

Збереження належного балансу між прокоагулявальною й антикоагулявальною активністю у кровоносних судинах істотно для нормального гемостазу (E. W. Davie й ін., *Biochemistry*, 30(43), 1991, стор.10363-10370). Порушення балансу в напрямку коагуляції приводить до тромбозів, які можуть викликати серцевий приступ, інсульт, легеневу емболію й венозний тромбоз. Існує необхідність у створенні більш ефективних і безпечних антикоагулянтів для лікування специфічних тромботичних порушень.

Тканинний фактор (TF) - це трансмембранний глікопротеїн, який є основним ініціатором каскаду коагуляції (Y. Nemerson, *Thromb. Haemost.* 74(1), 1995, стор. 180-184). При нормальних фізіологічних умовах TF не контактує із кров'ю. При судинному пошкодженні вплив на кров субендотеліального TF і колагену приводить до активації факторів коагуляції й тромбоцитів і згодом до утворення гемостатичної пробки. Недоречно індукція експресії TF у різних клінічних ситуаціях може привести до тромбозу, який загрожує життю, та/або сприяє патологічним ускладненням. Вплив TF на наступне руйнування тромбоцита вважається відповідальним за тромботичну оклюзію, яка приводить до гострого інфаркту міокарда або інсульту. У цих ситуаціях протизапальні сигнальні шляхи, активовані факторами коагуляції, сприяють також утворенню набряку й збільшенню об'єму інфаркту. Судинне пошкодження, асоційоване з ангіопластикою, приводить до активації TF на клітинах гладенького м'яза (SMC), яка, як вважається, індукує шляхи передачі клітинних сигналів, зв'язані з рестенозом. Понадэкспресія TF при раку й грамнегативному сепсисі приводить до тромбозу, який загрожує життю, й активації запальних шляхів.

Комплекс факторів VIIa (FVIIa)/TF включається в патогенетичний механізм при різних тромботичних захворюваннях, і циркулюючий рівень TF є чинником ризику для деяких пацієнтів. Фактори VIIa й TF відіграють унікальні ролі при судинному пошкодженні в збереженні гемостазу й ініціації тромбозу. Експресується TF звичайно в адвентиціальній оболонці, але при судинному захворюванні невідповідно активується й експресується в середині й неоінтимі судини. Експресія TF в атеросклеротичних бляшках підвищена й екранована від крові товстим волокнистим шаром, який може руйнуватися, вивільняючи TF. Хірургічні втручання, такі, як балонна ангіопластика, встановлення стента або ендартеректомія, пошкоджують судинну стінку й вивільняють TF, який знаходиться під нею. В атеросклеротичній товстостінній бляшці з високим вмістом ліпідів спонтанне руйнування або ерозія ендотелію приводить до впливу TF і тромбозу, що закінчується нестабільною стенокардією й інфарктом міокарда. TF може циркулювати в мікрочастинках, які походять від клітин, і рівні циркулюючого TF при нестабільній стенокардії є підвищеними, допускаючи припущення про те, що цей циркулюючий TF може сприяти утворенню тромбу (H. Soejima й ін., *Circulation*, 99(22), 1999, стор.2908-2913). Часто злоякісна пухлина асоціюється зі станом гіперкоагуляції, який пояснюють понадэкспресією TF на пухлинних клітинах. Це викликає схильність пацієнта до тромбозу глибоких вен, легеневої емболії й низького ступеня коагулопатії споживання (DIC). Коагулопатія споживання приводить до відкладень фібрину в капілярних судинах, сприяючи пошкодженню багатьох органів. Результати, отримані на моделях тромбозу від гострого артеріального порушення, вказують, що засновані на білках інгібітори FVIIa/TF, такі, як інгібітор активного центра фактора VIIa (FVIIai) і інгібітор метаболічних шляхів тканинного фактора (TFPI), є ефективними антитромботичними засобами з меншою крововтратою, у порівнянні з інгібіторами тромбіну й фактора Ха (FXa). Крім того, інгібітори FVIIa/TF перевершують інші антикоагулянти (наприклад, гепарин, інгібітори FXa) у запобіганні утворення потовщення неоінтими й судинного стенозу після порушення, викликаного балонною ангіопластикою (Y. Jang й ін., *Circulation*, 92(10), 1995, стор.3041-3050).

Тромбомодулін (TM) - це трансмембранний глікопротеїн, який має антикоагулявальні властивості й переважно експресується на порожнинній поверхні ендотеліально-клітинної вистілки кровоносних судин (N.L. Esmon й ін., *J. Biol. Chem.* 257(2), 1982, стор.859-864; H.H. Salem й ін., *J. Biol. Chem.* 259(19), 1983, стор.12246-12251). Зрілий з повною послідовністю TM є модульним білком з 557 амінокислотних залишків, який складається з 5 структурних доменів: N-кінцевої гідрофобної ділянки (залишки 1-226); багатой цистеїном ділянки (залишки 226-462); O-глікозилюваної Ser/Thr-багатой ділянки (залишки 463-497); гідрофобної трансмембранної ділянки (залишки 498-521); і C-кінцевого цитоплазматичного хвоста (залишки 522-557).

Багата цистеїном ділянка включає шість повторюваних структур, гомологічних до попередника епідермального фактора росту (EGF), названого EGF-подібний, EGF-гомологічний або EGF-домени. Багата цистеїном ділянка далі може бути розділена на 3 домени: EGF-подібні повтори 1, 2 й 3 (EGF123, залишки 226-344), міждомenna петля між EGF3 й EGF4 (залишки 345-349) і EGF-подібні домени 4, 5 й 6 (EGF456, залишки 350-462). Функція EGF456 полягає в тому, щоб опосередковувати зв'язування й активацію білка C. Одне дослідження припускає, що п'ятий й шостий EGF-подібні повтори (EGF5, залишки 390-407 й EGF6, залишки 427-462, відповідно) мають здатність зв'язувати тромбін (S. Kurosawa й ін., *J. Biol. Chem.* 263(13), 1988, стор.5993-5996); інше припускає, що домену EGF456 досить, щоб діяти як кофактор опосередкованої тромбіном активності, яка активує білок C, (M. Zushi й ін., *J. Biol. Chem.* 264(18), 1989, стор.10351-10353). Ser/Thr-багатий домен підсилює опосередковане EGF456 зв'язування тромбіну. Третій EGF-подібний повтор (EGF3, залишки 311-344) потрібен для активації інгібітора фібринолізу, який активує тромбін (TAFI). Описано декілька точкових мутантів, які перешкоджають активації TAFI (W. Wang й ін., *J. Biol. Chem.* 275(30), 2000, стор.22942-22947). Комплекс тромбін/TM перетворює білок C у активований білок C (APC), який, у свою чергу, руйнує фактори Va й Villa, перешкоджаючи тим самим генерації тромбіну. Отже, TM функціонує як молекулярний перемикач, перетворюючи тромбін із прокоагулянту в антикоагулянт.

Значення K_m білка із для комплексу тромбін/TM знижується 10-кратно, коли TM локалізований на поверхні мембрани (C.N. Esmon, *ESEB J.* 9(10), 1995, стор.946-955). Концентрація білка C у крові (0,065мкМ) значно нижче повідомленого значення K_m (5мкМ) для розчинного комплексу TM/тромбін, звідси твердження, що TM на прокоагулявальній мембранній поверхні приведе до помітного локального підвищення швидкості генерації білка C.

TM інгібує тромбоз за механізмом, відмінним від гепарину або його похідних. Гепарин є кофактором антитромбіну III й інгібує як FXa, так і тромбін за антитромбін III-залежним механізмом. Зв'язаний із тромбом тромбін захищений від дії антитромбіну III, який обмежує антитромботичну ефективність гепарину або гепарину з низькою молекулярною масою (LMWH) на існуючих раніше згустках. Це пояснює відсутність у гепарину або

LMWH здатності інгібувати ріст тромбу, що запускається зв'язаним зі згустком тромбіном або протромбіназою у дослідженнях на приматах, крім людини. На відміну від цього рекомбінантний ТМ ослабляє індуковану згустком генерацію тромбіну й утворення фібрину дозозалежним способом (M. Mohri й ін. *Thromb. Haemost.* 80(6), 1998, стор.925-929). Інгібувальний ефект ТМ анулюється антитілом до білка С. Пригнічення зв'язаної зі згустком прокоагулянтної активності є клінічно актуальним, тому що зв'язана зі згустком прокоагулювальна активність приводить до більш швидкого росту тромбу й в остаточному підсумку до судинної оклюзії або тромбоемболічних ускладнень. Інгібування росту тромбу дозволяє ендогенній фібринолітичній системі видаляти згустки швидше й повністю. Крім того, очікується також, що ТМ більш ефективно, ніж гепарин, при патологічних станах, при яких антитромбін у плазмі знижений, таких, як коагулопатія споживання (DIC). Незважаючи на те, що як ТМ, так і гепарин інгібують поглинання тромбоцитів і фібриногену при експериментальній DIC, тільки ТМ був ефективний, коли рівні антитромбіну III знижувалися.

Короткий зміст винаходу

Даний винахід забезпечує нові злиті білки, які діють як антикоагулянти й включають білок, який взаємодіє або із тканинним фактором (TF), або з комплексом фактора VIIa/тканинний фактор (FVIIa/TF), і функціонально зв'язаний із тромбомодуліновим (ТМ) доменом EGF456, одним або в комбінації з іншим доменом ТМ, вибраним із групи, яка складається з домену N-кінцевої гідрофобної ділянки, домену EGF123, міждоменої петлі між EGF3 і EGF4 й О-глікозильованого Ser/Thr-багатого домену або їх аналогів, фрагментів, похідних або варіантів.

Злитий антикоагулювальний білок за даним винаходом спрямований на й зв'язує TF або комплекс FVIIa/TF у ділянці ушкодження, локалізуючи ТМ у ділянці ушкодження й таким чином, запобігаючи утворенню тромбу й у зв'язку із цим діючи більш ефективно як антикоагулянт, у порівнянні або з розчинним антитілом до TF, або розчинним ТМ, або фрагментами ТМ. Злитий білок більш ефективний, ніж гепарин з низькою молекулярною масою (LMWH) при лікуванні деяких захворювань, включаючи, але без обмеження, сепсис, коагулопатію споживання, ішемічний удар, тромбоз глибоких вен, гострі коронарні синдроми, тромбозні ускладнення після ангіопластики й коагулопатію при прогресуючій злоякісній пухлині. Крім того, злитий білок застосовується в хірургічних операціях на капілярних судинах, у трансплантатах шкіри й вен і при пересадці органів.

В іншому аспекті винахід забезпечує фармацевтичні композиції, які включають як об'єкт злиті білки.

В іншому аспекті винахід забезпечує спосіб захисту пацієнта від утворення тромбу, який включає введення згаданому пацієнтові терапевтично ефективної кількості злитого білка, і у зв'язку із цим пригнічення генерації тромбіну без безпосереднього впливу на інші параметри коагуляції, такі, як активація й агрегація тромбоцитів.

В іншому аспекті винахід стосується способу запобігання й лікування тромбозу глибоких вен (DVT) або коагулопатії споживання (DIC), або гострого коронарного синдрому, або злоякісної пухлини із проявом коагулопатії в пацієнта, який включає введення згаданому пацієнтові терапевтично ефективної кількості злитого білка.

В іншому аспекті винахід стосується способу регулювання запальної відповіді в пацієнта, який включає введення згаданому пацієнтові терапевтично ефективної кількості злитого білка.

Ще в одному аспекті злитий білок за винаходом може бути використаний для утворення покриття, яке не є тромбогенним, медичних інструментів, що контактують із кров'ю.

В іншому аспекті винахід стосується набору, який містить злитий білок, що включає білок, який забезпечує спрямоване перенесення і зв'язує TF або комплекс FVIIa/TF і домени ТМ. Альтернативно набір може включати послідовності ДНК, які кодують компоненти злитого білка.

Розкриваються також способи одержання злитих білків за винаходом як рекомбінантні, так і синтетичні.

Опис графіків

Фіг.1. Зв'язування антитіла scFv(TF)3e10 з розчинним TF (sTF) збільшує уявну спорідненість sTF до FVIIa. Активаційний аналіз sTF/FVIIa здійснювали, як описано в прикладі 5, під заголовком «Аналіз активації sTF/FVIIa», використовуючи 2нМ FVIIa у присутності й за відсутності 800нМ scFv(TF)3e10. Титрували sTF у пробі, і визначали швидкість розщеплення хромогенного субстрату (S-2266). Значення уявної K_D для sTF розраховували, використовуючи стандартну 4-параметричну апроксимацію.

Фіг.2. Вимірювання спорідненості зв'язування scFv(TF)3e10 до sTF. Аналіз sTF/FVIIa здійснювали, як описано в прикладі 5, під заголовком «Аналіз активації sTF/FVIIa», використовуючи 3нМ sTF й 2нМ FVIIa. Використана концентрація sTF була нижче значення K_D для зв'язування з FVIIa. Зв'язування антитіла scFv(TF)3e10 знижувало значення K_D sTF для зв'язування з FVIIa, приводячи до підвищення утворення комплексу sTF/FVIIa й, отже, швидкості розщеплення хромогенного субстрату S2266. Додавали scFv(TF)3e10 при зростаючих концентраціях і підвищену швидкість реакції використали, щоб визначити уявну K_D антитіла для sTF, використовуючи стандартну 4-параметричну апроксимацію.

Фіг.3. Мікрокалориметричний аналіз показує, що scFv(TF)3e10 має 20-кратну більш високу спорідненість до комплексу sTF/FVIIa, ніж до одного sTF. Комплекс sTF/FVIIa був попередньо отриманий додаванням 2,3-кратного молярного надлишку FVIIa відносно sTF. Гранулометричну ексклюзійну хроматографію використали, щоб підтвердити, що sTF повністю комплексований. Для визначення спорідненості антитіла до комплексу додавали 1,2мкМ комплексу sTF/FVIIa у комірку мікрокалориметра, і 65мкМ антитіла scFv(TF)3e10 додавали в шприц. Для визначення спорідненості антитіла до одного sTF додавали 10мкМ sTF у комірку, і 141мкМ scFv(TF)3e10 додавали в шприц. Аналіз даних проводили, використовуючи програму MicroCal Origin. Дані були апроксимовані до одного сайту зв'язування.

Фіг.4. Антитіло scFv(TF)3e10 дозозалежно інгібує аналіз активації фактора X (FX). Деталі аналізу описані в прикладі 5, під заголовком «Аналіз активації фактора X». IC_{50} означає дозу, необхідну для досягнення 50% інгібування.

Фіг.5. Злитий білок сильніше пригнічує коагуляцію, ніж антитіло TF або один ТМi456. Аналіз протромбінового часу (ПЧ) проводили, щоб порівняти злитий білок з антитілом TF або одним ТМi456.

Відповідний об'єм концентрованого інгібітора або антитіла TF (scFv(TF)3e10), TМi456, або злитого білка (scFv(TF)3e10-TМi456) додавали до 100мкл рекомбінантного людського тромбoplastину (Ortho Recombiplastin). Приблизно через 2хв додавали 100мкл відновленої людської плазми. Час коагуляції визначали на коагулометрі Haemoliance. Криві відповіді на дозу одержували для кожного інгібітора й потім використали регресійний аналіз, щоб розрахувати концентрацію (у нМ), необхідну для двократного збільшення часу згортання крові.

Фіг.6. Злитий білок зберігає повну кофакторну активність для активації білка С. Аналіз, описаний у прикладі 5, під заголовком «Аналіз (хромогенний) активації білка С», включав 20мкл зразка ТМ або ТМi456, що містив домени EGF4-6 і міждоменну петлю між EGF3 й EGF4, або злитий білок (scFv(TF)3e10-TМi456), 20мкл 1,5мкМ білок С і 20мкл 3нМ α -тромбін. Активації давали можливість проходити протягом 1год. Фазу активації зупиняли шляхом додавання 20мкл 0,16од/мл гірудину. Потім додавали 100мкл 1мМ хромогену S2266, і A405 визначали кожні 10сек протягом 30хв. Швидкість реакції залежить від кількості генерованого активованого білка С. Дані виражені в мл/хв.

Фіг.7: Швидкість активації білка С злитим білком підвищується на фосфоліпідних поверхнях, які містять TF. На швидкість активації білка С не впливає додавання везикул TF. Зразок для аналізу, описаного в прикладі 5, під заголовком «Аналіз активації білка С (на TF-багатій поверхні)», містив 20мкл зразка ТМ, або ТМi456, або злитий білок (scFv(TF)3e10-TМi456), 20мкл 1,5мкМ білка С, 20мкл 3нМ α -тромбіну й 20мкл буфера або везикул TF (іновін, людський рекомбінантний TF, 4х нормальна концентрація для ПЧ). Активації давали проходити протягом 1год. Фазу активації зупиняли додаванням 20мкл 0,16од/мл гірудину. Потім додавали 100мкл 1мМ хромогену S2266, і A405 визначали кожні 10сек протягом 30хв. Швидкість реакції залежала від кількості генерованого активованого білка С. Дані виражені в МОГ/хв.

Фіг.8: Злитий білок показує більш високу специфічність до індукованої TF коагуляції, ніж ТМi456. Аналіз часткового активованого тромбoplastинового часу (ЧАТЧ) чутливий до інгібіторів внутрішнього й центрального метаболічних шляхів коагуляції. Коагуляція, яка відбувається в даному аналізі, незалежна від TF. Інгібітори - або антитіло TF (scFv(TF)3e10), ТМi456, або злитий білок (scFv(TF)3e10-TМi456) - розбавляли в 50мкл відновленої людської плазми до кінцевої концентрації, яка давала двократне збільшення в аналізі протромбінового часу (ПЧ). У коагулометр потім додавали 50мкл реагенту АРТТ (кефалін із кролячого мозку в 0,1мМ елагової кислоти, з буфером, стабілізаторами й консервантами; Alexin HS) і 50мкл розчину CaCl₂ (0,02моль/л) і визначали час згортання крові в сек.

Фіг.9: Злитий білок сильніше пригнічує індуковану TF коагуляцію цільної крові, ніж будь-який з його компонентів окремо. Коагуляцію цільної крові аналізували, використовуючи аналізатор тромбоеластограф (ТЕГ) Haemoscore. До цільної крові в цитратному буфері додавали 120нМ антитіла TF (scFv(TF)3e10), ТМi456 або злитий білок (scFv(TF)3e10-TМi456) разом з 10мкл тромбoplastинового реагенту (розведення 1:64) і 20мкл 0,2М CaCl₂. Значення R (час до початкового утворення фібрину) одержували для кожного зразка. Дане значення потім перетворювали в % не інгібованого контрольного значення R.

Фіг.10. Злитий білок проявляє більш передбачувану дозову відповідь, ніж LMWH, в аналізі коагуляції цільної крові (ТЕГ). До цільної крові в цитратному буфері додавали зростаючі концентрації (15нМ початкова й збільшені за допомогою інкрементів 2х) злиті білки (scFv(TF)3e10-TМi456) або зростаючі концентрації (0,15од/мл початкова й збільшені 2х) еноксапарину (LMWH) поряд з 10мкл тромбoplastинового реагенту (розведення 1:64) і 20мкл 0,2М CaCl₂. Значення R (час до початку утворення фібрину) одержували для кожного зразка й будували графік залежності від відносної концентрації (приймали найнижчу концентрацію за 1 для кожного (подібного значення R), потім наступні концентрації збільшували 2х).

Фіг.11. Злитий білок scFv(TF)3e10-TМi456 ефективний in vivo на моделі коагулопатії споживання (DIC). Антитіло TF (scFv(TF)3e10) і злитий білок (scFv(TF)3e10-TМi456) оцінювали на щурячій моделі тромбоемболії, описаній в прикладі 8, за (А) відсотком смертності й (Б) кількісним показником поширеності захворювання-смертності. (А) В обробленій наповнювачем групі використана доза TF привела до 60% летальності (LD₆₀). Злитий білок scFv(TF)3e10-TМi456 при 0,7нмоль/кг повністю запобігав загибелі. На відміну від цього, scFv(TF)3e10 при 0,7нмоль/кг не впливало на загибель. Злитий білок scFv(TF)3e10-TМi456 був більш ефективним, ніж 10-кратна більш висока доза scFv(TF)3e10. (Б) В обробленій наповнювачем групі застосовувана in vivo доза TF приводила до середньої кількісної оцінки поширеності захворювання-смертності в 2,6 бали, заснованій на наступній оцінці в балах: 0 - немає впливу; 1 - слабка дихальна недостатність (відновлення протягом 30хв); 2 - гостра дихальна недостатність (агонуючий стан, відновлення вимагає більш ніж 60хв); і 3 - загибель. Злитий білок scFv(TF)3e10-TМi456 дозозалежним чином запобігав індукованій TF загибелі й дихальній недостатності при значенні 50% ефективної дози ED₅₀ 0,46нмоль/кг (0,019мг/кг). У дозі 7,0нмоль/кг scFv(TF)3e10-TМi456 повністю запобігав загибелі, так і дихальній недостатності, а в дозі 0,7нмоль/кг повністю запобігав загибелі й значно зменшував дихальну недостатність. На відміну від цього, scFv(TF)3e10 при 0,7нмоль/кг не впливав на загибель і слабо або зовсім не діяв на дихальну недостатність. Злитий білок scFv(TF)3e10-TМi456 був більш ефективний, ніж 10-кратна більш висока доза scFv(TF)3e10.

Докладний опис винаходу

Злитий антикоагулювальний білок за даним винаходом включає білок, який забезпечує спрямоване перенесення й взаємодіє або із тканинним фактором (TF), або з комплексом фактор VІІа/тканинної фактор (FVІІа/TF), який функціонально зв'язаний з доменом EGF456 тромбомодуліну (ТМ), одним або в комбінації принаймні з іншим доменом ТМ, вибраним із групи, яка складається з N-кінцевого домену гідрофобної ділянки, домену EGF123, міждоменної петлі між EGF3 й EGF4, O-глікозилизованого Ser/Thr-багатого домену або їх аналогів, фрагментів, похідних або варіантів.

Визначення

В описі за даним винаходом визначені наступні терміни, як вказано нижче.

Термін «рекомбінантні білки або пептиди» стосується білків або пептидів, отриманих з використанням методик рекомбінантної ДНК, тобто отриманих з мікробних клітин і клітин ссавців, трансформованих за допомогою конструкції екзогенної ДНК, яка кодує необхідний поліпептид. Білки або поліпептиди, експресовані

в більшості бактеріальних культур, будуть вільні від глікану. Білки й поліпептиди, експресовані в дріжджових клітинах, мають глікозильовану структуру, відмінну від такої, яка експресується у клітинах ссавців.

Термін «нативні» білки або поліпептиди стосується білків або поліпептидів, виділених із природних джерел. Термін «нативний ТМ» буде включати існуючий у природі ТМ і його фрагменти.

Термін «кодувальна послідовність» ДНК означає послідовність ДНК, яка транскрибується в мРНК і транлюється в поліпептид у клітині-хазяїні при знаходженні під контролем відповідних регуляторних послідовностей. Межі кодувальної послідовності визначають за допомогою ініціюючого кодону на 5'-N-кінці й трансляційного термінуючого кодону на 3'-С-кінці. Кодувальна послідовність може включати прокариотичні послідовності, кДНК із еукаріотичною мРНК, геномні послідовності ДНК і синтетичні послідовності ДНК. Послідовність термінації транскрипції звичайно буде розташовуватися в положенні 3' по відношенню до кодувальної послідовності.

Термін «злитий білок» означає білок, який виникає в результаті експресії принаймні двох функціонально зв'язаних гетерологічних кодувальних послідовностей. Злитий білок за винаходом складається з білка, який забезпечує спрямоване перенесення і взаємодіє або з TF, або з комплексом FVIIa/TF, який функціонально зв'язаний тільки з доменом EGF456 тромбомодуліну (ТМ) або знаходиться в комбінації принаймні з іншим доменом ТМ, вибраним із групи, яка складається з N-кінцевого домену гідрофобної ділянки, домену EGF123, міждоменої петлі між EGF3 й EGF4, О-глікозильованого Ser/Thr-багатого домену або їх аналогів, фрагментів, похідних або варіантів.

Термін «білок, який забезпечує спрямоване перенесення» означає білок, який зв'язується або взаємодіє з іншим білком або білковим комплексом. Білок, який забезпечує спрямоване перенесення, за даним винаходом означає білок, який зв'язується або взаємодіє з TF або комплексом FVIIa/TF. Наприклад, антитіло до TF або до комплексу FVIIa/TF є білком, що забезпечує спрямоване перенесення, за даним винаходом. Двома іншими прикладами білків, які забезпечують спрямоване перенесення, є інгібований за активним центром фактор Vila (FVIIai), який може зв'язувати TF, утворювати неактивний комплекс FVIIai/TF, і інгібітор метаболізму тканинного фактора (TFPI), який може зв'язувати й інактивовувати комплекс FVIIa/TF.

Термін «нуклеотидна послідовність» означає гетерополімер з дезоксирибонуклеотидів (основи - аденін, гуанін, тимін або цитозин). Послідовності ДНК, які кодують злиті білки за даним винаходом, можуть бути складені із синтетичних фрагментів ДНК, які походять від кДНК, і коротких олігонуклеотидних лінкерів, щоб забезпечити одержання синтетичного гена, який здатний експресуватися за допомогою рекомбінантного вектор експресії. Під час обговорення структури окремих дволанцюгових молекул ДНК послідовності можуть бути описані в контексті відповідно до звичайного правила наведення послідовності тільки в напрямку від 5'-кінця до 3'-кінця вздовж не транскрибованого ланцюга кДНК.

Термін «рекомбінантний вектор експресії» означає конструкцію реплікованої ДНК, використану для того, щоб або ампліфікувати, або експресувати ДНК, яка кодує злиті білки за даним винаходом. Вектор експресії містить контролюючі послідовності ДНК і кодувальну послідовність. Контролюючі послідовності ДНК включають промоторні послідовності, сайти зв'язування рибосом, сигнали поліаденілування, послідовності термінації транскрипції, розташовані проти ходу транскрипції домени й енхансери. Рекомбінантні системи експресії, як визначено в контексті, будуть експресувати злиті білки при індукції регуляторних елементів.

Термін «трансформовані клітини-хазяї» стосується клітин, які були трансформовані й трансфіковані екзогенною ДНК. Екзогенна ДНК може бути або може не бути інтегрована (ковалентно зв'язана) із хромосомною ДНК, що становить геном клітини. Наприклад, у прокариотах і дріжджах екзогенна ДНК може зберігатися в епісомальному елементі, такому, як плазміда, або стійко інтегрувати в хромосомну ДНК. Що стосується еукаріотичних клітин, то стійко трансформована клітина означає клітину, у якій екзогенна ДНК стала інтегрованою в реплікацію хромосом. Ця стабільність демонструється здатністю ліній або клонів еукаріотичних клітин продукувати популяцію дочірніх клітин, що містять екзогенну ДНК.

Термін «тромбомодулін (ТМ)» стосується глікопротеїну поверхні клітин ендотелію, який утворює із високою спорідненістю до комплексу із тромбіном. Гени, які кодують нативний ТМ (як його геномну форму, так й у формі кДНК), були виділені з бичачого й людського джерел і секвеновані (R.W. Jackman й ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83(23), 1986, стор. 8834-8838 й R.W. Jackman й ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(18), 1987, стор. 6425-6429, обидві посилання включені в контекст шляхом цитування). Послідовності ТМ для бика, людини й миші мають високий ступінь гомології один з одним. У випадку людського ТМ кДНК кодує білок 60,3 кДа з 575 амінокислот, що включає сигнальну послідовність приблизно з 18 амінокислот, див., наприклад, патент US 5827824.

Коли тромбін зв'язується із ТМ, може бути тисячекратне або більше збільшення швидкості активації білка С, яка утворює активований антикоагулюючим ферментом білок С. Крім того, коли тромбін зв'язується із ТМ, тромбін більше не працює як прокоагулювальний фермент. А саме, каталізовані тромбіном утворення фібрину, активація фактора V й активація тромбоцитів, - всі інгібуються в присутності ТМ. Таким чином, ТМ перетворює тромбін у фізіологічний антикоагулянт.

Термін «тромбомодуліновий (ТМ) домен» стосується дискретної амінокислотної послідовності, яка може бути асоційована з особливою функцією або особливістю ТМ, такою, як структура, характерна для третинної структури. Ген ТМ повної довжини кодує попередник або прополіпептид, який містить наступні домени: амінокислоти 18-1 - сигнальна послідовність; амінокислоти 1-226 - N-кінцева гідрофобна ділянка; амінокислоти 227-462 - багата цистеїном ділянка; складається з 6 тандемних EGF-подібних повторів, з'єднаних невеликими міждоменими пептидами або петлями; амінокислоти 463-497 - О-глікозильована Ser/Thr-багата ділянка; амінокислоти 498-521 - гідрофобна трансмембранна ділянка; і амінокислоти 522-557 - C-кінцевий цитоплазматичний хвіст. Багата цистеїном ділянка може бути далі розділена на 3 домени: амінокислоти 226-344 - EGF123, що складається з EGF-подібних повторів 1, 2 й 3 (залишки 226-344); амінокислоти 345-349 - міждоменова петля між EGF3 й EGF4; і амінокислоти 350-462 - EGF456, що складається з EGF-подібних доменів 4, 5 й 6 (див., наприклад, C.S. Yost й ін., Cell, 34(3): 1983, стор. 759-766; D.Z. Wen й ін., Biochemistry, 26(14), 1987, стор. 4350-4357, і W. Wang й ін., 2000, див. вище, при цьому всі публікації включені в даний опис

як посилання).

Терміни «аналог», «фрагмент», «похідне» й «варіант», коли стосуються злитих білків за даним винаходом, а також білків, що забезпечують спрямоване перенесення і доменів ТМ, означають аналоги, фрагменти, похідні й варіанти злитих білків, білків, які забезпечують спрямоване перенесення, і доменів ТМ, які фактично зберігають таку ж біологічну функцію або активність, як описані нижче.

Термін «аналог» включає прополіпептид, який містить всередині себе амінокислотну послідовність злитого білка за даним винаходом. Активний злитий білок за даним винаходом може бути відщеплений від додаткових амінокислот, які замикають молекулу попередника злитого білка, за допомогою природних перетворень *in vivo* або за допомогою методик, добре відомих фахівцям, таких, як ензиматичне або хімічне розщеплення. Наприклад, нативний ТМ природно експресується як поліпептид з 575 амінокислот, який потім піддається процесингу *in vivo*, вивільняючи активний зрілий поліпептид з 557 амінокислот.

Термін «фрагмент» означає частину злитого білка, білка, яка забезпечує спрямоване перенесення, або доменів ТМ, які фактично зберігають однакову функціональну активність, як показано в аналізах *in vivo*, розкритих у контексті, як описано далі.

Термін «похідне» включає всі модифікації злитого білка, які фактично зберігають функції, розкриті в контексті, і включають додаткову структуру із супутньою функцією, наприклад, злиті білки, модифіковані поліетиленгліколем (PEG), які мають більший час напіввиведення, О-глікозильовані злиті білки, модифіковані додаванням сульфату хондроїтину, і біотинильовані злиті білки, як описано далі.

Терміни «по суті подібна функціональна активність» й «по суті та ж сама біологічна функція або активність» означають кожний, що інтенсивність біологічної активності знаходиться в інтервалі 30-100% або більше від біологічної активності продемонстрованої поліпептидом, з яким проводиться порівняння, коли біологічна активність кожного поліпептиду визначена з використанням тієї ж методики або того ж аналізу. Наприклад, злитий білок або домен ТМ, який має по суті подібну функціональну активність, що й злитий білок прикладу 2 (послідовність із ідентифікаційним номером 2 (SEQ ID No:2)), означає, що білок при тестуванні в аналізі (хромогенному) активації білка С, описаному в прикладі 5, демонструє нагромадження активованого білка С. Білок, який забезпечує спрямоване перенесення і має по суті подібну функціональну активність, що й антитіло до TF прикладу 1 (SEQ ID No:1), означає, що білок при тестуванні в аналізі sTF/FVIIa або в аналізах активації FX, описаних у прикладі 5, демонструє здатність зв'язувати або нейтралізувати TF або комплекс FVIIa/TF.

Термін «подібність» між двома поліпептидами визначається шляхом порівняння амінокислотної послідовності і її консервативних амінокислотних замісників одного поліпептиду з послідовністю другого поліпептиду. Такі консервативні замісники включають такі, описані вище в The Atlas of Protein Sequence and Structure, 5, Dayhoff й Argos (1989) EMBO J. 8, 1987, стор.779-785. Наприклад, амінокислоти, які належать до однієї з наступних груп, представляють консервативні зміни:

- Ala, Pro, Gly, GLN, Asn, Ser, Thr;
- Cys, Ser, Tyr, Thr;
- Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe;
- Lys, Arg, His;
- Phe, Tyr, Trp, His; i
- Asp, Glu.

Всі інші технічні терміни, використані в контексті, мають таке ж значення, яке використовують фахівці в галузі, до якої належить даний винахід.

Білок, який забезпечує спрямоване перенесення

Білок, який забезпечує спрямоване перенесення, за винаходом означає білок, який має здатність специфічно зв'язуватися з конкретно попередньо вибраною молекулою-мішенню, наприклад, TF або комплексом FVIIa/TF, і потім служить для направлення злитого білка в клітину або тканину, що містить попередньо вибрану молекулу-мішень.

В одному варіанті втілення за даним винаходом білок, який забезпечує спрямоване перенесення, означає антитіло, яке може зв'язуватися й нейтралізувати TF або комплекс FVIIa/TF. Термін «антитіло», як він використаний у контексті, включає інтактні молекули імуноглобуліну (Ig), а також їх фрагменти, такі, як Fab, F(ab')₂ й Fv, які здатні зв'язувати епітоп TF або комплексу FVIIa/TF. Звичайно потрібно принаймні 6, 8, 10 або 12 суміжних амінокислот, щоб утворити епітоп. Однак для епітопів, які включають амінокислоти, які не є суміжними, може знадобитися більше амінокислот, наприклад, принаймні 15, 25 або 50.

Звичайне антитіло, яке специфічно зв'язується з TF або комплексом FVIIa/TF зумовлює детектувальний сигнал принаймні 5-, 10- або 20-кратно більш сильний, ніж детектувальний сигнал, зумовлений іншими білками при використанні в імунохімічному аналізі. Переважно антитіла, які зв'язуються специфічно з TF або комплексом FVIIa/TF не детектують інші білки в імунохімічних аналізах і можуть утворювати імунопреципітат TF або комплексу FVIIa/TF з розчину.

TF або комплекс FVIIa/TF можуть бути використані для імунізації ссавця, такого, як миша, щур, кролик, морська свинка, мавпа або людина, щоб продукувати полікліональні антитіла. Якщо потрібно, TF або комплекс FVIIa/TF можуть бути кон'юговані з носієм-білком-носієм, таким, як бічний сироватковий альбумін, тироглобулін і гемоціанін з *Megathura crenulata*. Залежно від виду хазяїна можуть застосовуватися різні ад'юванти, щоб підсилити імунологічну відповідь. Такі ад'юванти включають, але без обмеження, ад'ювант Фрейнда, мінеральні гелі (наприклад, гідроксид алюмінію) і поверхнево-активні речовини (наприклад, лізолецитин, плурононі поліолі, поліаніони, пептиди, масляні емульсії, гемоціанін з *Megathura crenulata* і динітрофенол). Серед ад'ювантів, які застосовують у людини, особливо корисними є BCG (*bacilli Calmette-Guerin*) і *Corynebacterium parvum*.

Моноклональні антитіла, які специфічно зв'язуються з TF або комплексом FVIIa/TF, можуть бути отримані з використанням будь-якої методики, яка забезпечує продукцію молекул антитіл стабільними клітинними лініями в культурі. Ці методики включають, але без обмеження, гібридомну техніку, техніку людської В-

клітинної гібридомі й техніку гібридомі вірусу Епштейна-Барра (EBV) (Kohler й ін., *Nature* 256, 1987, стор.495-497; Kozbor й ін. *J. Immunol. Methods* 81, 1985, стор. 31-42; Cote й ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1983, стор.2026-2030; i Cote й ін., *Mol. Cell Biol.* 62, 1984, стор.109-120).

Крім того, можуть бути використані методики, створені для продукції «химерних антитіл», сплайсинг генів мишиного й людського антитіл, щоб одержати молекулу з відповідною антигенною специфічністю й біологічною активністю (Morrison й ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1984, стор.6851-6855; Neuberger й ін., *Nature* 312, 1984, стор.604-608; Takeda й ін., *Nature* 314, 1985, стор.452-454). Моноклональні й інші антитіла можуть бути також «гуманізовані», щоб запобігти в пацієнта формуванню імунної відповіді до антитіл, коли воно застосовується в терапевтичних цілях. Такі антитіла мають достатню подібність із послідовністю людського антитіла, щоб безпосередньо використовуватися в злитому білку, або можуть потребувати зміни декількох ключових залишків. Відмінності в послідовностях між антитілами гризунів і людських послідовностей можуть бути зведені до мінімуму шляхом заміни залишків, які відрізняються від таких у людських послідовностях за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу окремих залишків або за допомогою трансплантації повністю комплементарних детермінуючих ділянок. Альтернативно гуманізовані антитіла можуть бути продукуювані з використанням рекомбінантних способів, як описано в патенті GB 2188638B. Антитіла, які зв'язуються специфічно з TF або комплексом FVIIa/TF, можуть містити антиген-зв'язувальні сайти, які або частково, або повністю гуманізовані, як розкривається в патенті US 5565332.

Альтернативно методики, описані для продукування одноланцюгових антитіл, можуть бути адаптовані, використовуючи способи, відомі фахівцям, для продукування одноланцюгових антитіл, які специфічно зв'язуються з TF або комплексом FVIIa/TF. Антитіла з спорідненою специфічністю, але які відрізняються ідіотипічним складом, можуть бути отримані шляхом перестановки ланцюга з випадкових комбінаторних бібліотек Ig (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1991, стор.11120-11123).

Одноланцюгові антитіла можуть бути також сконструйовані із застосуванням способу ампліфікації ДНК, такого, як полімеразна ланцюгова реакція, використовуючи гібридомну кДНК як матрицю (Thirion й ін., *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 1996, стор.507-511). Одноланцюгові антитіла можуть бути моно- або біспецифічними й можуть бути бівалентними або тетравалентними. Конструкція тетравалентних біспецифічних одноланцюгових антитіл повідомлена, наприклад, Coloma й Morrison *Natl. Biotechnol.* 15, 1997, стор.159-163. Конструкція бівалентних біспецифічних одноланцюгових антитіл повідомлена Mallendar й Voss *J. Biol. Chem.* 269, 1994, стор.199-216.

Нуклеотидна послідовність, яка кодує одноланцюгове антитіло, може бути побудована із застосуванням ручного або автоматизованого синтезу нуклеотидів, клонована в конструкцію експресії з використанням стандартних способів рекомбінантної ДНК й введена в клітину, щоб експресувати кодувальну послідовність. Альтернативно одноланцюгові антитіла можуть бути продукуювані безпосередньо з використанням, наприклад, техніки відображення ниткоподібного фара (Verhaar й ін., *Int. J. Cancer*, 61, 1996, стор.497-501; i Nicholls й ін., *J. Immunol. Meth.* 165, 1993, стор.81-91).

Антитіла, які зв'язуються специфічно з TF або комплексом FVIIa/TF, можуть бути також отримані шляхом індукування *in vivo* продукції в популяції лімфоцитів або шляхом скринінгу бібліотек Ig або панелів реагентів з високою специфічністю зв'язування, як розкривається в літературі (Orlandi й ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3, 1989, стор.833-837; Winter й ін., *Nature* 349,1991, стор.293-299).

В іншому варіанті втілення за даним винаходом білок, який забезпечує спрямоване перенесення, є частиною, що забезпечує спрямоване перенесення, іншого, ніж антитіло, білка, який може зв'язувати й нейтралізувати TF. Двома такими прикладами є інгібований за активним центром фактор FVIIa (FVIIai) і інгібітор метаболізму тканинного фактора (TFPI).

Як FVIIa, так й FVIIai з високою спорідненістю утворюють комплекс із TF (B.B. Sorenson, B.B й L.V. Rao, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 9 (доп. 1), 1998, стор.67-71). Фактор FVIIai є нейтралізуючим TF антикоагулянт, який діє, конкуруючи з ендогенним FVIIa за зв'язування з експонованим TF. Фактор FVIIai пригнічує здатність протеолітично активного FVIIa утворювати компетентний комплекс FVIIa-TF і таким способом пригнічує ініціацію коагуляції. Шляхом генетичного злиття доменів TM в FVIIai тромбомодулін міг бути націлений на багаті TF протромбозні поверхні.

кДНК, яка кодує людський FVII, була виділена й секвенована (H.S. Hagen й ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(8), 1986, стор.2412-2416, посилання включене в контекст цитування). Людський FVIIa, який кодується кДНК, може бути отриманий за стандартними методиками рекомбінантної ДНК, виходячи із мРНК, виділеної з печінки людини. Фактор FVIIai може бути отриманий за допомогою зміни серину в активному центрі за стандартними методиками рекомбінантної ДНК або хімічною обробкою каталітично активного FVIIa пептидилхлорметилкетон, який необоротно модифікує й інгібує активний центр.

TFPI націлений на комплекс FVIIa/TF й інгібує його FXa-залежним чином (I. Salemink й ін., *J. Biol. Chem.* 274(40), 1999, стор.28225-28232). TFPI спочатку зв'язується з FXa, і потім комплекс TFPI-FXa зв'язується з комплексом FVIIa/TF й інгібує його. При генетичному злитті доменів TM в TFPI тромбомодулін (TM) міг бути націлений на TF-багаті протромбозні поверхні.

кДНК, яка кодує людський TFPI, була виділена й секвенована (T. C Wum й ін., *J. Biol. Chem.* 263(13), 1988, стор.6001-6004, посилання включене в контекст цитування). Людський TFPI, який кодується кДНК, може бути отриманий за допомогою стандартних методик рекомбінантної ДНК, виходячи із мРНК, виділеної з печінки людини.

Білок, який забезпечує спрямоване перенесення, за даним винаходом (тобто антитіло або інші відповідні білки) може бути експресований й очищений способами, добре відомими фахівцям. Наприклад, антитіла й білки можуть бути очищені афінним способом шляхом пропускання через колонку, у якій TF знаходиться у зв'язаному стані. Зв'язані антитіла або білки можуть потім елюватися із колонки з використанням буфера з високою концентрацією солі.

В одному переважному варіанті втілення за даним винаходом білком, який забезпечує спрямоване перенесення, є TF-зв'язувальне антитіло scFv, яке пригнічує активацію FX за допомогою комплексу FVIIa/TF і не конкурує зі зв'язуванням FVIIa. Для того щоб одержати TF-зв'язувальне антитіло scFv, бібліотека людських

антитіл HuPhaBL3 на ниткоподібній фазі, була відібрана за допомогою іммобілізованого розчинного TF. Антитіла TF-презентуючого фага були понадекспресовані в E. coli й афінно очищені з використанням колонки з послідовністю e-tag. Очищені антитіла були далі охарактеризовані, використовуючи BIAcore, аналіз sTF-залежного фактора Vila (аналіз sTF/FVIIa), аналіз активації FX й аналіз протромбінового часу (ПЧ). Послідовність TF-зв'язувального антитіла scFv, позначеного scFv(TF)3e10, показана в прикладі 1 і відповідає SEQ ID NO:1. Виділення, продукція й характеристика TF-зв'язувального антитіла scFv описані більш докладно нижче.

Тромбомодулін

Тромбомодулінова (TM) доменна частина злитого білка діє як кофактор каталізованої тромбіном активації білка C, який, у свою чергу, піддає деградації фактори Va й VIIa, запобігаючи тим самим подальшому тромбоутворенню. Домени TM включають, наприклад, домен N-кінцевої гідрофобної ділянки, домен EGF123, міждоменну петлю між EGF3 й EGF4, домен EGF456 і домен O-глікозильованої Ser/Thr-багатої ділянки. Домен EGF456, зокрема, опосередковує зв'язування тромбіну й активацію білка C (S. Kurosawa й ін. (1988), вище; і M. Zushi й ін. (1989), вище). У переважних втіленнях за даним винаходом тромбомодулінова доменна частина злитого білка включає домен EGF456, один або в комбінації з одним доменом або декількома іншими доменами TM. У ще більш переважних варіантах втілення за даним винаходом домен EGF456 містить точкові мутації, які роблять білок більше стійким до окисного пошкодження й дії протеаз та/або збільшують каталітичну ефективність.

Повна довжина послідовності ДНК, яка кодує людський TM, сприяє одержанню генів і використовується як вихідна точка для створення послідовностей ДНК, які кодують пептиди TM і злиті білки, які містять TM і фрагменти/пептиди TM.

Ген повної довжини TM може бути отриманий декількома способами. Людські геномні бібліотеки комерційно доступні. Олігонуклеотидні зонди, специфічні для цих генів, можуть бути синтезовані з використанням опублікованої генної послідовності. Відомі способи скринінгу геномних бібліотек з олігонуклеотидними зондами. Опубліковані генні послідовності TM демонструють, що всередині кодувальної ділянки немає інтронів. Таким чином, геномний клон забезпечує необхідний вихідний матеріал, щоб сконструювати плазмиду експресії для TM, використовуючи відомі способи.

Фрагмент ДНК, який кодує TM, може бути повернутий у попередній стан шляхом використання сайтів ендонуклеаз рестрикції, які були ідентифіковані в ділянках, розташованих збоку або які є внутрішніми по відношенню до гена (R.W. Jackman й ін. (1987), вище). Альтернативно гени повної довжини можуть також бути отримані з банку кДНК. Наприклад, матрична РНК, отримана із клітин ендотелію, забезпечує відповідний вихідний матеріал для одержання кДНК. Способи створення банків кДНК добре відомі (дивися, наприклад, J.F. Sambrook й ін., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), посилання включене в контекст шляхом цитування).

Злитий білок

Злитий антикоагулявальний білок за даним винаходом включає білок, який забезпечує спрямоване перенесення і зв'язується або з TF, або з комплексом FVIIa/TF і функціонально зв'язаний з доменом EGF456 тромбомодуліну (TM), одним або в комбінації принаймні з іншим доменом TM, вибраним із групи, яка складається з домену N-кінцевої гідрофобної ділянки, домену EGF123, міждоменної петлі між EGF3 й EGF4 й O-глікозильованого Ser/Thr-багатого домену або їх аналогів, фрагментів, похідних або варіантів. Злитий білок може включати білок, який забезпечує спрямоване перенесення, пов'язаний з доменами TM у будь-якій комбінації.

В одному особливо переважному варіанті втілення злитий білок включає антитіло, яке зв'язує TF, функціонально зв'язаний із тромбомодуліновим доменом EGF456 і міждоменною петлею між EGF3 й EGF4 (TM1456) або їх аналогами, фрагментами, похідними або варіантами.

Злитий білок за даним винаходом включає, але без обмеження, конструкції, у яких C-кінцева частина одноланцюгового антитіла з'єднується з N-кінцевою частиною аналога, фрагмента, похідного або варіанта домену TM, C-кінцева частина антитіла IgG з'єднується з N-кінцевою частиною аналога, фрагмента, похідного або варіанта домену TM, C-кінцева частина антитіла Fab з'єднується з N-кінцевою частиною аналога, фрагмента, похідного або варіанта домену TM, N-кінцева частина одноланцюгового антитіла з'єднується із C-кінцевою частиною аналога, фрагмента, похідного або варіанта домену TM, N-кінцева частина антитіла IgG з'єднується із C-кінцевою частиною аналога, фрагмента, похідного або варіанта домену TM, N-кінцева частина антитіла Fab з'єднується із C-кінцевою частиною аналога, фрагмента, похідного або варіанта домену TM, більш ніж одне одноланцюгове антитіло з'єднується як з N-кінцевою, так і з C-кінцевою частинами аналога, фрагмента, похідного або варіанта домену TM, більш ніж одне антитіло IgG з'єднується як з N-кінцевою, так й з C-кінцевою частинами аналога, фрагмента, похідного або варіанта домену TM, більш ніж одне антитіло Fab з'єднується як з N-кінцевою, так і з C-кінцевою частинами аналога, фрагмента, похідного або варіанта домену TM, більш ніж один аналог, фрагмент, похідне або варіант домену TM з'єднується як з N-кінцевою, так і із C-кінцевою частинами одноланцюгового антитіла, більш ніж один аналог, фрагмент, похідне або варіант домену TM з'єднується як з N-кінцевою, так і із C-кінцевою частинами антитіла IgG, більш ніж один аналог, фрагмент, похідне або варіант домену TM з'єднується як з N-кінцевою, так і із C-кінцевою частинами антитіла Fab, один або більше ніж один аналог, фрагмент, похідне або варіант домену TM з'єднується як з N-кінцевою, так і із C-кінцевою частинами димерного одноланцюгового антитіла.

Злиті білки за даним винаходом включають злиті білки прикладу 2 (SEQ ID NO:2) і 3 (SEQ ID NO:3), а також ті злиті білки, які мають несуттєві відхилення в послідовності від них. Термін «несуттєве відхилення» включає будь-яку послідовність, заміщення або делеційний варіант, які зберігають у значній мірі принаймні одну біологічну функцію поліпептидів за даним винаходом, переважно кофакторну активність для опосередкованої тромбіном активації білка C. Ці функціональні еквіваленти можуть переважно включати злиті білки, які мають принаймні приблизно 90% ідентичність зі злитими білками SEQ ID Nos:2 або 3, і більш переважно - принаймні 95% ідентичність із злитими білками SEQ ID Nos:2 або 3 і ще більш переважно -

принаймні 97% ідентичність зі злитими білками SEQ ID Nos:2 або 3, і також включають частини таких злитих білків, які мають значною мірою таку ж біологічну активність. Однак будь-який злитий білок, який має несуттєве відхилення в амінокислотній послідовності від злитих білків SEQ ID Nos:2 або 3, який проявляє функціональну еквівалентність, як описано далі в контексті, включений в опис за даним винаходом.

В іншому варіанті втілення винаходу злитий білок включає антитіло, яке зв'язує TF, функціонально зв'язаний із тромбомодуліновим (TM) доменом EGF3, який потрібен для активації інгібітора активованого тромбіном фібринолізу (TAFI).

Аналоги, фрагменти, похідні й варіанти

Аналог, фрагмент, похідне або варіант злитих білків, а також білки, які забезпечують спрямоване перенесення, і домен TM за даним винаходом можуть бути: (i) одним, у якому один або декілька амінокислотних залишків заміщені консервативним або неконсервативним амінокислотним залишком (переважно консервативним амінокислотним залишком), і такий заміщений амінокислотний залишок може або не може бути залишком, кодованим за допомогою генетичного коду; або (ii) одним, у якому один або декілька амінокислотних залишків включають замісник; або (iii) одним, у якому зрілий злитий білок з'єднується з іншою сполукою, такою, як сполука для збільшення часу напіввиведення злитого білка (наприклад, поліетиленгліколь); або (iv) одним, у якому додаткові амінокислоти з'єднані зі зрілим злитим білком, таким, як лідерна або секреторна послідовність, або послідовність, яка використовується для очищення зрілого злитого білка; або (v) одним, в якому поліпептидна послідовність з'єднана з більше довгим поліпептидом, тобто людським альбуміном, антитілом або білком Fc, для збільшення тривалості ефекту. Вважається, що такі аналоги, фрагменти, похідні й варіанти доступні фахівцям в даній галузі з повідомлень у контексті.

Переважно похідні за даним винаходом будуть містити консервативні амінокислотні заміщення (визначені нижче), зроблені в одному або декількох прогнозованих залишках, переважно в залишках замісних амінокислот. Термін «замінний» амінокислотний залишок означає залишок, який може змінюватися в білковій послідовності дикого типу без зміни біологічної активності, тоді як «незамінний» амінокислотний залишок необхідний для біологічної активності. Термін «консервативне амінокислотне заміщення» означає заміщення, при якому амінокислотний залишок замінюється амінокислотним залишком, який має подібний боковий ланцюг. Сімейства амінокислотних залишків, які мають подібні бокові ланцюги, визначені в даній галузі. Ці сімейства включають амінокислоти з основними боковими ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними боковими ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними боковими ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними боковими ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), β -розгалуженими боковими ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) і ароматичними боковими ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Неконсервативні заміщення не проводяться для консервативних амінокислотних залишків або амінокислотних залишків, які розташовуються всередині консервативного білкового домену, якщо неконсервативні заміщення не проводяться, щоб зробити злитий білок, що утворюється, більш стійким до окисного пошкодження й дії протеаз та/або підвищити його каталітичну ефективність. Фрагменти біологічно активних частин включають поліпептидні фрагменти, які придатні для застосування як лікарський засіб, як реагент для досліджень і тому подібного. Фрагменти включають пептиди, які містять амінокислотні послідовності, подібні до амінокислотних послідовностей або які походять від амінокислотних послідовностей злитого білка за даним винаходом й принаймні мають активність того поліпептиду, але які включають менше амінокислот, ніж поліпептид повної довжини, розкритий у контексті. Звичайно біологічно активні частини включають домен або мотив принаймні з активністю поліпептиду. Біологічно активна частина поліпептиду може бути пептидом, тобто, наприклад, довжиною в 5 або більше амінокислот. Такі біологічно активні частини можуть бути отримані синтетично або за допомогою рекомбінантних методик і можуть бути оцінені на одну або декілька функціональних активностей поліпептиду за даним винаходом способами, розкритими в контексті та/або добре відомими фахівцям.

Більш того, переважні похідні за даним винаходом включають зрілі злиті білки, які з'єднані з іншою сполукою, такою, як сполука для збільшення часу напіввиведення поліпептиду та/або для зниження потенціалу імуногенності поліпептиду (наприклад, поліетиленгліколь, PEG). Поліетиленгліколь може застосовуватися, щоб надати злитому білку розчинність у воді, габарити, малу швидкість ниркового кліренсу й знижену імуногенність. Дивися, наприклад, патент US 6214966. У випадку модифікації поліетиленгліколем з'єднання злитого білка з PEG може бути виконано будь-якими способами, відомими фахівцям у цій галузі. Наприклад, модифікація поліетиленгліколем може бути здійснена спочатку введенням цистеїнової мутації в злитий білок з наступним одержанням похідного з PEG-малеїмідом. Цистеїн може бути доданий до С-кінця пептидів. Дивися, наприклад, Tsutsumi й ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(15), 2000, стор.8548-8553. Інша модифікація, яка може бути проведена зі злитим білком, включає біотинілювання. У деяких випадках може бути корисним мати біотинілюваний злитий білок, щоб він міг легко реагувати зі стрептавідином. Способи біотинілювання білків добре відомі фахівцям. Крім того, зі злитим білком може бути зв'язаний сульфат хондроїтину.

Варіанти злитих білків, білків, які забезпечують спрямоване перенесення, і доменів TM за винаходом включають поліпептиди, білків, які мають амінокислотну послідовність, значною мірою подібну до амінокислотної послідовності вихідних злитих білків, білків, що забезпечують спрямоване перенесення, і доменів TM. Термін «подібні» означає першу амінокислотну послідовність, яка містить достатнє або мінімальне число ідентичних або еквівалентних амінокислотних залишків відносно другої амінокислотної послідовності, так що перша й друга амінокислотної послідовності мають загальний структурний домен та/або загальну функціональну активність. Наприклад, амінокислотні послідовності, які містять загальний структурний домен, що ідентичний принаймні приблизно на 45%, переважно приблизно на 75-98%, визначаються в контексті як ідентичні. Переважно варіанти будуть подібні до амінокислотної послідовності переважних злитих білків за даним винаходом. Варіанти включають варіанти злитих білків, які кодовані полінуклеотидом, що гібридизується з полінуклеотидом за даним винаходом або комплементарний до нього в жорстких умовах. Такі варіанти, як

правило, зберігають функціональну активність злитих білків за даним винаходом. Бібліотеки фрагментів полінуклеотидів можуть бути використані, щоб одержувати різноманітну популяцію фрагментів для скринінгу й наступної селекції. Наприклад, бібліотека фрагментів може бути отримана обробкою з нуклеазою отриманого ПЛР дволанцюгового фрагмента полінуклеотиду в умовах, де одностанцюговий розрив відбувається тільки приблизно один раз на молекулу, денатурацією дволанцюгової ДНК, ренатурацією ДНК, щоб утворити дволанцюгову ДНК, яка може включати смислові/антисмислові пари від різних продуктів з одностанцюговим розривом, видаленням одностанцюгових частин від реформованих дуплексів шляхом обробки з нуклеазою S1 і літуванням утвореної бібліотеки фрагментів у вектор експресії. Цим способом можна одержати бібліотеку експресії, яка кодує N-кінцевий і внутрішній фрагменти злитих білків різної величини за даним винаходом.

Варіанти включають злиті білки, а також білки, які забезпечують спрямоване перенесення, і домен ТМ, які відрізняються за амінокислотною послідовністю через мутагенез. Варіанти, які мають кофакторну активність для опосередкованої тромбіном активації білка С, можуть бути ідентифіковані за допомогою скринінгових комбінаторних бібліотек мутантів, наприклад, відсікання або точкові мутанти злитих білків або доменів ТМ за даним винаходом й використанням аналізу активації білка С, описаного в прикладі 5. Варіанти, які мають активність зв'язування TF або комплексу FVIIa/TF, можуть бути ідентифіковані за допомогою скринінгових комбінаторних бібліотек мутантів, наприклад, розщеплення або точкові мутанти злитих білків або білків, які забезпечують спрямоване перенесення, за даним винаходом з використанням аналізу sTF/FVIIa або аналізу за активації FX прикладу 5, описані в прикладі 5. Крім того, біоеквівалентні аналоги злитих білків можуть також бути утворені шляхом проведення різних заміщень за залишками або послідовностями у доменній частині ТМ злитого білка, які можуть зробити злитий білок більш стійким до окисного пошкодження або дії протеази, дивися, наприклад, патент US 5827824, або збільшити каталітичну ефективність злитого білка, дивися, наприклад, M. Adler й ін., J. Biol. Chem. 270(40), 1995, стор.23366-23372 і заявку WO 01/98352, опубліковану 27.12.2001, усе повністю включено в контекст шляхом цитування.

В одному варіанті втілення винаходу різноманітна бібліотека варіантів генерується шляхом комбінаторного мутагенезу на рівні нуклеїнових кислот і кодується різноманітною генною бібліотекою. Різноманітна бібліотека варіантів може бути отримана, наприклад, ензиматичним літуванням суміші синтетичних олігонуклеотидів у генні послідовності таким чином, що вироджений набір потенційних варіантних амінокислотних послідовностей експресується у вигляді індивідуальних поліпептидів, або альтернативно у вигляді набору злитих білків більшої довжини (наприклад, для розгортання фага), що містять набір їх послідовностей. Існує багато способів, які можуть застосовуватися для одержання бібліотек потенційних варіантів їх виродженої олігонуклеотидної послідовності. Хімічний синтез виродженої генної послідовності може бути здійснений в автоматичному синтезаторі ДНК, і потім синтетичний ген вбудовують у відповідний вектор експресії. Застосування виродженого набору генів допускає забезпечення в одній суміші всіх послідовностей, які кодують необхідний набір потенційних варіантних послідовностей. Способи синтезу вироджених олігонуклеотидів відомі фахівцям (дивися, наприклад, Narang, Tetrahedron 39, 1983, с. 3; Itakura й ін., Annu. Rev. Biochem. 53, 1984a, с.323; Itakura й ін., Science 198, 1984b, с.1056; Ike й ін., Nucleic Acid Res. 11, 1983 с.47).

Фахівцям відомі декілька методик скринінгу генних продуктів комбінаторних бібліотек, отриманих за допомогою точкових мутацій або розщеплення, і скринінгу бібліотек кДНК для генних продуктів, які мають вибрану властивість. Такі методики адаптуються для швидкого скринінгу генних бібліотек, отриманих шляхом комбінаторного мутагенезу злитих білків, а також білків, що забезпечують спрямоване перенесення, і доменів ТМ, на кофакторну активність опосередкованої тромбіном активації білка С або активності зв'язування TF або комплексу FVIIa/TF. Найбільш широко застосовувані методики, які підлягають аналізу з високою пропускну здатністю для скринінгу більших генних бібліотек, звичайно включають клонування генної бібліотеки в репліковані вектори експресії, трансформацію відповідних клітин з утворюваною бібліотекою векторів й експресію комбінаторних генів в умовах, при яких детектування необхідної активності сприяє виділенню вектора, який кодує ген, чий продукт був детектований. Рекурентний груповий мутагенез (REM), методика, яка підвищує частоту функціональних мутантів у бібліотеках, може бути застосований у комбінації зі скринінговими аналізами, щоб ідентифікувати необхідні варіанти.

Одержання злитих білків

Злитий білок за винаходом одержують з'єднанням білка, що забезпечує спрямоване перенесення, або інакше - зв'язуванням його з доменами ТМ або їх аналогами, фрагментами, похідними або варіантами будь-яким способом, відомим фахівцям у цій галузі. Два компоненти можуть бути хімічно зв'язані разом за допомогою багатьох добре відомих хімічних методик. Наприклад, зв'язок може бути утворений за допомогою гетеробіфункціональних місточкових лінкерів, наприклад, N-сукциніміділ-3-(2-піридилдитіо)пропіонату (SPDP), карбодііміду, глутарового альдегіду й тому подібного.

У більш переважному варіанті втілення білок, який забезпечує спрямоване перенесення, за даним винаходом може бути з'єднаний з доменами ТМ рекомбінантними способами, такими, як використання методик рекомбінантної ДНК для одержання нуклеїнової кислоти, яка кодує як білок, який забезпечує спрямоване перенесення, так і поліпептид, який кодує домен ТМ, і експресія послідовності ДНК у клітині-хазяїні, такий, як E. coli або клітині ссавця. ДНК, яка кодує злитий білок, може бути клонована в кДНК або в геномній формі за допомогою будь-якої методики клонування, відомої фахівцям у цій галузі. Дивися, наприклад, J.F. Sambrook й ін. (1989), вище.

У випадку, коли білок, який забезпечує спрямоване перенесення, є антитілом, якщо була ідентифікована послідовність ДНК, яка кодує ділянку Fv, що при експресії проявляє специфічну зв'язувальну активність, злиті білки, які включають цю ділянку Fv, можуть бути отримані способами, відомими фахівцям. Так, наприклад, V.K. Chaudhary й ін., Nature 339(6223), 1989, стор.394-397; J.K. Batra й ін., J. Biol. Chem. 265(25), 1990, стор.15198-15202; J.K. Batra й ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(21), 1989, стор.8545-8549; V.K. Chaudhary й ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(3) 1990, стор.1066-1070, всі публікації, включені шляхом цитування, описують одержання злитих білків на основі різних одностанцюгових антитіл. Ділянка Fv може бути з'єднана

безпосередньо з доменами ТМ або може бути зв'язана за допомогою лінкерної послідовності. Лінкерна послідовність може бути присутня просто для того, щоб забезпечити простір між частиною, яка забезпечує спрямоване перенесення, і доменами ТМ або сприяти мобільності між цими ділянками, щоб дати можливість кожному з них досягти своєї оптимальної конформації. Послідовність ДНК, яка включає з'єднувальний фрагмент, може також забезпечити послідовності (такі, як праймерні або рестрикційні сайти) для сприяння клонуванню або може зберігати рамку читування між послідовністю, яка кодує частину, що забезпечує спрямоване перенесення, і послідовністю, яка кодує домени ТМ. Створення таких сполучних пептидів добре відомо фахівцям у даній галузі.

За даним винаходом лінкерні послідовності можуть застосовуватися для зв'язування білка, який забезпечує спрямоване перенесення, з доменами ТМ. В одному переважному варіанті втілення за даним винаходом дві лінкерні послідовності застосовуються в створенні конструкції злитого білка, який складається з однокланцюгового антитіла й тромбомодулінового (ТМ) домену EGF456 і міждоменної петлі між EGF3 й EGF4 (ТМ456). Перша зв'язує важкий і легкий домени однокланцюгового антитіла. Перша лінкерна послідовність має довжину з 5 амінокислот. Буде очевидним, що можуть застосовуватися й інші короткі лінкерні послідовності, від 0 до 10 амінокислот. Другий лінкер за даним винаходом є лінкером з 15 амінокислот, що зв'язує антитіло з доменами ТМ. Буде очевидним для фахівців у даній галузі, що багато різних лінкерних послідовностей можуть використовуватися й так само приводити до злитого білка, який зберігає антикоагулявальну активність і здатність до активації білка С Модифікації існуючого лінкера будуть ставити своєю метою найбільше посилення активації білка С на фосфоліпідних поверхнях, які містять TF.

У переважному підході однокланцюгове антитіло одержували, використовуючи фагову дисплейну бібліотеку. На першому етапі конструювання фагової дисплейної бібліотеки гени (V_H (з IgM), V_K й V_L) були за допомогою ПЛР клоновані від об'єднаної мРНК із людського кісткового мозку, лімфатичного вузла й селезінки, використовуючи набір сімейства специфічних праймерів. Утворені бібліотеки pCITE- V_H (3.8×10^9 членів), pZ604- V_K (1.6×10^7) і pZ604- V_L (3.2×10^7) представляють перманентну й велику розмаїтість генів V. Гени V_H були ампліфіковані за допомогою бібліотеки pCITE- V_H . Гени V_K й V_L були ампліфіковані за допомогою ПЛР від бібліотеки pZ604- V_K й pZ604- V_L із зворотною J_H і лінкерною послідовністю на 5'-кінці. Очищені в гелі V_H , V_K й V_L , які містять продукти ПЛР, були потім піддані спільному сплайсингу, щоб одержати набір генів scFv. Набір генів scFv клонували у фагмідний вектор p603, і продукт лігування електропорували в компетентні клітини *E. coli* TG1, щоб одержувати фагову дисплейну бібліотеку scFv, HuPabL3, з 5.2×10^9 індивідуальних трансформантів (B.K. Kay й ін., Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996; J.D. Marks й ін., J. Mol. Biol. 222(3), 1991, стор.581-597; M.D. Sheets й ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(11), 1998, стор.6157-6162).

В переважному варіанті втілення за даним винаходом одержували однокланцюгове антитіло (scFv(TF)3e10), яке мало один зв'язувальний сайт V_H/V_L для TF. Амінокислотна послідовність scFv(TF)3e10 (SEQ ID NO:1) зображена в прикладі 1.

У переважному варіанті втілення за даним винаходом фрагмент ПЛР, який містить послідовність ТМ456 (з мутаціями M388L й H381G), фланковану за допомогою сайтів NotI, субклонували в сайт NotI вектора p612/3e10 (бактеріальний вектор експресії для scFv(TF)3e10, заснований на pCANTAB5 від Pharmacia). У контексті точкові мутації в частинах ТМ злитих білків за винаходом позначаються однобуквеним символом амінокислотного залишку нативного ТМ, що супроводжується номером положення амінокислотного залишку в зрілому ТМ й однобуквеним символом амінокислотної мутації. Наприклад, M388L вказує на те, що метіонін у положенні 388 амінокислоти зрілого ТМ замінений лейцином. Сайт NotI розташований між послідовністю антитіла й послідовністю e-tag. Це дозволяє одержати бактеріальну конструкцію експресії (pKM101) для злитого білка, що складається з scFv(TF)3e10 - лінкера з 15 амінокислот - ТМ456 і послідовність e-tag. Щоб одержати вектор експресії для ссавця, фрагмент ПЛР спочатку одержували на матриці pKM101. Цей фрагмент був створений для вбудовування в сайти StuI/MscI тромбомодулінового вектора експресії pTHR525. Це дозволило одержати вектор (pKM113), який мав сигнальну послідовність Solulin, послідовність зрілого злитого білка, послідовність e-tag. Вектор містить ген стійкості до ампіциліну й селектовані маркери гіроміцину й дигідрофолатредуктази (DHFR). Експресія запускається промотором MPSV LTR. Сайт-специфічний мутагенез здійснювали на даному векторі, щоб включити мутації R456G й H457Q, які надають частині ТМ стійкість до протеази. Утворений вектор позначали як pKM115. Вектор pKM115 містив лінкер з 15 амінокислот, який розділяє домени V_H й V_L , і інший лінкер з 15 амінокислот, який відокремлює домен V_L від ТМ456. Лінкер, який розділяє V_H й V_L , був зменшений до 5 амінокислот, щоб провести утворення димера більше високої авідності, позначеного як pNM115.5. Злитий білок, кодований pNM115.5, scFv(TF)3e10-ТМ456 (SEQ ID NO:2), зображений у прикладі 2. Додатковий вектор pKM125 генерували, використовуючи стандартні методи рекомбінантної ДНК, шляхом видалення 3 амінокислот (GAP) між лінкером з 5 амінокислот, які розділяють домени V_H й V_L , і видалення e-tag на С-кінці злитого білка. Утворений злитий білок, scFv(TF)3e10-ТМ456A (SEQ ID NO:3), зображений у прикладі 3.

Експресія й очищення злитих білків

Існує декілька шляхів, щоб експресувати рекомбінантні злиті білки *in vitro*, включаючи *E. coli*, бакуловіруси, клітини дріжджів і ссавців або інші системи експресії. Способи експресії клонованих генів у бактеріях добре відомі. Щоб одержати високий рівень експресії клонованого гена в прокаріотичній системі, необхідно створити вектори експресії, які містять як мінімум сильний промотор, щоб направляти термінацію транскрипції мРНК. Прикладами регуляторних ділянок, які підходять для цієї мети, є промоторна й операторна ділянка гена β -глюкозидази *E. coli*, біосинтетичний шлях триптофану *E. coli* або лівий промотор фага λ . Корисним є включення селектованих маркерів у вектори ДНК, які трансформують в *E. coli*. Приклади таких маркерів включають гени, які визначають стійкість до ампіциліну, тетрацикліну або хлорамфеніколу.

Існує багато клітинних систем, які можуть бути використані для відбору еукаріотичних клітинних систем, найбільш придатних для експресії злитих білків й їх аналогів. Ілюстративні приклади ліній клітин ссавців включають, але без обмеження, клітини RPMI 7932, VERO й HeLa, лінії клітин яєчника китайського хом'яка

(CHO), лінії клітин W138, BHK, COS-7, C127 або MDCK. Переважною лінією клітин ссавців є CHL-1. При використанні клітин CHL-1 гігromіцин включають як еукаріотичний селективний маркер. Клітини CHL-1 походять від клітин меланоми RPMI 7032, легко доступної лінії людських клітин. Лінія клітин CHL-1 була закладена на зберігання Американською колекцією тканинних культур (ATCC) відповідно до будапештського договору й була позначена #CRL 9446, депонована 18.06.1987. Клітини, які підходять для застосування за даним винаходом, комерційно доступні від ATCC. Ілюстративні лінії клітин включають *Spodoptera frugiperda* й *Bombix mori*.

Прокаріотична система *E. coli* не здатна здійснювати посттрансляційну модифікацію, таку, як глікозилювання. Крім того, часто порушується укладання білків зі складними дисульфідними структурами при експресії в *E. coli*. Для злитого білка, описаного в контексті, спостерігалось помітне зниження тримомодульної кофакторної активності при експресії в *E. coli*, хоча обидві активності ще були присутні. У випадку прокаріотичної системи експресований білок або присутній у цитоплазмі клітини в нерозчинній формі, у вигляді так званих тілець включення, знайдених у розчинній фракції після лізису клітини, або направляється в периплазму при додаванні відповідної секреторної сигнальної послідовності. Якщо експресований білок знаходиться у вигляді тілець включення, звичайно потрібні розчинення й наступне повторне укладання тілець включення.

Фахівцям відомо багато прокаріотичних векторів експресії, таких, як pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pKK233-2 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) і pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, USA), які комерційно доступні.

Промотори, які звичайно застосовують в рекомбінантних мікробних системах експресії, включають β -лактамазу (пеніциліназу) і систему лактозного промотору (F.C. Chang й ін., *Nature* 275(5681), 1978, стор.617-624; D.V. Goeddel й ін., *Nature* 281(5732), 1979, стор.544-548), промоторну систему триптофану (trp) (D.V. Goeddel й ін., *Nucl. Acids Res.* 8(18), 1980, стор.4057-4074) і промотор tac (T. Maniatis й ін., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Інша підходяща бактеріальна система експресії використовує промотор pL фага λ і термоіндукований репресор clts857 (H.U. Bernard й ін., *Gene* 5(1), 1979, стор.59-76; CA. Love й ін., *Gene* 176(1-2), 1996, стор.49-53). Рекомбінантні злиті білки можуть бути також експресовані в дріжджах-хазяїнах, таких, як *Saccharomyces cerevisiae*. Звичайно це дає можливість проводити різні посттрансляційні модифікації. Експресований злитий білок може бути секретований у культуральний супернатант, де залишається небагато інших білків, що полегшує очищення. Дріжджові вектори для експресії злитих білків за даним винаходом зберігають деякі необхідні властивості. Елементи вектора звичайно одержують із дріжджів і бактерій, щоб уможливити відтворення плазмиди в обох системах. Бактеріальні елементи включають джерело реплікації й селективний маркер. Дріжджові елементи включають джерело реплікаційної послідовності (ARS), селективний маркер, промотор і термінатор транскрипції.

Відповідні промотори в дріжджових векторах для експресії включають промотори гена TRP1, ADH1 або гена ADHII, ген кислій фосфатази (PH03 або PH05), ген ізоцитохрому або промотори, включені в гліколітичний шлях обміну, такі, як промотор енolази, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GADPH), 3-фосфогліцераткінази (PGK), гексокінази, піруваткінази, триозафосфатізомерази й фосфоглюкозаізомерази (R.A. Hitzeman й ін., *J. Biol. Chem.* 255(24), 1980, 12073-12080; B. Hess й ін., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7, 1968, стор.149-167; і M.J. Holland й J. P. Holland., *Biochemistry*, 17(23), 1978, стор.4900-4907).

Комерційно доступні дріжджові вектори включають pYES2, pPIC9 (Invitrogen, San Diego, CA), Yerp-pADH2a, pYcDE-1 (Washington Research, Seattle, WA), pBC102-K22 (ATCC # 67255) і YpGX265GAL4 (ATCC # 67233). Лінії клітин ссавців, які включають, але без обмеження, COS-7, клітини L, C127, 3T3, клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), HeLa, BHK, CHL-1, NSO й HEK293, можуть бути використані для експресії рекомбінантних злитих білків за даним винаходом. Рекомбінантні білки, які продукуються в клітинах ссавців, звичайно розчинні, глікозилювані й мають автентичні N-кінці. Вектори експресії ссавців можуть містити нетранскрибовані елементи, такі, як джерело реплікації, промотор й енхансер, і нетрансльовані 5'- або 3'- послідовності, такі, як сайти зв'язування рибосом, сайти поліаденілування, акцепторний сайт і сплайсинг-донор, і послідовності термінації транскрипції. Промотори, придатні для використання у векторах експресії ссавців, звичайно є, наприклад, промоторами вірусів, таких, як вірус поліоми, аденовірус, вірус людського T-клітинного лейкозу (HTLV), вірус мавпи 40 (SV 40) і людський цитомегаловірус (CMV).

Залежно від системи експресії й вибраного хазяїна гомогенний рекомбінантний злитий білок може бути отриманий з використанням різних комбінацій загальновідомої хроматографії, застосовуваної для очищення білка. Це включає імуноафінну хроматографію, хроматографію з оберненою фазою, катіонообмінну хроматографію, аніонообмінну хроматографію, хроматографію гідрофобної взаємодії, гель-фільтраційну хроматографію й ВЕРХ. Якщо система експресії секретує злитий білок у ростове середовище, білок може бути очищений безпосередньо із середовища. Якщо злитий білок не секретується, він виділяється із клітинних лізатів. Руйнування клітин може бути здійснено будь-яким загальновідомим способом, включаючи чергування заморожування-відтавання, опромінення ультразвуком, механічне руйнування або застосування агентів, що лізують клітини.

У переважному варіанті втілення за даним винаходом конструкції експресії ссавців були трансфіковані в клітини CHO DXB11. Стійкі популяції були відібрані з використанням 400мкг/мл гігromіцину В середовищі HAMS/F12. Рівні експресії склали приблизно 500мкг/л. Щоб підвищити рівні експресії, була відібрана популяція з використанням 100нМ метотрексату в середовищі α -MEM. Приблизний рівень експресії даної популяції склав 5мкг/л.

Ця конструкція містила послідовність e-tag на C-кінці білка. Колонки зі спорідненістю до e-tag були придбані в American/Pharmacia Biotech. Середовище клітинної культури фільтрували через фільтр 0,22мкм і завантажували в колонку на 5мл з послідовністю e-tag зі швидкістю 2мл/хв. Колонкові промивали 0,2М фосфатним буфером з 0,05% Na₃N, pH 7,0 і потім елюат збирали в пробірки, який містять 0,1 об'єму 1М трис-буфера, pH 8,2, щоб нейтралізувати буфер елюції. Альтернативне фільтроване культуральне середовище завантажували в колонку з білком А. У цьому випадку колонку промивали 50мМ лимонною кислотою, 300мМ

NaCl, pH 6,5 й елюювали тим же самим буфером при pH 3,0. В обох випадках очищені зразки потім завантажували в колонку із сефадексом 200, щоб відокремити мономер від димерної форми злитого білка.

Фармацевтичні композиції

Винахід забезпечує також фармацевтичні композиції, які можуть бути введені пацієнтові для досягнення терапевтичного ефекту. Фармацевтичні композиції за даним винаходом можуть бути отримані для введення шляхом комбінування злитого білка, який має необхідний ступінь чистоти й фармацевтично ефективною кількістю, з фізіологічно прийнятними носіями.

Злиті білки за даним винаходом можуть застосовуватися у фармацевтичних композиціях для внутрішньовенного введення або підшкірного введення, або подоболонкового введення. Так, описані вище злиті білки переважно будуть комбінуватися із прийнятним стерильним фармацевтичним носієм, таким, як 5% декстроза, модифікований лактатом розчин Рінгера, нормальний фізіологічний розчин, стерильна вода або будь-який інший приготовлений для продажу фізіологічний буферний розчин, створений для внутрішньовенної інфузії. Буде зрозуміло, що вибір розчину-носія й дози й способу введення композиції будуть змінюватися залежно від суб'єкта й конкретної клінічної ситуації й будуть обумовлені стандартними медичними процедурами.

Відповідно до способів за даним винаходом ці фармацевтичні композиції можуть бути введені в кількостях, ефективних для пригнічення патологічних наслідків, асоційованих з надлишковою генерацією тромбіну в суб'єкта.

Введення злитого білка може бути болюсною внутрішньовенною ін'єкцією, безперервною внутрішньовенною інфузією або комбінацією обох шляхів. Альтернативно або додатково злитий білок, змішаний з відповідними наповнювачами, може потрапити в систему кровообігу із внутрішньом'язової ділянки. Систематичну обробку злитим білком можна контролювати визначенням активованого неповного тромбoplastинового часу (ПЧ) на серійних зразках крові, взятих у пацієнта. Час коагуляції, який спостерігається в цьому аналізі, є тривалим, коли в системі кровообігу досягається достатній рівень злитого білка.

Рекомбінантні злиті білки й фармацевтичні композиції за даним винаходом застосовні для парентерального, місцевого, внутрішньовенного, перорального або локального введення. Фармацевтичні композиції можуть бути введені в різноманітних стандартних дозованих формах залежно від способу введення. Наприклад, стандартні дозовані форми можуть бути введені в лікарській формі, яка включає, але без обмеження, таблетки, капсули, порошки, розчини й емульсії.

Рекомбінантні злиті білки й фармацевтичні композиції за даним винаходом застосовні для внутрішньовенного введення. Композиції для введення звичайно будуть містити розчин одноланцюгового антитіла або злитого білка, що включає одноланцюгове антитіло, розчинене у фармацевтично прийнятному носії, переважно у водному носії. Можуть застосовуватися різноманітні водні носії, наприклад, забуферений фізіологічний розчин тощо. Ці розчини стерильні й, як правило, вільні від небажаного матеріалу. Композиції можуть стерилізуватися звичайними, добре відомими способами.

Типова фармацевтична композиція для внутрішньовенного вливання може бути легко визначена фахівцем у даній галузі. Кількості, які вводять, зовсім очевидно є специфічним білком і залежать від його ефективності й фармакокінетичного профілю. Сучасні способи одержання композицій, які вводять парентерально, будуть відомі або очевидні фахівцям й описані більш докладно в таких публікаціях, як Remington's Pharmaceutical Science, 15^е вид., Mack Publishing Company, Easton, Pa (1980).

Композиції, які містять дані злиті білки або коктейль на їх основі (тобто з іншими білками), можуть вводитися у вигляді терапевтичних курсів лікування. При терапевтичному застосуванні композиції вводять пацієнтові, який страждає від кровотечі в результаті порушення або захворювання, у кількості, достатній, щоб лікувати або принаймні зупинити кровотечу. Кількість, достатня для того, щоб це здійснити, визначена як «терапевтично ефективна кількість». Кількості, ефективні для даного застосування, будуть залежати від тяжкості захворювання й загального стану здоров'я пацієнта.

Одне або множинне введення композицій може проводитися залежно від дози й частоти, які потрібні й переносимі пацієнтом. У кожному разі композиція повинна забезпечити достатню кількість білків за даним винаходом для ефективного лікування пацієнта.

Злиті білки за винаходом або їх фармацевтично прийнятні композиції вводять у терапевтично ефективній кількості, яка буде змінюватися залежно від багатьох факторів, включаючи активність застосовуваного специфічного злитого білка; метаболічну стабільність і тривалість дії злитого білка; вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать й дієту пацієнта; спосіб дії й час введення, швидкість екскреції; комбінацію препаратів; тяжкість конкретного захворювання-стану; і реципієнта, що піддається терапії. Як правило, щоденна терапевтично ефективна кількість становить від приблизно 0,14мг до приблизно 14,3мг/кг маси тіла/день злитого білка за винаходом або його фармацевтично прийнятною композиції; переважно від приблизно 0,7мг до 10мг/кг маси тіла/день; і найбільш переважно від приблизно 1,4мг до приблизно 7,2мг/кг маси тіла/день. Наприклад, для введення людині з масою 70кг дозовий діапазон був би від приблизно 10мг до приблизно 1,0г/день злитого білка за винаходом або його фармацевтично прийнятною композиції, переважно від приблизно 50 мг до приблизно 700мг/день і найбільш переважно від приблизно 100мг до приблизно 500мг/день.

Генна терапія

Злитий білок за винаходом може бути також використаний згідно із даним винаходом шляхом експресії такого злитого білка *in vivo*, яку часто відносять до «генної терапії». Так, наприклад, клітини можуть бути сконструйовані з полінуклеотидом (ДНК або РНК), який кодує злитий білок *ex vivo*, потім створені клітини вводять пацієнтові, який повинен бути підданий терапії злитим білком. Такі способи добре відомі фахівцям. Наприклад, клітини можуть бути сконструйовані за допомогою методик, відомих фахівцям, з використанням ретровірусних частинок, які містять РНК, яка кодує злитий білок за даним винаходом.

Локальна доставка злитих антикоагулювальних білків за даним винаходом, що використовує генну

терапію, може забезпечити терапевтичний агент у галузі-мішені, ендотеліальній клітинній вистілці кровоносних судин.

Розглядаються методології генної терапії як *in vitro*, так й *in vivo*. Відомо декілька способів перенесення потенційно терапевтичних генів, щоб визначити клітинну популяцію. Дивися, наприклад, Mulligan, Science 260, 1993, стор.936-931. Ці способи включають:

(1) пряме перенесення гена. Дивися, наприклад, Wolff й ін. (1990) Science 247: 1465-1468;

(2) опосередковане ліпосою перенесення ДНК. Дивися, наприклад, Caplen й ін., Nature Med. 3, 1995, стор.39-46; Crystal, Nature Med. 1, 1995, стор.15-17; Gao й Huang, Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 1991, стор.280-285;

(3) опосередковане ретровірусом перенесення ДНК. Дивися, наприклад, Kay й ін., Science 262, 1993, стор.117-119; Anderson, Science 256, 1992, стор.808-813;

(4) опосередковане ДНК-вмісним вірусом перенесення ДНК. Такі ДНК-вмісні віруси включають аденовіруси (переважно вектори на основі Ad2 або Ad5), віруси герпесу (переважно вектори на основі вірусу простого герпесу) і парвовіруси (переважно вектори на основі «дефектних» або неавтономних парвовірусів, більш переважно вектори на основі адено-асоційованих вірусів, найбільш переважно вектори на основі AAV-2). Дивися, наприклад, Ali й ін., Gene Therapy, 1, 1994, стор.367-384; патент US 4797368, включений у контекст шляхом цитування, і патент US 5139941, включений у контекст шляхом цитування.

Вибір конкретної векторної системи для перенесення гена, який представляє інтерес, буде залежати від багатьох факторів. Одним важливим фактором є клітинна популяція-мішень. Хоча ретровірусні вектори широко вивчені й використовувалися в багатьох випадках застосування генної терапії, ці вектори, як правило, не підходять для зараження клітин, які не діляться. Крім того, ретровіруси мають потенціал онкогенності. Однак недавні розробки в галузі лентивірусних векторів можуть обійти деякі із цих обмежень. Дивися Naldini й ін., Science 272, 1996, стор.263-267.

Ретровіруси, на основі яких можуть бути отримані ретровірусні плазмідні вектори, згадані вище, включають, але без обмеження, вірус мишиного лейкозу Молоні, вірус некрозу селезінки, ретровіруси, такі, як вірус саркоми Рауса, вірус саркоми Харві, вірус лейкозу птахів, вірус лейкозу гібонів, вірус імунodefіциту людини, аденовірус, вірус мієлопроліферативної саркоми й вірус пухлини молочної залози. В одному варіанті втілення винаходу ретровірусний плазмідний вектор створюється на основі вірусу мишиного лейкозу Молоні.

Аденовіруси мають ту перевагу, що вони мають широкий діапазон хазяїв, можуть заражати спочиваючі або повністю диференційовані клітини, такі, як нейрони або гепатоцити, і, очевидно, в істотній мірі не є онкогенними. Дивися, наприклад, Ali й ін. (1994), вище, стор.367. Аденовіруси, очевидно, не інтегрують у геном хазяїна. Через те, що вони існують екстрахромосомально, небезпека інсерційного мутагенезу сильно знижена. Ali й ін. (1994), вище, стр.373.

Адено-асоційовані віруси мають подібні переваги, що й вектори на основі аденовірусів. Однак AAVs мають властивість сайт-специфічної інтеграції в людську хромосому 19 (Ali й ін., 1994, с.377).

У переважному варіанті втілення винаходу ДНК, які кодують злиті білки за даним винаходом, застосовується в генній терапії порушень, включаючи, але без обмеження, тромбоз глибоких вен, коагулопатію споживання, гострий коронарний синдром або злоякісну пухлину з ознаками коагулопатії.

Відповідно до даного варіанта втілення генна терапія із ДНК, яка кодує злиті білки за даним винаходом, проводиться пацієнтові, який цього потребує, паралельно або негайно після постановки діагнозу.

Кваліфікований фахівець визнає, що будь-який відповідний вектор для генної терапії, який містить ДНК, яка кодує злитий білок за винаходом, або ДНК, яка кодує аналоги, фрагменти, похідні або варіанти злитого білка за винаходом, може бути застосований відповідно до даного варіанта втілення. Методики створення такого вектора відомі. Дивися, наприклад, W.F. Anderson, Nature 392, 1998, стор.25-30; I.M. Verna й N. Somia, Nature 389, 1998, стор.239-242. Введення ДНК-вмісного вектора злитого білка в сайт-мішень може бути виконане з використанням відомих методик.

Вектор для генної терапії включає один або декілька промоторів. Відповідні промотори, які можуть використовуватися, включають, але без обмеження, ретровірусний довгий кінцевий повтор (LTR); промотор вірусу SV40 і промотор людського цитомегаловірусу (CMV), описаний Miller й ін., Biotechniques 7(9), 1989, стор.980-990, або будь-який інший промотор (наприклад, клітинні промотори, такі, як еукаріотичні клітинні промотори, що включають, але без обмеження, гістоновий, *pol III* й β -актиновий промотори).

Інші вірусні промотори, які можуть використовуватися, включають, але без обмеження, аденовірусні промотори, тимідинкінази (TK) промотори й промотори парвовірусу B19. Вибір відповідного промотору із вказівок, які містяться в контексті, буде очевидним для фахівця в даній галузі.

Послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує злитий білок за даним винаходом, знаходиться під контролем відповідного промотору. Відповідні промотори, які можуть використовуватися, включають, але без обмеження, аденовірусні промотори, такі, як аденовірусний основний пізній промотор; або гетерологічні промотори, такі, як промотор цитомегаловірусу (CMV); промотор респіраторного синтиціального вірусу (RSV); індуковані промотори, такі, як промотор мишиної пухлини молочної залози (MMT), промотор металотіонеїну; промотори теплового шоку; альбуміновий промотор; промотор аполіпопротеїну AI (ApoAI); промотори людського глібіну; промотори вірусної тимідинкінази, такі, як промотор тимідинкінази вірусу простого герпесу; ретровірусні LTRs (включаючи модифіковані ретровірусні LTRs, описані вище); промотор β -актину; і промотор людського гормону росту.

Ретровірусний плазмідний вектор використовується, щоб трансдукувати упаковані клітинні лінії з метою утворення продукуючих ліній клітин. Прикладами упакованих клітин, які можуть бути трансфіковані, включають, але без обмеження, лінії клітин PE501, PA3 17, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X; VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+ β -86, GP+envAm12 й DAN, як описано в публікації Miller, Human Gene Therapy, 1990, стор.15-14, яка включена в контекст повністю шляхом цитування. Вектор може трансдукувати упаковані клітин за допомогою будь-яких способів, відомих фахівцям. Такі способи включають, але без обмеження, електропорацію, застосування ліпосом й осадження фосфатом кальцію. За однією з альтернативних

можливостей ретровірусний плазмідний вектор може бути інкапсульований у ліпосому або з'єднаний з ліпідом і потім введений хазяїнові. Продукуюча лінія клітин генерує інфекційні частинки ретровірусного вектора, які включають нуклеїнові послідовності, які кодують поліпептиди. Такі частинки ретровірусного вектора потім можуть використовуватися для трансдукції еукаріотичних клітин або *in vitro*, або *in vivo*. Трансдуковані еукаріотичні клітини будуть експресувати нуклеїнові послідовності, які кодують поліпептид. Еукаріотичні клітини, які можуть бути трансдуковані, включають, але без обмеження, ембріональні стовбурові клітини, ембріональні клітини карциноми, а також гемопоетичні стовбурові клітини, гепатоцити, фібробласти, міобласти, кератиноцити, ендотеліальні клітини й бронхіальні епітеліальні клітини.

Іншим підходом до генної терапії є «транскаріотична терапія», де клітини пацієнтів обробляють *ex vivo* для індукції в спочиваючих хромосомних генів здатність продукувати білок, який представляє інтерес, після зворотного введення пацієнтові. Транскаріотична терапія передбачає, що реципієнт має нормальний комплект генів, необхідних для активації. Транскаріотична терапія включає введення промотору або іншої екзогенної регуляторної послідовності, здатної активувати гени, які знаходяться на стадії виникнення, у хромосомну ДНК клітин пацієнта *ex vivo*, культивування й відбір клітин, які продукують активний білок, і потім повторне введення активованих клітин пацієнтові з наміром, що вони там повністю відновлюються. Клітини, «активовані геном», потім виробляють білок, що представляє інтерес, протягом деякого значного періоду часу, можливо, такої тривалості, як життя пацієнта. Патенти US 5641670 й 5733761 розкривають деталі цієї концепції, і тим самим включені у всій повноті шляхом цитування.

Набори

Крім того, даний винахід стосується наборів для дослідницьких або діагностичних цілей. Звичайно набір включає один або декілька контейнерів, які містять одноланцюгові антитіла за даним винаходом. У переважному варіанті втілення винаходу набори включають контейнери, які містять одноланцюгові антитіла у формі, яка підходить для одержання похідного із другою молекулою, наприклад, доменом ТМ або його фрагментами. У більш переважному варіанті втілення набори включають контейнери, які містять злиті білки з послідовностями SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:3.

В іншому варіанті втілення винаходу набори можуть містити послідовності ДНК, які кодують злиті білки. Переважно послідовності ДНК, які кодують ці злиті білки, забезпечуються в плазміді, яка підходить для трансфекції в клітину-хазяїн й експресії в хазяїнській клітині. Плазміда може містити промотор (часто індукований промотор) для регуляції експресії ДНК у клітині-хазяїні. Плазміда може також містити відповідні сайти рестрикції для сприяння вставки в плазміді іншої послідовності ДНК, щоб продукувати різні злиті білки. Плазміди можуть також містити численні інші елементи, щоб сприяти клонуванню й експресії кодованих білків. Такі елементи добре відомі фахівцям і включають, наприклад, селектовані маркери, кодони ініціації, кодони термінації тощо.

Терапевтичні показання

Захворювання, при яких утворення тромбу відіграє важливу етіологічну роль, включають інфаркт міокарда, коагулопатію споживання, тромбоз глибоких вен, легеневу емболію, ішемічний удар, септичний шок, гострий респіраторний дистрес-синдром, нестабільну стенокардію й інші артеріальні й венозні закупорювальні стани. Злиті білки за даним винаходом корисні при всіх цих, а також інших захворюваннях, при яких тромбоутворення є патологічним. Інші патологічні стани, при яких злитий білок за даним винаходом може бути корисний, включають злоякісну пухлину з коагулопатією і запалення. Сполуки можуть також знайти застосування при пересадженнях шкіри й вен і трансплантації органів. Термін «корисний» означає, що сполуки корисні для терапії або для запобігання захворюванню, або для його прогресування в більш важкий стан. Сполуки за даним винаходом забезпечують також безпечний й ефективний антикоагулянт, наприклад, у пацієнтів, які одержують біопротези, такі, як серцеві клапани. Ці сполуки можуть замінити гепарин і варфарин при лікуванні, наприклад, легеневої емболії або гострого інфаркту міокарда. Злиті білки за даним винаходом можуть також знайти застосування в нанесенні покриття на медичні пристосування, де коагуляція є предметом стурбованості.

Аналізи

Багато лабораторних аналізів для вимірювання активності ТМ у злитому білку за винаходом є доступними. Активність білка С може бути виміряна в аналізі, описаному H.H. Salem й ін., 1984 вище, і J.B. Galvin й ін., J. Biol. Chem. 262(5), 1987, стор.2199-2205. Коротко аналіз складається із двох етапів. Першим етапом є інкубація тестованого злитого білка із тромбіном і білком С за певних умов. На другому етапі тромбін інактивують гірудином або антитромбіном III і гепарином, і активність знову активованого білка С визначають із застосуванням хромогенного субстрату, за допомогою чого хромофор вивільняється за допомогою протеолітичної активності активованого білка С. Цей аналіз проводять із очищеними реагентами.

Альтернативно ефект злитого білка може бути виміряний з використанням аналізів часу згортання плазми, такого, як час частково активованого тромбопластину (ЧАТЧ), час згортання тромбіну (ЧЗГ) і/або протромбіновий час (ПЧ). Ці аналізи проводять відмінність між різними механізмами пригнічення коагуляції й включають активацію білка С Подовження часу згортання в будь-якому із цих аналізів показує, що молекула може пригнітити коагуляцію в плазмі.

Наведені вище аналізи застосовуються для ідентифікації злитих білків з активністю ТМ, які здатні зв'язувати тромбін як в очищених системах, так й у навколишньому середовищі плазми. Додаткові аналізи потім використовують, щоб оцінити інші види активності нативного ТМ, такі, як пригнічення каталізованого тромбіном утворення фібрину з фібриногену (H.V. Jakubowski й ін., J. Biol. Chem. 261(8), 1986, стор.3876-3882), пригнічення активації тромбіном фактора V (C.T. Esmon й ін., J. Biol. Chem. 257 (14), 1982, 7944-7947), прискорене пригнічення тромбіну антитромбіном III і гепариновим кофактором II (N.L. Esmon й ін., J. Biol. Chem. 258(20), 1983, стор.12238-12242), пригнічення тромбіном фактора XIII (J. Polgar й ін., Thromb. Haemost. 58(1), 1987, с. 140), пригнічення опосередкованої тромбіном інактивації білка S (E.A. Thompson й H.H. Salem., J. Clin. Inv. 78(1), 1986, стор.13-17) і пригнічення опосередкованої тромбіном активації й агрегації тромбоцитів (N.L. Esmon, і ін., 1983, див. вище).

Наступні аналізи, описані в деталях нижче в прикладі 5, використали для вимірювання ефективності *in vitro* злитих білків за винаходом: (1) аналіз (хромогенний) активації білка С; (2) аналіз активації sTF/FVIIa; (3) аналіз активації фактора X; і (4) аналіз активації білка С (на багатій TF поверхні).

Мається на увазі, що при здійсненні методик за даним винаходом, безумовно, слід розуміти, що посилання на конкретні буфери, середовища, реагенти, умови культивування тощо, не є обмежувачами, але повинні сприйматися так, начебто включають всі споріднені матеріали, які фахівець у даній галузі визнав би такими, що представляють інтерес або цінність в особливому контексті, у якому це обговорення представлено. Наприклад, часто можна замінити одну буферну систему або культуральне середовище іншим і все-таки досягти подібних, якщо не ідентичних, результатів. У таких фахівців буде достатньо інформації про такі системи й методології, щоб зуміти без неналежного експериментування зробити такі заміни, які будуть оптимально служити своїм цілям при застосуванні способів і методик, розкритих у контексті.

Даний винахід тепер буде, крім того, описуватися за допомогою наступних прикладів, які його не обмежують. При використанні розкриття прикладу слід чітко пам'ятати, що інші й різні варіанти втілення способів, розкритих за даним винаходом, будуть, без сумніву, пропонуватися фахівцям в галузі, що має відношення до справи.

Без подальшого уточнення вважається, що будь-який фахівець у цій галузі, використовуючи попередній опис, застосує даний винахід у його найбільш повному обсязі. У зв'язку із цим наступні переважні специфічні варіанти втілення винаходи повинні розглядатися як просто ілюстративні, а не як такі, що якимось чином обмежують розкриття, що залишилося.

У згаданих й у наступних прикладах всі температури не виправлені й дані в градусах Цельсія, всі частини й відсотки є масовими, якщо не вказано інакше.

Повні розкриття заявок, патентів і публікацій, цитованих вище, тим самим включені шляхом цитування.

Наступні приклади передбачені як посібник, щоб сприяти застосуванню винаходу на практиці.

Приклад 1

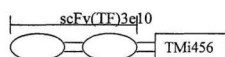
Конструкція одноланцюгового анти-TF антитіла scFv(TF)3e10

```
(-18)MLGVLLV LGALALAGLVFPPEMAQVNLRESG
GTLVQPGGSLRLSCAASGFSFTDAWMSWVRQ
APGKELEWVSSISGSGGSTYYAGSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVLSL
TDYYWYGMDVWGQGTLVTVSAGGGGSGAPN
FMLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSSGVSASY
VQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVPDRFSG
SIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYQCQSYDSN
NLVVFGGGTKLTVLGAAAGAPVPPDPLEPRA
A (264)
```

Одноланцюгове анти-TF антитіло scFv(TF)3e10 (SEQ ID NO:1) складається із сигнального пептиду (-18 до -1), домену V_H (1-126), лінкера V_H-V_L (127-131), домену V_L (132-246) і послідовності e-tag (247-264).

Приклад 2

Конструкція 1 злитого білка scFv(TF)3e10-TMi456



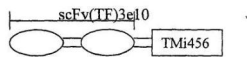
```
(-18)MLGVLLV LGALALAGLVFPPEMAQVNLRESG
GTLVQPGGSLRLSCAASGFSFTDAWMSWVRQ
APGKELEWVSSISGSGGSTYYAGSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVLSL
TDYYWYGMDVWGQGTLVTVSAGGGGSGAPN
FMLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSSGVSASY
VQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVPDRFSG
SIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYQCQSYDSN
NLVVFGGGTKLTVLGAAAGGGGSGGGGSGGG
GSVERPVDPCFRANCEYQCQPLNQTSYLCVCAE
GFAPIRGEPHRCQLFCNQATACPADCDPNTQAS

CECPGYILDDGFICTDIDECENGGFCSGVCH
NLPGTFFECICGPDALAGQIGTDCAAAGAPVP
YPDPLEPRAA (400)
```

Злитий білок scFv(TF)3e10-TMi456 (SEQ ID NO:2) складається із сигнального пептиду (від положення -18 до положення -1), V_H-ділянки (1-126), V_H-V_L-лінкера (127-131), V_L-ділянки (132-246), V_L-TM-лінкера (247-264), TMi-домену (265-382) і послідовності e-tag (383-400). Мутації H381G, M388L, R456G й H457Q в TMi456 підкреслені.

Приклад 3

Конструкція 2 злитого білка scFv(TF)3e10-TMi456



```
(-18)MLGVLVVLGALALAGLVFPMAQVNLRESG
GTLVQPGSLRLSCAASGFSFTDAWMSWVRQ
APGKELEWVSSISGSGGSTYYAGSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVLSL
TDYYWYGMVDVWGQGTLLVTVSAGGGGSGNFM
LTPHVSASAPGKTVTISCTRSSGVSASYVQW
YQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVPDRFSGSIDT
SSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSNNLVV
FGGGTKLTVLGAAAGGGGSGGGGSGGGGSVE
PVDPCFRANCEYQCQPLNQTSYLCVCAEGFAP
IPQEPHRCQQLFCNQATACPADCDPNTQASCECP
EGYILDDGFICTDIDECENGGFCSGVCHNLP
GFECICGPDSALAGQIGTDC(379)
```

Злитий білок scFv(TF)3e10-TMi456 (SEQ ID NO:3) складається із сигнального пептиду (від положення -18 до положення -1), V_H-ділянки (1-126), V_H-V_L-лінкера (127-131), V_L-ділянки (132-246), V_L-TM-лінкера (244-261), TMi-домену (262-379). Мутації H381G, M388L, R456G й H457Q в TMi456 підкреслені.

У змінах, внесених у письмову й комп'ютерну версію опису й переліку послідовностей, виключені помилки. До цих змін ніяких доповнень не зроблено.

Приклад 4

Експресія злитого білка в бактеріальних клітинах/клітинах ссавців

Експресія в бактеріальних клітинах можлива, але вона дає білок, який має сильно знижену кофакторну активність TM. Злитий білок експресували в клітинах CHO. Плазмідна експресія містила як гігromіцин В, так і селектовані маркери DHFR. Первинна селекція була проведена при 400мкг/мл гігromіцину, щоб відібрати популяцію. Утворену популяцію потім піддавали селекції з 100нМ метотрексатом. У ході даної селекції клітини, які мають ампліфіковані копії ділянки ДНК, що містить селектований маркер, і ген-мішень, відбирають серед популяції. У результаті даної селекції рівні експресії були підвищеними від приблизно 0,3мг/л до приблизно 6мг/л.

Приклад 5

Аналізи in vitro

1. Аналіз (хромогенний) активації білка С

Даний аналіз проводили змішуванням 20мкл кожного з наступних білків у планшеті для мікротитрування: зразок TM (невідомий або стандартний), тромбін (3нМ) і білок С (1,5мкМ). Розріджувачем в аналізі для кожного білка був 20мМ трис-НСІ, 0,1М NaCl, 2,5мМ CaCl₂, 2,5мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (BSA), рН 7,4. Лунки інкубували протягом 2год при 37°C, після чого активацію білка С переривали додаванням 20мкл гірудину (0,16од/мкл, 370нМ) у розріджувачі для аналізу й інкубували протягом додаткових 10хв.

Утворену кількість активованого білка С визначали додаванням 100мкл 1мМ субстрату S2266 (у розріджувачі для аналізу) і продовжували інкубувати планшет при 37°C. Поглинання при 405нМ у кожній лунці зчитували кожні 10сек протягом 30хв, використовуючи зчитувальний пристрій для планшетів Molecular Devices. Дані поглинання зберігали, і зміну поглинання за секунду (кутовий коефіцієнт) розраховували для кожної лунки. Зміна поглинання на секунду було пропорційно до пмолів/мл активованого білка С.

Співвідношення визначали емпірично, використовуючи змінювані концентрації активованого білка С. Зразки, які містять 100% активованого білка С, генерували змішуванням білка С при 0-1,5мкМ із 60нМ кролячим TM й 30нМ тромбіном, інкубацією протягом 0-4год, додаванням гірудину й виміром активності S2266, як описано вище. Умови, при яких активувалося 100% білка С, визначали, як ті, при яких активність S2266 (поглинання А405/сек) досягала плато. Одиницю активності визначали як 1пмоль активованого білка С, генерованого за мл/хв із реагентами в умовах, визначених вище. Альтернативно значення активності наведені в порівнянні з нативним кролячим TM, розчиненим за допомогою детергенту.

2. Аналіз активації sTF/FVIIa

Принцип даного аналізу описаний нижче. Амідний зв'язок субстрату п-нітроаніліду трипептиду гідролізували за допомогою комплексу sTF/FVIIa. Виділений хромофорний продукт п-нітроанілід контролювали при 405нМ і концентрацію продукту, утвореного за одиницю часу розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції 9920М⁻¹см⁻¹. Значення IC₅₀ (С) визначали шляхом апроксимації початкових швидкостей в 4-параметричному рівнянні: $Y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$

H-D-Val-Leu-Arg-p-NA → H-D-Val-Leu-Arg + p-NA

Субстрат S2266 Трипептид Хромофор

Реагенти й розчини

1. Буфер для аналізу: 50мМ трис-НСІ, 150мМ NaCl, 5мМ CaCl₂, 0,1% BSA, рН 7,5

2. Людський FVIIa (HCVIIA-0060, Haematologic Technologies Inc.): 10х робочий розчин - приготувати 20нМ розчин у буфері для аналізу перед використанням.

3. Розчинний TF (Berlex): 10х робочий розчин - приготувати 30нМ розчин у буфері для аналізу перед використанням.

4. Хромогенний субстрат S2266 (Kabi Pharmacia Nepar Inc.): вихідний розчин: 10мМ у H₂O, який зберігають при 4°C; 2,5х робочий розчин -приготувати 2,5мМ розчин у буфері для аналізу перед використанням.

5. Антитіло: приготувати 2,5 × розведення в буфері для аналізу перед використанням.

Умови аналізу

Аналізи проводили в 96-лунковому планшеті для титрування при кімнатній температурі. Кінцеві концентрації компонентів були наступними:

Сім різних зв'язувальних TF антитіл виділяли з фагової дисплейної бібліотеки людських одноланцюгових антитіл. Значення спорідненості зв'язувальних sTF антитіл, виміряні з використанням BIAcore, були між 35 й 470 nM. Аналіз sTF/VIIa використали, щоб визначити, чи блокують антитіла утворення активного комплексу VIIa/TF. В аналізі sTF/VIIa зв'язування VIIa з sTF більш ніж 20-кратно збільшує швидкість розщеплення в порівнянні із хромогенним пептидним субстратом S2266. Антитіла, які пригнічують зв'язування FVIIa з TF, блокують дане прискорення. Серед виділених семи різних антитіл тільки одне з них, scFv(TF)3e10, не викликало пригнічення в аналізі sTF/VIIa. Дане антитіло збільшувало спорідненість FVIIa до sTF, знижуючи константу дисоціації K_D п'ятикратно (Fig.1). Значення K_D антитіла scFv(TF)3e10 для sTF, виміряне з використанням аналізу sTF/FVIIa, склало 65,4 nM (Fig.2). Мікрокалориметрію використали, щоб порівняти спорідненість scFv(TF)3e10 до TF при порівнянні з комплексом FVIIa/TF. Ці експерименти показали, що антитіло мало 20-кратне більш високу спорідненість до комплексу TF/FVIIa у порівнянні з вільним sTF 9 (33 nM проти 600 nM, Fig.3). Антитіла порівнювали, використовуючи аналіз активації FX, що складався з TF повної довжини у фосфоліпідних везикулах, FVIIa й FX. Кількість генерованого FXa визначали, використовуючи хромогенний субстрат S2765. Хоча антитіло scFv(TF)3e10 не мало найвищої спорідненості, як виміряно за допомогою BIAcore, і це підвищувало спорідненість FVIIa до sTF, воно було єдиним антитілом у групі, яке

пригнічувало активацію FX і подовжувало час згортання в аналізі ПЧ. Значення IC_{50} (димерного) антитіла scFv(TF)3e10 для інгібування в аналізі активації FX склало 0,44нМ (Фіг.4), і двократне збільшення ПЧ відбувалося при 417нМ (Фіг.5).

Антитіло scFv(TF)3e10 ідентифікували на основі зв'язування з рекомбінантним людським розчинним TF. Гомологія послідовностей TF між людською і мишиною або людською й кролячою склала 58% й 71%, відповідно. Антитіло зв'язується з унікальним епітопом на людському TF, що перешкоджає активації FX комплексом FVIIa/TF. Фізіологічно антитіло має перевагу над антитілами, які конкурують зі зв'язуванням FVTI або FVIIa з TF. Значення K_D як FVII, так й FVIIa у людській плазмі склало 10нМ або між 100-і 1000-кратним значенням, більш високим, ніж K_D . Дисоціація для комплексу з високою спорідненістю буде повільною ($70-700$ сек, припускаючи значення константи швидкості асоціації $k_{on} = 10^8 M^{-1} \text{сек}^{-1}$). На відміну від цього, константа Михаеліса K_m фактора X для комплексу VIIa/TF була між 0,200 й 4 мкМ, і концентрація FX у людській плазмі склала 130нМ (між 0,03- і 0,65-кратним K_D). Первинна функція комплексу FVIIa/TF при коагуляції складається в перетворенні FX в FXa.

Приклад 7

Властивості *in vitro* злитого білка scFv(TF)3e10-TMi456

Властивості злитого білка за винаходом scFv(TF)3e10-TMi456 оцінювали в різних аналізах *in vitro*. Злитий білок scFv(TF)3e10-TMi456 зберігав здатність пригнічувати активацію FX за допомогою комплексу FVIIa/TF ($IC_{50} = 0,5нМ$, дані не наведені) і діяти як кофактор каталізованої тромбіном активації білка C (хромогенний аналіз, Фіг.6). Не спостерігалось ніякої значної відмінності в кофакторній активності ТМ між злитим білком й одним ТМі456 за відсутності фосфоліпідних пухирців, які містять TF. На відміну від цього, кофакторна активність ТМ злитого білка, але не ТМі456, підвищувалася більш ніж 5-кратно в присутності фосфоліпідних везикул, які містять TF (Фіг.7). Активність *in vitro* злитого білка scFv(TF)3e10-TMi456 проти індукованої TF коагуляції (аналіз ПЧ, невластивий шлях коагуляції) була в 6 разів вище, ніж антитіла scFv(TF)3e10 й в 17 разів вище, ніж одного ТМі456 (Фіг.5). На відміну від цього, ефективність злитого білка *in vitro* проти властивих і загальних шляхів коагуляції не була змінена значно (аналізи АРТТ і ТСТ, дані не наведені). Отже, доза злитого білка, яка викликала двократне збільшення ПЧ, тільки помірно впливала на АРТТ, тоді як ТМі456 в еквівалентній дозі в аналізі ПЧ викликав 4-кратне збільшення АРТТ (Фіг.8). Профіль *in vitro* був сумісний з таким, очікуваним для антикоагулянтів, спрямованих на TF/FVIIa, які, як відомо, мають винятковий вплив на співвідношення кровотечі на тваринних моделях тромбозу. Відповідно до аналізів заснованої на плазмі коагуляції злитий білок scFv(TF)3e10-TMi456 був сильнішим в аналізі індукованої TF коагуляції цільної крові (тромбоеластограф, TEG), ніж або антитіло scFv(TF)3e10, або один ТМі456 (Фіг.9). Крім того, злитий білок scFv(TF)3e10-TMi456 давав більше передбачуваний дозовий відклик при коагуляції цільної крові, індукованої TF, ніж низькомолекулярний гепарин (LMWH, Фіг.10). У підсумку наведені вище дані демонструють, що злиті білки за винаходом є потужними й селективними антикоагулянтами *in vitro*.

Приклад 8

Модель шурячої тромбоемболії *in vivo*

TF-частина антитіла злитого білка scFv(TF)3e10-TMi456 є специфічною для TF приматів. Модель тромбоемболії, ініційована за допомогою людського TF (тромбопластиновий реагент, який містить людський рекомбінантний TF, Ortho), була створена в самців, які знаходяться при свідомості, щурів лінії Sprague-Dawley (350-400г, n>7/групу). На цій моделі коагулопатії споживання (DIC) фактор тканини за посередництвом ін'єкції тромбопластину індукуює відкладення легеневого фібрину, порушення дихання й смерть. Еквімолярні дози scFv(TF)3e10-TMi456 або scFv(TF)3e10, або наповнювача вводили за допомогою ін'єкції у хвостову вену, потім через 15хв за допомогою болюсної ін'єкції вводили тромбопластин (0,5мг/кг). У групі, обробленій наповнювачем, дана доза TF приводила до 60% летальності (LD_{60}) звичайно протягом 5хв після ін'єкції тромбопластину. Щурів оцінювали відповідно до наступної системи показників у балах, що характеризують поширеність захворювання-смертність: 0 - без впливу; 1 - слабкий розлад дихання (відновлення до норми через 30хв); 2 - гострий розлад дихання (агонізуючий стан, відновлення до норми потребувало більше 60хв); і 3 - загибель. Середня оцінка була вибрана для порівняння ефективності 4 різних оброблених груп. Результати використання даного аналізу *in vivo* наведені на Фіг.11. У цьому аналізі злитий білок за винаходом був здатний пригнітити загибель і розлад дихання.

Попередні приклади можуть бути повторені з однаковим успіхом за допомогою заміщуваних у родовому відношенні або конкретно описаних реагентів та/або робочих умов за даним винаходом для тих, які використані в попередніх прикладах.

Незважаючи на те, що винахід ілюстрований щодо одержання деяких конструкцій злитих білків, очевидно, що можуть бути зроблені зміни й модифікації за винаходом без відходу від суті й обсягу винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Light, David
McLean, Kirk

<120> НОВІ ЗЛИТІ БІЛКИ ТРОМБОМОДУЛІНУ, ЯКІ ЗАБЕЗПЕЧУЮТЬ СПРЯМОВАНЕ
ПЕРЕНЕСЕННЯ ДО ТКАНИННОГО ФАКТОРА, ЯК АНТИКОАГУЛЯНТИ

<130> BERLX 282WO

<140> PCT/US03/13522

<141> 2003-04-30

<150> 60/376,566

<151> 2002-05-01

<160> 3

<170> PatentIn версія 3.1

<210> 1

<211> 282

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний злитий білок

<400> 1

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His
145 150 155 160

Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg
165 170 175

Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg
180 185 190

Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro
195 200 205

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn
210 215 220

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

Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro
260 265 270

Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Ala Ala
275 280

<210> 2

<211> 418

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний злитий білок

<400> 2

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His
145 150 155 160

Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg

```

165          170          175
Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg
180          185          190
Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro
195          200          205
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn
210          215          220
Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp
225          230          235          240
Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly
245          250          255
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser
260          265          270
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Val Glu Pro Val Asp Pro
275          280          285
Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
290          295          300
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro Gly Glu
305          310          315          320
Pro His Arg Cys Gln Leu Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
325          330          335
Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
340          345          350
Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
355          360          365
Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
370          375          380
Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Gly Gln Ile Gly Thr Asp Cys
385          390          395          400
Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg
405          410          415

```

Ala Ala

<210> 3

<211> 397

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний злитий білок

<400> 3

```

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1      5      10      15

```

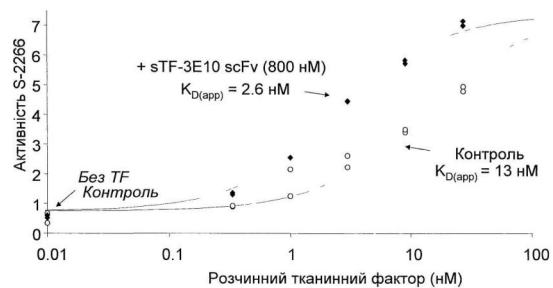
```

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20          25          30
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35          40          45
Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50          55          60
Glu Leu Glu Trp Val Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65          70          75          80
Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85          90          95
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100         105         110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
115         120         125
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130         135         140
Gly Gly Gly Gly Ser Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser
145         150         155         160
Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly
165         170         175
Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser
180         185         190
Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro Ser Gly Val
195         200         205
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn Ser Ala Ser
210         215         220
Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
225         230         235         240
Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
245         250         255
Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260         265         270
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg
275         280         285
Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu
290         295         300
Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro Gly Glu Pro His Arg
305         310         315         320
Cys Gln Leu Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys Asp Pro
325         330         335
Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp
340         345         350

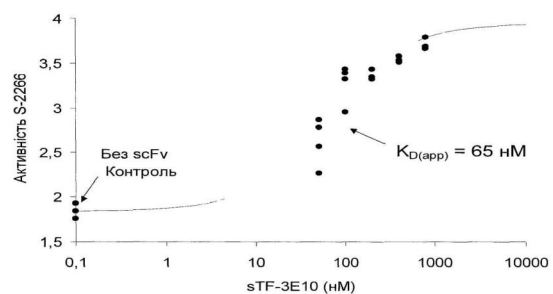
```

Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys
 355 360 365
 Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys Ile Cys Gly
 370 375 380
 Pro Asp Ser Ala Leu Ala Gly Gln Ile Gly Thr Asp Cys
 385 390 395

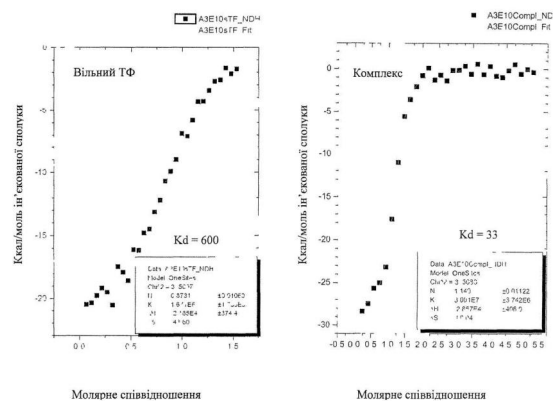
Фігура 1



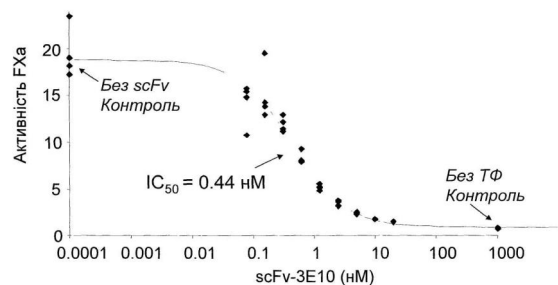
Фігура 2



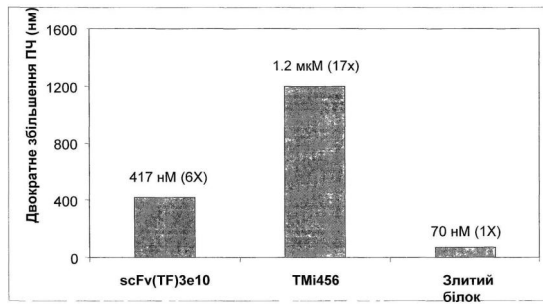
Фігура 3



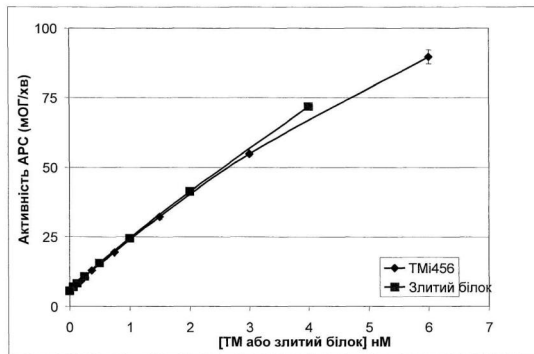
Фігура 4



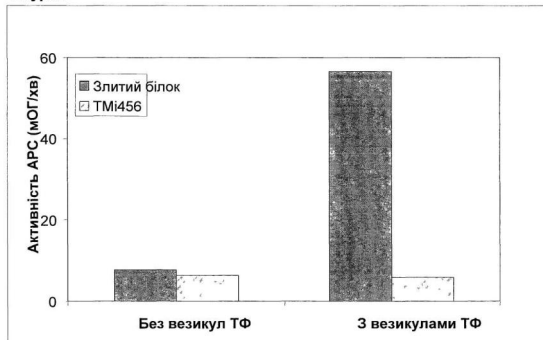
Фігура 5



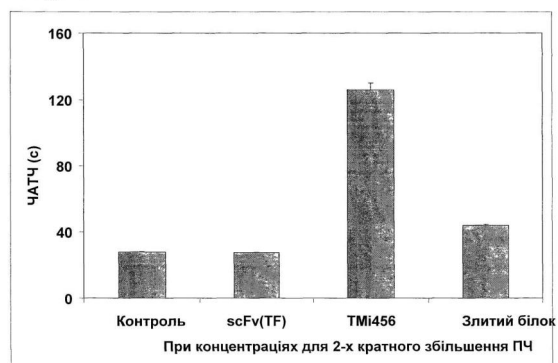
Фігура 6



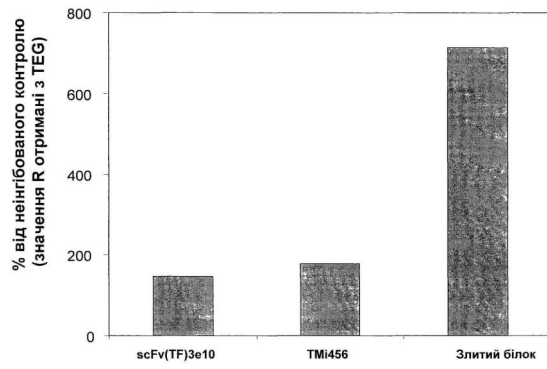
Фігура 7



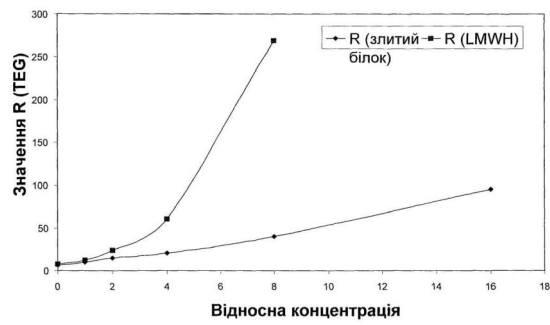
Фігура 8



Фігура 9



Фігура 10



Фігура 11

