариабельным доменом.

Термин "нейтрализующий", используемый в описании заявки в связи с молекулой, связывающейся с Nogo-A или NiG, обозначает, что связывающая молекула препятствует измеряемой активности или функции Nogo-A или NiG. Молекула, связывающаяся с Nogo-A или NiG, является "нейтрализующим" полипептидом, если оно снижает измеряемую активность или функцию антигена-мишени, например, Nogo-A или NiG,

по меньшей мере на 50%, и предпочтительно по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более, до и включая 100%. Указанное снижение измеряемой активности или функции антигена-мишени может оценить специалист в данной области с использованием стандартных методов измерения одного или более показателей такой активности или функции. Например, если мишенью является Nogo-A или NiG, нейтрализующую активность можно оценивать с использованием анализа роста невритов, описанного ниже.

Связывающую молекулу по изобретению, прежде всего, можно использовать для регенерации аксонов и повышенного разрастания после повреждения нервного волокна. Таким образом, молекулы по изобретению могут найти широкое применение прежде всего для лечении человека. Например, связывающую молекулу по изобретению можно использовать при лечении многих заболеваний периферической (ПНС) и центральной (ЦНС) нервной системы, т.е. более предпочтительно нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз (БАС), патологическая деменция Леви или другие виды деменции, заболевания после черепной, церебральной или спинномозговой травмы, инсульт и демиелинизирующее заболевание. Такие демиелинизирующие заболевания включают, но не ограничиваясь только ими, рассеянный склероз, монофазную демиелинизацию, энцефаломиелит, многоочаговую лейкодистрофию, панэнцефалит, болезнь Маркиафавы-Бигнами, демиелинизацию варолиева моста, адренолейкодистрофию, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера, спонгиозную дегенерацию, болезнь Александера, болезнь Канавана, метахроматическую лейкодистрофию и болезнь Краббе. В одном примере введение связывающих молекул по изобретению можно использовать для лечения демиелинизирующего заболевания, ассоциированного с белком Nogo-A.

В другом примере клетки, которые экспрессируют связывающие молекулы по изобретению, можно трансплантировать в очаг поражения спинного мозга для облегчения роста аксона через поврежденный участок. Такие трансплантированные клетки можно использовать в качестве средства для восстановления функции спинного мозга после повреждения или травмы. Такие клетки могут включать нейросенсорные (обонятельные) клетки и стволовые клетки различных поколений эмбрионального нерва или тканевых трансплантатов.

Кроме того, связывающие молекулы по изобретению можно использовать для лечения дегенеративных глазных нарушений, которые могут непосредственно или опосредованно включать дегенерацию клеток сетчатки или роговицы, включающих ишемические ретинопатии, раннюю ишемическую глазную невропатию, все формы глазного неврита, возрастную дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию, кистозный отек желтого пятна (КОП), пигментозную дистрофию сетчатки, болезнь Штаргардта, желточную макулярную дистрофию (болезнь Беста), врожденный амавроз Лебера и другие виды наследственной дегенерации сетчатки, патологическую близорукость, ретролетальную фиброплазию и наследственную глазную невропатию Лебера, побочные действия после пересадки роговицы или хирургии хрусталика и герпетический кератит.

Кроме того, связывающие молекулы по изобретению можно использовать для лечения психиатрических состояний, прежде всего шизофрении и депрессии.

Для указанных показаний соответствующая доза может изменяться в зависимости, например, от конкретной молекулы по изобретению, способа введения и природы и тяжести состояния, подлежащего лечению. В общем случае доза предпочтительно составляет от 1 мкг/кг/день до 1 мг/кг/день.

Связывающие молекулы по изобретению обычно вводят насосом или инъецируют в очаг поражения, например, молекулы можно вводить непосредственно в ЦНС интракраниально или в спинной мозг интратекально в пораженный участок. СМЖ заполняет пространство вокруг спинного мозга, которое называется субарахноидальным или интратекальным пространством. Поток спинномозговой жидкости (СМЖ) через эту область омывает и защищает головной мозг и спинной мозг. Интратекальный насос для доставки лекарственного средства является более эффективным по сравнению с пероральным введением, поскольку обеспечивает доставку лекарственного средства непосредственно в СМЖ, минуя тот путь, который проходит в организме пероральное лекарственное средство. Следовательно, в предпочтительном варианте препарат вводят интратекально, например, с использованием соответствующего катетера, связанного с портативным насосом. В другом предпочтительном варианте используют интратекальную струйную инъекцию. Пригодные средства и методы интратекального введения лекарственных средств известны специалисту в данной области. Примерами насосов являются, но не ограничиваясь только ими, насос Alzet® и Medtronic SynchroMed® или системы вливания Isomed®. Связывающие молекулы можно вводить непрерывным вливанием или предпочтительно в виде фиксированных доз через конкретные интервалы времени, составляющие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 или 30 дней, например, прямой болюсной инъекцией в спинномозговую жидкость.

Связывающие молекулы по изобретению можно вводить отдельно или в комбинации, или при последовательной комбинации с другими агентами. Например, связывающие молекулы по изобретению можно вводить в комбинации с противовоспалительными агентами, такими как, но не ограничиваясь только ими, кортикостероиды, после инсульта или травмы спинного мозга, в качестве средств, блокирующих дальнейшее повреждение нейронов и ингибирование регенерации аксонов, нейротрофическими факторами, такими как фактор роста нервов (ФРН), нейротропный фактор мозга (НФМ), или другими лекарственными средствами, предназначенными для лечения нейродегенративных заболеваний, такими как экзелон(tm) (ривастигмин) или леводопа (L-ДОФА (3,4-дигидрокси-L-фенилаланин)). Другими пригодными партнерами комбинации, предназначенной для лечения инсульта, являются алтеплаз и десмотеплаз (DSPA, например, описанный в WO 90/09438). В одном варианте настоящего изобретения предлагается комбинация, включающая связывающую молекулу по изобретению и десмотепаз, прежде всего для лечения инсульта, а также фармацевтические композиции, включающие указанную комбинацию. Подразумевается, что используемые в описании заявки два агента вводятся в комбинации в том случае, если оба агента вводят одновременно или вводят независимо таким образом, что агенты действуют одновременно.

Структуры активных ингредиентов, идентифицированных кодовыми номерами, общими названиями или товарными знаками, приводятся в последнем издании стандартного справочника "The Merck Index" или в базах данных, например, Patents InternationalPHK (например, IMS World Publications) или в других базах данных, предлагаемых IMS Health. Соответствующее содержание указанных публикаций включено в описание заявки в виде ссылки. На основании указанных документов любой специалист в данной области может идентифицировать активные агенты, а также получить их и испытать фармацевтические критерии и свойства на стандартных моделях in vitro и in vivo.

Фармацевтические композиции по изобретению получают стандартными методами. Например, композицию по изобретению, включающую молекулу по изобретению, предпочтительно получают в лиофилизованной форме. Для немедленного введения

композицию растворяют в пригодном водном носителе, например, в стерильной воде для инъекций или в стерильном физиологическом солевом буферном растворе.

Для получения пригодных композиций связывающие молекулы по изобретению и необязательно второе лекарственное средство, усиливающее действие связывающей молекулы по изобретению, помещают раздельно в одном контейнере вместе с инструкциями для смешанного или попеременного введения. Варианты необязательного второго агента приведены выше.

Синергетическое действие комбинации связывающей молекулы по изобретения и ростовых факторов, таких как ФРН, можно продемонстрировать in vivo на моделях травмы спинного мозга.

Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции по изобретению для получения препарата с замедленным высвобождением связывающей молекулы по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к применению фармацевтической композиции по изобретению для получения препарата, предназначенного для местного депонирования связывающей молекулы по изобретению в очаге повреждения.

Настоящее изобретение также относится к лекарственным формам по изобретению, предназначенным для замедленного высвобождения связывающей молекулы по изобретению и для местного депонирования связывающей молекулы по изобретению в очаге повреждения.

Настоящее изобретение также относится к способу замедленного высвобождения связывающей молекулы по изобретению и для местного депонирования связывающей молекулы по изобретению.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами, не ограничивающими его объем.

В описании примеров температура указана в градусах Цельсия (°C).

Упомянутые в Примерах моноклональные антитела являются связывающими молекулами по настоящему изобретению, включающими вариабельную область легкой цепи (SEQ ID NO: 5) и вариабельную область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 4, 6A3-IgG1), или включающими вариабельную область легкой цепи (SEQ ID NO: 25) и вариабельную область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 24, 6A3-IgG4).

Подразумевается, что в вышеуказанных параграфах термин "включающий" соответствует термину "состоящий из".

В описании заявки используются следующие сокращения:

АТ	антитела
ИФА	иммуноферментный анализ
КСВФ	клеточный сортер с возбуждением флуоресценции
ФИТЦ	флуоресцеинизотиоцианат
ЭКС	эмбриональная коровья сыворотка
ЭТС	эмбриональная телячья сыворотка
ПЦЧ	промотор цитомегаловируса человека
IgG	иммуноглобулин изотипа G
мА	моноклональные антитела
VH	вариабельная область тяжелой цепи
VL	вариабельная область легкой цепи
ЛЦ	легкая цепь
ТЦ	тяжелая цепь
CDR	участок комплементарности
БСА	бычий сывороточный альбумин

по	пары оснований
ЦНС	центральная нервная система
ПОХ	пероксидаза хрена
КТ	комнатная температура
ФСБ	фосфатно-солевой буферный раствор
ТСБ	трис-солевой буферный раствор
КЭА	карциноэмбриональный антиген
ИФ	иммунофлуоресценция
IgG	иммуноглобулин G
ФСБ/Т	фосфатно-солевой буферный раствор/0,05% твин 20
ПФА	параформальдегид.

Примеры

Изобретение иллюстрируется следующими примерами, не ограничивающими его объем.

Пример 1

Последовательность моноклональных антител Medarex 6A3, специфичных в отношении Nogo-A человека

Отбирали моноклональные антитела IgG1 человека, обладающие высокой аффинностью в отношении NiG-фрагмента Nogo-A человека. Первоначальные моноклональные антитела секретировались клонами мышиных гибридов, которые получали стандартными методами гибридомной технологии с использованием "мышей Medarex", рекомбинантно реконструированных мышей, содержащих гены иммуноглобулина человека (фирма Medarex Inc., Annandale, NJ). Генерация мышей Medarex, иммунизированных NiG человека, и получение гибридом известны в данной области техники, а условия аналогичны описанным в WO 2005/028508. Большинство гибридом продуцируют антитела на очень низком уровне, следовательно для конструирования специализированных векторов экспрессии, предназначенных для продуцирования полноразмерных антител или Fab-фрагмента в клеточной линии использовали метод рекомбинантной ДНК. Получение очищенных антител и их Fab фрагментов известно и подробно описано, например, в WO 2005/028508. Аналогичные стадии использовали для получения очищенных антител 6A3-мА и 6A3-Fab.

кДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей антител 6A3-IgG1, амплифицировали методом ПЦР (полимеразной цепной реакции) из гибридомной мРНК, клонировали и характеризовали последовательностью (Фиг.1 и 2, SEQ ID NO 7 и 6).

Пример 2

Получение Fab и IgG4

мА 6A3 относятся к изотипу IgG1. Антитела изотипа IgG1 человека обладают высокой аффинностью в отношении клеточных рецепторов Fc и могут индуцировать антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКОЦ) и комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ) (Jerries и др., 2002, Hezareh и др., 2001). Более того, установлено, что мА IgG быстро вымываются из головного мозга кровью через гематоэнцефалический барьер по механизму обратного трансцитоза, опосредованного Fc рецептором (Zhang и др., 2001). С целью исключения возможных взаимодействий мА 6A3 IgG1 с Fc рецептором указанный изотип рекомбинантно переключали на изотип IgG4 и также получали рекомбинантными методами моновалентный Fab фрагмент, предназначенный для высокоэффективной экспрессии в клетках SP2/0 и E.coli.

Последовательность вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей указанных антител анти-Nogo-A человека позволяет рекомбинантно продуцировать 6A3-Fab фрагмент и антитела изотипа 6A3-IgG4 в высокопродуктивных линиях клеток-

продуцентов.

Для экспрессии Fab фрагмента в E.coli обе кДНК (SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 6) клонировали в вектор pASK116. Плазмиду использовали для клонирования кДНК, продуцирующих гены константного домена мышиного IgG1/κ (Skerra, 1994). Две полипептидных цепи фрагмента антител кодируются опероном под транскрипционным контролем промотора тетрациклина. Первый цистрон кодирует тяжелую цепь Fab фрагмента. Домен VH гибридизовали с сигнальным пептидом OmpA по N-концевому фрагменту и доменом CH1 мышиного IgG1 по C-концевому фрагменту. Второй цистрон кодирует легкую цепь, содержащую домен VL, гибридизованный с лидерным пептидом PhoA и мышиным доменом CH1. После индукции экспрессии две цепи Fab фрагмента одновременно секретируются в периплазму E.coli, где происходит укладка белка, образование дисульфидных связей и сборка упорядоченной структуры цепей. Для экспрессии Fab в E.coli плазмиды трансфектировали в BMP для препаративного продуцирования.

Для клонирования легкой и тяжелой цепи вариабельной области антител 6A3 с целью экспрессии антител IgG4 в клетках SP2/0 соответствующие кДНК клонировали в плазмиду LCvec-AAL160 и hcMCPfin. Для экспрессии полноразмерных антител IgG4 плазмиды линеаризовали с NotI для получения конструкта легкой цепи и с PvuI для получения конструкта тяжелой цепи и трансфектировали в клетки SP2/0.

Затем получали и очищали моновалентный фрагмент 6A3 IgG4 и 6A3 Fab, содержащий метку his-tag. Рекомбинантные антитела проявляли высокую аффинность в отношении фрагмента Nogo-A, hNiG, в экспериментах с использованием анализа BIAcore (см. ниже). Соответствующие значения K_D 0,14 нМ и 1,1 нМ, подтверждают успешное клонирование и рекомбинантную экспрессию мА, сохраняющих высокую активность в отношении фрагмента Nogo-A, hNiG.

Кодирующие области и аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи 6A3-Ig4 приводятся на Фиг.3 и 4 (SEQ ID NO 24, 25, 28 и 28).

Пример 3

Определение участков комплементарности антител 6A3

Участки комплементарности вариабельной тяжелой и легкой цепи антител 6A3 определяли с использованием базы данных Kabat, URL. Определение по Kabat основано на вариабельности последовательности и является общепринятым способом определения CDR вариабельных областей антител (Wu T.T., Kabat E.A., 1970).

Значения всех 6 CDR хорошо коррелируют с экспериментально установленными аминокислотными последовательностями за исключением CDR-H2, где типичными остатками перед CDR должны быть LEWIG, а найдены LEWVA (Фиг.5). Однако возможно существование вариантов CDR-H2.

Пример 4

Измерение аффинности мышиных 6A3-IgG1, 6A3-IgG4 и 6A3 Fab на биосенсорном чипе, содержащем NiG

Аффинность мышиных мА 6A3-IgG1, мА 6A3-IgG4 и 6A3 Fab измеряют поверхностным плазменным резонансом (ППР) с использованием оптического биосенсора BIAcore 2000 (фирма Biacore, Uppsala, Швеция) согласно инструкциям фирмы-производителя. Рекомбинантный NIG человека ковалентно иммобилизовали на проточном сенсорном чипе CM5 с использованием конденсации по аминогруппе. Матричный носитель на основе карбоксиметилированного декстрана активировали инъекцией 35 мкл раствора, содержащего 0,025 М N-оксисукцинимид и 0,1 М EDC. Для иммобилизации на сенсорном чипе рекомбинантный NIG человека растворяли в 0,01

М цитратном буферном растворе при pH 4 и инъецировали со скоростью потока 5 мкл/мин до достижения уровня конденсации, достаточного для измерения аффинности. Инактивацию избыточных N-оксиимидиловых эфирных групп проводили инъекцией 35 мкл 1 М раствора гидрохлорида этаноламина (pH 8,5). Поверхность сенсорного чипа регенерировали инъекцией 5 мкл 0,1 М HCl. Для измерения аффинности антитела инъецировали при различных концентрациях в интервале от 0,50 нМ до 100 нМ при скорости потока 200 мкл/мин. После каждой инъекции поверхность сенсорного чипа регенерировали инъекцией 10 мкл 0,1 М HCl при сохранении связывающей активности на поверхности чипа. Константы кинетики связывания $к_a$ и $к_D$ и константы аффинности K_a и K_D рассчитывали с использованием программы BIAevaluations 3.0, представленной производителем.

Измерение аффинности методом BIAcore

Константы кинетики и аффинность связывания мышиных мА 6A3-IgG1 и 6A3-IgG4 и моновалентного Fab фрагмента 6A3 с рекомбинантным Nogo-A человека измеряли в режиме реального времени с использованием поверхностного плазменного резонанса (ППР) (фирма Biacore). Для проведения указанного анализа рекомбинантный NIG человека конденсировали на поверхности сенсорного чипа и инъецировали антитела при различных концентрациях. Кинетические параметры связывания определяли по сенсограммам на основе нелинейного графика. Константы аффинности при нейтрализации NIG человека антителами находились в интервале K_D от 0,13 нМ до 2,5 нМ для мА 6A3-IgG4, 6A3-IgG1 и 6A3 Fab.

Пример 5

Связывание антител анти-Nogo-A NVP-6A3-Ab-NX-1 и NVP-IIC7-NX-1 с эндогенным Nogo-A человека

В этом примере демонстрируется связывание антител с эндогенным Nogo-A человека. Для этого исследовали две линии клеток человека, которые, как установлено ранее, характеризуются экспрессией олигодендритно-специфичного гена Nogo-A, и следовательно, специфичным связыванием с антителами. Для характеризации двух антител анти-Nogo-A NVP-6A3-Ab-NX-1 (6A3-Ab) и NVP-IIC7Ab-NX-1 (IIC7-Ab) в связи с их связыванием с эндогенным Nogo-A использовали линии клеток олигодендроглии человека MO3.13 и HOG. Кроме того, клетки можно использовать для разработки методов биоанализа, предназначенных для характеризации различных партий антител для клинических испытаний. Связывание 6A3-Ab с эндогенным Nogo-A человека в таких клетках анализировали и детектировали по двум независимым схемам.

На первой стадии клетки MO3:13 анализировали на присутствие мРНК Nogo-A методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных для Nogo-A человека. На второй стадии исследовали связывание обоих антител с эндогенным Nogo-A иммунопреципитацией и иммунодетектированием лизатов клеток MO3.13. Наконец, результаты иммунопреципитации подтверждали специфичным иммунофлуоресцентным окрашиванием клеток MO3.13 и HOG антителами 6A3-Ab.

Таким образом было установлено, что антитела 6A3-AB и 11C7-Ab способны специфично связываться с эндогенным Nogo-A человека.

Методы

Клеточные линии: клетки MO3.13 предоставлены др. N.Cashman, Университет Торонто. Клетки получали слиянием 6-тиогуанин-резистентного мутанта рабдомиосаркомы (РД) человека с олигодендроцитами взрослого человека, культивированных из хирургического образца. Клетки HOG представлены др. G.Dawson,

Университет Чикаго. Указанную линию клеток получали из хирургически удаленной олигодендроглиомы. Все клетки культивировали в среде Игла, модифицированной Дальбекко, с высоким содержанием глюкозы (фирма Gibco), содержащей препарат Glutamax, 10% ЭТС и пенициллин/стрептомицин.

ОТ-ПЦР: суммарную РНК получали из 5×10^5 клеток MO3.13 с использованием реагента Tripure (фирма Roche Diagnostics). После обработки ДНКазой 1 мкг РНК подвергали обратной транскрипции в общем объеме 20 мкл с использованием Omniscript RT (фирма Qiagen) и олиго dT-праймера. Праймеры, используемые для ПЦР, которые являются специфичными для Nogo-A, амплифицируют фрагмент (194 по), который начинается с положения 1197 в полноразмерном Nogo-A человека (5'-TGAGGGAAG-TAGGGATGTGC-3' (SEQ ID NO: 32), 5'-CAGGTGATGTACGCTCTGGA-3' (SEQ ID NO: 33)). Реакцию проводили с использованием 2 мкл кДНК (или 0,1 мкг РНК-ОТ), 5 мкл 10× буферного раствора, 3 мкл dNTP (5 мМ каждого), 2,5 мкл 5' праймера (10 мкМ), 2,5 мкл 3' праймера (10 мкМ), 0,5 мкл HotStar Taq-полимеразы (фирма Qiagen) и 34,5 мкл H_2O. При этом использовали следующие циклы ПЦР: 95°C 15 мин, (94°C 30 с, 55°C 30 с., 72°C 15 с)×35, 72°C 10 мин → 4°C. После завершения ПЦР аликвотные части (10 мкл) анализировали в агарозном геле при проявлении 2% этидий бромидом.

Иммунопреципитация и иммунодетектирование: для получения каждого иммунопреципитата клетки MO3.13, которые культивировали в одной культуральной чашке (диаметром 10 см) до конфлюэнтности, промывали ФСБ и клетки лизировали в 500 мкл реагента для экстракции белков млекопитающих (M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent, фирма Pierce), содержащего полную смесь ингибиторов протеаз (фирма Roche Diagnostics). Растворимую фракцию лизата подвергали предварительной очистке при обработке сорбентом белок G/сефароза (фирма Sigma) в течение 15 мин при КТ. В предварительно очищенный супернатант добавляли свежую порцию сорбента белок G/сефароза и соответствующие антитела (при конечной концентрации 50 нМ) и инкубировали при 4°C в течение 4 ч на ротационной качалке. Антитела представляли собой 6A3 IgG4, 11C7 IgG1 или анти-CEA IgG4, специфичные в отношении белка другого типа (карциноэмбриональный антиген), который использовали в качестве отрицательного контроля. Для анализа несвязанной фракции отбирали аликвотную часть каждого супернатанта, сефарозу промывали (4×) буферным раствором TNS (10 мМ трис/HCl, pH 7,8, 1% (мас./об.) N-лаурилсаркозин, 100 мМ NaCl), однократно ФСБ, и фракцию, связанную на сефарозе, элюировали 20 мкл буферного раствора нанесения в ДСН/ПААГ (фирма Invitrogen). Образцы нагревали при 95°C в течение 5 мин и каждую аликвотную часть (10 мкл) анализировали электрофорезом (NuPage, 4-12% гель, фирма Invitrogen) в MES буферном растворе. Белки переносили на целлюлозную мембрану в течение 4 ч при 30 В и анализировали на полноту переноса при окрашивании красителем Ponceau. После переноса мембрану блокировали в течение ночи при 4°C в реагенте для вестерн-блоттинга (фирма Roche Diagnostics) в ФСБ/Т. Для иммунодетектирования мембрану инкубировали в присутствии антител 6A3-IgG4 (1 нМ) в течение 2 ч при КТ, а затем в присутствии конъюгата вторичных антител (против иммуноглобулина человека) с пероксидазой хрена в течение 1 ч при КТ. Сигналы регистрировали в системе ECL-Advance (фирма Amersham) и снимали на пленку в течение 1 мин.

Иммунофлуоресценция: клетки MO3.13 и HOG высевали на 8-луночные предметные стекла, покрытые поли-D-лизином (фирма Becton Dickinson), и культивировали до 80% конфлюэнтности. Затем клетки промывали ФСБ и фиксировали в 4% ПФА в течение 30 мин при КТ. Неспецифичное связывание блокировали при обработке 10% ЭКС, 0,1% тритон X-100 в течение 20 мин. Клетки инкубировали в 1% ЭТС, 0,1% тритоне X-100 в

течение 1 ч в присутствии 5 нМ 6A3-IgG4 или только буферного раствора в качестве отрицательного контроля. После инкубации в присутствии антител клетки трижды промывали ФСБ и инкубировали в присутствии антител IgG человека, меченых красителем Alexa Fluor 488 (фирма Molecular Probes) при разведении 1:200 в ФСБ в течение 1 ч.

Результаты

ОТ-ПЦР: ОТ-ПЦР проводили с использованием в качестве матрицы РНК клеток MO3.13, при этом получали определенный фрагмент ДНК размером приблизительно 200 по (Фиг.6). В отрицательных контролях (РНК в отсутствии обратной транскрипции и H_2O) не наблюдалось образования каких-либо продуктов. Фрагмент ПЦР характеризовался ожидаемым размером 194 по, в контрольных образцах (РНК обработанная ДНКазой и H_2O) амплификации продуктов не наблюдалось.

Иммунопреципитация: После иммунопреципитации (ИП) лизатов клеток MO3.13 и иммунодетектирования анти-Nogo-A антителами 6A3 (Фиг.7) наблюдали одну интенсивную полосу продукта с ожидаемой ММ (190 кДа) при проявлении антителами 6A3-IgG4 (трек 4) и 11C7-IgG1 (трек 6). Сигнал не наблюдается после ИП антителами анти-КЭА против белка другого типа (карциноэмрионального антигена, трек 1) и никакого сигнала не наблюдалось в несвязанных фракциях (треки 5 и 7). До проведения ИП полоса с низкой интенсивностью наблюдается в неочищенном лизате клеток MO3.13 (трек 2). Слабый неспецифичный сигнал в области более низкой ММ наблюдается в нерастворимой фракции клеточного лизата (трек 3).

Иммунофлуоресценция: Иммунофлуоресцентное окрашивание проницаемых клеток MO3.13 и клеток HOG антителами 6A3-IgG4 и вторичными антителами против иммуноглобулина человека, мечеными красителем Alexa-Fluor 488, приводит к чрезвычайно интенсивному окрашиванию клеток (Фиг.8а и 8б, слева), в то время как никакого сигнала не наблюдается при проявлении одними вторичными антителами (справа).

Обсуждение результатов

ОТ-ПЦР анализ клеток MO3.13 с использованием Nogo-A специфичных праймеров для ПЦР позволяет получить фрагмент ДНК ожидаемых размеров (194 по), в то время как никакого продукта ПЦР не детектируется при применении образца РНК, полученной прямой транкскрипцией, или воды в качестве контроля. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что клетки экспрессируют эндогенный Nogo-A.

После иммунопреципитации лизатов клеток MO3.13 и иммунодетектирования антителами 6A3 анти-Nogo-A наблюдается одна интенсивная полоса Nogo-A, соответствующая ожидаемой ММ (190 кДа). Напротив, при проявлении контрольными антителами анти-КЭА (IgG4) полоса белка соответствующей ММ не наблюдается. Различие в интенсивности полос, полученных при иммунопреципитации антителами 6A3 и 11C7, наиболее вероятно обусловлено различной аффинностью изотипов антител к белку G/сефарозе (аффиность 6A3 > аффинности 11C7). Результаты внутриклеточного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток MO3.13 и HOG свидетельствуют о том, что 6A3-IgG4 связываются с эндогенным Nogo-A.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что две клеточных линии эндогенно экспрессируют Nogo-A, а оба типа антител 6A3 IgG4 (6A3-Ab) и 11C7 IgG1 (11C7-Ab) специфично связываются с эндогенным Nogo-A человека. Указанные данные свидетельствуют о том, что клетки линии MO3.13 можно использовать для разработки анализа связывания Nogo-A с целью, например, идентификации антител.

Пример 6

Воздействие 6A3 на функциональное восстановление у макак с повреждениями головного мозга

В следующем эксперименте подопытным обезьянам (макакам) наносили повреждение, как описано ранее, и лечили интратекальным вливанием (4 раза в неделю) антител 6A3 или контрольного IgG, начиная с момента нанесения повреждения. Мануальную ловкость пораженной левой лапы оценивали с использованием модифицированного теста на «доске Бринкманна» в условиях, описанных выше. Лечение антителами 6A3 повышало скорость и степень функционального восстановления по сравнению с контрольным лечением IgG. По результатам определения размера повреждения при завершении эксперимента было установлено, что функциональное восстановление обезьян, которых лечили контрольным IgG, приблизительно обратно пропорционально размеру повреждения, например, составляет от 90% (при 50% повреждения) до 53% (при 90% повреждения). Напротив, число животных, которых лечили мА анти-Nogo-A, практически не зависело от размера повреждения, у животных, которых лечили 6A3, наблюдалось почти полное восстановление до исходного состояния даже в том случае, если размер повреждения составлял 85%.

Пример 7

Удерживание в СМЖ и период полураспада антител 6A3 в организме человека

Удерживание в СМЖ и период полураспада антител 6A3 в организме человека оценивали после вливаний в СМЖ в течение 14 дней (при суточной дозе 15 мг/день) и определения индивидуальные концентрации в сыворотке и в СМЖ (фиг.9 и 10).

Концентрация в СМЖ не изменялась или снижалась незначительно, в двух случаях в день 34 и 56, т.е. приблизительно через 20 и 42 сут после завершения вливания, по сравнению с уровнем, измеренным во время вливания, что свидетельствует о неожиданно продолжительном удерживании и/или периоде полураспада 6A3 в СМЖ. Указанные фармакокинетические свойства позволяют использовать различные способы введения и курсы лечения с более продолжительными интервалами. Целесообразно использовать струйную инъекцию в СМЖ с интервалами 2 или более дней или недель. Антитела 6A3 можно использовать для получения препаратов с контролируемым высвобождением, таких как состав в биодеградируемых или небиодеградируемых полимерах или имплантатах.

Пример 8

Эффективность при испытании на модели повреждения спинного мозга у макак

У 3 обезьян проводили одностороннее рассечение спинного мозга на границе C7/C8, т.е. наносили повреждение, которое как известно снижает управление точными тонкими движениями пальцев, и имплантировали осмотический насос Alzet®, который интратекально доставляет в очаг поражения мышиные антитела IgG контрольному животному или антитела 6A3 подопытным животным в течение 4 недель в дозе 1 мг/день (фиг.11 и Freund и др., Nat. Med., 12, №7, 90-92, (2006)). Мануальную ловкость оценивали по поиску кормовых гранул в вертикальных и горизонтальных прорезях при испытании на модифицированной доске Бринкмана. Другие поведенческие задачи включали поиск кормовых гранул в выдвижном ящике, баллистические движения лапами, моторную способность лап при захвате корма и поведенческие реакции на боль и дискомфорт. Испытания проводили за 60 дней до нанесения повреждения в течение до 120 дней после нанесения повреждения с регулярными интервалами.

У обезьян проводили одностороннее рассечение спинного мозга и вводили интратекально мышиные контрольные антитела IgG (n=2, т.е. контроль 1, 50% повреждения, и контроль 2, 90% повреждения) или 6A3 (n=2, т.е. ATI1, 85% повреждения,

и ATI2, 80% повреждения) в дозе 1 мг/день в течение 4 недель (масса обезьян: контроль 1, 5,1 кг, контроль 2, 4,1 кг, ATI 1, 5,0 кг, ATI 2, 4,5 кг). Результаты приводили в виде общего числа гранул во время курса испытаний в конкретные дни. Величины рассчитывали с использованием индивидуальных поведенческих оценок в баллах до повреждения и после повреждения, когда уровень активности остается стабильным.

Лечение обезьян антителами 6A3 приводит к постепенному улучшению поиска кормовых гранул с использованием пораженной левой лапы в горизонтальных и вертикальных прорезях по сравнению с контрольными животными, которым вводили IgG. У контрольных животных наблюдался общий стойкий дефицит гранул, извлекаемых из горизонтальных прорезей, т.е. дефицит движения, для которого требуется более высокая мануальная ловкость по сравнению с поиском в вертикальных прорезях.

После выздоровления достигался максимальный уровень при испытании на доске Бринкмана, причем обезьяны проходили испытания на способность хватать ручку выдвижного ящика пораженной левой лапой с целью выдвинуть его и извлечь кормовые гранулы из лунки в ящике.

Обезьяны с повреждением 90% (контроль 2), которых лечили контрольным IgG, вообще не могли хватать ручку и открывать выдвижной ящик. Движение лапы замедлялось по сравнению с нормой, а движение лапы отличалось от нормы. Такие движения показаны двойной линией со стрелкой, свидетельствующей о явном различии между активностью до повреждения и активностью после повреждения и лечения контрольными антителами IgG, что в свою очередь свидетельствует только о частичном выздоровлении. У животных с 85% (ATI-1) или 80% (ATI-2) поражения, которых лечили антителами 6A3, наблюдалось восстановление способности выполнять задачу быстро и эффективно независимо от размеров поражения. При этом не наблюдалось существенного различия в активности до и после повреждения, которое лечили антителами 6A3, что указывает на полное выздоровление в результате лечения антителами 6A3. Таким образом, при введении антител 6A3 наблюдается явное лечебное действие, т.е. восстановление после индуцированных повреждений головного мозга у макак, по сравнению с лечением контрольными антителами IgG.

Пример 9

Клинические испытания

Пригодные клинические испытания проводили по следующему протоколу.

Испытания включали три фазы: массовое обследование (включая фон), фазу лечения с открытой этикеткой и по меньшей мере заключительную фазу в течение 22 недель. Испытания проводили под контролем независимого отдела по контролю за безопасностью лекарственных средств (DSMB).

22 пациента разделяли на 4 частично перекрывающиеся последовательные группы, которым непрерывно вливали антитела 6A3. Все пациенты после вливания проходили заключительную фазу в течение 22 недель для последующей оценки безопасности лекарственного средства.

В испытаниях использовали следующее распределение пациентов по группам, дозам и продолжительность лечения:

Группа 1: трем пациентам с параплегией вводили дозу 5 мг (в 2,5 мл) в течение 24 ч,

Группа 2: трем пациентам с параплегией вводили дозу 30 мг (в 2,5 мл) в течение 24 ч,

Группа 3: шести пациентам с параплегией вводили дозу 30 мг/день (2,5 мл/день) в течение 14 дней,

Группа 4: десяти пациентам с пара- и тетраплегией вводили дозу 30 мг/день (2,5 мл/

день) в течение 28 дней,

Состояние пациентов строго регистрировали в течение по меньшей мере шести месяцев после начала вливания. Состояние пациентов строго контролировали, при этом оценивали основные показатели состояния пациента, результаты ЭКГ (расшифровка в центральном медицинском учреждении) и лабораторные анализы основных показателей крови, мочи и СМЖ. Неврологические исследования с использованием шкалы ASIA (Applicable Standard Neurological Classification of Spinal Cord Injury by the American Spinal Injury Association, Ditunno, и др., American Spinal Cord Injury Association, Paraplegia, 32(2), 7080 (1994)) проводили квалифицированные клиницисты для оценки эффективности, а также для оценки возможного обострения повреждения спинного мозга. Для каждого пациента проводили всего четыре анализа спинного и головного мозга методом ядерно-магнитной томографии. У каждого пациента трижды отбирали образцы СМЖ (до введения дозы, во время лечения и на заключительной фазе) для оценки фармакокинетических (ФК) параметров. Для тех же целей во время лечения и на заключительной фазе отбирали также образцы крови. Полученные данные контролировались в независимом отделе по контролю за безопасностью лекарственных средств (DSMB) согласно протоколу.

Формула изобретения

1. Выделенное антитело для восстановления центральной нервной системы, содержащее антиген-связывающий участок, который специфично связывается с полипептидом Nogo A человека (SEQ ID NO:2) или NiG человека (SEQ ID NO:3), причем указанный антиген-связывающий участок содержит:

- по порядку, гипервариабельные области CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO:8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO:9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO:10); и
- по порядку, гипервариабельные области CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO:11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO:12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO:13).

2. Антитело по п.1, которое содержит:

- тяжелую цепь иммуноглобулина или ее фрагмент, содержащую(ий) (i) вариабельный домен, содержащий, по порядку, гипервариабельные области CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO:9) и CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO:10) и (ii) константую часть тяжелой цепи иммуноглобулина человека или ее фрагмент, и
- легкую цепь иммуноглобулина или ее фрагмент, содержащую(ий) (i) вариабельный домен, содержащий, по порядку, гипервариабельные области CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO:12) и CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO:13) и (2) константную часть легкой цепи иммуноглобулина человека или ее фрагмент.

3. Антитело по п.1, характеризующееся константой диссоциации <1000 нМ.

4. Антитело по п.1, где константная часть тяжелой цепи иммуноглобулина человека или ее фрагмент относится к типу γ4, а константная часть легкой цепи иммуноглобулина человека или ее фрагмент относится к типу κ.

5. Антитело по п.1, где указанное антитело представляет собой антитело человека или химерное или гуманизированное моноклональное антитело.

6. Антитело по п.1, содержащее SEQ ID NO:4 (тяжелая цепь IgG1) и SEQ ID NO:5 (легкая цепь IgG1) или SEQ ID NO:24 (тяжелая цепь IgG4) и SEQ ID NO:25 (легкая цепь IgG4).

7. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело по п.1.

8. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело по п.1, содержащий

- полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:

16; и

- полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO:19.

9. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.7 или 8.

10. Выделенная клетка-хозяин, выбранная из бактерии, дрожжей или линии клеток млекопитающих, содержащей миелому, гибридому или иммортализованную В-клетку, для получения выделенного антитела по п.1, которая содержит вектор по п.9.

11. Фармацевтическая композиция для восстановления ЦНС, содержащая эффективное количество антитела по п.1 в смеси по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, где указанная композиция является композицией замедленного высвобождения.

13. Способ получения антитела по п.1, включающий экспрессию полинуклеотида по п.7 или вектора по п.9 в клетке-хозяине по п.10.

14. Применение полинуклеотида по п.7 для получения фармацевтической композиции для восстановления ЦНС, содержащей эффективное количество антитела по п.1.

15. Применение вектора экспрессии по п.9 для получения фармацевтической композиции для восстановления ЦНС, содержащей эффективное количество антитела по п.1.

16. Применение клетки-хозяина по п.10 для получения фармацевтической композиции для восстановления ЦНС, содержащей эффективное количество антитела по п.1.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Новартис АГ,
Юниверсити оф Цюрих

<120> Улучшенные молекулы, связывающиеся с NOGO-A, и их фармацевтическое применение

<130> NIAG-006-PCT

<150> 61/001,741
<151> 2007-11-02

<150> EP07119847.7
<151> 2007-11-02

<160> 33

<170> PatentIn версия 3.3

<210> 1
<211> 3919
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(3579)
<223> NogoA человека

<400> 1

```
atg gaa gac ctg gac cag tct cct ctg gtc tcg tcc tcg gac agc cca       48
Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser Ser Asp Ser Pro
1               5                  10                  15

ccc cgg ccg cag ccc gcg ttc aag tac cag ttc gtg agg gag ccc gag       96
Pro Arg Pro Gln Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Arg Glu Pro Glu
            20                  25                  30

gac gag gag gaa gaa gag gag gag gaa gag gag gac gag gac gaa gac      144
Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Asp
        35                  40                  45

ctg gag gag ctg gag gtg ctg gag agg aag ccc gcc gcc ggg ctg tcc      192
Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly Leu Ser
    50                  55                  60

gcg gcc cca gtg ccc acc gcc cct gcc gcc ggc gcg ccc ctg atg gac      240
Ala Ala Pro Val Pro Thr Ala Pro Ala Ala Gly Ala Pro Leu Met Asp
65                  70                  75                  80

ttc gga aat gac ttc gtg ccg ccg gcg ccc cgg gga ccc ctg ccg gcc      288
Phe Gly Asn Asp Phe Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala
                85                  90                  95

gct ccc ccc gtc gcc ccg gag cgg cag ccg tct tgg gac ccg agc ccg      336
Ala Pro Pro Val Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Asp Pro Ser Pro
            100                 105                 110

gtg tcg tcg acc gtg ccc gcg cca tcc ccg ctg tct gct gcc gca gtc      384
```

```
Val Ser Ser Thr Val Pro Ala Pro Ser Pro Leu Ser Ala Ala Ala Val
        115                 120                 125

tcg ccc tcc aag ctc cct gag gac gac gag cct ccg gcc cgg cct ccc      432
Ser Pro Ser Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro
    130                 135                 140

cct cct ccc ccg gcc agc gtg agc ccc cag gca gag ccc gtg tgg acc      480
Pro Pro Pro Pro Ala Ser Val Ser Pro Gln Ala Glu Pro Val Trp Thr
145                 150                 155                 160

ccg cca gcc ccg gct ccc gcc gcg ccc ccc tcc acc ccg gcc gcg ccc      528
Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Ala Ala Pro
                165                 170                 175

aag cgc agg ggc tcc tcg ggc tca gtg gat gag acc ctt ttt gct ctt      576
Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu Phe Ala Leu
            180                 185                 190

cct gct gca tct gag cct gtg ata cgc tcc tct gca gaa aat atg gac      624
Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Arg Ser Ser Ala Glu Asn Met Asp
        195                 200                 205

ttg aag gag cag cca ggt aac act att tcg gct ggt caa gag gat ttc      672
Leu Lys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Ile Ser Ala Gly Gln Glu Asp Phe
    210                 215                 220

cca tct gtc ctg ctt gaa act gct gct tct ctt cct tct ctg tct cct      720
Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro
225                 230                 235                 240

ctc tca gcc gct tct ttc aaa gaa cat gaa tac ctt ggt aat ttg tca      768
Leu Ser Ala Ala Ser Phe Lys Glu His Glu Tyr Leu Gly Asn Leu Ser
                245                 250                 255

aca gta tta ccc act gaa gga aca ctt caa gaa aat gtc agt gaa gct      816
Thr Val Leu Pro Thr Glu Gly Thr Leu Gln Glu Asn Val Ser Glu Ala
            260                 265                 270

tct aaa gag gtc tca gag aag gca aaa act cta ctc ata gat aga gat      864
Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys Thr Leu Leu Ile Asp Arg Asp
        275                 280                 285

tta aca gag ttt tca gaa tta gaa tac tca gaa atg gga tca tcg ttc      912
Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met Gly Ser Ser Phe
    290                 295                 300

agt gtc tct cca aaa gca gaa tct gcc gta ata gta gca aat cct agg      960
Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala Val Ile Val Ala Asn Pro Arg
305                 310                 315                 320

gaa gaa ata atc gtg aaa aat aaa gat gaa gaa gag aag tta gtt agt     1008
Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp Glu Glu Glu Lys Leu Val Ser
                325                 330                 335

aat aac atc ctt cat aat caa caa gag tta cct aca gct ctt act aaa     1056
Asn Asn Ile Leu His Asn Gln Gln Glu Leu Pro Thr Ala Leu Thr Lys
            340                 345                 350

ttg gtt aaa gag gat gaa gtt gtg tct tca gaa aaa gca aaa gac agt     1104
Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser Ser Glu Lys Ala Lys Asp Ser
```

```
        355                 360                 365

ttt aat gaa aag aga gtt gca gtg gaa gct cct atg agg gag gaa tat     1152
Phe Asn Glu Lys Arg Val Ala Val Glu Ala Pro Met Arg Glu Glu Tyr
    370                 375                 380

gca gac ttc aaa cca ttt gag cga gta tgg gaa gtg aaa gat agt aag     1200
Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Arg Val Trp Glu Val Lys Asp Ser Lys
385                 390                 395                 400

gaa gat agt gat atg ttg gct gct gga ggt aaa atc gag agc aac ttg     1248
Glu Asp Ser Asp Met Leu Ala Ala Gly Gly Lys Ile Glu Ser Asn Leu
                405                 410                 415

gaa agt aaa gtg gat aaa aaa tgt ttt gca gat agc ctt gag caa act     1296
Glu Ser Lys Val Asp Lys Lys Cys Phe Ala Asp Ser Leu Glu Gln Thr
            420                 425                 430

aat cac gaa aaa gat agt gag agt agt aat gat gat act tct ttc ccc     1344
Asn His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Ser Asn Asp Asp Thr Ser Phe Pro
        435                 440                 445

agt acg cca gaa ggt ata aag gat cgt tca gga gca tat atc aca tgt     1392
Ser Thr Pro Glu Gly Ile Lys Asp Arg Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Cys
    450                 455                 460

gct ccc ttt aac cca gca gca act gag agc att gca aca aac att ttt     1440
Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu Ser Ile Ala Thr Asn Ile Phe
465                 470                 475                 480

cct ttg tta gga gat cct act tca gaa aat aag acc gat gaa aaa aaa     1488
Pro Leu Leu Gly Asp Pro Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys
                485                 490                 495

ata gaa gaa aag aag gcc caa ata gta aca gag aag aat act agc acc     1536
Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val Thr Glu Lys Asn Thr Ser Thr
            500                 505                 510

aaa aca tca aac cct ttt ctt gta gca gca cag gat tct gag aca gat     1584
Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu Val Ala Ala Gln Asp Ser Glu Thr Asp
        515                 520                 525

tat gtc aca aca gat aat tta aca aag gtg act gag gaa gtc gtg gca     1632
Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys Val Thr Glu Glu Val Val Ala
    530                 535                 540

aac atg cct gaa ggc ctg act cca gat tta gta cag gaa gca tgt gaa     1680
Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu
545                 550                 555                 560

agt gaa ttg aat gaa gtt act ggt aca aag att gct tat gaa aca aaa     1728
Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys
                565                 570                 575

atg gac ttg gtt caa aca tca gaa gtt atg caa gag tca ctc tat cct     1776
Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro
            580                 585                 590

gca gca cag ctt tgc cca tca ttt gaa gag tca gaa gct act cct tca     1824
Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser
        595                 600                 605
```

```
cca gtt ttg cct gac att gtt atg gaa gca cca ttg aat tct gca gtt      1872
Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val
    610                 615                 620

cct agt gct ggt gct tcc gtg ata cag ccc agc tca tca cca tta gaa      1920
Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu
625                 630                 635                 640

gct tct tca gtt aat tat gaa agc ata aaa cat gag cct gaa aac ccc      1968
Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile Lys His Glu Pro Glu Asn Pro
                645                 650                 655

cca cca tat gaa gag gcc atg agt gta tca cta aaa aaa gta tca gga      2016
Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly
            660                 665                 670

ata aag gaa gaa att aaa gag cct gaa aat att aat gca gct ctt caa      2064
Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu Asn Ile Asn Ala Ala Leu Gln
        675                 680                 685

gaa aca gaa gct cct tat ata tct att gca tgt gat tta att aaa gaa      2112
Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu
    690                 695                 700

aca aag ctt tct gct gaa cca gct ccg gat ttc tct gat tat tca gaa      2160
Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu
705                 710                 715                 720

atg gca aaa gtt gaa cag cca gtg cct gat cat tct gag cta gtt gaa      2208
Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro Asp His Ser Glu Leu Val Glu
                725                 730                 735

gat tcc tca cct gat tct gaa cca gtt gac tta ttt agt gat gat tca      2256
Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser
            740                 745                 750

ata cct gac gtt cca caa aaa caa gat gaa act gtg atg ctt gtg aaa      2304
Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp Glu Thr Val Met Leu Val Lys
        755                 760                 765

gaa agt ctc act gag act tca ttt gag tca atg ata gaa tat gaa aat      2352
Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu Ser Met Ile Glu Tyr Glu Asn
    770                 775                 780

aag gaa aaa ctc agt gct ttg cca cct gag gga gga aag cca tat ttg      2400
Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro Glu Gly Gly Lys Pro Tyr Leu
785                 790                 795                 800

gaa tct ttt aag ctc agt tta gat aac aca aaa gat acc ctg tta cct      2448
Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn Thr Lys Asp Thr Leu Leu Pro
                805                 810                 815

gat gaa gtt tca aca ttg agc aaa aag gag aaa att cct ttg cag atg      2496
Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys Glu Lys Ile Pro Leu Gln Met
            820                 825                 830

gag gag ctc agt act gca gtt tat tca aat gat gac tta ttt att tct      2544
Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser
        835                 840                 845
```

```
aag gaa gca cag ata aga gaa act gaa acg ttt tca gat tca tct cca     2592
Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro
    850                 855                 860

att gaa att ata gat gag ttc cct aca ttg atc agt tct aaa act gat     2640
Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp
865                 870                 875                 880

tca ttt tct aaa tta gcc agg gaa tat act gac cta gaa gta tcc cac     2688
Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr Thr Asp Leu Glu Val Ser His
                885                 890                 895

aaa agt gaa att gct aat gcc ccg gat gga gct ggg tca ttg cct tgc     2736
Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys
            900                 905                 910

aca gaa ttg ccc cat gac ctt tct ttg aag aac ata caa ccc aaa gtt     2784
Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val
        915                 920                 925

gaa gag aaa atc agt ttc tca gat gac ttt tct aaa aat ggg tct gct     2832
Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala
    930                 935                 940

aca tca aag gtg ctc tta ttg cct cca gat gtt tct gct ttg gcc act     2880
Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr
945                 950                 955                 960

caa gca gag ata gag agc ata gtt aaa ccc aaa gtt ctt gtg aaa gaa     2928
Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys Pro Lys Val Leu Val Lys Glu
                965                 970                 975

gct gag aaa aaa ctt cct tcc gat aca gaa aaa gag gac aga tca cca     2976
Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro
            980                 985                 990

tct gct ata ttt tca gca gag ctg  agt aaa act tca gtt  gtt gac ctc   3024
Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu  Ser Lys Thr Ser Val  Val Asp Leu
        995                 1000                1005

ctg tac  tgg aga gac att aag  aag act gga gtg gtg  ttt ggt gcc      3069
Leu Tyr  Trp Arg Asp Ile Lys  Lys Thr Gly Val Val  Phe Gly Ala
    1010                1015                1020

agc cta  ttc ctg ctg ctt tca  ttg aca gta ttc agc  att gtg agc      3114
Ser Leu  Phe Leu Leu Leu Ser  Leu Thr Val Phe Ser  Ile Val Ser
    1025                1030                1035

gta aca  gcc tac att gcc ttg  gcc ctg ctc tct gtg  acc atc agc      3159
Val Thr  Ala Tyr Ile Ala Leu  Ala Leu Leu Ser Val  Thr Ile Ser
    1040                1045                1050

ttt agg  ata tac aag ggt gtg  atc caa gct atc cag  aaa tca gat      3204
Phe Arg  Ile Tyr Lys Gly Val  Ile Gln Ala Ile Gln  Lys Ser Asp
    1055                1060                1065

gaa ggc  cac cca ttc agg gca  tat ctg gaa tct gaa  gtt gct ata      3249
Glu Gly  His Pro Phe Arg Ala  Tyr Leu Glu Ser Glu  Val Ala Ile
    1070                1075                1080

tct gag  gag ttg gtt cag aag  tac agt aat tct gct  ctt ggt cat      3294
```

```
Ser Glu  Glu Leu Val Gln Lys  Tyr Ser Asn Ser Ala  Leu Gly His
    1085                 1090                 1095

gtg aac  tgc acg ata aag gaa  ctc agg cgc ctc ttc  tta gtt gat      3339
Val Asn  Cys Thr Ile Lys Glu  Leu Arg Arg Leu Phe  Leu Val Asp
    1100                 1105                 1110

gat tta  gtt gat tct ctg aag  ttt gca gtg ttg atg  tgg gta ttt      3384
Asp Leu  Val Asp Ser Leu Lys  Phe Ala Val Leu Met  Trp Val Phe
    1115                 1120                 1125

acc tat  gtt ggt gcc ttg ttt  aat ggt ctg aca cta  ctg att ttg      3429
Thr Tyr  Val Gly Ala Leu Phe  Asn Gly Leu Thr Leu  Leu Ile Leu
    1130                 1135                 1140

gct ctc  att tca ctc ttc agt  gtt cct gtt att tat  gaa cgg cat      3474
Ala Leu  Ile Ser Leu Phe Ser  Val Pro Val Ile Tyr  Glu Arg His
    1145                 1150                 1155

cag gca  cag ata gat cat tat  cta gga ctt gca aat  aag aat gtt      3519
Gln Ala  Gln Ile Asp His Tyr  Leu Gly Leu Ala Asn  Lys Asn Val
    1160                 1165                 1170

aaa gat  gct atg gct aaa atc  caa gca aaa atc cct  gga ttg aag      3564
Lys Asp  Ala Met Ala Lys Ile  Gln Ala Lys Ile Pro  Gly Leu Lys
    1175                 1180                 1185

cgc aaa  gct gaa tga aaacgcccaa aataattagt aggagttcat ctttaaaggg    3619
Arg Lys  Ala Glu
    1190

gatattcatt tgattatacg ggggagggtc agggaagaac gaaccttgac gttgcagtgc   3679

agtttcacag atcgttgtta gatctttatt tttagccatg cactgttgtg aggaaaaatt   3739

acctgtcttg actgccatgt gttcatcatc ttaagtattg taagctgcta tgtatggatt   3799

taaaccgtaa tcatatcttt ttcctatctg aggcactggt ggaataaaaa acctgtatat   3859

tttactttgt tgcagatagt cttgccgcat cttggcaagt tgcagagatg gtggagctag   3919


<210>  2
<211>  1192
<212>  белок
<213>  Homo sapiens

<400>  2

Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser Ser Asp Ser Pro
1               5                  10                  15

Pro Arg Pro Gln Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Arg Glu Pro Glu
            20                  25                  30

Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Asp
        35                  40                  45
```

Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly Leu Ser
50 55 60

Ala Ala Pro Val Pro Thr Ala Pro Ala Ala Gly Ala Pro Leu Met Asp
65 70 75 80

Phe Gly Asn Asp Phe Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala
85 90 95

Ala Pro Pro Val Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Asp Pro Ser Pro
100 105 110

Val Ser Ser Thr Val Pro Ala Pro Ser Pro Leu Ser Ala Ala Ala Val
115 120 125

Ser Pro Ser Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro
130 135 140

Pro Pro Pro Pro Ala Ser Val Ser Pro Gln Ala Glu Pro Val Trp Thr
145 150 155 160

Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Ala Ala Pro
165 170 175

Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu Phe Ala Leu
180 185 190

Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Arg Ser Ser Ala Glu Asn Met Asp
195 200 205

Leu Lys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Ile Ser Ala Gly Gln Glu Asp Phe
210 215 220

Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro
225 230 235 240

Leu Ser Ala Ala Ser Phe Lys Glu His Glu Tyr Leu Gly Asn Leu Ser
245 250 255

Thr Val Leu Pro Thr Glu Gly Thr Leu Gln Glu Asn Val Ser Glu Ala
260 265 270

Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys Thr Leu Leu Ile Asp Arg Asp
275 280 285

Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met Gly Ser Ser Phe

290 295 300

Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala Val Ile Val Ala Asn Pro Arg
305 310 315 320

Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp Glu Glu Glu Lys Leu Val Ser
325 330 335

Asn Asn Ile Leu His Asn Gln Gln Glu Leu Pro Thr Ala Leu Thr Lys
340 345 350

Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser Ser Glu Lys Ala Lys Asp Ser
355 360 365

Phe Asn Glu Lys Arg Val Ala Val Glu Ala Pro Met Arg Glu Glu Tyr
370 375 380

Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Arg Val Trp Glu Val Lys Asp Ser Lys
385 390 395 400

Glu Asp Ser Asp Met Leu Ala Ala Gly Gly Lys Ile Glu Ser Asn Leu
405 410 415

Glu Ser Lys Val Asp Lys Lys Cys Phe Ala Asp Ser Leu Glu Gln Thr
420 425 430

Asn His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Ser Asn Asp Asp Thr Ser Phe Pro
435 440 445

Ser Thr Pro Glu Gly Ile Lys Asp Arg Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Cys
450 455 460

Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu Ser Ile Ala Thr Asn Ile Phe
465 470 475 480

Pro Leu Leu Gly Asp Pro Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys
485 490 495

Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val Thr Glu Lys Asn Thr Ser Thr
500 505 510

Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu Val Ala Ala Gln Asp Ser Glu Thr Asp
515 520 525

Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys Val Thr Glu Glu Val Val Ala
530 535 540

Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu
545 550 555 560

Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys
565 570 575

Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro
580 585 590

Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser
595 600 605

Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val
610 615 620

Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu
625 630 635 640

Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile Lys His Glu Pro Glu Asn Pro
645 650 655

Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly
660 665 670

Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu Asn Ile Asn Ala Ala Leu Gln
675 680 685

Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu
690 695 700

Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu
705 710 715 720

Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro Asp His Ser Glu Leu Val Glu
725 730 735

Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser
740 745 750

Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp Glu Thr Val Met Leu Val Lys
755 760 765

Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu Ser Met Ile Glu Tyr Glu Asn
770 775 780

Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro Glu Gly Gly Lys Pro Tyr Leu
785 790 795 800

Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn Thr Lys Asp Thr Leu Leu Pro
805 810 815

Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys Glu Lys Ile Pro Leu Gln Met
820 825 830

Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser
835 840 845

Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro
850 855 860

Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp
865 870 875 880

Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr Thr Asp Leu Glu Val Ser His
885 890 895

Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys
900 905 910

Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val
915 920 925

Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala
930 935 940

Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr
945 950 955 960

Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys Pro Lys Val Leu Val Lys Glu
965 970 975

Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro
980 985 990

Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val Val Asp Leu
995 1000 1005

Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly Ala
1010 1015 1020

Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser
1025 1030 1035

Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser
1040 1045 1050

Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp
1055 1060 1065

Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile
1070 1075 1080

Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His
1085 1090 1095

Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp
1100 1105 1110

Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe
1115 1120 1125

Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu
1130 1135 1140

Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Val Pro Val Ile Tyr Glu Arg His
1145 1150 1155

Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys Asn Val
1160 1165 1170

Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu Lys
1175 1180 1185

Arg Lys Ala Glu
1190

<210> 3
<211> 819
<212> белок
<213> Homo sapiens

<220>
<221> пептид
<222> (1)..(819)
<223> Nig человека

<400> 3

Asp Glu Thr Leu Phe Ala Leu Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Arg
1 5 10 15

Ser Ser Ala Glu Asn Met Asp Leu Lys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Ile
20 25 30

Ser Ala Gly Gln Glu Asp Phe Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala
35 40 45

Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro Leu Ser Ala Ala Ser Phe Lys Glu His
50 55 60

Glu Tyr Leu Gly Asn Leu Ser Thr Val Leu Pro Thr Glu Gly Thr Leu
65 70 75 80

Gln Glu Asn Val Ser Glu Ala Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys
85 90 95

Thr Leu Leu Ile Asp Arg Asp Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr
100 105 110

Ser Glu Met Gly Ser Ser Phe Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala
115 120 125

Val Ile Val Ala Asn Pro Arg Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp
130 135 140

Glu Glu Glu Lys Leu Val Ser Asn Asn Ile Leu His Asn Gln Gln Glu
145 150 155 160

Leu Pro Thr Ala Leu Thr Lys Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser
165 170 175

Ser Glu Lys Ala Lys Asp Ser Phe Asn Glu Lys Arg Val Ala Val Glu
180 185 190

Ala Pro Met Arg Glu Glu Tyr Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Arg Val
195 200 205

Trp Glu Val Lys Asp Ser Lys Glu Asp Ser Asp Met Leu Ala Ala Gly
210 215 220

Gly Lys Ile Glu Ser Asn Leu Glu Ser Lys Val Asp Lys Lys Cys Phe
225 230 235 240

Ala Asp Ser Leu Glu Gln Thr Asn His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Ser

245 250 255

Asn Asp Asp Thr Ser Phe Pro Ser Thr Pro Glu Gly Ile Lys Asp Arg
260 265 270

Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Cys Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu
275 280 285

Ser Ile Ala Thr Asn Ile Phe Pro Leu Leu Gly Asp Pro Thr Ser Glu
290 295 300

Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val
305 310 315 320

Thr Glu Lys Asn Thr Ser Thr Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu Val Ala
325 330 335

Ala Gln Asp Ser Glu Thr Asp Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys
340 345 350

Val Thr Glu Glu Val Val Ala Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp
355 360 365

Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr
370 375 380

Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val
385 390 395 400

Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu
405 410 415

Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu
420 425 430

Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln
435 440 445

Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile
450 455 460

Lys His Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val
465 470 475 480

Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu
485 490 495

Asn Ile Asn Ala Ala Leu Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile
500 505 510

Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro
515 520 525

Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro
530 535 540

Asp His Ser Glu Leu Val Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val
545 550 555 560

Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp
565 570 575

Glu Thr Val Met Leu Val Lys Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu
580 585 590

Ser Met Ile Glu Tyr Glu Asn Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro
595 600 605

Glu Gly Gly Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn
610 615 620

Thr Lys Asp Thr Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys
625 630 635 640

Glu Lys Ile Pro Leu Gln Met Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser
645 650 655

Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu
660 665 670

Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr
675 680 685

Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr
690 695 700

Thr Asp Leu Glu Val Ser His Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp
705 710 715 720

Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu
725 730 735

```
Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp
            740                 745                 750

Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro
        755                 760                 765

Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys
    770                 775                 780

Pro Lys Val Leu Val Lys Glu Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr
785                 790                 795                 800

Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser
                805                 810                 815

Lys Thr Ser
```

<210> 4
<211> 246
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 4

```
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1               5                   10                  15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
        35                  40                  45

Ser Asn Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Gln Lys Asn Tyr Val
65                  70                  75                  80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
                85                  90                  95

Ser Leu Tyr Leu Arg Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Leu Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Ser Leu
```

115 120 125

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
145 150 155 160

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
165 170 175

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
180 185 190

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
195 200 205

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
210 215 220

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro
245

<210> 5
<211> 246
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 5

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Cys Asp Arg Leu Leu Ser Cys Arg
35 40 45

Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Cys Asp Arg Leu Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser
65 70 75 80

Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
85 90 95

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Cys Asp Arg Leu
100 105 110

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
115 120 125

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
130 135 140

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
145 150 155 160

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
165 170 175

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
180 185 190

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
195 200 205

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
210 215 220

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
225 230 235 240

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
245

<210> 6
<211> 741
<212> ДНК
<213> Домовая мышь

<400> 6
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctattt tagaaggtgt ccagtgtgag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg gggggtccct gagactctcc 120

tgtgcagctt ctggattcac ctttagtaac tattggatga gctgggtccg ccaggctccg 180

gggaaagggc tggagtgggt ggccaccata aagcaagatg gaagtcagaa aaactatgtg 240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg 300

cgattgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgac tgaactcttc 360

gatctctggg gccgtggctc cctggtcacc gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg 420

gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 480

ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc 540

agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 600

gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 660

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 720

acatgcccac cgtgcccata a 741

<210> 7
<211> 705
<212> ДНК
<213> Домовая мышь

<400> 7
atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatcac cttcggccaa 360

gggacacgac tggagattaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 420

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 8
<211> 10
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 8

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 17
<212> белок

<213> Домовая мышь

<400> 9

Thr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Gln Lys Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 10
<211> 5
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 10

Glu Leu Phe Asp Leu
1 5

<210> 11
<211> 11
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 11

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 12
<211> 7
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 12

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 13

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr
1 5

<210> 14
<211> 34
<212> ДНК
<213> Домовая мышь

<400> 14
agggccagtc agagtgttag cagctactta gcct 34

<210> 15
<211> 21
<212> ДНК
<213> Домовая мышь

<400> 15
gatgcatcca acagggccac t 21

<210> 16
<211> 27
<212> ДНК
<213> Домовая мышь

<400> 16
cagcagcgta gcaactggcc gatcacc 27

<210> 17
<211> 30
<212> ДНК
<213> Домовая мышь

<400> 17
ggattcacct ttagtaacta ttggatgagc 30

<210> 18
<211> 51
<212> ДНК
<213> Домовая мышь

<400> 18
accataaagc aagatggaag tcagaaaaac tatgtggact ctgtgaaggg c 51

<210> 19
<211> 15
<212> ДНК
<213> Домовая мышь

<400> 19
gaactcttcg atctc 15

<210> 20
<211> 57
<212> ДНК
<213> Домовая мышь

<400> 20
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctattt tagaaggtgt ccagtgt 57

<210> 21
<211> 19
<212> белок

<213> Домовая мышь

<400> 21

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 22
<211> 60
<212> ДНК
<213> Домовая мышь

<400> 22
atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

<210> 23
<211> 20
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 23

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly
20

<210> 24
<211> 460
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 24

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

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

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Gln Lys Asn Tyr Val
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Arg Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Leu Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Ser Leu
115 120 125

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

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
145 150 155 160

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
165 170 175

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
180 185 190

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
195 200 205

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
210 215 220

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
225 230 235 240

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
275 280 285

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

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

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

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

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

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
370 375 380

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
405 410 415

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

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

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

<210> 25
<211> 234
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 25

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

Gly Thr Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 26
<211> 321
<212> ДНК
<213> Домовая мышь

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 26
gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

```
tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc      192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg atc      288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
                85                  90                  95

acc ttc ggc caa ggg aca aag ctt gaa atc aaa                         321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 27
<211> 107
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 27

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 28
<211> 342
<212> ДНК
<213> Домовая мышь

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(342)

<400> 28

```
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg        48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gct tct gga ttc acc ttt agt aac tat        96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct ccg ggg aaa ggg ctg gag tgg gtg       144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gcc acc ata aag caa gat gga agt cag aaa aac tat gtg gac tct gtg       192
Ala Thr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Gln Lys Asn Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat       240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg cga ttg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt       288
Leu Arg Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg act gaa ctc ttc gat ctc tgg ggc cgt ggc tcc ctg gtc acc gtc       336
Ala Thr Glu Leu Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Ser Leu Val Thr Val
            100                 105                 110

tcc tca                                                              342
Ser Ser
```

<210> 29
<211> 114
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 29

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Ala Thr Ile Lys Gln Asp Gly Ser Gln Lys Asn Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Arg Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Ser Ser

<210> 30
<211> 19
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 30

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Val Gln Ala

<210> 31
<211> 20
<212> белок
<213> Домовая мышь

<400> 31

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

Gly Thr Arg Cys
20

<210> 32
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер

<400> 32
tgagggaagt agggatgtgc 20

<210> 33

<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер

<400> 33
caggtgatgt acgctctgga 20

ATG GAA GCC CCA GCT CAG CTT CTC TTC CTC CTG CTA CTC TGG CTC CCA GAT ACC ACC GGA

M E A P A Q L L F L L L L W L P D T T G

GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T

CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAA CAG AAA CCT

L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P

GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A

AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P

GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCG ATC ACC TTC GGC CAA

E D F A V Y Y C Q Q R S N W P I T F G Q

GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA

G T R L E I K R T V A A P S V F I F P P

TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT

S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y

CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG

P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q

GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG

E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T

CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC

L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G

CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG

L S S P V T K S F N R G E C

Фиг. 1

```
ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA GAA GGT GTC CAG TGT GAG
 M   E   F   G   L   S   W   V   F   L   V   A   I   L   E   G   V   Q   C   E

GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC
 V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L   R   L   S

TGT GCA GCT TCT GGA TTC ACC TTT AGT AAC TAT TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCG
 C   A   A   S   G   F   T   F   S   N   Y   W   M   S   W   V   R   Q   A   P

GGG AAA GGG CTG GAG TGG GTG GCC ACC ATA AAG CAA GAT GGA AGT CAG AAA AAC TAT GTG
 G   K   G   L   E   W   V   A   T   I   K   Q   D   G   S   Q   K   N   Y   V

GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG
 D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L

CGA TTG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG ACT GAA CTC TTC
 R   L   N   S   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   T   E   L   F

GAT CTC TGG GGC CGT GGC TCC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG
 D   L   W   G   R   G   S   L   V   T   V   S   S   A   S   T   K   G   P   S

GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC
 V   F   P   L   A   P   S   S   K   S   T   S   G   G   T   A   A   L   G   C

CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC
 L   V   K   D   Y   F   P   E   P   V   T   V   S   W   N   S   G   A   L   T

AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC
 S   G   V   H   T   F   P   A   V   L   Q   S   S   G   L   Y   S   L   S   S

GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC
 V   V   T   V   P   S   S   S   L   G   T   Q   T   Y   I   C   N   V   N   H

AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC
 K   P   S   N   T   K   V   D   K   R   V   E   P   K   S   C   D   K   T   H

ACA TGC CCA CCG TGC CCA TAA
 T   C   P   P   C   P
```

Фиг. 2

Последовательность ДНК, кодирующей вариабельный участок легкой цепи.

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggcc
agtcagagtgttagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgat
gcatccaacagggccactggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggacagacttcactctcaccat
cagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggccgatcaccttcggcca
agggacaaagcttgaaatcaaa

Последовательность ДНК, кодирующей вариабельный участок тяжелой цепи.

gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtccagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcttct
ggattcacctttagtaactattggatgagctgggtccgccaggctccggggaaagggctggagtgggtggccac
cataaagcaagatggaagtcagaaaaactatgtggactctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaa
cgccaagaactcactgtatctgcgattgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgactg
aactcttcgatctctggggccgtggctccctggtcaccgtctcctca

Фиг. 3

Последовательности вариабельного и константного участка легкой цепи IgG4, включая последовательность лидерного пептида.

Лидерный пептид *CDRL-1*

*MSVLTQVLALLLLWLTGTRC*EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSSYLA**WY

CDRL-2

CDRL-3

QQKPGQAPRLLIY**DASNRAT**GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQ RSN**

Ск

WPITFGQGT**K**LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

Аминокислотные последовательности тяжелой цепи IgG4, включая последовательность лидерного пептида, CH1, шарнирного участка, CH2 и CH3.

Лидерный пептид

CDR-H1

*MAWVWTLPFLMAAAQSVQA*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSNY WM**

CDR-H2

SWVRQAPGKGLEWVA**TIKQDGSQKNYVDSVKG**RFTISRDNAKNSLYLRLNSLR AE ***CDR-H3***

DTAVYYCAT**ELFDL**WGRGSLVTVSS

CH1

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAV шарнирный участок

LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPSCP

CH2

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAK

CH3

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK

Фиг. 4

Последовательность легкой цепи антител 6A3-IgG1, включая последовательности CDR

Лидерный пептид
M E A P A Q L L F L L L L W L P D T T G

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T
CDR-L1
L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
CDR-L2
G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
CDR-L3
E D F A V Y Y C Q Q R S N W P I T F G Q

G T R L E I K R T V A A P S V F I F P P

S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y

P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q

E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T

L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G

L S S P V T K S F N R G E C

Последовательность тяжелой цепи антител 6A3-IgG1, включая последовательности CDR

Лидерный пептид
M E F G L S W V F L V A I L E G V Q C E

V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S
CDR-H1
C A A S G F T F S N Y W M S W V R Q A P
CDR-H2
G K G L E W V A T I K Q D G S Q K N Y V

D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L
CDR-H3
R L N S L R A E D T A V Y Y C A T E L F

D L W G R G S L V T V S S A S T K G P S

V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C

L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T

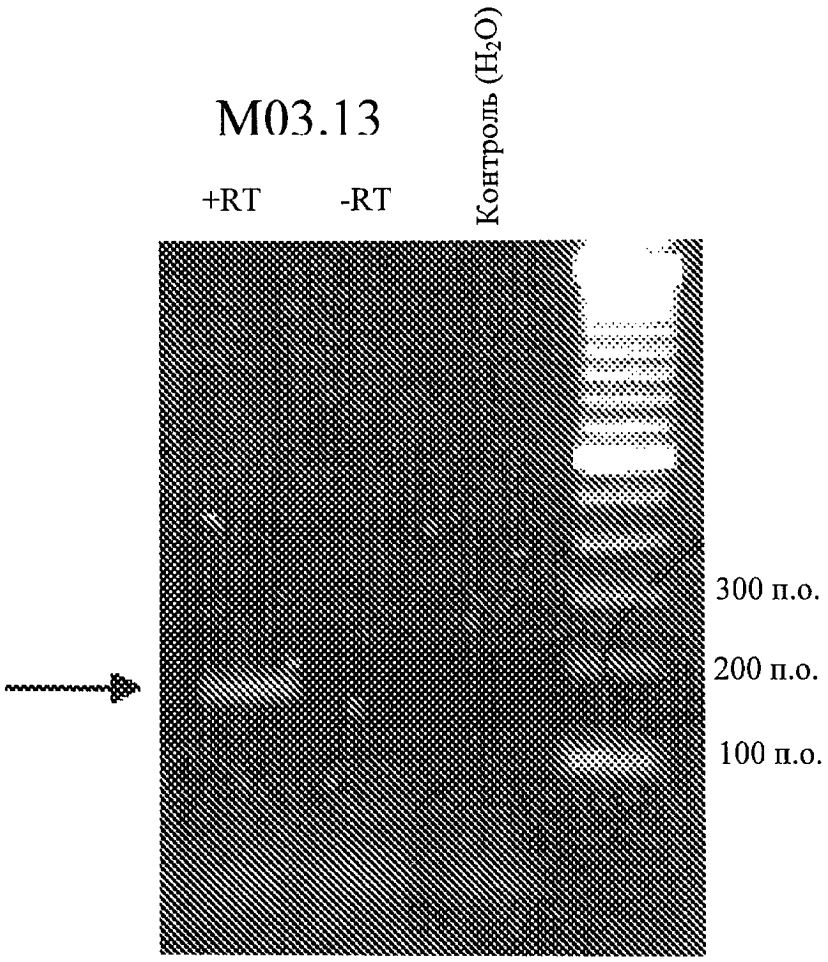
S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S

V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H

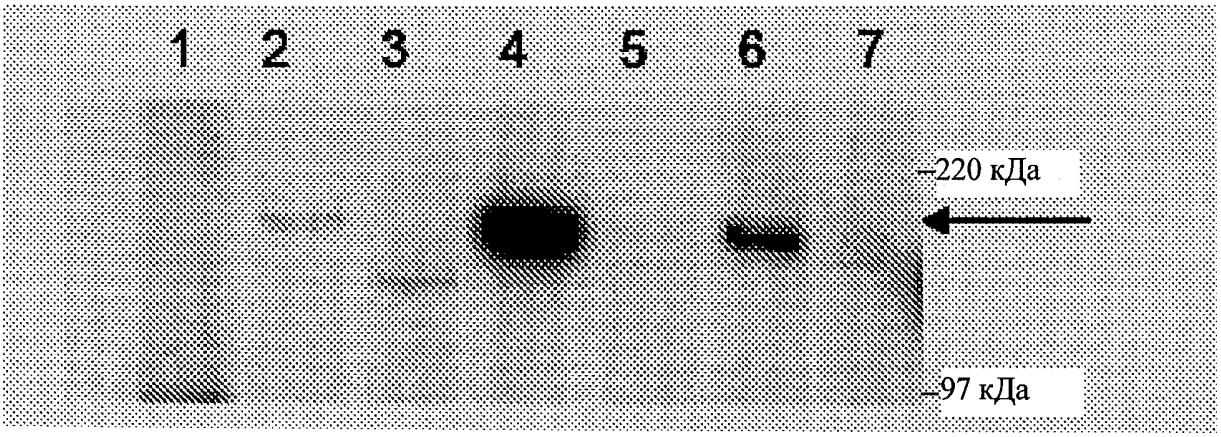
K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H

T C P P C P

Фиг. 5

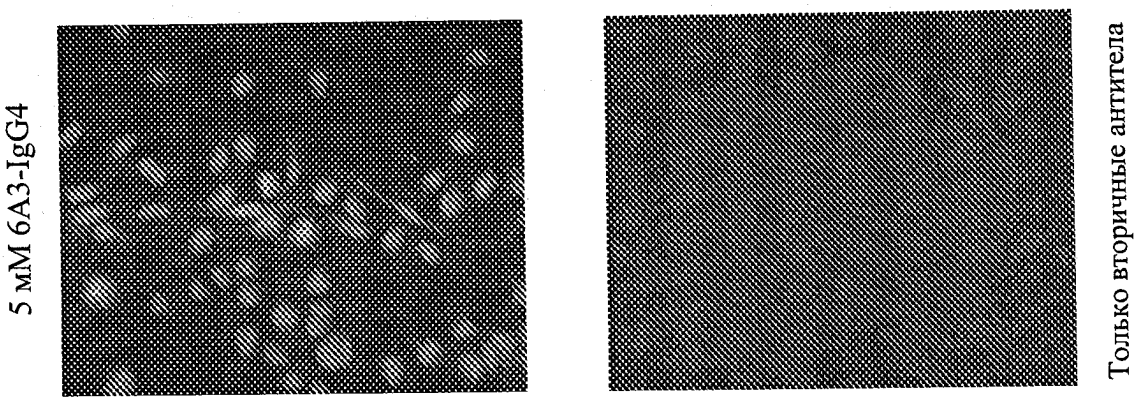

M03.13
+RT
-RT
Контроль (H_2O)
300 п.о.
200 п.о.
100 п.о.

Фиг. 6


1
2
3
4
5
6
7
~220 кДа
~97 кДа

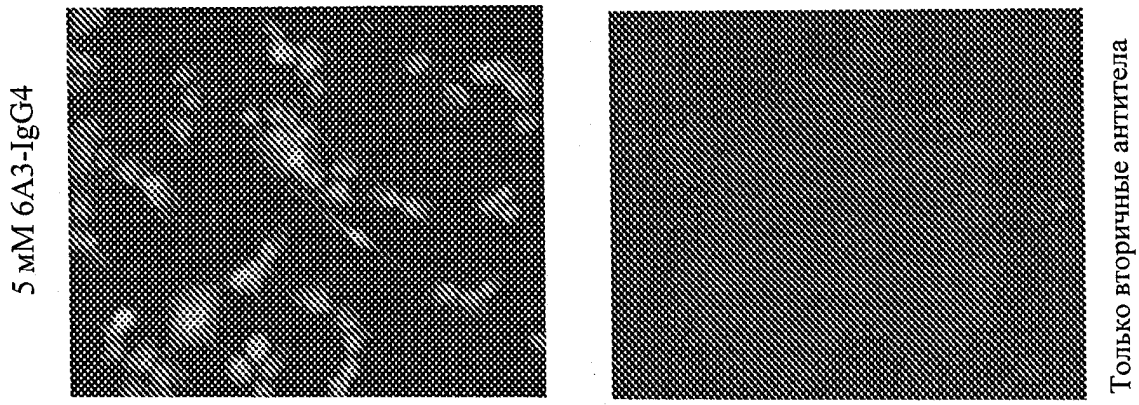
Фиг. 7

Клетки M03.13

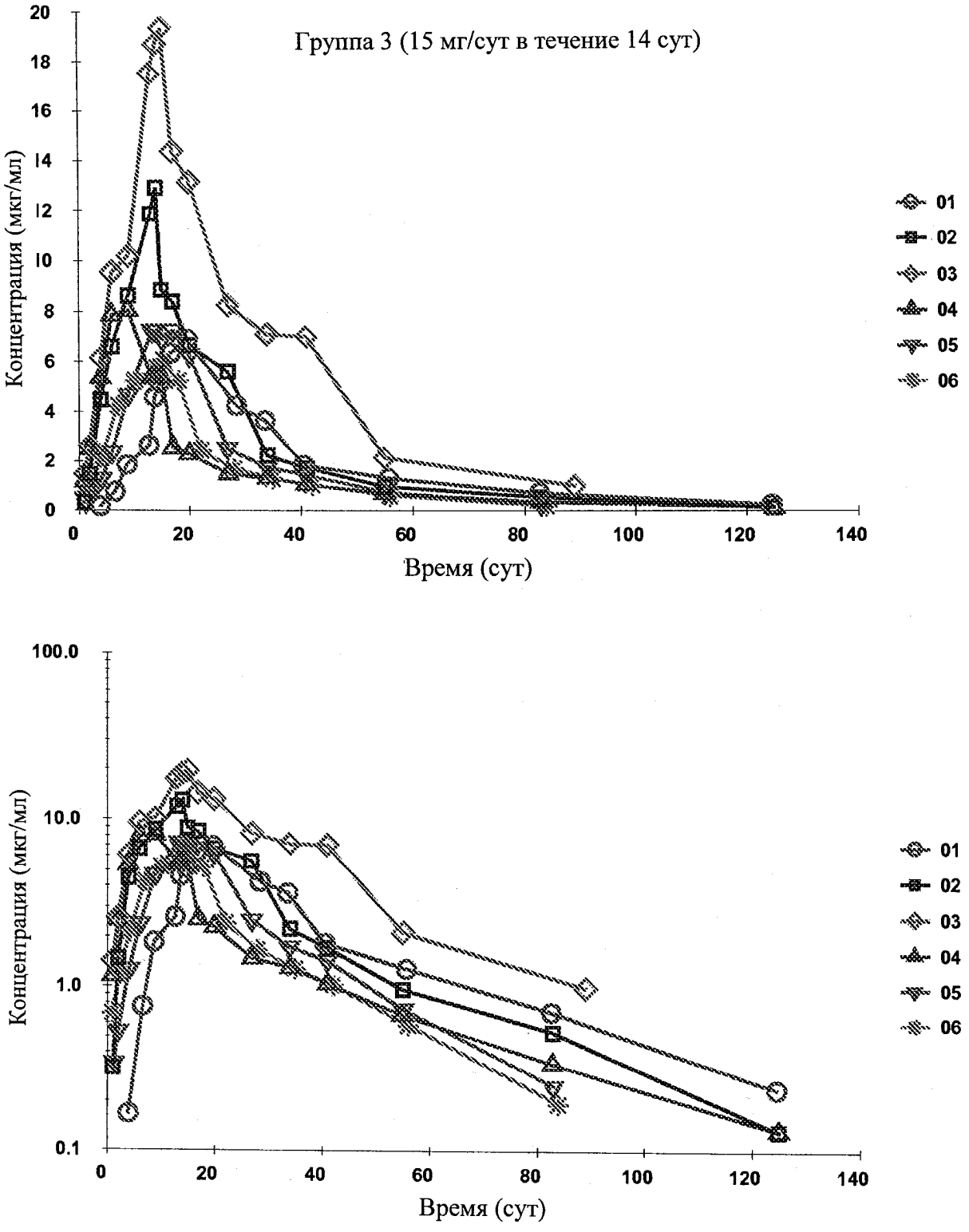


Фиг. 8а

Клетки HOG

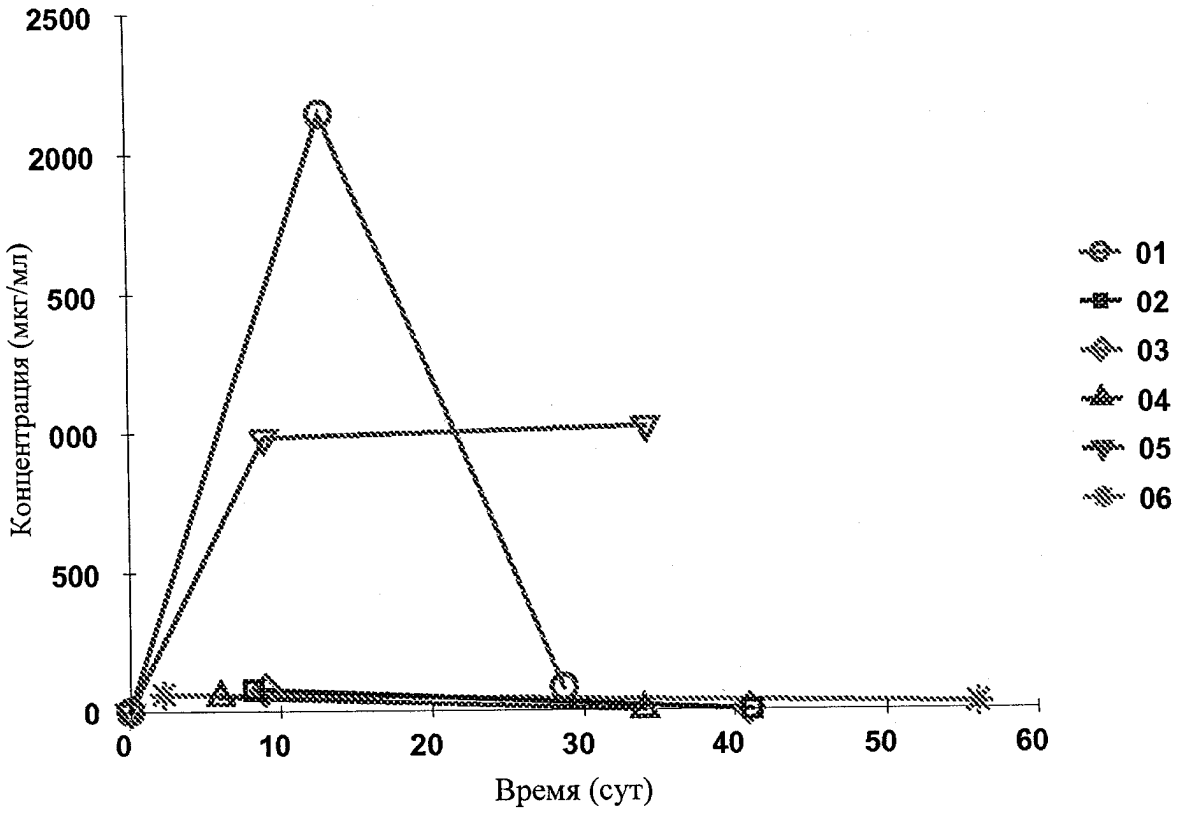


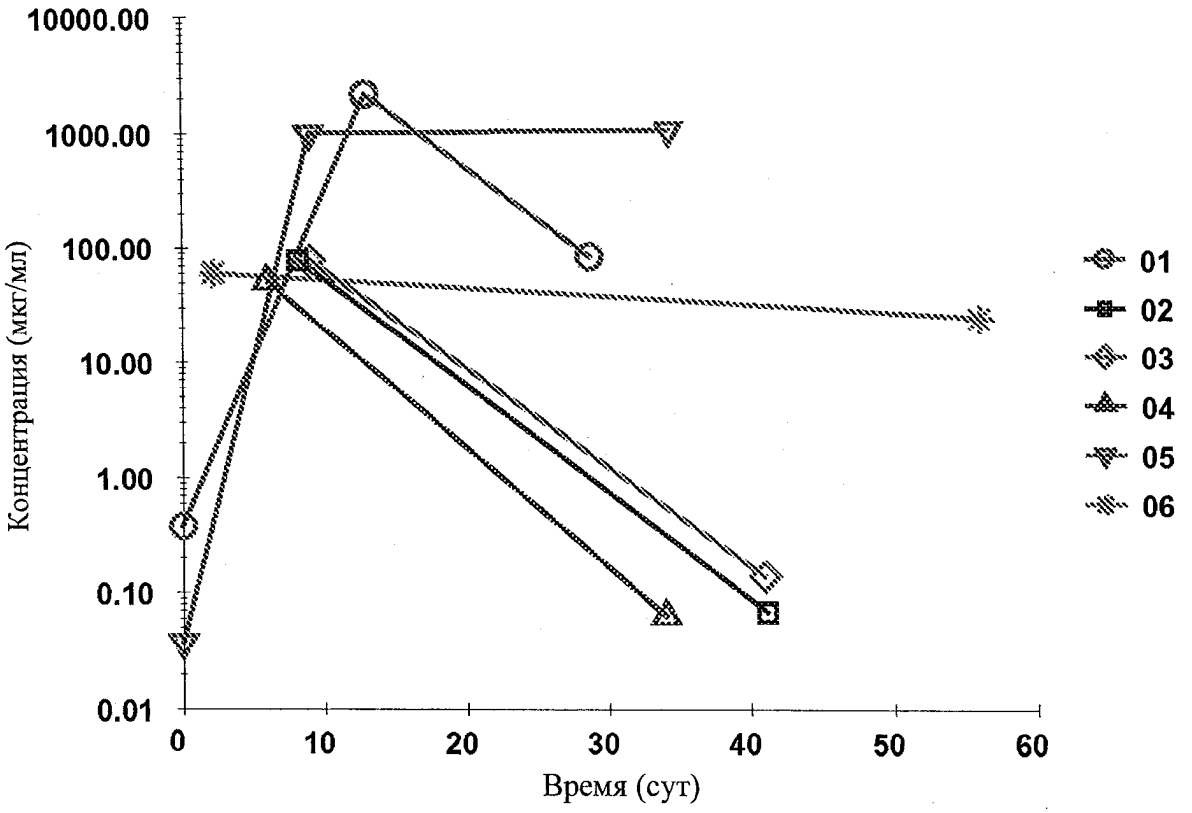
Фиг. 8б


Группа 3 (15 мг/сут в течение 14 сут)
Концентрация (мкг/мл)
Время (сут)
01
02
03
04
05
06
100.0
10.0
1.0
0.1

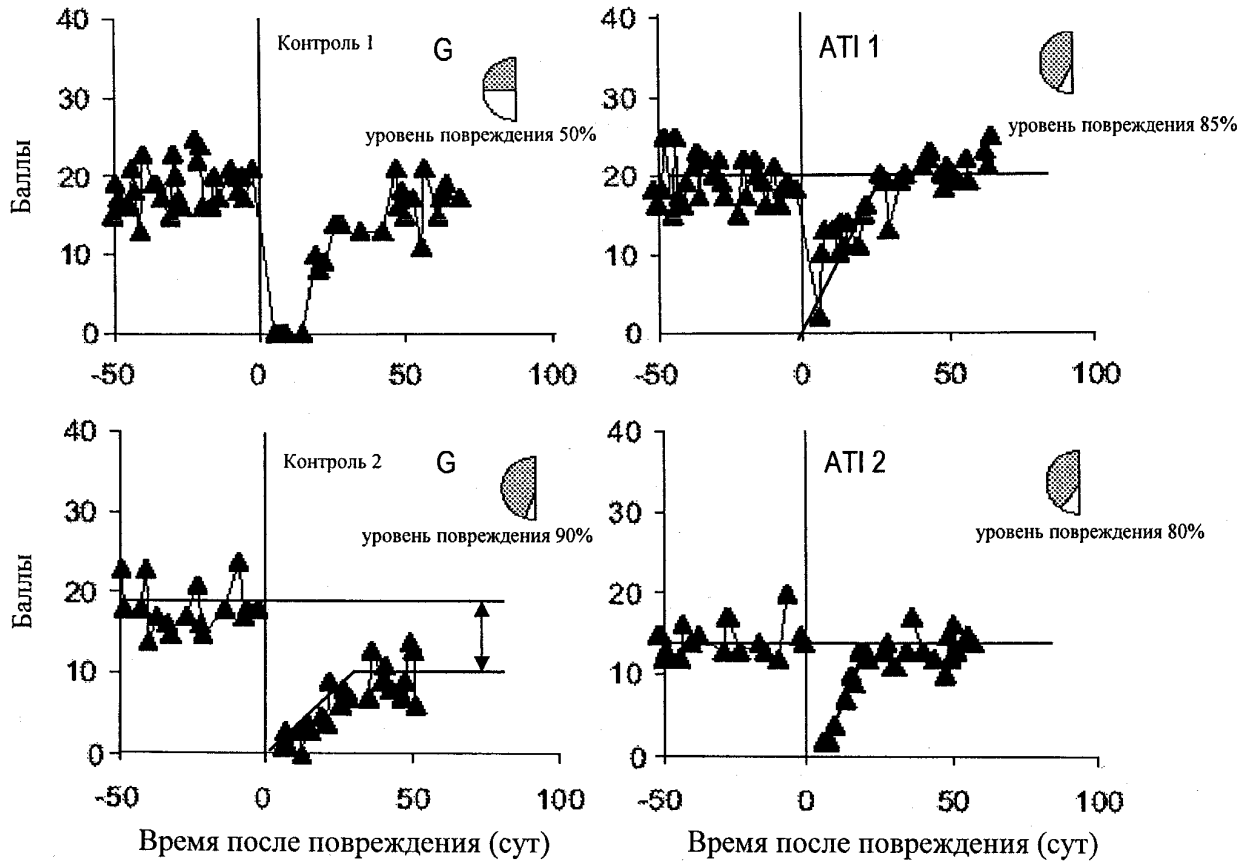
Фиг. 9

(15 мг/сут в течение 14 сут)





Фиг. 10


Баллы
40
30
20
10
0
-50
0
50
100
Контроль 1
G
уровень повреждения 50%
ATI 1
уровень повреждения 85%
Контроль 2
уровень повреждения 90%
ATI 2
уровень повреждения 80%
Время после повреждения (сут)
Время после повреждения (сут)

Фиг. 11