

Настоящее изобретение разработано при поддержке правительства по контракту № AI 27849, заключенному с Национальным Ин-ститутом Здоровья. Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

Настоящее изобретение относится к функцио-нальным химерам фрагментов CD4 и рецепторов иммунных клеток, способным вызвать лизис ВИЧ-инфицированных клеток иммунными клетками, но не сообщающим иммунным клеткам восприимчивости к ВИЧ-инфекции. Таким образом, настоящее изобретение дает новое и эффективное средство против ВИЧ-инфекции.

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

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

ВИЧ и иммунопатогенез

В 1984 году было выяснено, что ВИЧ является этиологическим фактором СПИДа. С тех пор определение СПИДа несколько раз пересматривалось в отношении того, какие критерии следует включать в диагноз. Однако, несмотря на непостоянство диагностических параметров, простым общим знаменателем СПИДа является заражение ВИЧ с последующим развитием стойких генерализованных симптомов и болезней, определяющих СПИД: вторичных инфекций, новообразований и неврологических расстройств (Harrison's Principles of Internal Medicine, 12 th ed., McGraw Hill (1991)).

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

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

В репликации и других биологических действиях ВИЧ участвуют обычные ретровирусные гены (*env*, *gag* и *pol*) и еще шесть генов. Как сказано выше, общим знаменателем СПИДа является сильное подавление иммунитета, преимущественно, клеточного. Это подавление иммунитета приводит к возникновению различных заболеваний - к поражению условно-патогенными микроорганизмами и развитию новообразований.

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

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

ВИЧ связывается специфически и с высокой аффинностью, при помощи последовательности аминокислот вирусной оболочки (gp120), с частью фрагмента V1 молекулы CD4, расположенного у ее аминоконца. После связывания вирус сливается с мембраной клетки-мишени и интернализируется. Оказавшись внутри клетки, он при помощи фермента обратной транскриптазы проводит транскрипцию своей геномной РНК в ДНК, которая интегрируется в ДНК клетки, где существует на протяжении жизни клетки как "провирус".

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

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

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

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

Клетки, зараженные вирусом иммунодефицита человека, экспрессируют на поверхности гликопротеин gp120. Gp120 опосредствует слияние клеток CD4⁺, происходящее аналогично слиянию вируса с клеткой и приводящее к образованию не-долговечных многоядерных гигантских клеток. Образование синцитиев зависит от непосредственного взаимодействия гликопротеина оболочки gp120 и белка CD4 (Dalgleish et al., там же; Klatzman, D. et al., *Nature* 312:763 (1984); McDougal, J.S. et al., *Science* 231:382(1986); Sodroski, J. et al., *Nature* 322:470 (1986); Lifson, J.D. et al., *Nature* 323:725 (1986); Sodroski, J. et al., *Nature* 321:412 (1986)).

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

Несколько исследовательских коллективов (Deen et al., *Nature* 331:82-84 (1988); Fisher et al., *Nature* 331:76-78 (1988); Hussey et al., *Nature* 331: 78-81 (1988); Smith et al., *Science* 238:1704-1707 (1987); Trauneker et al., *Nature* 331:84-86 (1988)) предложили и успешно продемонстрировали в лабораторных условиях ряд терапевтических программ, предусматривающих использование растворимого CD4 в качестве пассивного средства противодействия адсорбции вируса и передаче его через синцитии; впоследствии были получены слитые белки из иммуноглобулина CD4 с более продолжительным временем полужизни и скромной биологической активностью (Capon et al., *Nature* 337:525-531 (1989); Trauneker et al., *Nature* 339:68-70 (1989); Byrn et al., *Nature* 344:667-670 (1990); Zettlmeissl et al., *DNA Cell Biol.* 9:347-353 (1990)).

Хотя конъюгаты, или слитые белки, иммуно-токсина CD4 в лабораторных условиях обладают сильной цитотоксичностью в отношении зараженных клеток (Chaundhary et al., *Nature* 335:369-372 (1988); Till et al., *Science* 242: 1166-1168 (1988)), скрытый характер синдрома иммунодефицита не позволяет надеяться на то, что какое-то одно лекарственное средство будет эффективным в облегчении бремени инфекции, а антигенные свойства чужеродных слитых белков, скорее всего, ограничат их приемлемость для стратегий лечения, требующих их неоднократного применения. Исследования с обезьянами, пораженными вирусом иммунодефицита обезьян, показали, что растворимый CD4, если вводить его обезьянам, у которых не наблюдается явный дефицит клеток CD4, может снизить титр вируса иммунодефицита (SIV) и улучшить миелоидный потенциал в лабораторных условиях (Watanabe et al., *Nature* 337:267-270 (1989)). Однако, по окончании лечения количество вирусов быстро восстанавливалось, а это говорит о том, что для предотвращения выхода иммунной системы из строя может потребоваться пожизненное применение лекарства.

Т-клеточные рецепторы и рецепторы Fc

Экспрессия на поверхности клетки наиболее распространенной формы Т-клеточных антигенных рецепторов (TCR) возможна за счет совместной экспрессии по меньшей мере 6 различных полипептидных цепей (Weiss et al., *J. Exp. Med.* 160:1284-1299 (1984); Orloffhashi et al., *Nature* 316: 606-609 (1985); Berkhout et al., *J. Biol. Chem.* 263:8528-8536 (1988); Sussman et al., *Cell* 52:85-95 (1988)), цепей, связывающих антигены α/β , трех полипептидов комплекса CD3 и ζ . Если одна из этих цепей отсутствует, стабильная экспрессия остальных составляющих комплекса не состоится. ζ является критическим полипептидом для поверхностной экспрессии всего комплекса (Sussman et al., *Cell* 52:85-95 (1988)) и считается, что она опосредствует хотя бы часть программ клеточной активации, запускаемых в результате распознавания лиганда рецептором (Weissman et al., *EMBO J.* 8:3651-3656 (1989); Frank et al., *Science* 249:174-177 (1990)). ζ - это интегральный полипептид мембраны, гомодимер I типа с молекулярной массой 32 килодальтона, имеющий внеклеточный домен из 9 остатков, на котором нет участков для присоединения N-связанного гликана, и внутриклеточный домен из 112 (у мышей) или 113 (у человека) остатков (Weissman et al., *Science* 238:1018-1020 (1988); Weissman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9709-9713 (1988)). В клетках, экспрессирующих упомянутый антигенный рецептор, в небольших количествах присутствует изоформа полипептида ζ , названная η (Baniyash et al., *J. Biol. Chem.* 263:9874-9878 (1988); Orloff et al., *J. Biol. Chem.* 264:14812-14817 (1989)), которая образуется при изменении порядка сплайсинга мРНК (Jin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3319-3233 (1990)). Считается, что гетеродимеры ζ - η опосредствуют образование инозитфосфатов, а так же провоцируемую рецептором, программируемую гибель клеток, называемую апоптозом (Mercep et al., *Science* 242:571-574 (1988); Mercep et al., *Science* 246:1162-1165 (1989)).

Подобно цепям ζ и η , цепь γ , связанная с рецептором Fc, экспрессируется на поверхности клеток в комплексе с дополнительными полипептидами, часть которых опосредствует распознавание лиганда, а функция другой части не установлена. Гомодимерная структура цепи γ (гамма) и вся ее организация имеет сильное сходство со структурой ζ , и является составной частью как высокоаффинного рецептора IgE тучных клеток/базофилов - рецептора Fc ϵ RI, - который состоит по меньшей мере из трех различных полипептидных цепей (Blank et al., *Nature* 337:187-189 (1989); Ra et al., *Nature* 241:752-754 (1989)), так и одного из низаффинных рецепторов IgG, представленного у мышей типом Fc γ RII α (Ra et al., *J. Biol. Chem.* 264:15323-15327 (1989)), а у человека подтипом CD16, который экспрессируется макрофагами и

естественными клетками-киллерами, CD16TM (CD16, трансмембранный) (Lanier et al., Nature 342:803-805 (1989); Anderson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2274-2278 (1990)) и полипептидом с неустановленной функцией (Anderson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2274-2278 (1990)). Недавно появилось сообщение о том, что γ экспрессируется линией мышиных Т-клеток (CTL) и образует гомодимеры и гетеродимеры γ - ζ и γ - η (Orloff et al., Nature 347:189-191 (1990)).

Рецепторы Fc опосредствуют фагоцитоз им-мунных комплексов, трансцитоз и серологически типизируемую клеточную цитотоксичность (Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Unkeless et al., Annu. Rev. Immunol. 6:251-281 (1988); Mellman, Curr. Opin. Immunol. 1:16-25 (1988)). Недавно обнаружилось, что одна из изо-форм мышиного низкоаффинного рецептора Fc, FcR γ IIIb1, опосредствует интернализацию покры-тых Ig мишеней в покрытые клатрином ячейки и что другой низкоаффинный рецептор, FcR γ IIIA, опосредствует серологически типизируемую клеточную цитотоксичность за счет связи с одним или несколькими членами небольшого семейства мо-лекул - "инициаторов" (Miettinen et al., Cell 58:317-327 (1989); Hunziker and Mellman, J. Cell Biol. 109:3291-3302 (1989)). Эти молекулы-инициаторы, Т-клеточный рецептор, цепь ζ , цепь η Т-клеточного рецептора и цепь γ рецептора Fc взаимодействуют с доменами распознавания лиганда, принадлежащими различным рецепторам иммунной системы, и при агрегации могут самостоятельно запускать клеточные процессы, в том числе лизис клеток (Samelson et al., Cell 43:223-231 (1985); Weissman et al., Science 239:1018-1020 (1988); Jin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3319-3323 (1990); Blank et al., Nature 337:187-189 (1989); Lanier et al., Nature 342:805-807 (1989); Kurosaki and Ravetch, Nature 342:805-807 (1989); Hibbs et al., Science 246:1608-1611 (1989); Anderson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2274-2278 (1990); and Irving and Weiss, Cell 64: 891-901 (1991)).

При проведении параллелей между семейст-вами рецепторов Fc человека и мышей стало яс-но, что изоформы FcR γ IIA и C человека не имеют мышиных аналогов. Отчасти поэтому их функция еще не определена.

Поскольку гуморальные агенты, основанные только на CD4, в живом организме могут оказать-ся лишь ограниченно полезными, изучалась воз-можность усиления клеточного иммунитета к ВИЧ. Были получены препараты белковых химер, в ко-торых внеклеточный домен CD4 был слит с тран-смембранными и/или внутриклеточными домена-ми Т-клеточного рецептора, рецептора IgG Fc или элементами В-клеточного рецептора, проводящи-ми сигналы (U.S.S.N. 07/847566 и 07/665961, включенные в настоящий документ посредством ссылки). Цитолитические Т-клетки, экспрессирую-щие химеры, в которых присутствует внеклеточный домен CD4, оказывают сильное, не завися-щее от главного комплекса гистосовместимости, разрушительное воздей-ствие на клеточные мише-ни, экспрессирующие белки оболочки ВИЧ. Ис-ключительно важным и новым компонентом этого подхода явилось выделение отдельных цепей Т-клеточного рецептора, рецептора Fc и В-клеточ-ного рецептора, агрегации которых достаточно, чтобы инициировать клеточный ответ. Одним из особенно полезных вариантов осуществления это-го подхода явилось изобретение химер CD4 с ζ , η или γ , которые направляют цитолитические Т-лим-фоциты на распознавание и уничтожение клеток, экспрессирующих gp120 ВИЧ (U.S.S.N. 07/847566 и 07/665961, включенные в настоящий документ посредством ссылки).

В целом настоящее изобретение представл-яет собой способ нацеливания клеточного иммун-ного ответа на ВИЧ-инфицированную клетку в ор-ганизме млекопитающего. Этот способ предусмат-ривает введение в организм млекопитающего эф-фективного количества лечебных клеток, экспрес-сирующих связанный с мембраной белковый хи-мерный рецептор, который включает (а) внекле-точную часть, содержащую фрагмент CD4, спо-собный специфически распознавать и связывать ВИЧ-инфицированные клетки, но неспособный опосредствовать ВИЧ-инфекцию, и (b) внутрикле-точную часть, которая способна подать лечебной клетке сигнал уничтожить связанную с рецептором ВИЧ-инфицированную клетку.

Настоящее изобретение предусматривает так-же использование лечебных клеток, экспрессиру-ющих связанный с мембраной белковый химер-ный рецептор, включающий (а) внеклеточную часть, которая содержит фрагмент CD4, спосо-бный специфически распознавать и связывать кле-тки, зараженные ВИЧ, но неспособный опосредст-вовать заражение, и (b) внутриклеточную часть, которая способна подать лечебной клетке сигнал уничтожить связанную с рецептором ВИЧ-инфи-цированную клетку, для изготовления медикамен-та, предназначенного для лечения вызванных ВИЧ заболеваний.

Во втором аспекте настоящего изобретения рассматривается клетка, которая экспрессирует белковый связанный с мембраной химерный ре-цептор, включающий (а) внеклеточную часть, со-держащую фрагмент CD4, способный специфиче-ски распознавать и связывать ВИЧ-инфицирован-ную клетку, но не способный опосредствовать за-ражение ВИЧ, и (b) внутриклеточную часть, спо-собную подать лечебной клетке сигнал уничто-жить связанную с рецептором ВИЧ-инфицирован-ную клетку.

В предпочтительных вариантах осуществле-ния обоих аспектов фрагмент CD4 образован ами-нокислотами 1-394 или 1-200 последовательно-сти CD4; этот фрагмент CD4 отделен от внутрикле-точной части трансмембранным доменом CD7, изображенным на фиг. 26, или центральным до-меном и доменами CH2 и CH3 молекулы IgG1 че-ловека, показанными на фиг. 25; рецептор содер-жит трансмембранный участок CD7; рецептор со-держит трансмембранный участок CD5; рецептор содержит трансмембранный участок CD34; фраг-мент CD4 отделен от мембраны лечебной клетки одной или несколькими белковыми альфа-спира-лями; фрагмент CD4 отделен от мембраны ле-чебной клетки расстоянием по меньшей мере в 48 ангстрем или по меньшей мере в 72 ангстрема; внутриклеточная часть - это часть белка Т-клеточ-ного рецептора (например, ζ), В-клеточного рецеп-тора или рецептора Fc, способная проводить сиг-налы; лечебные клетки выбираются из числа (а) Т-лимфоцитов, (b) цитотоксических Т-лимфоцитов, (c) естественных клеток-киллеров, (d) нейтрофи-лов, (e) гранулоцитов, (f) макрофагов, (g) тучных клеток, (h) клеток HeLa и (i) стволовых клеток за-родыша (ES).

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

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

В настоящее время наиболее удобным спосо-бом доставки химер к клеткам иммунной системы является использование приемов генотерапии. Однако, достройка клеток иммунной системы хи-мерными рецепторами за счет смешивания клеток с подходящим образом растворенным и очищен-ным химерным белком приведет также к образо-ванию популяции сконструированных клеток, спо-собных реагировать на ВИЧ-инфицированные ми-шени. Подобные подходы использовались, напри-мер, для введения молекулы CD4 в эритроциты в лечебных целях. В этом случае популяция сконст-руированных клеток неспособна к самостоятель-ному воспроизведению.

Настоящее изобретение относится к функцио-нальным и упрощенным химерам фрагментов CD4 с подъединицами Т-клеточного рецептора, В-кле-точного рецептора и рецептора Fc, способным на-целивать иммунные клетки на распознавание и лизис ВИЧ-инфицированных клеток. Способ уп-равления клеточным ответом в организме млеко-питающего включает введение в организм млеко-питающего эффективного количества лечебных клеток (например, цитотоксичных Т-лимфоцитов), способных распознавать и уничтожать ВИЧ-инфи-цированные клетки.

Настоящее изобретение также касается бел-ков химерных рецепторов, направляющих цито-токсичные Т-лимфоциты на распознавание и ли-зис ВИЧ-инфицированных клеток; клеток, транс-формированных при помощи вектора, содержаще-го химерные рецепторы; и антител к химерным рецепторам.

Эти и другие варианты осуществления на-стоящего изобретения, не исчерпывающие его сущности, станут очевидными для специалистов по прочтении нижеследующего подробного описа-ния изобретения.

В нижеследующем подробном описании мы будем ссылаться на различные методики, извест-ные специалистам в области молекулярной био-логии и иммунологии. Публикации и другие мате-риалы, в которых изложены эти известные мето-дики и на которые мы будем ссылаться, включа-ются в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте, как если бы приводились целиком.

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

Определения

Под "клонированием" подразумевается ис-пользование в лабораторных условиях методов рекомбинации для осуществления вставки опре-деленного гена или другой последовательности ДНК в векторную молекулу.

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

Под "библиотекой кДНК" подразумевается коллекция рекомбинантных молекул ДНК, содер-жащих вставки кДНК, включающие ДНК-копии мРНК, экспрессируемых клеткой в период созда-ния библиотеки кДНК. Такую библиотеку кДНК можно получить при помощи способов, известных специалистам и описанных, например, у Ausubel et al. (см. выше) и Maniatis et al. (см. выше).

Обычно сначала из организма, из генома ко-торого нужно клонировать какой-либо ген, выде-ляют РНК. Для достижения целей настоящего изо-бретения лучше использовать линии лимфоцитов млекопитающих, в частности, человека. В настоя-щее время предпочтительным вектором для этого является штамм WR вируса осповакцины.

Под "вектором" подразумевается молекула ДНК, полученная, например, из плазмиды, бакте-риофага, вируса млекопитающих или насекомых, в которую могут быть вставлены, или клонирова-ны, фрагменты ДНК. Вектор содержит один или несколько сайтов рестрикции и может быть спо-собным к самостоятельной репликации в опреде-ленном организме-хозяине (носителе), тогда воз-можно воспроизводство клонированной последо-вательности. Так, под "вектором экспрессии ДНК" подразумевается любой самостоятельный эле-мент, способный управлять синтезом рекомби-нантного пептида. К таким векторам экспрессии ДНК относятся бактериальные плазмиды и фаги, а также плазмиды и вирусы млекопитающих и насе-комых.

Под "практически чистым" подразумевается соединение, например, белок, полипептид или ан-титело, которое практически не содержит компо-нентов, которые характерны для него в естествен-ных условиях. Обычно вещество считается прак-тически чистым, если по меньшей мере 60%, а предпочтительно по меньшей мере 75%, и наибо-лее предпочтительно по меньшей мере 90% ма-териала, взятого в качестве

образца, - это требуемое соединение. Чистоту можно определить любым подходящим способом, например, при помощи хроматографии на колонке, электрофореза на полиакриламидном геле или жидкостной хроматографии высокого разрешения. Если речь идет о нуклеиновых кислотах, то "практически чистыми" называются последовательности, сегменты или фрагменты, не сопряженные непосредственно (т.е. не связанные ковалентной связью) ни с одной из кодирующих последовательностей, с которыми они непосредственно сопряжены (т.е. связаны с одной на конце 5', а с другой на конце 3') в естественных условиях в геноме организма, из которого получена ДНК, соответствующая настоящему изобретению.

"Фрагментом" молекулы, такой как любая из последовательностей ДНК, соответствующих настоящему изобретению, называется любая под-группа нуклеотидов молекулы, связанных друг с другом. "Аналогом" молекулы называется искусственная молекула, в основном подобная исходной молекуле или ее фрагменту. Молекула называется "в основном подобной" другой молекуле, если последовательности аминокислот в обеих молекулах в основном одинаковы. В основном подобные аминокислотные молекулы обладают подобной биологической активностью. В настоящем документе молекула называется "химическим производным" от другой молекулы, если содержит химические группы, не содержащиеся в исходной молекуле в естественных условиях. Эти группы могут повышать растворимость молекулы, абсорбцию, продлевать время полужизни и т.д. Иногда такие группы уменьшают токсичность молекулы, устраняют или ослабляют нежелательные побочные действия и т.д. Группы, обладающие такими свойствами, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, Penn (1980).

"Функциональное производное" гена химерного рецептора, предложенного настоящим изобретением, должно содержать "фрагменты" или "аналоги" этого гена, "в основном подобные" ему по последовательности нуклеотидов и кодирующие молекулу, действие которой подобно, например, действию химеры Т-клеточного, В-клеточного рецептора или рецептора Fc. Предпочтительно, производное сохраняет 40%, более предпочтительно - 70% и наиболее предпочтительно 90% активности химеры рецептора дикого типа. Активность функционального производного от химерного рецептора состоит в специфическом связывании (при помощи внеклеточного участка CD4) с ВИЧ-инфицированной клеткой и в последующем разрушении этой клетки; кроме того, химерный рецептор не сообщает несущей его клетке восприимчивость к заражению ВИЧ. Активность химерного рецептора можно протестировать любым из описанных в настоящем документе способов.

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

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

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

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

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

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

В предпочтительном случае антитела, соответствующие настоящему изобретению, являются моноклональными. Такие моноклональные антитела можно приготовить, используя технологию гибридом (Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975); Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6:511 (1976); Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 61:292 (1976); Hamming et al., в кн.: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y., pp. 563-684 (1981)). В общем случае такая процедура предусматривает иммунизацию животного антигеном химеры рецептора CD4. У животного изымают спленоциты и сливают их с подходящей миеломной клеточной линией. В рамках настоящего изобретения может быть использована любая подходящая миеломная клеточная линия. Полученные в результате слияния гибридомные клетки избирательно выдерживают в среде ГАТ (гипоксантин-аминоптеринтимидиновой среде), а затем клонируют путем предельного разбавления, как описано у Wands et al., (*Gastroenterology* 80:225-232 (1981)). Гибридомные клетки, полученные в результате такого отбора, подвергаются анализу с целью выявления клонов, вырабатывающих антитела, способные связывать химеру.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Под "вирусом иммунодефицита" подразумевается ретровирус, который в форме дикого типа способен поражать клетки Т4 в организме хозяина-примата и характеризуется морфогенезом и морфологией, свойственными подсемейству лентивирусов. Этот термин относится, без каких-либо ограничений, ко всем разновидностям вирусов иммунодефицита человека и обезьян, в том числе к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и к вирусам иммунодефицита обезьян SIVmac, SIVagm, SIVmnd, SIVsmm, SIVman, SIVmand и SIVspz.

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

Выражение "функциональное производное, способное проводить цитолитический сигнал" означает функциональное производное (см. определение, данное выше), способное осуществить по меньшей мере 40%, более предпочтительно 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% биологической активности молекулы дикого типа. Объекты, называемые в настоящем документе "функциональными производными, способными проводить цитолитический сигнал", могут действовать путем непосредственной подачи лечебной клетке сигнала об уничтожении связанной с рецептором клетки или агента (напр., как в случае внутриклеточной части химерного рецептора) или косвенно - тогда они способствуют олигомеризации с белками лечебной клетки, проводящими цитолитический сигнал (как в случае трансмембранного домена). Эффективность таких производных можно испытать при помощи описанных в настоящем документе способов лабораторного анализа.

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

Применение в лечебных целях

Трансформированные клетки, предложенные настоящим изобретением, используются в лечебных целях при заражении вирусом иммунодефицита. К способам применения таких трансформированных клеток, практикуемым в настоящее время, относятся адоптивная терапия или терапия переносом клеток. Эти способы позволяют возвращать трансформированные клетки иммунной системы в кровь (Rosenberg, Scientific American 62 (May 1990); Rosenberg et al., The New England Journal of Medicine 323 (9):570 (1990)).

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

Сначала дадим пояснение к фигурам.

Фиг. 1А - изображение аминокислотной последовательности в окрестности участка слияния между CD4 (остатки 1-369) и различными рецепторными цепями. Подчеркнутая последовательность - это место расположения аминокислот, закодированных участком VamH1 и участвующих в слиянии. Начало трансмембранного домена отмечено вертикальной чертой. Последовательность η на аминоконце идентична последовательности ζ , но отличается от нее на карбоксильном конце (Jin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3319-3323 (1990)).

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

Фиг. 2 представляет поверхностную экспрессию CD16_{TR} после заражения только CD16_{TR} (частые точки) или CD16_{TR} совместно с вирусом, экспрессирующим CD4: γ (штрихи) или CD4: ζ (непрерывная линия). Редкие точки соответствуют клеткам, зараженным только CD4: ζ и окрашенным 3G8 (Fleit et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3275-3279 (1982)) (антитела MAb к CD16).

Фиг. 3 показывает поверхностную экспрессию CD16_{TR} после заражения вирусом, экспрессирующим CD16_{TR}, совместно с вирусами, экспрессирующими следующие химеры ζ : CD4: ζ (жирная линия), CD4: ζ C11G (непрерывная линия), CD4: ζ (штриховая линия), CD4: ζ C11G/D15G (частые точки), и после заражения только CD16_{TR} (редкие точки). Клетки были выдержаны с антителами к CD16 MAb 3G8 и козыми антителами Fab₂ к мышиному IgG, конъюгированными с фикоэритрином. Уровень экспрессии химер ζ был практически идентичным для различных мутантов, а совместное заражение клеток вирусами, экспрессирующими CD16_{TR} и химеры ζ , не повлияло в значительной степени на экспрессию химер.

Фиг. 4А-Д показывает повышение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция после перекрестного связывания мутантных химер ζ в Т-клеточной линии. Клетки Jurkat E6 (Weiss et al., J. Immunol. 133:123-128 (1984)) были заражены рекомбинантными вирусами осповакцины и проанализированы методом проточной цитометрии. Результаты, отображенные на фигуре, относятся только к популяции CD4⁺, прошедшей дискриминацию, т.е. к тем клеткам, которые экспрессируют соответствующий химерный белок. Среднее отношение фиолетовой к голубой (краситель Индо-1)

флуоресценции отражает внутриклеточную концентрацию свободного кальция в популяции в целом, а процентная доля ответивших клеток по-казывает у какой части клеток это отношение пре-вышает заранее заданный порог (установленный таким образом, что 10% необработанных клеток дают положительный результат).

Фиг. 4А и 4В представляют экспрессию в клет-ках Jurkat белков CD4:ζ (непрерывная линия) или CD16:ζ (штриховая линия), обработанных антите-лами MAb Leu3a к CD4 (конъюгат с фикоэритри-ном), с последующим перекрестным связыванием с козьими антителами к мышиному IgG. Пунктир-ной линией обозначен ответ незараженных клеток на MAb OKT3 к CD3. На фиг. 4С и 4D показана экспрессия в клетках Jurkat белков CD4:ζ D15G (непрерывная линия); CD4:ζC11G/D15G (штрихи) или CD4:ζC11G (точки) в результате обработки и анализа, описанных в пояснении к фиг. 4А и 4В.

Фиг. 5А-С показывает, что рецепторы CD4:ζ, CD4:η и CD4:γ позволяют цитолитическим Т-лим-фоцитам уничтожать мишени, экспрессирующие gp120/41 ВИЧ-1. Фиг. 5А: окрашенные кружки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4:ζ и выдержанные с клетками HeLa, экспрес-сирующими gp120/41; незакрашенные кружки - ци-толитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4:ζ и выдержанные с незараженными клетками HeLa; окрашенные квадраты - незараженные ци-толитические Т-лимфоциты, выдержанные с клет-ками HeLa, экспрессирующими gp120/41; неза-крашенные квадраты - незараженные ци-толитиче-ские Т-лимфоциты, выдержанные с незаражен-ными клетками HeLa. Фиг. 5В: окрашенные круж-ки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессиру-щие CD4:η и выдержанные с клетками HeLa, экс-прессиирующими gp120/41; незакрашенные кружки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4:γ и выдержанные с клетками HeLa, экспрес-сирующими gp120/41; незакрашенные квадраты -цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие химеру CD4:ζ с двойной мутацией C11G/D15G и выдержанные с клетками HeLa, экспрессирующи-ми gp120/41. Фиг. 5С: проточный цитометрический анализ экспрессии CD4 в цитолитических Т-лим-фоцитах, упомянутых в связи с фиг. 5В. Для кор-рекции отношений мишень-эффектор, процентные доли клеток, экспрессирующих химеру CD4, опре-деляли путем вычитания отрицательной (незара-женной) популяции, представленной в соответст-вующем масштабе, при помощи наложения гисто-грамм; для сравнения на этой фигуре незаражен-ным клеткам поставлен в соответствие произ-вольный порог, дающий приблизительно те же доли положительных ответов в других популя-циях, что и вычитание гистограмм.

Фиг. 6А-В иллюстрируют специфичность ци-толиза, управляемого CD4. Фиг. 6А: окрашенные кружки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрес-сирующие CD4:ζ и выдержанные с клетками HeLa, экспрессирующими CD16_{RI}; незакрашенные круж-ки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессиру-щие CD4 и выдержанные с клетками HeLa, экс-прессиирующими gp120; окрашенные квадраты - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD16:ζ и выдержанные с клетками HeLa, экспрес-сирующими gp120/41; незакрашенные квадраты - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD16_{RI} и выдержанные с клетками HeLa, экспрес-сирующими gp120/41. Фиг. 6В: окрашенные круж-ки - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессиру-щие CD4:ζ и выдержанные с клетками Raji (ГКГС, класс II⁺); незакрашенные кружки - незараженные цитолитические Т-лимфоциты, выдержанные с клетками RJ2.2.5 (Raji - мутанты, класс II⁻ ГКГС); окрашенные квадраты - незараженные цитолити-ческие Т-лимфоциты, выдержанные с клетками Raji (класс II⁺ ГКГС); незакрашенные квадраты - цитолитические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4:ζ и выдержанные с клетками RJ2.2.5 (класс II⁺ ГКГС). Шкала на ординате растянута.

Фиг. 7А-В - характеристика химерного рецеп-тора CD16:ζ. Фиг. 7А - схематическое изображе-ние слитого белка CD16:ζ. Внеклеточная часть фосфатидилинозит-связанной формы мономерно-го CD16 была присоединена к димерному ζ сразу за трансмембранным доменом. Последователь-ность аминокислот на месте слияния приведена внизу. Фиг. 7В представляет проточный цитомет-рический анализ мобилизации кальция после пе-рекрестного связывания химеры CD16:ζ в клеточ-ных линиях, положительных или отрицательных в отношении Т-клеточных рецепторов. Показано среднее отношение фиолетовой к голубой флуо-ресценции (мера относительной концентрации ио-нов кальция) в популяциях клеток, обработанных антителами в момент времени 0. Окрашенные квадраты - ответ клеток Jurkat на антитела MAb OKT3 к CD3; окрашенные треугольники - ответ CD16:ζ на антитела MAb 3G8 к CD16 с перекрест-ным связыванием в мутантных клетках REX33A TCR⁻; незакрашенные квадраты - ответ на перекрестное связывание CD16:ζ в мутантной ли-нии JRT3.T3.5 клеток Jurkat TCR⁻; незакрашенные треугольники - ответ на перекрестное связывание CD16:ζ в клетках Jurkat; крестики - ответ на нехи-мерные CD16 в клетках Jurkat; точки - ответ на не-химерные CD16 в клеточной линии REX33A TCR⁻.

Фиг. 8А-В иллюстрирует делеционный анализ цитолитического потенциала. Фиг. 8А иллюстри-рует расположение конечных точек делеции ζ. Здесь, как и везде, мутации ζ представлены фор-мулой исходный остаток-место-мутантный оста-ток, так что D66*, например, обозначает замеще-ние Asp-66 стоп-кодоном. На фиг. 8В представле-ны результаты оценки цитолиза для неделетиро-ванного CD16:ζ и характерных делений ζ. Гибри-домные клетки, экспрессирующие на поверхности антитела к CD16, были нагружены ⁵¹Сг и выдер-жаны с различным (возрастающим) количеством цитолитических Т-лимфоцитов человека, зара-женных рекомбинантами осповакцины, экспресси-рующими химеры CD16:ζ. Процентная доля вы-свобожденного ⁵¹Сг вычерчена как функция отно-шения эффектора (цитолитических лимфоцитов) к мишени (гибридным клеткам). Окрашенные кружки - цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими CD16:ζ (среднекратный при-рост 18,7); окрашенные квадраты - цитолиз, опо-средствованный клетками, экспрессирующими CD16: ζ Asp66* (среднекратный прирост 940,2);

незакрашенные квадраты - цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими CD16:ζGlu60* (среднекратный прирост 16,0); незакрашенные кружки - цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими CD16:ζTyr51* (среднекратный прирост 17,4); закрашенные треугольники - цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими CD16:ζPhe34* (среднекратный прирост 17,8); незакрашенные треугольники - цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими нехимерный CD16 (среднекратный прирост 591). Хотя в этом эксперименте экспрессия CD16:ζAsp66* не соответствовала экспрессии других слитых белков, цитолиз, опосредствованный клетками, экспрессирующими CD16:ζ на эквивалентных уровнях, в том же эксперименте дал результаты, практически идентичные тем, которые были получены для клеток, экспрессирующих CD16:ζAsp66*.

Фиг. 9A-D показывает, что элиминация потенциала трансмембранных взаимодействий открывает короткий сегмент ζ, способный опосредствовать цитолиз. Фиг. 9A - это схематическое изображение мономерных двухчастных и трехчастных химер. Сверху изображена конструкция CD16:ζ, усеченная на остатке 65, в которой отсутствуют трансмембранные остатки Cys и Asp. Ниже изображены конструкции CD16:CD5:ζ и CD16:CD7:ζ и соответствующие контрольные конструкции. Пептидные последовательности внутриклеточных доменов приведены внизу. Фиг. 9B иллюстрирует цитолитическую активность делеционных мутаций мономерных химер. Цитолитическая активность клеток, экспрессирующих CD16:ζ (закрашенные кружки; среднекратный прирост 495), сравнивалась с активностью клеток, экспрессирующих CD16:ζAsp66* (закрашенные квадраты, среднекратный прирост 527), или мутантов CD16:ζCys11Gly/Asp15Gly/Asp66* (незакрашенные квадраты, среднекратный прирост 338) и CD16:ζCys11Gly/Asp15Gly/Gly60* (закрашенные треугольники, среднекратный прирост 259). Фиг. 9C иллюстрирует цитолитическую активность, опосредствованную трехчастными слитыми белками. Закрашенные треугольники CD16:ζAsp66*; незакрашенные квадраты - CD16:5:ζ(48-65); закрашенные квадраты - CD16:7:ζ(48-65); незакрашенные треугольники - CD16:7:ζ(48-59); незакрашенные кружки - CD16:5; закрашенные кружки - CD16:7. Фиг. 9D иллюстрирует мобилизацию кальция мутантными и трехчастными химерами в мутантной клеточной линии Jurkat JRT3.T3.5, отрицательной в отношении T-клеточных рецепторов. Незакрашенные кружки - ответ клеток, экспрессирующих димерные CD16:ζAsp66*; закрашенные квадраты -

ответ клеток, экспрессирующих CD16:ζCys11Gly/Asp15Gly/Asp66*; незакрашенные квадраты - ответ клеток, экспрессирующих CD16:ζCys11Gly/Asp15Gly/Glu60*; закрашенные треугольники - ответ клеток, экспрессирующих CD16:7:ζ(48-65); незакрашенные треугольники - CD16:ζ(48-59).

Фиг. 10A-F иллюстрирует вклад отдельных аминокислот в активность участка из 18 остатков, проводящего цитолитический сигнал. Фиг. 10A и 10B иллюстрируют цитолитическую активность, а фиг. 10C - мобилизацию ионов кальция, опосредствованную химерами с точечными мутациями в окрестности карбоксиконечного тирозина (Y62). Фиг. 10A и 10B представляют данные о клетках, экспрессирующих малые и большие количества, соответственно, слитых белков CD16:ζ. На обоих фигурах использованы одинаковые обозначения и буквенные коды, помещенные справа. Закрашенные кружки - клетки, экспрессирующие CD16:ζ (среднекратный прирост: A - 21; B - 376); закрашенные квадраты - клетки, экспрессирующие CD16:7:ζ(48-65) (среднекратный прирост: A - 31, B - 82); незакрашенные квадраты - CD16:7:ζ(48-65) Glu60Gln (среднекратный прирост: A - 33; B - 92); крестики - CD16:7:ζ(48-65)Asp63Asn (среднекратный прирост: A - 30; B - 74); закрашенные треугольники - CD16:7:ζ(48-65)Tyr62Phe (среднекратный прирост: A - 24; B - 88); незакрашенные кружки - CD16:7:ζ(48-65)Glu61Gln (среднекратный прирост: A - 20; B - 62); незакрашенные треугольники - CD16:7:ζ(48-65)Tyr62Ser (среднекратный прирост: B - 64). Фиг. 10D и 10E иллюстрируют цитолитическую активность, а фиг. 10F - мобилизацию ионов кальция, опосредствованную химерами с точечными мутациями в окрестности аминоконечного тирозина (Y51). На графиках цитолитической активности и мобилизации кальция использованы одинаковые обозначения, расшифрованные справа. Закрашенные кружки - клетки, экспрессирующие CD16:ζ (среднекратный прирост: D - 21,2; E - 672); закрашенные квадраты - клетки, экспрессирующие CD16:7:ζ(48-65) (среднекратный прирост: D - 31,3; E - 179); закрашенные треугольники - CD16:7:ζ(48-65)Asn48Ser (среднекратный прирост: D - 22,4; E - 209); незакрашенные квадраты - CD16:7:ζ(48-65)Leu50Ser (среднекратный прирост: D - 25,0; E - 142); незакрашенные треугольники - CD16:7:ζ(48-65)Tyr51Phe (среднекратный прирост: D - 32,3; E - 294).

На фиг. 11A-B дан сравнительный анализ структуры внутренних повторов ζ и сравнение их способности обеспечивать цитолиз. Фиг. 11A - это схематическое изображение химер, образованных путем деления внутриклеточного домена ζ на три и присоединения их к трансмембранному домену химеры CD16:7. Последовательности внутриклеточных доменов приведены ниже, общие остатки заключены в рамки, а родственные остатки отмечены звездочками. На фиг. 11B проиллюстрирована цитолитическая способность этих трех субдоменов ζ. Закрашенные кружки - клетки, экспрессирующие CD16:ζ (среднекратный прирост 476); закрашенные квадраты - клетки, экспрессирующие CD16:7:ζ(33-65) (среднекратный прирост 68); незакрашенные квадраты - CD16:7:ζ(71-104) (среднекратный прирост 114); закрашенные треугольники - CD16:7:ζ(104-138) (среднекратный прирост 104).

Фиг. 12 - схематическое изображение химер CD16:FcRγII.

Фиг. 13A-B иллюстрируют мобилизацию кальция после перекрестного связывания химер CD4:FcRγII и CD16:FcRγII. Фиг. 13A представляет соотношение соотношения фиолетовой и голубой флуоресценции клеток, нагруженных чувствительным к кальцию красителем Индо-1, в виде функции от времени, прошедшего с момента перекрестного связывания внеклеточного домена CD16 с антителами. На фиг. 13B приведены

результаты подобного анализа роста отношения фиолетовой флуоресценции к голубой для клеток, несущих химеры CD4:FcRγII, после перекрестного связывания с антителами.

Фиг. 14A-B иллюстрируют анализ цитолитических свойств химер CD4:FcRγII и CD16:FcRγII. На фиг. 14A показана процентная доля 51α , высвобожденного гибридными против-CD16 клетками (мишенями) при их взаимодействии с возрастающим количеством цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих химеры CD16:FcRγII (эф-факторов). На фиг. 14B проиллюстрирован аналогичный анализ цитотоксичности, опосредствованной химерами CD4:FcRγII, по отношению к клеткам-мишеням, экспрессирующим гликопротеины оболочки ВИЧ.

На фиг. 15A-E показана идентификация остатков в хвосте A FcRγII, которые имеют большое значение для цитолиза. Фиг. 15A - это схематическое изображение делеционных конструкций. Фиг. 15B и 15C иллюстрируют мобилизацию кальция и цитолиз, опосредствованные вариантами химеры CD16:FcRγII A с делениями на карбоксильном конце. Фиг. 15D и 15E иллюстрируют мобилизацию кальция и цитолиз, опосредствованные трехчастными химерами, у которых постепенно укорачивался аминоконец внутриклеточного хвоста CD16:FcRγII A.

Фиг. 16 (последовательность № 24) представляет последовательность аминокислот белка рецептора CDS-дельта; в рамку заключен предпочтительный участок для передачи цитолитического сигнала.

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

На фиг. 18 (последовательность № 26) представлена аминокислотная последовательность белка рецептора mb1; в рамку заключен предпочтительный для передачи цитолитического сигнала участок.

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

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

На фиг. 21 проиллюстрирован лизис клеток-мишеней, экспрессирующих гликопротеин оболочки ВИЧ-1, опосредствованный Т-клеточным клоном WH3, экспрессирующим различные химеры CD4 в качестве эффекторных молекул. Для испытания цитотоксичности линию WH3 Т-клеток человека с рестрикциями CD8⁺ CD4⁻ HLA B44 выдержали в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков (IMDM), дополненной 10% человеческой сывороткой, как описано выше. Клетки подвергли стимуляции при помощи гамма-облученных (3000 рад) одноядерных клеток-носителей B44 и фитогемагглютинаина в концентрации 1 мкг/мл. Через день фитогемагглютинин развели до 0,5 мкг/мл путем добавления свежей среды; через 3 дня среду полностью заменили. Перед использованием в анализе цитотоксичности клетки выращивали не менее 10 дней. Клетки были заражены соответствующими рекомбинантными вирусами осповакцины, как описано в настоящем документе для vPE16. Инфекцию оставили развиваться в полной среде в течение 3-4 часов, после чего клетки отобрали путем центрифугирования и снова взвесили в концентрации 1×10^7 /мл. В каждую ячейку U-образного титрационного микропланшета, содержащую 100 мкл полной среды, добавили по 100 мкл и разбавили в 2 раза последовательными шагами. Две ячейки для каждого образца не содержали лимфоцитов, чтобы можно было измерить спонтанное высвобождение хрома и суммарное поглощение хрома. Клетки, служащие мишенями, сублинию S3 HeLa (HeLa-S3, Американская коллекция типовых культур) заразили vPE16 в 10-сантиметровых чашках, как описано выше. 10^6 зараженных клеток отделили при помощи фосфатно-солевого буфера и 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты, центрифугировали и взвесили в 100 мкл натрия хромата (^{51}Cr , 1 мКи/мл в фосфатно-солевом буфере) на 1 час при 37°C, затем три раза промыли фосфатно-солевым буфером. В каждую ячейку добавили 100 мкл меченых клеток-мишеней. Титрационный микропланшет вращали в течение 1 минуты при 750×g и в течение 4 часов выдерживали при 37°C. После этого клетки в каждой ячейке снова взвесили путем осторожного пипетирования, один образец отобрали, чтобы определить общее количество клеток, и вращали планшет при 750×g в течение минуты. Порции (100 мкл) супернатанта отобрали и анализировали в счетчике гамма-сцинтилляций. К отношению эффектор:мишень была сделана поправка на процент зараженных клеток, определенный при помощи проточной цитометрии.

Фиг. 22 иллюстрирует репликацию ВИЧ-1 в трансфицированных клеточных линиях. Клеточные линии, стабильно экспрессирующие CD4 дикого типа и различные рекомбинантные химеры, были получены из сублинии линии 293 почечных клеток зародыша человека. Штамм культуры IIIB ВИЧ-1 был приготовлен с титром инфицирующих частиц $\approx 10^6$ /мл, измеренным при помощи титрования в конечной точке с использованием Т-клеточной линии C8166 в качестве индикатора. Заражение проводилось с

множественностью заражения около 1 в течение 8-12 часов при 37°C. На следующий день клетки трижды промыли фосфатно-солевым буфером, обработали трипсином, пересаживали в другие чашки, а супернатант культуры проверили на титр р24 (результат датировали днем 0). После этого с промежутками в 3-4 дня отбирали супернатанты клеточной культуры для анализа на р24. Клеткам давали свежую среду, содержащую гидромицин В в концентрации 100 мкг/мл. Анализ супернатантов культуры проводили с использованием серийного набора для регистрации антигена р24 ВИЧ-1, основанного на твердофазном иммуоферментном анализе (Coulter), в соответствии с инструкцией изготовителя. Представлены результаты двух независимых экспериментов одинаковой длительности.

На фиг. 23 приведены последовательности нуклеиновых и аминокислот для доменов D1-D4 CD4 (CD4 Vam).

На фиг. 24 приведены последовательности нуклеиновых и аминокислот для доменов D1-D2 CD4 (CD4 Nhe).

На фиг. 25 приведены последовательности нуклеиновых и аминокислот центрального домена и доменов CH2 и CH3 IgG1 (Igh23 Vam) человека.

На фиг. 26 приведены последовательности нуклеиновых и аминокислот для трансмембранного домена CD7 (TM7 Vam Mlu).

На фиг. 27 приведены последовательности нуклеиновых и аминокислот для внутриклеточного домена дзета (Zeta Mlu Not).

На фиг. 28 приведены последовательности ДНК и первичная последовательность аминокислот для синтетической альфа-спирали.

Пример I

Конструирование химер IgG1 и рецептора человека

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

CGC GGG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC

(последовательность № 7) и

CGC GGG GAT CCG TCG TCC AGA GCC CGT CCA GCTCCC CGT CCT GCG CCT CA

(последовательность № 8), которые соответствовали концам 5' и 3' нужных фрагментов ДНК, соответственно. Олигонуклеотид 5' комплементарен одному из сайтов домена CH1 IgG1 человека, а олигонуклеотид 3' комплементарен сайту, следующему в направлении 5' сразу за последовательностями, кодирующими домен, пересекающий мембрану. Продукт цепной полимеразной реакции переварили при помощи BstXI и BamHI и вшили между сайтами BstXI и BamHI полусинтетического гена антитела IgG1, имеющего переменные и постоянные участки. После осуществления вставки фрагмента между BstXI и BamHI амплифицированные части конструкции были заменены до сайта SmaI в домене CH3 путем обмена рестрикционными фрагментами, так что из продуктов цепной полимеразной реакции остался только участок между сайтом SmaI и олигонуклеотидом 3'.

Чтобы получить химерный рецептор IgG1:ζ человека, ген тяжелой цепи, заканчивающийся на сайте BamHI, присоединили к сайту BamHI химеры ζ, описанной ниже, так что последовательности антитела оказались во внеклеточной части. Проточная цитометрия клеток COS, трансфицированных плазмидами, кодирующими химеру, показала высокий уровень экспрессии детерминант антител для клеток, дополнительно зараженных плазмидами, кодирующими кДНК легкой цепи, и умеренную экспрессию детерминант антител для клеток, в которых не было плазмид, экспрессирующих легкую цепь.

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

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

CGC GGG CGG CCG CGA CGC CGG CCA AGA CAG CAC

(последовательность № 9) и

CGC GTT GAC GAG CAG CCA GTT GGG CAG CAG CAG

(последовательность № 10) - на концах 5' и 3', соответственно. Цепные полимеразные реакции с этими олигонуклеотидами проводились в присутствии 10% диметилсульфоксида. Фрагмент, полученный в результате цепной полимеразной реакции, переварили при помощи NotI и HincII и вставили между сайтами NotI и HpaI вслед за последовательностями, кодирующими IgG1 человека. Затем, вслед за лидерной последовательностью grp78, используя сайт HincII и еще один сайт вектора, вставили последовательности, кодирующие кДНК легкой цепи каппа IgG человека. Полученная в результате этих процедур экспрессионная плаزمид состояла из полусинтетического гена тяжелой цепи, за которыми следовали лидерные последовательности grp78, затем последовательности кДНК легкой цепи каппа, затем сигналы полиаденилирования, полученные из фрагмента ДНК SV40. Трансфекция клеток COS

такими плазмидами дала заметное усиление экспрессии детерминант тяжелой цепи по сравнению с трансфекцией плазмидами, кодирующими детерминанты только тяжелой цепи.

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

Пример II

Конструирование химер рецептора CD4

КДНК ζ человека (Weissman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9709-9713 (1988b)) и γ (Kuster et al., J. Biol. Chem. 265:6448-6452 (1990)) были выделены при помощи цепной полимеразной реакции из библиотек, приготовленных из опухолевой клеточной линии HPB-ALL (Aruffo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8573-8577 (1987b)) и из естественных клеток-киллеров человека, а кДНК η (Jin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3319-3323 (1990)) была выделена из библиотеки мышинных тимоматов. КДНК ζ , η и γ присоединяли к внеклеточному домену перестроенной формы CD4, в которой сайт BamHI располагался непосредственно перед доменом, пересекающим мембрану (Aruffo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8573-8577 (1987b)); Zettlmeissl et al., DNA Cell Biol. 9:347-353 (1990)); внеклеточный домен был присоединен к сайту BamHI, в естественных условиях расположенному в кДНК ζ и η в подобной позиции - на несколько остатков впереди домена, пересекающего мембрану (последовательности № 1, 3, 4, и 6). Для получения белков, слитых с γ , сайт BamHI вставляли в последовательность приблизительно в том же месте (фиг. 1, последовательности № 2 и № 5). Слитые гены вводили в экспрессионные плазмиды вируса осповакцины с геном *gpt* *E. coli* в качестве селектируемого маркера и вставляли в геном штамма WR осповакцины путем гомологичной рекомбинации и селекции по росту в микофенольной кислоте (Falkner et al., J. Virol. 62:1849-1854 (1988); Bayle et al., Gene 65:123-128 (1988)). Проточный цитометрический анализ показал, что рекомбинанты осповакцины вызывают обильную выработку слитых белков CD4: ζ и CD4: γ на поверхности клеток, а экспрессия CD4: η происходит значительно слабее (фиг. 1B). Последнее наблюдение подтверждено недавним сообщением о том, что трансфекция линии мышинных гибридных клеток плазмидами экспрессии кДНК η дает гораздо менее сильную экспрессию, чем трансфекция сравнимыми плазмидами экспрессии ζ (Clayton et al., J. Exp. Med. 172:1243-1253 (1990)). Иммунопреципитация клеток, зараженных рекомбинантными осповакцинами, показала, что слитые белки образуют ковалентные димеры, в отличие от антигена CD4 в естественном виде. Были определены молекулярные массы мономерных слитых белков CD4: ζ и CD4: γ и нативного CD4:63, 55 и 53 килодальтонов, соответственно. Большие массы слитых белков приблизительно соответствуют большим длинам внутриклеточной части, которая длиннее, чем у нативного CD4, на 75 (CD4: ζ) или на 5 (CD4: γ) остатков.

Пример III

Химеры CD4 могут соединяться с цепями других рецепторов

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

Этим сообщениям не противоречит то обстоятельство, что экспрессия химер также способствует экспрессии CD16_{TM} при одновременной трансфекции клеток-мишеней или одновременном заражении рекомбинантными вирусами осповакцины (фиг. 2). Дзета более выражение, чем гамма, способствовала поверхностной экспрессии CD16_{TM} в исследуемой клеточной линии (фиг. 2), а нативный CD4 не усиливал поверхностную экспрессию CD16_{TM}.

Пример IV

Аспарагиновые мутанты ζ не соединяются с Fc-рецептором

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

Пример V

Мутантные рецепторы сохраняют способность вызывать кальциевый ответ

Чтобы определить, приводит ли перекрестное связывание слитых белков к накоплению свободного кальция в клетке, которое происходит в случае Т-клеточного антигенного рецептора, линию клеток Т-клеточного лейкоза человека, Jurkat E6 (ATCC Accession Number TIB 152, American Type Culture Collection (Американская коллекция типовых культур), Rockville, MD), заразили рекомбинантами осповакцины и измеряли относительную концентрацию кальция в цитоплазме после перекрестного связывания внеклеточного домена с антителами. Клетки нагрузили чувствительным к кальцию красителем Индо-1 и провели проточный цитометрический анализ (Grynkiewicz et al., J. Biol. Chem. 260:3340-3450 (1985); Rabinovitch et al., J. Immunol. 137:952-961 (1986)). На фиг. 4A-D представлены результаты измерений переноса кальция в клетках, зараженных CD4: ζ и мутантами ζ Asp⁻ и Cys⁻. Перекрестное связывание

химер с хо-рошей воспроизводимостью давало повышение внутриклеточной концентрации кальция. CD4:η и CD4:γ также вызывали накопление кальция внутри зараженных клеток. Клетки Jurkat слабо экспрессируют CD4 на поверхности, но перекрестное связывание нативного CD4 в присутствии CD16:ζ или в его отсутствие не влияет на уровень внутри-клеточного кальция (фиг. 4A-B).

Пример VI

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

Чтобы определить, способны ли химерные ре-цепторы запускать эффекторные цитолитические программы, создали модель системы мишень:эф-фектор, основанной на распознавании рецепто-ром CD4 комплекса gp120/41 оболочки ВИЧ. Клет-ки HeLa заразили рекомбинантными вирусами ос-повакцины, экспрессирующими gp120/41 (Chakra-barti et al., Nature 320:535-537 (1986); Earl et al., J Virol. 64:2448-2451 (1990)), и поместили ⁵¹Cr. Мече-ные клетки выдержали с клетками линии аллоген-ных (CD8⁺, CD4⁺) цитотоксических Т-лимфоцитов человека, зараженными рекомбинантами осповак-цины, экспрессирующими химеры CD4:ζ, CD4:η или CD4:γ или химеру с двойной мутацией CD4:ζCys11Gly:Asp15Gly. На фиг. 5A-C показано, что клетки HeLa, экспрессирующие gp120/41, подверглись специфическому лизису со стороны ци-тотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих химеры CD4. Незараженные клетки HeLa не под-верглись воздействию цитотоксических Т-лимфо-цитов, вооруженных химерами CD4, а клетки HeLa, экспрессирующие gp120/41, не были распо-знаны незараженными цитотоксическими Т-лим-фоцитами. Чтобы сравнить эффектив-ность дейст-вия различных химер, к отношениям эффе-ктор: мишень были сделаны поправки на долю цитоток-сических Т-лимфоцитов, экспрессирующих химе-ры CD4, и на долю клеток HeLa, экспрессирующих gp120/41, определенные при помощи проточной цитометрии. На фиг. 5C проиллюстрирован цито-метрический анализ экспрессии CD4 цитотоксиче-скими Т-лимфоцитами, использованными в экспе-рименте по цитолизу, проиллюстрированном на фиг 5A и 5B. Хотя средняя плотность поверхно-стной CD4:ζ значительно превышала среднюю пло-тность поверхностной CD4:η, цитолитическая ак-тивность клеток, экспрессирующих эти формы, была одинаковой. С учетом поправки на долю мишеней, экспрессирующих gp120, эффе-ктив-ность цитолиза, опосредствованного белками CD4:ζ и CD4:η, сравнима с лучшими результа-ми, отмеченными для пар мишень:эффе-ктор со специфическим участием Т-клеточного рецептора (среднее отношение эффе-ктор:мишень для 50% высвобождения Т-клетками, экспрессирующими CD4:ζ, составило 1/9±0,99; n=10). Слитый белок CD4:γ был менее активным, как и слитый белок CD4:ζ, в котором отсутствовали трансмембранные остатки Cys и Asp. Однако, в обоих этих случаях наблюдался достаточно эффективный цитолиз (фиг. 5B-5C).

Для исключения возможности того, что зара-жение осповакциной способствует ложному рас-познаванию мишеней цитотоксическими Т-лимфо-цитами, подобные цитолитические эксперименты были проведены в таких условиях: клетки-мишени были заражены рекомбинантами осповакцины, экспрессирующими фосфатидилинозит-связанную форму CD16 (CD16_{PI}), и помечены ⁵¹Cr, а цитоток-сические Т-лимфоциты были заражены контроль-ными рекомбинантами, экспрессирующими либо CD16_{PI}, либо CD16:ζ.

На фиг. 6A показано, что Т-клетки, экспрес-си-рующие химеры без CD4, не распознают нативные клетки HeLa или клетки HeLa, экспрессирующие gp120/41, и что Т-клетки, экспрессирующие химе-ры CD4, не распознают клетки HeLa, экспрес-си-рующие другие поверхностные белки, закодиро-ванные в вирусах осповакцины. Кроме того, цито-токсические Т-лимфоциты, экспрессирующие не-химерные CD4, не осуществляют в значительной степени лизис клеток HeLa, экспрессирующих gp120/41 (фиг. 6A).

Пример VII

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

Считается, что CD4 взаимодействует с непо-лиморфной последовательностью, экспрессируе-мой антигеном II класса главного комплекса гисто-совместимости (ГКГС) (Gay et al.. Nature 328:626-629 (1987); Sleckman et al.. Nature 328:351-353 (1987)). Хотя специфическое взаимодействие ме-жду CD4 и антигеном класса II в очищенном виде никогда не наблюдалось, при определенных усло-виях можно продемонстрировать склеивание кле-ток, экспрессирующих CD4, с клетками, экспрес-сирующими молекулы класса II (Doyle et al., Nature 330:256-259 (1987); Clayton et al., J. Exp. Med. 172:1243-1253 (1990); Lamarre et al., Science 245:743-746 (1989)). Затем проверили, возможно ли уничтожение клеток-носителей молекул клас-са II. На фиг. 6B видно, что CD4:ζ не осуществ-ляет специфического лизиса клеток В-клеточной ли-нии Raji, в избытии экспрессирующих антиген класса II. Хотя наблюдается умеренный лизис (≈5%), RJ2.2.5 - мутант Raji, отрицательный по классу II (Accolla, J. Exp. Med. 157:1053-1058 (1983)), - проявляет подобную восприимчивость, как и клетки Raji, выдержанные с незараженными Т-клетками.

Пример VIII

Требования к структуре цепи дзета Т-клеточ-ного антигена/Fc-рецептора, вызывающей цитолиз

Хотя химеры CD4 и ζ сообщают цитотоксиче-ским Т-лимфоцитам способность убивать клетки-мишени, экспрессирующие gp120 ВИЧ, нужно бы-ло найти альтернативу CD4, чтобы недвусмы-сленно сравнить свойства химер дзета, вводимых в Т-клеточные линии человека. Такие линии могут экспрессировать CD4, затрудняя точное опреде-ление соотношения между характером или степе-нью мобилизации кальция и цитотоксическим по-тенциалом различных химер. Поэтому были соз-даны химеры из ζ и CD16, в которых внеклеточ-ный домен CD16 присоединяется к трансмем-бранной и внутриклеточной последовательностям ζ (фиг. 7A). Слитые гены вводились в экспрес-сионную плазмиду вируса осповакцины, снабженную геном *gpt E.coli* в качестве селектируемого марке-ра, и вставлялись в геном штамма WR осповакци-ны путем

гомологичной рекомбинации и селекции по росту в микофенольной кислоте (Falkner and Moss, J. Virol 62:1849 (1988); Boyle and Coupar, Gene 65:123 (1988)).

T-клеточные линии были заражены рекомбинантами осповакцины и после перекрестного связывания внеклеточных доменов с антителами была измерена относительная концентрация свободных ионов кальция в цитоплазме. Клетки, меченные красителем Индо-1, подвергли и спектрофлуориметрии (всю популяцию), и проточной цитометрии (отдельные клетки) (Gryniewicz et al., J. Biol. Chem. 260:3440 (1985); Rabinovitch et al., J. Immunol. 137:952 (1986)). На фиг. 7B проиллюстрирован анализ данных, полученных для линии Jurkat клеток T-клеточного лейкоза человека, зараженных рекомбинантами осповакцины, экспрессирующими слитый белок CD16:ζ. Перекрестное связывание химер с хорошей воспроизводимостью повышало внутриклеточную концентрацию кальция, тогда как аналогичная обработка клеток, экспрессирующих нехимерные CD16, не давала эффекта или давала незначительный эффект. Когда химера экспрессировалась в мутантных клеточных линиях, в которых отсутствовал антигенный рецептор, например, в REX33A (Breitmeyer et al., J. Immunol. 138:726 (1987); Sancho et al., J. Biol. Chem. 264:20760 (1989)) или в Jurkat JRT3.T3.5 (Weiss et al., J. Immunol. 135:123 (1984)), наблюдался сильный ответ на перекрестное связывание антителами CD16. Подобные результаты были получены для мутантной линии REX20A (Breitmeyer et al., там же (1987); Blumberg et al., J. Biol. Chem. 265:14036 (1990)) и для мутантной линии клеток Jurkat, отрицательной по CD3/Ti, полученной в нашей лаборатории. Заражение рекомбинантами, экспрессирующими CD16:ζ, не восстанавливает ответ на антитела против CD3, следовательно, слитый белок действует не за счет спасения внутриклеточных цепей комплекса CD3.

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

Чтобы определить минимальную последовательность ζ, необходимую для цитолиза, приготовили ряд делеционных мутантов, в которых от карбоксильного конца отнимали все большие участки внутриклеточного домена ζ (фиг. 8A). Можно удалить большую часть внутриклеточного домена ζ без значительных последствий для цитотоксического потенциала; химера CD16:ζ полной длины была настолько же активной, насколько химера, усеченная до остатка 65 – CD16:ζAsp66* (фиг. 8B). Существенное ослабление цитотоксичности наблюдалось при укорочении ζ до остатка 59 (химера CD16:ζGlu60*), дальнейшее усечение до остатка 50 ослабило активность еще немного. Однако полной потери активности не произошло, даже когда внутриклеточный домен усекли вплоть до трансмембранного "якоря", состоящего из трех остатков (фиг. 8B).

Поскольку ζ - это димер с дисульфидной связью, одна из причин сохранения цитолитической активности состоит в том, что эндогенные ζ образуют гетеродимеры с урезанными последовательностями ζ, тем самым восстанавливая их активность. Для проверки этого предположения остатки 11 и 15 в последовательности ζ (Asp и Cys, соответственно) заменили на Gly (Cys11Gly/Asp15Gly) и провели иммунопреципитацию следующим образом.

Приблизительно 2×10^6 клеток CV1 инфицировали в течение одного часа в бессывороточной среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DME), рекомбинантами осповакцины с множественностью заражения не менее десяти. Через шесть-восемь часов после заражения клетки отобрали из чашек фосфатно-солевым буфером/1mM этилендиамин-тетрауксусной кислотой и поместили их поверхность ^{125}J , 0,2 мКи на 2×10^6 клеток по способу Кларка и Эйфельда (Clark, Einfeld) с использованием лактопероксидазы и H_2O_2 (Leukocyte Typing II, pp 155-167, Springer-Verlag, NY, 1986). Меченые клетки собрали посредством центрифугирования и подвергли лизису в 1% NP-40, 0,1% додецил-сульфате натрия, 0,15 M NaCl, 0,05 M трис, pH 8,0, 5 mM MgCl_2 , 5 mM KCl, 0,2 M иодацетамиде и 1 mM фенилметилсульфонилфториде. Ядра отобрали посредством центрифугирования и провели реакции иммунопреципитации белка CD16 при помощи антител 3G8 (Fleit et al., см. выше, 1982; Medarex) и агарозы с мышинным анти-IgG (Cappel, Durham, NC). Образцы подвергли электрофорезу в 8% геле из полиакриламида/додецилсульфата натрия в невозстанавливающих условиях или в 10% геле в восстанавливающих условиях. Эти реакции иммунопреципитации подтвердили, что химера CD16:ζCys11Gly/Asp15Gly не образует димерных структур с дисульфидной связью.

Проверялась также цитолитическая активность мутантных рецепторов. Мутантная химера, усеченная до остатка 65 (CD16:ζCys11Gly/Asp15Gly/Asp66*) была, в зависимости от условий эксперимента, в 2-8 раз менее активной цитолитически, чем сравнимая химера без мутаций (CD16:ζAsp66*), которая обычно также активна, как CD16:ζ, или в 1-2 раза менее активна (фиг. 9B). Снижение активности мутантных химер сравнимо со снижением активности химер CD4 аналогичной структуры (см. выше) и, скорее всего, объясняется тем, что мономеры ζ действуют менее эффективно,

чем димеры. Химера с мутациями Asp⁻ и Cys⁻, усеченная до остатка 59, во-обще не проявляла цитолитической активности (фиг. 9B), что служит подтверждением гипотезы о том, что именно связь с другими цепями, опосред-ствованная трансмембранными остатками Cys и/или Asp, была причиной неустойчивой цитолитической активности при делениях, расположен-ных ближе к аминоконцу, чем остаток 65.

Проточный цитометрический анализ показал, что делеционные мутанты, в которых недостает трансмембранных остатков Asp и Cys, все же спо-собствуют увеличению внутриклеточной концен-трации свободных ионов кальция в ответ на пере-крестное связывание с антителами в мутантной (без Т-клеточных рецепторов) клеточной линии Jurkat (фиг. 9D). Подобные результаты были получены для химер, экспрессированных родительской линией Jurkat. В случае CD16:ζCys11Gly/Asp15Gly/Glu60* эти результаты говорят о том, что способность опосредствовать кальциевую чувствительность можно при помощи мутации отделить от способности обеспечивать цитолиз.

Чтобы полностью исключить возможность участия трансмембранных остатков ζ, трансмем-бранные остатки и 17 первых цитоплазматических остатков ζ заменили последовательностями, ко-дирующими трансмембранные остатки и первые 14 или 17 цитоплазматических остатков антигенов CD5 или CD7, соответственно (фиг. 9A). Получен-ные трехчастные слитые белки CD16:5:ζ(48-65) и CD16:7:ζ(48-65) не образовывали димеров с ди-сульфидными связями, в отличие от более про-стых химер CD16:ζ, так как не имели остатка цис-теина в трансмембранном домене ζ. Обе трехча-стные химеры были способны мобилизовать каль-ций в клетках Jurkat и в клетках Jurkat без Т-кле-точных рецепторов (фиг. 9D) и вызывать цитолитический ответ в цитотоксических Т-лимфоцитах (фиг. 9C и не представленные данные). Однако, отсечение части ζ до остатка 59 в химере CD16:7:ζ(48-59) лишает трехчастный слитый бе-лок способности управлять чувствительностью кальция в клетках Jurkat (с Т-клеточными рецеп-торами или без них) или цитолитической активно-стью в зрелых цитотоксических Т-лимфоцитах (фиг. 9C и 9D и не представленные данные).

Для изучения роли отдельных остатков в ак-тивности цепи из 18 остатков мы приготовили не-сколько мутантных вариантов путем сайт-направленного мутагенеза и оценили их способ-ность опосредствовать направляемое рецептором уничтожение в условиях слабой (фиг. 10A и 10D) или сильной экспрессии (фиг. 10B и 10E) химерно-го рецептора. На фиг. 10A-F видно, что хотя ряд относительно консервативных замен (например, замещений кислотных остатков родственными им амидами или тирозина фенилаланином) на участ-ке между остатками 59-63 привел к умеренному ослаблению цитолитической активности, вариан-ты в общем сохранили способность мобилизовать кальций. Однако, в совокупности эти остатки пред-ставляют собой важный участок, так как их деле-ция приводит к потере цитолитической активнос-ти. Замена Tyr 62 на Phe или Ser приводила и к потере цитолитической активности, и к утрате кальциевой чувствительности. На аминоконце сег-мента из 18 остатков замена Tyr 51 на Phe делала невозможной как мобилизацию кальция, так и ци-толитическую активность, а замена Leu в позиции 50 на Ser делала невозможной мобилизацию кальция и лишь частично ослабляла цитолитиче-скую способность. Не ограничивая себя рамками определенной гипотезы, мы предполагаем, что не-способность мутанта Leu50Ser мобилизовать кальций в коротких проточных цитометрических анализах не полностью отражает его способность к опосредствованию значительного повышения внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция в течение более длительного времени, которое затрачивается на цитолитический анализ. Однако, в некоторых линиях цитолитических Т-клеток наблюдалась нечувствительная к кальцию цитолитическая активность, и мы не исключаем возможность, что подобное явление обусловило полученный результат. Замена Asn48 на Ser час-тично ослабила цитотоксичность в нескольких экспериментах и не дала значительного эффекта в остальных.

Для изучения потенциальной роли избыточ-ных элементов последовательности ζ внутрикле-точный домен ζ был разбит на три сегмента: ос-татки 33-65, 71-104 и 104-138. Каждый из этих сегментов присоединяли к химере CD16:CD7 при помощи сайта MluI, вводимого у дистального кон-ца последовательности мембранного якоря внут-риклеточного домена CD7 (см. ниже; фиг. 11A). Сравнение цитолитической активности трех эле-ментов показало, что их активность практически одинакова (фиг. 11B). Сравнение последователь-ностей (фиг. 11A) показывает, что во втором от-резке между тирозинами находится одиннадцать остатков, а в первом и третьем - по десять.

Хотя точное объяснение процесса активации Т-клеток не найдено, ясно, что агрегация антиген-ных рецепторов, или химерных рецепторов, вклю-чающих в себя внутриклеточные последователь-ности ζ, инициирует мобилизацию кальция, вы-свобождение цитокинов и гранул и появление на поверхности клеток маркеров активации. При опо-средствовании активации клетки активный сайт ζ, короткая линейная пептидная последователь-ность, скорее всего, слишком маленькая для того, чтобы обладать собственной ферментной актив-ностью, вероятно, взаимодействует с одним или, самое большое, с несколькими белками. Ясно так-же, что мобилизации свободного кальция как та-ковой недостаточно для активации клетки, по-скольку способность к опосредствованию цитоли-за можно при помощи мутации отделить от спо-собности к опосредствованию накопления кальция.

Как показано в настоящем документе, добав-ление 18 остатков из внутриклеточного домена ζ к трансмембранному и внутриклеточному домену двух других белков приводит к созданию химер, способных направлять цитолитическую активность против клеток-мишеней, которые связываются с внеклеточной частью слитых белков. Хотя химе-ры, имеющие в своем составе отрезок из 18 ос-татков, приблизительно в

восемь раз менее активны, чем химеры, содержащие ζ целиком, уменьшение активности можно приписать потере трансмембранных взаимодействий, за счет которых обычно ζ дикого типа образует димеры с дисульфидной связью. То есть, делеционные конструкции с ζ , имеющие тот же карбоксильный конец, что и отрезок, и не имеющие трансмембранных остатков Cys и Asp, обычно проявляют несколько меньшую активность, чем химеры, содержащие только отрезок из 18 остатков.

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

Последовательности, подобные активному отрезку ζ , встречаются в цитоплазматических доменах некоторых других трансмембранных белков, в том числе, в молекулах δ и γ CD3; в белках mb1 и B29, связанных с поверхностным IgM; в цепях β и γ высокоаффинного рецептора IgE, Fc ϵ RI (Reth, Nature 338:383, 1989). Хотя функция этих последовательностей точно не установлена, в случае эффективной экспрессии любая из них способна самостоятельно активировать Т-клетку, и это может быть причиной остаточной чувствительности Т-клеточных рецепторов, наблюдаемой в ζ -отрицательной мутантной клеточной линии (Sussman et al., Cell 52:85, 1988).

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

Пример IX

Передача цитолитического сигнала Fc-рецептором человека

Для оценки действия различных подтипов рецептора Fc человека были созданы химерные молекулы, в которых внеклеточный домен антигенов CD4, CD5 или CD16 человека присоединялся к трансмембранным и внутриклеточным доменам подтипов FcRII γ A, B1, B2 и C (номенклатура авто-ров Ravetch and Kinet, Ann. Rev. Immunol. 9:457, 1991). Говоря точнее, последовательности кДНК, соответствующие трансмембранным и цитоплазматическим доменам ранее описанных изоформ FcRIIA, B1 и B2, были амплифицированы из уже существующего клона PC23 или из библиотеки кДНК миндалин человека (составленной стандартными способами) с использованием следующих олигонуклеотидных затравок.

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

CGC GGG GCG GCC GCT TTA GTT ATT ACT GTT GAC ATG GTC GTT (последовательность № 19, FcRII A обратная);

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

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

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

TCA GAA AGA GAC AAC CTG AAG AAA CCA ACA A

(последовательность №22) и

TTG TTG GTT TCT TCA GGT TGT GTC TTT CTG A

(последовательность № 23).

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

Получение белков химерных рецепторов было подтверждено экспериментами по иммунопреципитации. Приблизительно 10^7 клеток JRT3.T3.5 инфицировали в течение одного часа в бессывороточной

среде IMDM, рекомбинантами осповакцины со множественностью заражения не менее 10. Через 12 часов после заражения клетки собрали и поместили их поверхность ^{125}J , 0,5 мКи на 10^7 клеток, по способу Кларка и Эйнфельда - с использованием лактопероксидазы/глюкозооксидазы (Clark and Einfeld, см. выше). Меченые клетки собрали посредством центрифугирования и по-двергли лизису в 1% NP-40, 0,1 mM MgCl_2 , 5 mM KCl, 0,02 M иодацетамиде и 1 mM фенилметил-сульфонилфториде. Ядра отобрали посредством центрифугирования и провели иммунопреципитацию слитых белков CD16 с помощью антител 4G8 и агарозы с мышинным анти-IgG. Образцы под-вергли электрофору в восстанавливающих условиях. Все молекулы преципитированных химерных рецепторов имели ожидаемую молекулярную массу.

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

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

Чтобы исключить возможность того, что специфический цитолиз в какой-то мере объясняется взаимодействием с группой CD16, мы провели цитолитические эксперименты, в которых внутриклеточные домены FcR γ II были соединены с внеклеточным доменом CD4. В этом случае мишенями служили клетки HeLa, экспрессирующие белки оболочки ВИЧ gp120/41 (а именно, клетки HeLa, зараженные вектором осповакцины vPE16 (из СПИД-хранилища Национального института по изучению аллергических и инфекционных заболеваний - National Institute of Allergy and Infectious Disease AIDS Depository, Bethesda, MD). Как и в системе CD16, клетки-мишени, экспрессирующие оболочку ВИЧ, были восприимчивы к лизису со стороны Т-клеток, экспрессирующих химеру CD4:FcR γ II A, но не FcR γ II B1 или B2 (фиг. 14B).

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

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

Пример X

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

Как сказано выше, существует возможность построения эффекторных молекул, направляющих цитолитическую активность цитотоксических Т-лимфоцитов и делающих ее независимой от главного комплекса гистосовместимости. Например, химера, состоящая из внеклеточного домена CD4, слитого с цепью ζ в клоне цитотоксических Т-лимфоцитов человека WH3, специфически уничтожает клетки-мишени, на поверхности которых проявляется гликопротеин оболочки ВИЧ-1, gp120. Поскольку внеклеточный домен молекулы CD4 сообщает клетке восприимчивость к ВИЧ, вооруженные

цитотоксические Т-лимфоциты могут стать мишенями для вируса, что снижает их эффективность (Dalgleish et al., *Nature* 312:767 (1984); Klatzmann et al., *Nature* 312:767 (1984)). Чтобы это-го не случилось, на основе CD4 были разработаны химерные эффекторные молекулы, которые специфически связываются с ВИЧ-инфицированными клетками для их уничтожения, но не сообщают своей клетке восприимчивости к ВИЧ.

Был создан трехчастный слитый белок – посредством генного соположения внеклеточного домена CD4 (фиг. 23) и центрального, второго и третьего константных доменов тяжелой цепи IgG1 человека (Zettlmeissl et al., *DNA Cell. Biol.* 9:347 (1990)) (фиг. 25), которые в этом случае присоединялись к части первого трансмембранного экзона IgG1 человека, связанного с мембраной, за которой следовала часть антигена человека CD7, содержащая последовательности, расположенные в CD7 между единственным Ig-подобным доменом и последовательностью остановки переноса, расположенной за трансмембранным доменом (Aruffo and Seed, *EMBO J.* 6:3313 (1987)) (фиг. 26). Первичная последовательность аминокислот внеклеточной группы сегмента CD7 включала богатый пролином участок, стоящий торчком и отодвигающий Ig-подобный домен от поверхности клетки (Aruffo and Seed *EMBO J.* 6:3313 (1987)) (фиг. 26). Были приготовлены рекомбинантные вирусы осповакцины для экспрессии этой и родственных химер (как описано в настоящем документе). В частности, рекомбинантные вирусы осповакцины были получены путем гомологичной рекомбинации в клетках CV-1. Перед приготовлением высоких титров каждого штамма в клетках CV-1 для каждого штамма выполнили не менее двух циклов визуализации бляшек при помощи OKT4 или Leu3A с последующей очисткой бляшек.

Трехчастная химера CD4(D1-D4):Ig:CD7 (фиг. 20, молекула "A") эффективно экспрессировалась на поверхности клеток и была испытана на способность выступать в качестве рецептора ВИЧ - в ходе эксперимента по образованию синцитиев на основе осповакцины (Lifson et al., *Nature* 323:725 (1986); Ashorn et al., *J. Virol.* 64:2149 (1990)). Клетки HeLa, зараженные рекомбинантным вирусом осповакцины (vPE16), кодирующим гликопротеин оболочки ВИЧ-1 (Earl et al., *J. Virol.* 64:2448 (1990)) культивировали совместно с клетками HeLa, зараженными либо CD4, CD4:ζ, либо CD4(D1-D4):Ig:CD7. Шестисантиметровые чашки с клетками HeLa (ATCC, Rockville, MD – Американская коллекция типовых культур) при 50% слиянии инфицировали в течение 1 часа в бессывороточной среде с приблизительноной множественностью заражения 10. Клетки выдержали еще 5-6 часов в полной среде, затем отобрали в фосфатно-солевой буфер, содержащий 1 мМ этилендиамин-тетрауксусную кислоту. Клетки, экспрессирующие оболочку и химеру CD4, смешали в соотношении 1:1 и посеяли в 6-сантиметровые чашки с полной средой. Синцитии подсчитали и сфотографировали через 6-8 часов совместного культивирования.

Совместное культивирование CD4 и vPE16 привело к образованию легко обнаружимых гигантских многоядерных клеток. Кроме того, химера, состоящая из внеклеточного домена CD4, слитого с цепью ζ Т-клеточного рецептора (фиг. 27) (CD4:ζ) оказалась способной опосредствовать образование синцитиев, а клетки, экспрессирующие CD4(D1-D4):Ig:CD7, не проявляли признаков слияния. Мы испытали также конструкцию, экспрессирующую только первый и второй домены CD4 (фиг. 24), CD4(D1,D2):Ig:CD7 (фиг. 20, молекула "B"), поскольку в другом контексте эти два аминоконечных домена были необходимы для создания восприимчивости к ВИЧ (Landau et al., *Nature* 334:159 (1988)). Эта молекула также оказалась невосприимчивой к ВИЧ-опосредствованному образованию синцитиев. Эксперименты по связыванию с растворимой gp120, меченной ¹²⁵I, показали, что и CD4 (D1-D4):Ig:CD7, и CD4 (D1, D2):Ig:CD7 сохранили аффинность к gp120.

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

Радиоиммунопреципитационный анализ показал, что слитые молекулы - это преимущественно, если не полностью, димеры. В ходе этого анализа для преципитации растворенного экстракта метаболически меченных клеток HeLa, зараженных рекомбинантами осповакцины, экспрессирующими химеры CD4(D1-D4):Ig:CD7:ζ и CD4(D1,D2):Ig:CD7:ζ, использовались шарики протеин-А агарозы. Преципитированный материал разделили на фракции посредством электрофореза на полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. В частности, приблизительно 5×10⁶ клеток HeLa-33 заразили, как описано выше, vPE16 - через соответствующий штамм вируса осповакцины. Клетки

мета-болически поместили меткой Tran³⁵S-Label (ICN Radiochemicals, Irvine, CA), 200 мкКи/мл, выдержав 6-8 часов в цистеин- и метионин-дефицитной среде, и собрали в фосфатно-солевой буфер, содержащий 1 mM этилендиаминтетрауксусную кислоту. Затем клетки центрифугировали и подвергли лизису в 150 mM NaCl, 50 mM трис pH 7,5, 5 mM этилендиаминтетрауксусной кислоте, 0,5% NP-40, 0,1% додецилсульфате натрия, 5 mM этилендиаминтетрауксусной кислоте, 1 mM фенилметил-сульфонилфториде.

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

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

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

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

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

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

В третьем эксперименте домен CD4 отодвигали на различные расстояния от клеточной мембраны при помощи синтетических α-спиралей различной длины. В частности, были разработаны синтетические олигонуклеотиды, соответствующие повторяющимся α-спиральным участкам из остатков лизина и глутаминовой кислоты, окаймленным двумя остатками аланина (первичные последовательности

нуклеотидов и аминокислот приведены на фиг. 28) В ходе предшествующих исследований выяснилось, что такие аминокислотные последовательности часто встречаются в α -спиралях, а значит, можно предположить, что такие повторяющиеся участки принимают α -спиральную структуру и что помещение таких альфа спиралей между трансмембранным доменом и внеклеточным доменом CD4 отодвигает CD4 от клеточной мембраны. Изменяя длину α -спирального сегмента, мы определили (на основании известных величин подъема и поворота спирали) вынос, необходимый для обеспечения сопротивляемости к проникновению ВИЧ-инфекции. Эти результаты представлены в таблице.

Таблица

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

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

В этой таблице "CD4" обозначает CD4(D1-D4), если не указано иное; "H", "CH2", и "CH3" обозначают центральный домен и домены CH2 и CH3 тяжелой цепи IgG1 человека, соответственно; CD7tm+stk обозначает "стебель" и трансмембранный домен CD7; "CD7tm (длинная версия)" и "CD7tm (короткая версия)" обозначают, соответственно, трансмембранный участок CD7 и трансмембранный участок CD7 без богатого пролином домена (см. выше); "CD5tm" обозначает трансмембранный участок CD5; "CD34tm" обозначает трансмембранный участок CD34. В позициях J-L указана длина α -спирального участка в ангстремах, эти значения выведены на основании того, что на 1 виток α -спирали приходится 3,6 остатка, что соответствует 5,4 Å (или 1,5 Å на остаток). Следовательно, α -спираль из 16 остатков вынесет внеклеточный домен CD4 на 24 ангстрема. Альфа-спирали высотой в 48 и 72 ангстрема были получены путем последовательной конкатемеризации фрагмента BstY1 в уникальный сайт BamH1 на этом участке (см. фиг. 28), с последующим отбором клонов нужной ориентации.

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

Экспрессию Thy-1 измеряли следующим образом. Был сконструирован живой ретровирусный вектор на основе клона hxb.2 ВИЧ-1. В этом векторе второстепенный ген nef заменили последовательностью, кодирующей крысиный thy-1 - эффективно экспрессируемую молекулу, соединенную с мембраной фосфатидилинозитной связью. Вирус, полученный из этого молекулярного клона и обозначенный hxb/thy-1, был заразным, так как давал цитопатологические эффекты и способствовал выработке p24 в супернатантах культуры зараженных клеток C8166 (линия Т-клеточного лейкоза человека, Т-клетки CD4⁺). Кроме того, после обработки вирусом hxb/thy-1 и переходящей трансфекции CD4 клетки HeLa проявляли признаки экспрессии thy-1 уже через 18 часов после заражения, как и следовало ожидать для объекта, управляемого по образцу nef. Сообщения, кодируемые геном nef, обычно относятся к классу вирусных регуляторных белков, в которых происходит множественный сплайсинг и отсутствует элемент ответа rev. Эти сообщения могут накапливаться в цитоплазме в значительном количестве в виде ранних генов. Ожидалось, что сообщения thy-1 будут вести себя подобным образом, т.е. встречаться на ранних стадиях жизненного цикла вируса. Говоря вкратце, эта система облегчила проверку проникновения ВИЧ, так как экспрессия thy-1 служила его суррогатом. Проводилась переходящая трансфекция клеток HeLa различными химерами CD4 при помощи стандартных способов с использованием диэтил-аминоэтил-декстрана. Трансфицированные клетки подвергали обработке hxb/thy-1 через 48 часов после трансфекции и измеряли экспрессию thy-1 через 24-48 часов после заражения. Результаты, представленные в таблице, относятся к экспрессии thy-1, измеренной через 24 часа после заражения при помощи стандартного моноклонального антитела к thy-1 (Accurate).

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

При использовании стратегии, подобной генеральной стратегии, описанной в настоящем документе, можно конструировать химеры на основе антител к оболочке ВИЧ, которые будут специфически связывать ВИЧ-инфицированные клетки. Примеры таких антител описаны у Gorny et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1624 (1989) и Marasco et al., J. Clin. Invest. 90:1467 (1992).

Пример XI

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

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

Пример XII

Экспериментальные методы

Заражение осповакциной и радиоиммуно-преципитация

Приблизительно 5×10^6 клеток CV1 инфицировали в течение одного часа в бессывороточной среде DME рекомбинантами осповакцины со множественностью заражения не меньше десяти (титр определялся по клеткам CV1). После заражения клетки поместили в свежую среду и мета-болически поместили 200 мКи/мл ^{35}S -метионина и цистеина (метка Tran ^{35}S -label, ICN; Costo Mesa, CA) в среде Игла, модифицированной по Дульбекко и не содержащей метионина и цистеина (DMEM) (Gibco; Grand Island, NY). Обработка продолжалась шесть часов. Меченые клетки отделили при помощи фосфатно-солевого буфера, содержащего 1 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту, собрали посредством центрифугирования и подвергли лизису в 1% NP-40, 0,1% додецилсульфате натрия, 0,15 М NaCl, 0,05 М трис pH 8,0, 5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и 1 мМ фенилметилсульфонилфториде. Ядра отобрали посредством центрифугирования, а белки CD4 иммунопреципитировали при помощи антител ОКТ4 и агарозы с мышиным анти-IgG (Cappel, Durham, NC). Образцы подвергли электрофорезу в 8% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия при невозобновляющих (NR) и возобновляющих (R) условиях. Гели, содержащие образцы, меченные ^{35}S , перед автордиографией пропитали составом En³Hance (New England Nuclear, Boston, MA). Облегченную экспрессию трансмембранной формы CD16, CD16_{TM} измеряли путем сравнения ее экспрессии в клетках CV1, зараженных только CD16_{TM}, с экспрессией в клетках, зараженных вирусами, кодирующими CD16_{TM} и химерами ζ или γ . После заражения и выдержки в течение 6 или более часов клетки отбирали из чашек в фосфатно-солевой буфер с 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислотой и проводили измерение экспрессии CD16_{TM} и химер способом непрямой иммуно-флуоресценции и проточной цитометрии.

Анализ переноса кальция

Сублинию E6 клеток Jurkat (Weiss et al., J. Immunol. 133:123-128 (1984)) инфицировали рекомбинантными вирусами осповакцины в течение одного часа в бессывороточной среде IMDM со множественностью заражения 10 и выдерживали от трех до девяти часов в среде IMDM с 10% фосфатно-солевого буфера. Клетки отбирали центрифугированием и взвешивали в концентрации 3×10^6 клеток/мл в полной среде, содержащей 1 мМ Индо-1 ацетометоксиэфир (сложный) (Gryn-kiewicz et al., J. Biol. Chem. 260:3340-3450 (1985)) (Molecular Probes), затем выдерживали 45 минут при 37°C. Клетки, нагруженные Индо-1, центрифугировали, взвешивали в количестве 1×10^6 /мл в бессывороточной среде IMDM и хранили в темноте при комнатной температуре. Анализ на свободные ионы кальция проводили путем одновременного измерения голубой и фиолетовой флуоресценции при проточной цитометрии (Rabinovitch et al., J. Immunol. 137:952-961 (1986)). Для запуска переноса кальция к суспензии клеток в момент времени 0 добавляли либо конъюгированные с фикоэритрином (PE) антитела Leu-3A (против CD4) (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) в концентрации 1 мкг/мл, затем неконъюгированные козы антитела к мышиному IgG в концентрации 10 мкг/мл, либо неконъюгированные моноклональные антитела 3G8 (против CD16) в концентрации 1 мкг/мл, а затем козы антитела Fab₂' к мышиному IgG, конъюгированные с фико-эритрином, в концентрации 10 мкг/мл. Были собраны гистограммы отношения фиолетового излучения к голубому для популяции PE-положительных (зараженных) клеток, которые обычно составляли 40-80% от всех клеток. Ответ Т-клеточного антигенного рецептора в незараженных клетках запускался антителами ОКТ3 без перекрестного связывания. В экспериментах с химерными рецепторами CD16 образцы, в которых наблюдался исходный сдвиг в сторону снижения внутриклеточной концентрации кальция (без антител), исключались из анализа. Гистограммы анализировали путем перевода двоичных данных в коды ASCII при помощи программы Write Hand Man (Cooper City, FL) и последующей обработки при помощи ряда программ на ФОРТРАНе (FORTRAN). Для определения исходного нормализованного отношения фиолетового излучения к голубому (приравниваемого к единице) использовали отношение, наблюдаемое перед добавлением второго реагента-антитела. Его же использовали для определения порогового отношения в покое, которое установили так, чтобы 10% популяции в покое находилось над порогом.

Анализ цитолитической активности

Т-клеточную линию WH3 человека, цитолитическую линию с рестрикциями CD8⁺, CD4⁻, HLA B44, выдерживали в среде IMDM с 10% человеческой сыворотки и с 100 Ед/мл IL-2 и периодически стимулировали либо неспецифически, облученными (3000 рад) не соответствующими по HLA лимфоцитами периферийной крови и фито-гематтуплинином в концентрации 1 мкг/мл, либо специфически, облученными одноядерными клетками с B44. Через день неспецифической стимуляции фитогемагглютинин разбавили до 0,5 мкг/мл свежей средой, а через три дня среду сменили. Между стимуляцией и анализом цитотоксичности клетки культивировали не менее 10 дней. Клетки инфицировали

рекомбинантами осповакцины со множественностью заражения не менее 10 в течение одного часа в бессывороточной среде, затем выдерживали три часа в полной среде. Клетки отбирали центрифугированием и взвешивали с плотностью 1×10^7 клеток/мл. В U-образной титрационный микропланшет, в каждой ячейке которого содержалось по 100 мкл полной среды, добавляли по 100 мкл взвеси, затем разбавляли вдвое последовательными шагами. Две ячейки на каждый образец не содержали лимфо-цитов, чтобы можно было измерить спонтанное высвобождение хрома и его суммарное поглощение. Клетки-мишени, взятые из сублинии HeLa S3, инфицировали в 6- или 10-сантиметровых чашках, с приблизительной множественностью заражения 10, в течение одного часа в бессывороточной среде, затем выдерживали в полной среде в течение трех часов. Затем их выделили при помощи фосфатно-солевого буфера с 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислотой и пересчитали. Порцию в 10^6 клеток-мишеней (HeLa, Raji или RJ2.2.5 для экспериментов с химерным рецептором CD4 и клеток 3G8 10-2; Shen et al., Mol. Immunol. 26:959 (1989) для экспериментов с химерным рецептором CD16) центрифугировали и взвесили в 50 мкл стерильного натрия хромата (^{51}Cr , 1 мКи/мл, Dupont Wilmington, DE) на один час при 37°C, время от времени перемешивая, затем три раза промыли фосфатно-солевым буфером. Сто мкл меченых клеток снова взвесили в среде с плотностью 10^5 клеток/мл и добавили в каждую ячейку. Клетки Raji и RJ2.2.5 метили так же, как и клетки HeLa. Микропланшет вращали в течение 1 минуты при 750xg и выдерживали 4 часа при 37°C. В конце периода инкубации клетки в каждой ячейке осторожно взвешивали посредством пипетирования, отбирали образец для подсчета и вращали микропланшет в течение 1 минуты при 750xg. Порции по 100 мкл супернатанта отбирали и проверяли в гамма-сцинтиляционном счетчике. К проценту уничтожения была сделана поправка на долю инфицированных клеток-мишеней (обычно 50-90%), определенную посредством проточной цитометрии. К отношению эффектор:мишень для инфицированных эффекторных клеток была сделана поправка на процент зараженных клеток (обычно 20-50% для экспериментов с химерным рецептором CD4 и >70% для экспериментов с химерным рецептором CD16).

Мутагенез последовательности ζ in vitro

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

Для получения делеций в последовательности ζ кДНК ζ были амплифицированы посредством цепных полимеразных реакций, в которых были использованы синтетические олигонуклеотидные затравки, сконструированные для создания стоп-кодона (UAG) после остатков 50, 59 или 65. Затравки содержали сайт расщепления для фермента NotI, отстоящий на 5 или 6 остатков от конца 5', обычно в последовательности вида CGC GGG CGG CTA (последовательность № 11), где три последних остатка соответствуют стоп-антикодону. За последовательностями NotI и стоп-антикодона шли 18 или более остатков, комплементарных требуемому концу 3' фрагмента. Полученные химеры были обозначены CD16: ζ Y51*, CD16: ζ E60* и CD16: ζ D66*, соответственно. Сайт BamHI у начала трансмембранного домена и сайт NotI использовались для генерации фрагментов, которые вставлялись в конструкции CD16: ζ дикого типа. Мономерные химеры ζ строились путем высвобождения трансмембранной и примембранной внутриклеточной последовательностей ζ за счет переваривания ферментами BamHI и SacI конструкции CD4: ζ Asp⁻ и Cys⁻, описанной выше, и осуществления вставки этого фрагмента в конструкции CD16: ζ E60* и CD16: ζ D66*, соответственно.

Трехчастные химерные конструкции CD16:7: ζ (48-65) и CD16:7: ζ (48-59)

Для приготовления конструкции CD16: ζ D66* последовательность кДНК ζ , соответствующую трансмембранному домену и 17 первым остаткам цитоплазматического домена, заменили соответствующими трансмембранным и цитоплазматическим доменами, полученными из кДНК CD5 и CD7. Фрагменты CD5 и CD7 были получены при помощи цепных полимеразных реакций с использованием олигонуклеотидов прямой последовательности, содержащих сайт рестрикционного расщепления BamHI и соответствующих участку, прилежащему "сверху" к трансмембранному домену CD5 и CD7, соответственно, и представленных ниже олигонуклеотидов обратной последовательности, перекрывающихся с последовательностями CD5 и CD7, соответственно, и последовательности ζ , содержащей сайт SacI рестрикционного расщепления.

CD5: ζ CGC GGG CTC GTT ATA GAG CTG GTT CTG GCG CTG CTT CTT CTG (последовательность № 12)

CD7: ζ CGC GGG GAG CTC GTT ATA GAG CTG GTT TGC GCG CGA ATT CTT ATC CCG (последовательность № 13)

Продукты цепной реакции CD5 и CD7 переварили BamHI и SacI и сшили с CD16: ζ E60*, переваренной ферментами BamHI и SacI. Этим фрагментом CD7 была заменена последовательность цепи ζ от BamHI до SacI. Для построения конструкций CD16:CD5 и CD16:CD7 фрагменты CD5 и CD7 готовили при помощи цепной полимеразной реакции с использованием олигонуклеотида, содержащего сайт NotI рестрикционного расщепления и кодирующий стоп-кодон (UAA) после остатков Gln416 и A1a193 CD5 и CD7, соответственно. Фрагменты CD5 и CD7 переварили при помощи BamHI и NotI и вставили в конструкцию CD16: ζ Asp66*.

Мутагенез in vitro аминоконечных остатков отрезка ζ , проводящего цитолитический сигнал

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

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

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

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

Трансмембранный фрагмент CD7, содержащий сайты MluI и NotI в месте соединения трансмембранного и внутриклеточного домена, был получен при помощи цепной полимеразной реакции с использованием олигонуклеотида с такой последовательностью: CGC GGG GCG GCC ACG CGT CCT CGC CAG CAC ACA (последовательность № 14). Полученный фрагмент переварили при помощи BamHI и NotI и повторно вставили в конструкцию CD16:7: ζ (48-65). Фрагменты ζ , кодирующие остатки с 33 по 65, с 71 по 104 и со 104 по 137, были получены при помощи цепной полимеразной реакции с использованием пар затравок, содержащих сайты MluI на конце 5' (прямые затравки) и стоп-кодона, за которыми следуют сайты NotI, также на конце 5' (обратные затравки). В каждом случае сайты рестрикции отстояли на шесть остатков от конца 5' затравки, чтобы расщепление рестрикционным ферментом было гарантированным.

ζ 33: CGC GGG ACG CGT TTC AGC CGT CCT CGC CAG CAC ACA
(последовательность № 15)

ζ 71: CGC GGG ACG CGT GAC CCT GAG ATG GGG GGA AAG
(последовательность № 16) и

ζ 104: CGC GGG ACG CGT ATT GGG ATG AAA GGC GAG CGC
(последовательность № 17).

Построение делеционных мутантов FcR γ IIA

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

Другие варианты осуществления изобретения

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

Сила цитолитического ответа и отсутствие ответа по отношению к клеткам-мишеням, несущим рецепторы класса II ГКГС, показывает, что химеры, основанные на ζ , η или γ , служат основой генетического вмешательства при СПИДе, которое осуществляется при помощи адоптивной иммунотерапии. Широкое распространение эндогенных ζ и γ и данные о том, что Fc-рецепторы, связанные с γ , опосредствуют цитотоксичность в клетках различных типов (Fanger et al., Immunol. Today 10:92-99 (1989)), позволяет рассматривать возможность применения в этих целях различных клеток. Например, нейтрофильные гранулоциты, которые очень недолго (\approx 4 часа) живут в системе кровообращения и обладают очень сильной цитолитической способностью, представляют собой привлекательное место экспрессии таких химер. Заражение нейтрофилов ВИЧ, скорее всего, не приведет к высвобождению вируса, а обилие этих клеток (они преобладают среди лейкоцитов) должно облегчить организму-хозяину задачу защиты. Еще один привлекательный носитель химер - это зрелые Т-клетки, популяция, в настоящее время доступная ретровирусной инженерии (Rosenberg, S.A. Sci. Am. 262:62-69 (1990)). При помощи рекомбинантных IL-2 популяции Т-клеток сравнительно легко размножаются в культуре, и такие размноженные популяции, вернувшись в организм, обычно живут недолго (Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. 323:570-578 (1990)).

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

Появившиеся недавно описания схем конструирования сопротивления инфекции, проявляющегося на этапах, отличных от этапа проникновения вируса (Friedman et al., Nature 335:452-454 (1988); Green et al.,

Cell 58:215-223 (1989); Malim et al., Cell 58:205-214 (1989); Trono et al., Cell 59:113-120 (1989); Buonocore et al., Nature 345:625-628 (1990)), позволяют предположить, что клетки с химерными рецепторами CD4 можно перестроить таким образом, что они будут препятствовать выработке вируса за счет экспрессии соответствующих агентов, действующих внутри клетки.

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

Настоящее изобретение было описано лишь в связи с отдельными вариантами его осуществления, но следует понимать, что существует возможность его модификации, и настоящее изобретение распространяется на видоизменения, другие способы использования или варианты адаптации настоящего изобретения, предусматривающие такие отклонения от изложенного выше, которые возможны в этой области деятельности, допустимы в рамках настоящего изобретения и согласуются с его основными особенностями, определенными формулой изобретения.

Сведения о последовательностях

(1) ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ:

(i) ЗАЯВИТЕЛИ: Сид, Брайен и др.

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

(iii) КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 27

(iv) АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ:

(A) ПОЛУЧАТЕЛЬ:	Фиш энд Ричардсон
(B) УЛИЦА:	225 Франклин Стрит
(C) ГОРОД:	Бостон
(D) ШТАТ:	МА
(E) СТРАНА:	США
(F) ПОЧТОВЫЙ ИНДЕКС (ЗИП):	02110-2804

- (v) МАШИНОЧИТАЕМАЯ ФОРМА:
- (A) ТИП НОСИТЕЛЯ: дискета 3.5", 1.44 Mb
 - (B) КОМПЬЮТЕР: IBM PS/2, модель 50Z or 55SX
 - (C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: IBM P.C. DOS (Версия 3.30)
 - (D) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: Wordperfect (Версия 5.0)
- (vi) СВЕДЕНИЯ О НАСТОЯЩЕЙ ЗАЯВКЕ:
- (A) НОМЕР ЗАЯВКИ:
 - (B) ДАТА ПОДАЧИ:
 - (C) КЛАССИФИКАЦИЯ:
- (vii) СВЕДЕНИЯ О ПРЕДЫДУЩЕЙ ЗАЯВКЕ:
- (A) НОМЕР ЗАЯВКИ: 07/847,566
 - (B) ДАТА ПОДАЧИ: 6 марта 1992
 - (C) КЛАССИФИКАЦИЯ:
- (vii) СВЕДЕНИЯ О ПРЕДЫДУЩЕЙ ЗАЯВКЕ:
- (A) НОМЕР ЗАЯВКИ: 07/665,961
 - (B) ДАТА ПОДАЧИ: 7 марта 1991
 - (C) КЛАССИФИКАЦИЯ:
- (viii) СВЕДЕНИЯ О ПОВЕРЕННОМ/АГЕНТЕ:
- (A) ИМЯ: Clark, Paul T.
 - (B) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР: 30,162
 - (C) ССЫЛКА/НОМЕР ДЕЛА: 00786/212001
- (ix) ТЕЛЕКОММУНИКАЦИОННЫЕ СВЕДЕНИЯ:
- (A) ТЕЛЕФОН: (617) 542-5070
 - (B) ТЕЛЕФАКС: (617) 542-8906
 - (C) ТЕЛЕКС: 200154
- (2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 1:
- (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
- (A) ДЛИНА: 1728 пар оснований
 - (B) ТИП: нуклеиновая кислота
 - (C) Двухцепочечная
 - (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)
- (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 1:
- | | |
|---|-----|
| ATGAACCGGG GAGTCCSTTT TAGGCACTTG CTTCTGGTGC TGCAACTGGC | 50 |
| GCTCSTCCCA GCAGCCACTC AGGGAAACAA AGTGGTGCTG GGCAAAAAAG | 100 |
| GGGATACAGT GGAAC TGACC TGTACAGCTT CCCAGAAGAA GAGCATACAA | 150 |
| TTCCACTGGA AAAACTCCAA CCAGATAAAG ATTCTGGGAA ATCAGGGCTC | 200 |
| CTTCTTAACT AAAGGTCCAT CCAAGCTGAA TGATCGCGCT GACTCAAGAA | 250 |
| GAAGCSTTTG GGACCAAGGA AACTTCCCCC TGATCATCAA GAATCTTAAG | 300 |

GAAGCCTTTG GGACCAAGGA AACTTCCCCC TGATCATCAA GAATCTTAAG	300
ATAGAAGACT CAGATACTTA CATCTGTGAA GTGGAGGACC AGAAGGAGGA	350
GGTGCAATTG CTAGTGTTTCG GATTGACTGC CAACTCTGAC ACCCACCTGC	400
TTCAGGGGCA GAGCCTGACC CTGACCTTGG AGAGCCCCCC TGGTAGTAGC	450
CCCTCAGTGC AATGTAGGAG TCCAAGGGGT AAAAACATAC AGGGGGGGAA	500
GACCCTCTCC GTGTCTCAGC TGGAGCTCCA GGATAGTGGC ACCTGGACAT	550
GCACTGTCTT GCAGAACCAG AAGAAGGTGG AGTTCAAAAT AGACATCGTG	600
GTGCTAGCTT TCCAGAAGGC CTCCAGCATA GTCTATAAGA AAGAGGGGGA	650
ACAGGTGGAG TTCTCCTTCC CACTCGCCTT TACAGTTGAA AAGCTGACGG	700
GCAGTGGCGA GCTGTGGTGG CAGGCGGAGA GGGCTTCCTC CTCCAAGTCT	750
TGGATCACCT TTGACCTGAA GAACAAGGAA GTGTCTGTAA AACGGGTTAC	800
CCAGGACCCT AAGCTCCAGA TGGGCAAGAA GCTCCCGCTC CACCTCACCC	850
TGCCCCAGGC CTTGCCTCAG TATGCTGGCT CTGGAAACCT CACCCTGGCC	900
CTTGAAGCGA AAACAGGAAA GTTGCATCAG GAAGTGAACC TGGTGGTGAT	950
GAGAGCCACT CAGCTCCAGA AAAATTTGAC CTGTGAGGTG TGGGGACCCA	1000
CCTCCCCTAA GCTGATGCTG AGCTTGAAAC TGGAGAACAA GGAGGCAAAG	1050
GTCTCGAAGC GGGAGAAGCC GGTGTGGGTG CTGAACCCTG AGGCGGGGAT	1100
GTGGCAGTGT CTGCTGAGTG ACTCGGGACA GGTCTTGCTG GAATCCAACA	1150
TCAAGGTTCT GCCCACATGG TCCACCCCGG TGCACGCGGA TCCCAAATC	1200
TGCTACTTGC TAGATGGAAT CCTCTTCATC TACGGAGTCA TCATCACAGC	1250
CCTGTACCTG AGAGCAAAAT TCAGCAGGAG TGCAGAGACT GCTGCCAACC	1300
TGCAGGACCC CAACCAGCTC TACAATGAGC TCAATCTAGG GCGAAGAGAG	1350
GAATATGACG TCTTGAGAA GAAGCGGGCT CGGGATCCAG AGATGGGAGG	1400
CAAACAGCAG AGGAGGAGGA ACCCCCAGGA AGGCGTATAC AATGCACTGC	1450
AGAAAGACAA GATGCCAGAA GCCTACAGTG AGATCGGCAC AAAAGGCGAG	1500
AGGCGGAGAG GCAAGGGGCA CGATGGCCTT TACCAGGACA GCCACTTCCA	1550
AGCAGTGCAG TTCGGGAACA GAAGAGAGAG AGAAGGTTCA GAACTCACAA	1600
GGACCCTTGG GTTAAGAGCC CGCCCCAAAG GTGAAAGCAC CCAGCAGAGT	1650
AGCCAATCCT GTGCCAGCGT CTTCAGCATC CCCACTCTGT GGAGTCCATG	1700
GCCACCCAGT AGCAGCTCCC AGCTCTAA	1728

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

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

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 2:

ATGAACCGGG GAGTCCSTTT TAGGCACTTG CTTCTGGTGC TGCAACTGGC	50
GCTCCTCCCA GCAGCCACTC AGGGAAACAA AGTGGTGCTG GGCAAAAAG	100
GGGATACAGT GGAAC TGACC TGTACAGCTT CCCAGAAGAA GAGCATACAA	150
TTCCACTGGA AAAACTCCAA CCAGATAAAG ATTCTGGGAA ATCAGGGCTC	200
CTTCTTAACT AAAGGTCCAT CCAAGCTGAA TGATCGCGCT GACTCAAGAA	250
GAAGCCTTTG GGACCAAGGA AACTTCCCCC TGATCATCAA GAATCTTAAG	300
ATAGAAGACT CAGATACTTA CATCTGTGAA GTGGAGGACC AGAAGGAGGA	350
GGTGCAATTG CTAGTGTTTG GATTGACTGC CAACTCTGAC ACCCACCTGC	400
TTCAGGGGCA GAGCCTGACC CTGACCTTGG AGAGCCCCC TGGTAGTAGC	450
CCCTCAGTGC AATGTAGGAG TCCAAGGGGT AAAAACATAC AGGGGGGGAA	500
GACCCTCTCC GTGTCTCAGC TGGAGCTCCA GGATAGTGGC ACCTGGACAT	550
GCACTGTCTT GCAGAACCAG AAGAAGGTGG AGTTCAAAAT AGACATCGTG	600
GTGCTAGCTT TCCAGAAGGC CTCCAGCATA GTCTATAAGA AAGAGGGGGA	650
ACAGGTGGAG TTCTCCTTCC CACTCGCCTT TACAGTTGAA AAGCTGACGG	700
GCAGTGGCGA GCTGTGGTGG CAGGCGGAGA GGGCTTCCTC CTCCAAGTCT	750
TGGATCACCT TTGACCTGAA GAACAAGGAA GTGTCTGTAA AACGGGTTAC	800
CCAGGACCCT AAGCTCCAGA TGGGCAAGAA GCTCCCGCTC CACCTCACCC	850
TGCCCCAGGC CTTGCCTCAG TATGCTGGCT CTGGAAACCT CACCCTGGCC	900
CTTGAAGCGA AAACAGGAAA GTTGCATCAG GAAGTGAACC TGGTGGTGAT	950
GAGAGCCACT CAGCTCCAGA AAAATTTGAC CTGTGAGGTG TGGGGACCCA	1000
CCTCCCCTAA GCTGATGCTG AGCTTGAAAC TGGAGAACAA GGAGGCAAAG	1050

GTCTCGAAGC GGGAGAAGCC GGTGTGGGTG CTGAACCCTG AGGCGGGGAT	1100
GTGGCAGTGT CTGCTGAGTG ACTCGGGACA GGTCTTGCTG GAATCCAACA	1150
TCAAGGTTCT GCCCACATGG TCCACCCCGG TGCACGCGGA TCCGCAGCTC	1200
TGCTATATCC TGGATGCCAT CCTGTTTTTG TATGGTATTG TCCTTACCCT	1250
GCTCTACTGT CGACTCAAGA TCCAGGTCCG AAAGGCAGAC ATAGCCAGCC	1300
GTGAGAAATC AGATGCTGTC TACACGGGCC TGAACACCCG GAACCAGGAG	1350
ACATATGAGA CTCTGAAACA TGAGAAACCA CCCCААТАG	1389

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

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

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 3:

ATGAACCGGG GAGTCCSTTT TAGGCACTTG CTCTGGTGTC TGCAACTGGC	50
GCTCCTCCCA GCAGCCTCTC AGGGAAACAA AGTGGTGCTG GGCAAAAAG	100
GGGATACAGT GGAAGTGACC TGTACAGCTT CCCAGAAGAA GAGCATACAA	150
TTCCACTGGA AAAACTCCAA CCAGATAAAG ATTCTGGGAA ATCAGGGCTC	200
CTTCTTAACT AAAGGTCCAT CCAAGCTGAA TGATCGCGCT GACTCAAGAA	250
GAAGCCTTTG GGACCAAGGA AACTTCCCCC TGATCATCAA GAATCTTAAG	300
ATAGAAGACT CAGATACTTA CATCTGTGAA GTGGAGGACC AGAAGGAGGA	350
GGTGCAATTG CTAGTGTTCTG GATTGACTGC CAACTCTGAC ACCCACCTGC	400
TTCAGGGGCA GAGCCTGACC CTGACCTTGG AGAGCCCCCC TGGTAGTAGC	450
CCCTCAGTGC AATGTAGGAG TCCAAGGGGT AAAAACATAC AGGGGGGGAA	500
GACCTCTCTC GTGTCTCAGC TGGAGCTCCA GGATAGTGGC ACCTGGACAT	550
GCACTGTCTT GCAGAACCAG AAGAAGGTGG AGTTCAAAAT AGACATCGTG	600
GTGCTAGCTT TCCAGAAGGC CTCCAGCATA GTCTATAAGA AAGAGGGGGA	650
ACAGGTGGAG TTCTCCTTCC CACTCGCCTT TACAGTTGAA AAGCTGACGG	700
GCAGTGGCGA GCTGTGGTGG CAGGCGGAGA GGGCTTCCTC CTCCAAGTCT	750
TGGATCACCT TTGACCTGAA GAACAAGGAA GTGTCTGTAA AACGGGTAC	800
CCAGGACCCT AAGCTCCAGA TGGGCAAGAA GCTCCCGCTC CACCTCACCC	850

```

TGCCCCAGGC CTTGCCTCAG TATGCTGGCT CTGGAAACCT CACCCTGGCC      900
CTTGAAGCGA AAACAGGAAA GTTGCATCAG GAAGTGAACC TGGTGGTGAT      950
GAGAGCCACT CAGCTCCAGA AAAATTTGAC CTGTGAGGTG TGGGGACCCA     1000
CCTCCCCTAA GCTGATGCTG AGCTTGAAAC TGGAGAACAA GGAGGCAAAG     1050
GTCTCGAAGC GGGAGAAGCC GGTGTGGGTG CTGAACCCCTG AGGCGGGGAT     1100
GTGGCAGTGT CTGCTGAGTG ACTCGGGACA GGTCTGTCTG GAATCCAACA     1150
TCAAGGTTCT GCCCACATGG TCCACCCCGG TGCACGCGGA TCCCAAATC      1200
TGCTACCTGC TGGATGGAAT CCTCTTCATC TATGGTGTCA TTCTCACTGC     1250
CTTGTTCCCTG AGAGTGAAGT TCAGCAGGAG CGCAGAGCCC CCCGCGTACC     1300
AGCAGGGCCA GAACCAGCTC TATAACGAGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG     1350
GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGACGTGGC CGGGACCCTG AGATGGGGGG     1400
AAAGCCGAGA AGGAAGAACC CTCAGGAAGG CCTGTACAAT GAACTGCAGA     1450
AAGATAAGAT GGC GGAGGCC TACAGTGAGA TTGGGATGAA AGGCGAGCGC     1500
CGGAGGGGCA AGGGGCACGA TGGCCTTTAC CAGGGTCTCA GTACAGCCAC     1550
CAAGGACACC TACGACGCC TTACATGCA GGCCCTGCCC CCTCGCTAA      1599

```

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 575 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 4:

```

Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu
 1          5          10          15
Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Asn Lys Val Val Leu Gly Lys
 20          25          30
Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser
 35          40          45
Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn
 50          55          60
Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala
 65          70          75          80
Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile
 85          90          95
Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu
100          105          110
Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn
115          120          125

```

Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu
 130 135 140
 Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly
 145 150 155 160
 Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu
 165 170 175
 Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys
 180 185 190
 Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser
 195 200 205
 Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro
 210 215 220
 Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp
 225 230 235 240
 Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu
 245 250 255
 Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu
 260 265 270
 Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu
 275 280 285
 Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys
 290 295 300
 Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr
 305 310 315 320
 Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro
 325 330 335
 Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser
 340 345 350
 Lys Arg Glu Lys Pro Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp
 355 360 365
 Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile
 370 375 380
 Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val His Ala Asp Pro Lys Leu
 385 390 395 400
 Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Ile Thr
 405 410 415
 Ala Leu Tyr Leu Arg Ala Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Thr Ala Ala
 420 425 430
 Asn Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
 435 440 445
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu Lys Lys Arg Ala Arg Asp Pro Glu
 450 455 460
 Met Gly Gly Lys Gln Gln Arg Arg Arg Asn Pro Gln Glu Gly Val Tyr
 465 470 475 480
 Asn Ala Leu Gln Lys Asp Lys Met Pro Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
 485 490 495
 Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 500 505 510
 Asp Ser His Phe Gln Ala Val Gln Phe Gly Asn Arg Arg Glu Arg Glu
 515 520 525
 Gly Ser Glu Leu Thr Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ala Arg Pro Lys Gly
 530 535 540
 Glu Ser Thr Gln Gln Ser Ser Gln Ser Cys Ala Ser Val Phe Ser Ile
 555 560 565
 Pro Thr Leu Trp Ser Pro Trp Pro Pro Ser Ser Ser Ser Gln Leu
 565 570 575

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 5:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 462 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 5:

Met	Asn	Arg	Gly	Val	Pro	Phe	Arg	His	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Gln	Leu	1	5	10	15
Ala	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Thr	Gln	Gly	Asn	Lys	Val	Val	Leu	Gly	Lys	20	25	30	
Lys	Gly	Asp	Thr	Val	Glu	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gln	Lys	Lys	Ser	35	40	45	
Ile	Gln	Phe	His	Trp	Lys	Asn	Ser	Asn	Gln	Ile	Lys	Ile	Leu	Gly	Asn	50	55	60	
Gln	Gly	Ser	Phe	Leu	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Lys	Leu	Asn	Asp	Arg	Ala	65	70	75	80
Asp	Ser	Arg	Arg	Ser	Leu	Trp	Asp	Gln	Gly	Asn	Phe	Pro	Leu	Ile	Ile	85	90	95	
Lys	Asn	Leu	Lys	Ile	Glu	Asp	Ser	Asp	Thr	Tyr	Ile	Cys	Glu	Val	Glu	100	105	110	
Asp	Gln	Lys	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Val	Phe	Gly	Leu	Thr	Ala	Asn	115	120	125	
Ser	Asp	Thr	His	Leu	Leu	Gln	Gly	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Thr	Leu	Glu	130	135	140	
Ser	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Val	Gln	Cys	Arg	Ser	Pro	Arg	Gly	145	150	155	160
Lys	Asn	Ile	Gln	Gly	Gly	Lys	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Glu	Leu	165	170	175	
Gln	Asp	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr	Cys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Gln	Lys	Lys	180	185	190	
Val	Glu	Phe	Lys	Ile	Asp	Ile	Val	Val	Leu	Ala	Phe	Gln	Lys	Ala	Ser	195	200	205	
Ser	Ile	Val	Tyr	Lys	Lys	Glu	Gly	Glu	Gln	Val	Glu	Phe	Ser	Phe	Pro	210	215	220	
Leu	Ala	Phe	Thr	Val	Glu	Lys	Leu	Thr	Gly	Ser	Gly	Glu	Leu	Trp	Trp	225	230	235	240
Gln	Ala	Glu	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser	Trp	Ile	Thr	Phe	Asp	Leu	245	250	255	
Lys	Asn	Lys	Glu	Val	Ser	Val	Lys	Arg	Val	Thr	Gln	Asp	Pro	Lys	Leu	260	265	270	
Gln	Met	Gly	Lys	Lys	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Thr	Leu	Pro	Gln	Ala	Leu	275	280	285	
Pro	Gln	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Ala	Leu	Glu	Ala	Lys	290	295	300	
Thr	Gly	Lys	Leu	His	Gln	Glu	Val	Asn	Leu	Val	Val	Met	Arg	Ala	Thr	305	310	315	320
Gln	Leu	Gln	Lys	Asn	Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Trp	Gly	Pro	Thr	Ser	Pro	325	330	335	
Lys	Leu	Met	Leu	Ser	Leu	Lys	Leu	Glu	Asn	Lys	Glu	Ala	Lys	Val	Ser	340	345	350	
Lys	Arg	Glu	Lys	Pro	Val	Trp	Val	Leu	Asn	Pro	Glu	Ala	Gly	Met	Trp	355	360	365	

Gln	Cys	Leu	Leu	Ser	Asp	Ser	Gly	Gln	Val	Leu	Leu	Glu	Ser	Asn	Ile
	370					375					380				
Lys	Val	Leu	Pro	Thr	Trp	Ser	Thr	Pro	Val	His	Ala	Asp	Pro	Gln	Leu
385					390					395					400
Cys	Tyr	Ile	Leu	Asp	Ala	Ile	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gly	Ile	Val	Leu	Thr
				405					410					415	
Leu	Leu	Tyr	Cys	Arg	Leu	Lys	Ile	Gln	Val	Arg	Lys	Ala	Asp	Ile	Ala
			420					425					430		
Ser	Arg	Glu	Lys	Ser	Asp	Ala	Val	Tyr	Thr	Gly	Leu	Asn	Thr	Arg	Asn
	435						440					445			
Gln	Glu	Thr	Tyr	Glu	Thr	Leu	Lys	His	Glu	Lys	Pro	Pro	Gln		
450						455					460		462		

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 6:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 532 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 6:

Met	Asn	Arg	Gly	Val	Pro	Phe	Arg	His	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Gln	Leu
1				5					10					15	
Ala	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Thr	Gln	Gly	Asn	Lys	Val	Val	Leu	Gly	Lys
			20					25					30		
Lys	Gly	Asp	Thr	Val	Glu	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gln	Lys	Lys	Ser
		35					40					45			
Ile	Gln	Phe	His	Trp	Lys	Asn	Ser	Asn	Gln	Ile	Lys	Ile	Leu	Gly	Asn
	50					55					60				
Gln	Gly	Ser	Phe	Leu	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Lys	Leu	Asn	Asp	Arg	Ala
65					70					75					80
Asp	Ser	Arg	Arg	Ser	Leu	Trp	Asp	Gln	Gly	Asn	Phe	Pro	Leu	Ile	Ile
				85					90					95	
Lys	Asn	Leu	Lys	Ile	Glu	Asp	Ser	Asp	Thr	Tyr	Ile	Cys	Glu	Val	Glu
			100					105					110		
Asp	Gln	Lys	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Val	Phe	Gly	Leu	Thr	Ala	Asn
	115						120					125			
Ser	Asp	Thr	His	Leu	Leu	Gln	Gly	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Thr	Leu	Glu
	130					135					140				
Ser	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Val	Gln	Cys	Arg	Ser	Pro	Arg	Gly
145					150					155					160
Lys	Asn	Ile	Gln	Gly	Lys	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Glu	Leu	
			165					170					175		
Gln	Asp	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr	Cys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Gln	Lys	Lys
			180					185					190		
Val	Glu	Phe	Lys	Ile	Asp	Ile	Val	Val	Leu	Ala	Phe	Gln	Lys	Ala	Ser
		195					200					205			
Ser	Ile	Val	Tyr	Lys	Lys	Glu	Gly	Glu	Gln	Val	Glu	Phe	Ser	Phe	Pro
	210					215					220				
Leu	Ala	Phe	Thr	Val	Glu	Lys	Leu	Thr	Gly	Ser	Gly	Glu	Leu	Trp	Trp
225					230					235					240
Gln	Ala	Glu	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser	Trp	Ile	Thr	Phe	Asp	Leu
				245					250					255	
Lys	Asn	Lys	Glu	Val	Ser	Val	Lys	Arg	Val	Thr	Gln	Asp	Pro	Lys	Leu
			260					265					270		
Gln	Met	Gly	Lys	Lys	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Thr	Leu	Pro	Gln	Ala	Leu
	275						280					285			
Pro	Gln	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Ala	Leu	Glu	Ala	Lys
290						295					300				

Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr
 305 310 315 320
 Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro
 325 330 335
 Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser
 340 345 350
 Lys Arg Glu Lys Pro Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp
 355 360 365
 Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile
 370 375 380
 Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val His Ala Asp Pro Lys Leu
 385 390 395 400
 Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr
 405 410 415
 Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala
 420 425 430
 Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
 435 440 445
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
 450 455 460
 Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 465 470 475 480
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 485 490 495
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 500 505 510
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 515 520 525
 Leu Pro Pro Arg
 530

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 33 основания
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 7:

CGCGGGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGC

33

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 8:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 50 оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 8:

CGCGGGGATC CGTCGTCCAG AGCCCGTCCA GCTCCCCGTC CTGGGCCTCA 50

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 9:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 33 основания
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 9:

CGCGGGCGGC CGCGACGCCG GCSAAGACAG CAC 33

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 10:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 33 основания
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 10:

CGCGTTGACG AGCAGCCAGT TGGGCAGCAG CAG 33

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 11:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 15 оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 11:

CGCGGGCGGC CGCTA 15

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 12:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 42 основания
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 12:

CGCGGGCTCG TTATAGAGCT GGTTCSTGGCG CTGCTTCTTC TG
(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 13:

42

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 48 оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 13:

CGCGGGGAGC TCGTTATAGA GCTGGTTTGC CGCCGAATTC TTATCCCG

48

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 14:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 33 основания
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 14:

CGCGGGGCGG CCACGCGTCC TCGCCAGCAC ACA

33

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 15:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 36 оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 15:

CGCGGGACGC GTTTCAGCCG TCSTCGCCAG CACACA

36

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 16:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 33 основания
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 16:

CGCGGGACGC GTGACCSTGA GATGGGGGGA AAG

33

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 17:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 33 основания
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 17:

CGCGGGACGC GTATTGGGAT GAAAGGCGAG CGC

33

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 18:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 26 оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 18:

CCCGGATCCC AGCATGGGCA GCTCTT

26

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 19:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 42 основания
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 19:

CGCGGGGCGG CCGCTTTAGT ТАТТАСТГТТ GACATGGTCG TT

42

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 20:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 30 оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 20:

GCGGGGGGAT CCCACTGTCC AAGSTCCCAG

30

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 21:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 32 основания
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 21:

GCGGGGGCGG CCGCСТАААТ ACGGTTCTGG TC

32

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 22:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 31 основание
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 22:

TCAGAAAGAG ACAACCTGAA GAAACCAACA A

31

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 23:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 31 основание
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) Одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: нуклеиновая кислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 23:

TTGTTGGTTT CTTCAAGGTG TGTCTTTCTG A

31

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 24:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 171 аминокислота

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: аминокислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 24:

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

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 25:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 182 аминокислоты

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: аминокислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 25:

Met	Glu	Gln	Gly	Lys	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Ala	Ile	Ile	Leu			
			5						10					15				

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

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 26:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 220 аминокислот
 (B) ТИП: аминокислота
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: аминокислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 26:

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

Lys	Arg	Trp	Gln	Asn	Glu	Lys	Phe	Gly	Val	Asp	Met	Pro	Asp	Asp	Tyr
				165					170					175	
Glu	Asp	Glu	Asn	Leu	Tyr	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Asp	Asp	Cys	Ser	Met
			180					185					190		
Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Arg	Gly	Leu	Gln	Gly	Thr	Tyr	Gln	Asp	Val	Gly
			195				200					205			
Asn	Leu	His	Ile	Gly	Asp	Ala	Gln	Leu	Glu	Lys	Pro				
	210					215					220				

(2) СВЕДЕНИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 27:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 228 аминокислот

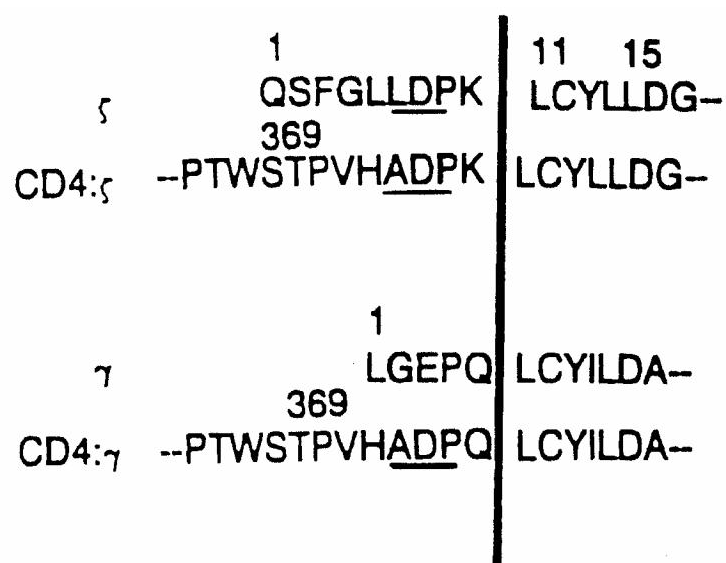
(В) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

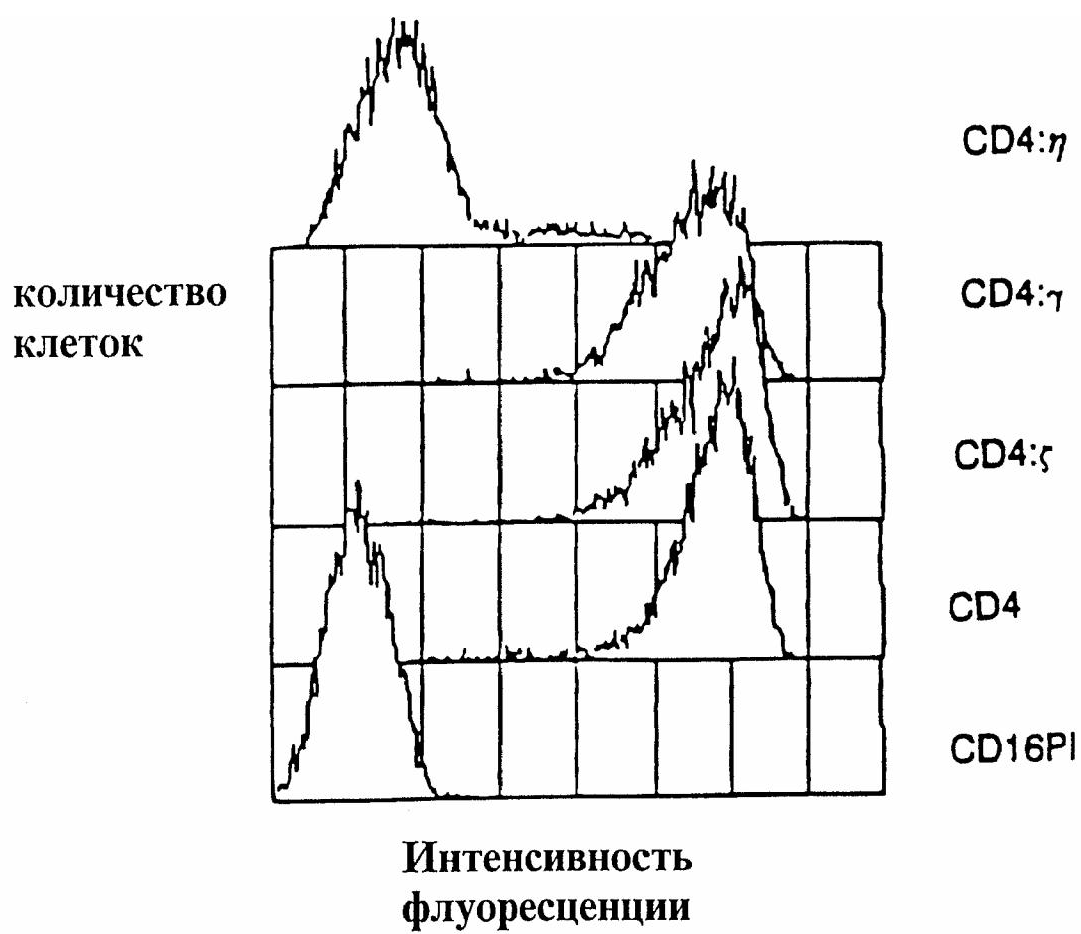
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: аминокислота

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ № 27:

[illegible]

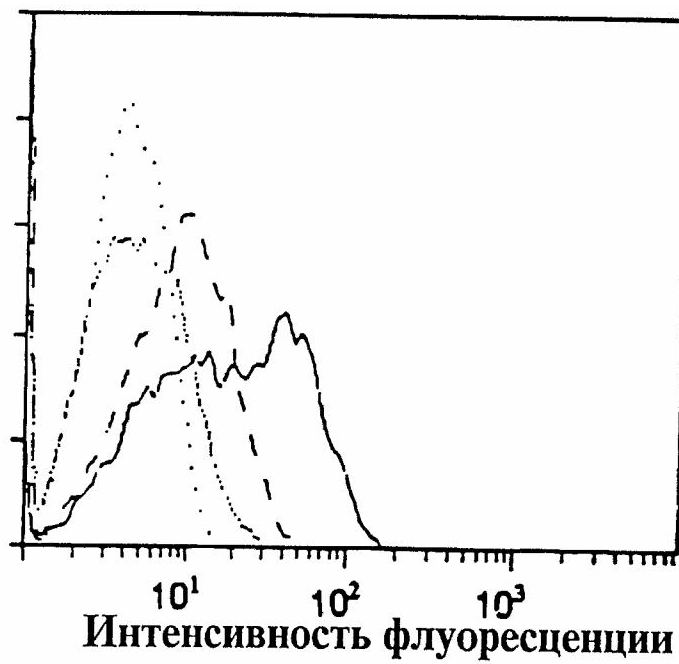


Фиг. 1a



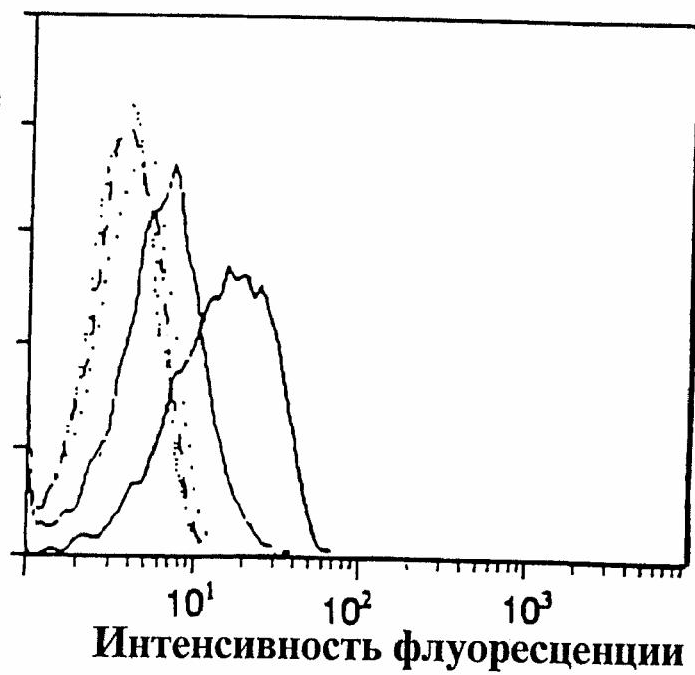
Фиг. 1b

относительное
количество
клеток

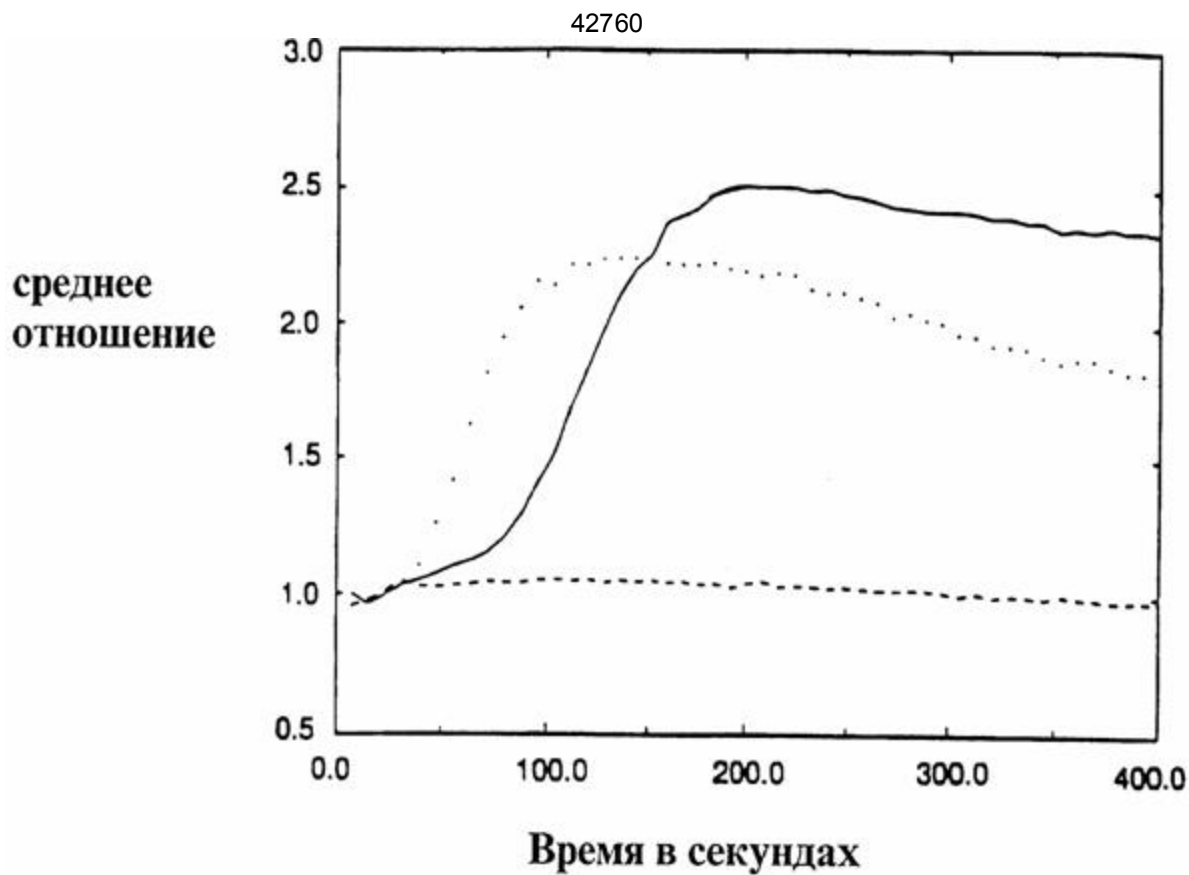


Фиг. 2

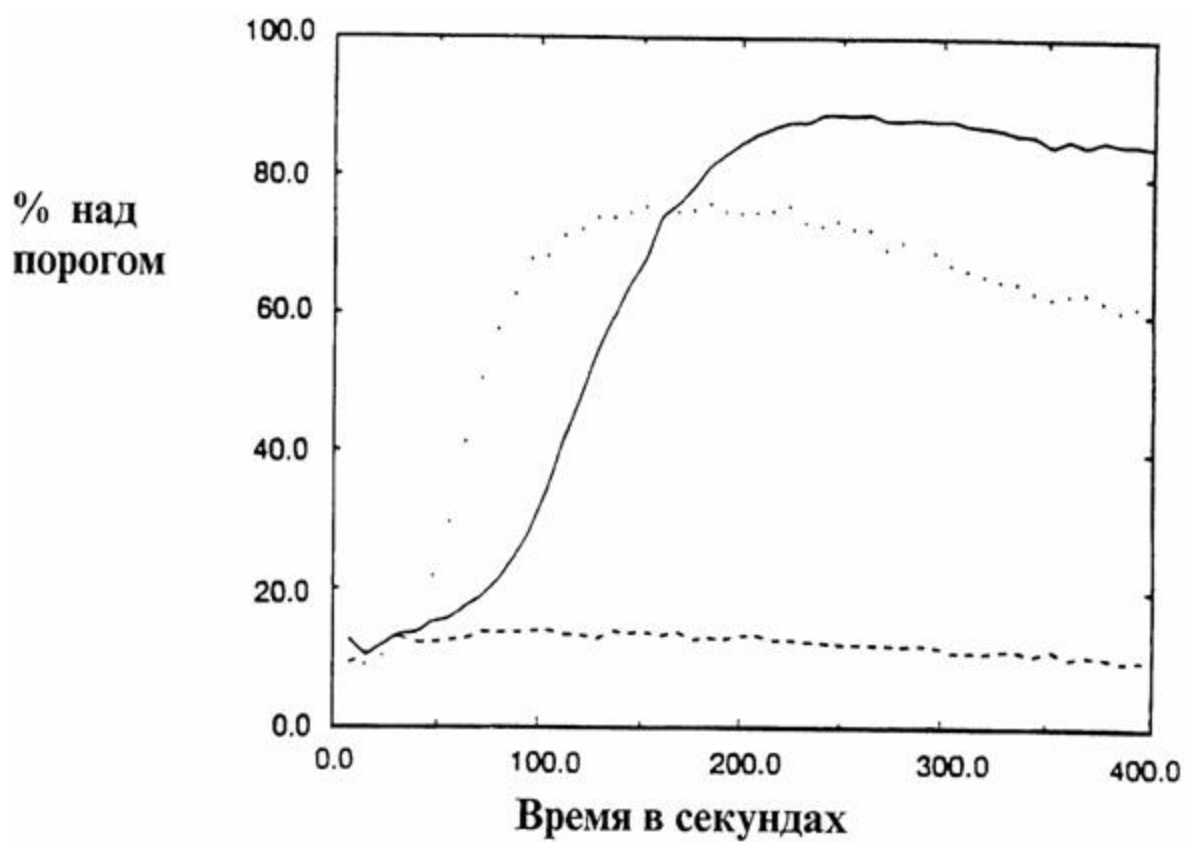
относительное
количество
клеток



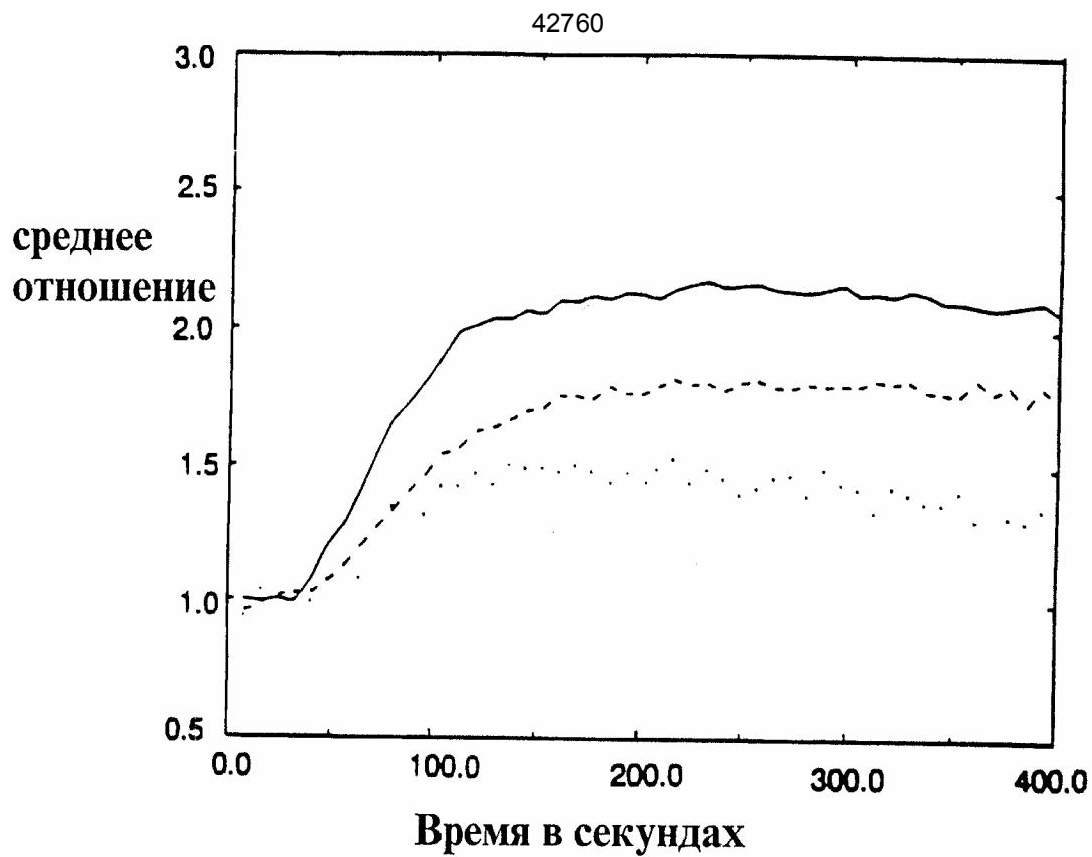
Фиг. 3



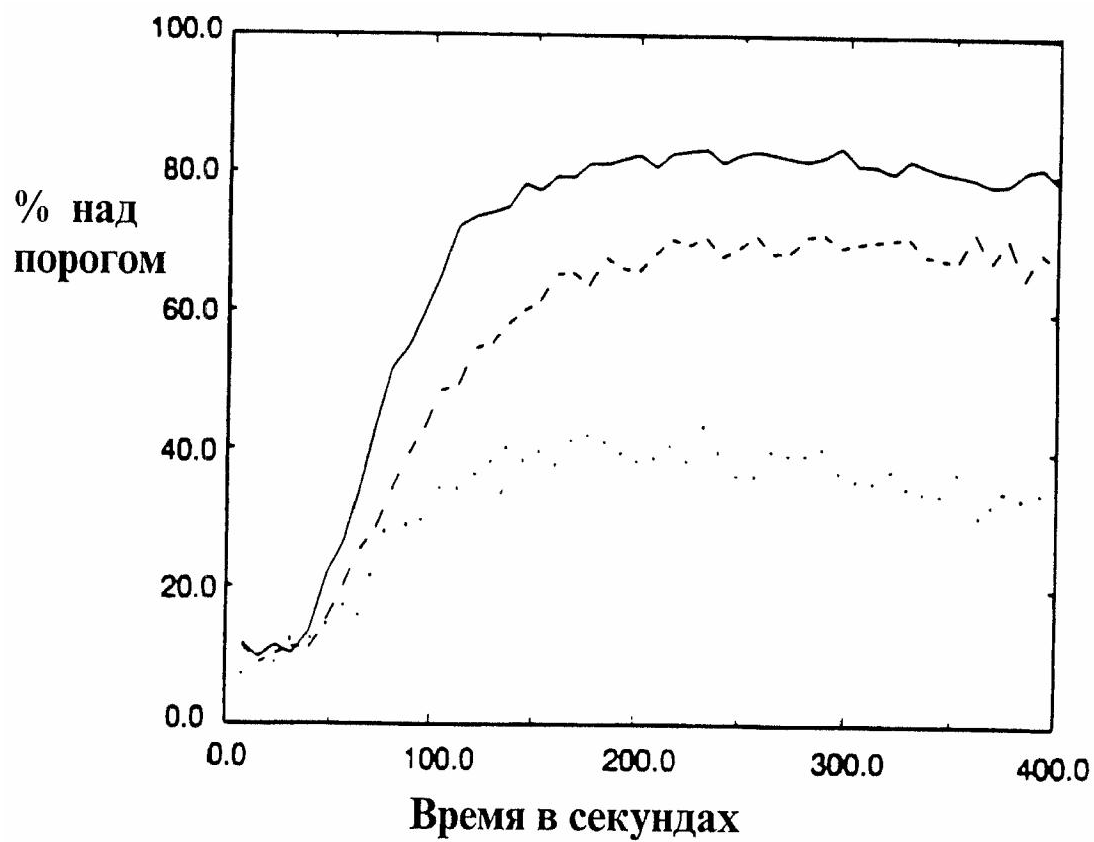
Фиг. 4а



Фиг. 4b

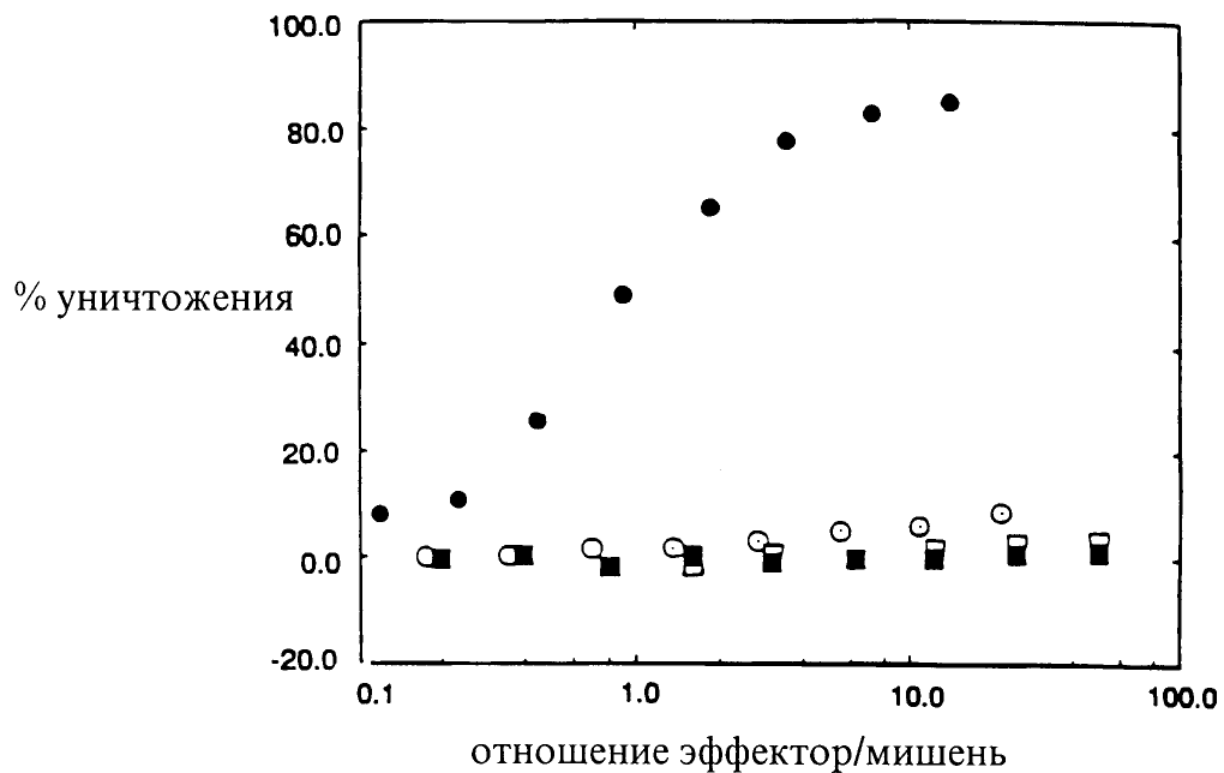


Фиг. 4с

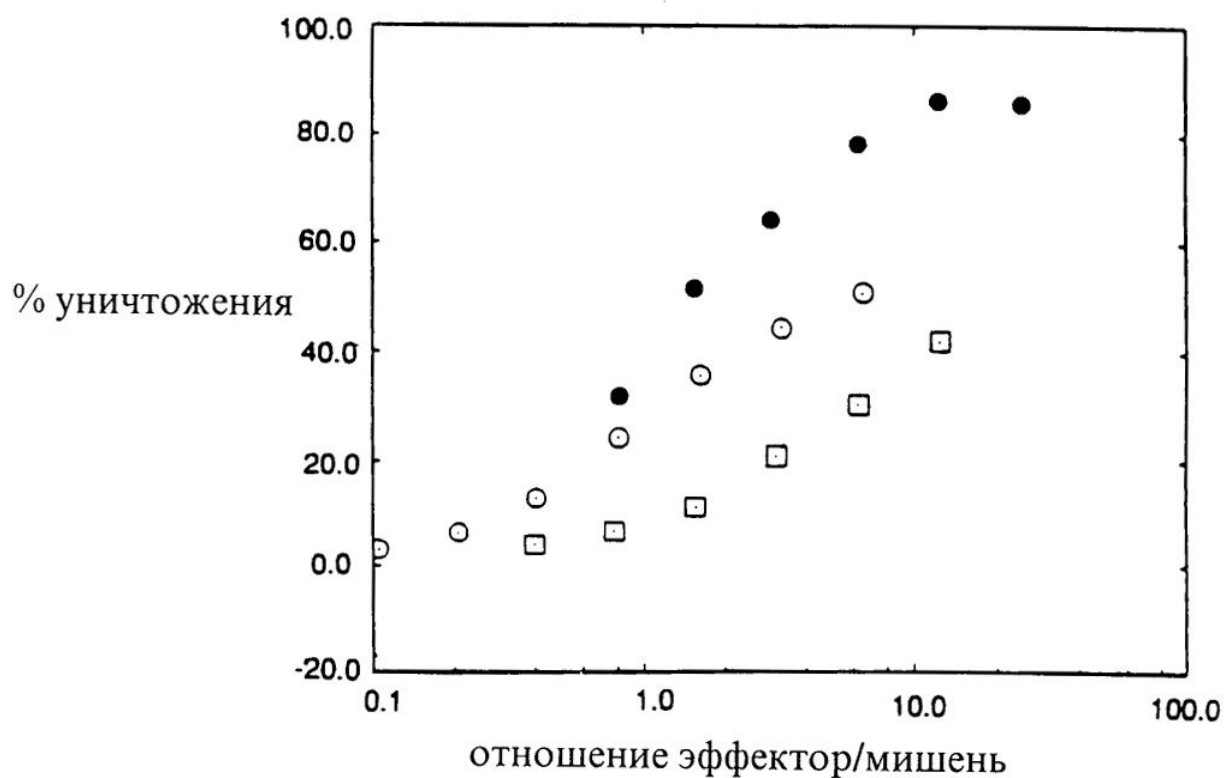


Фиг. 4d

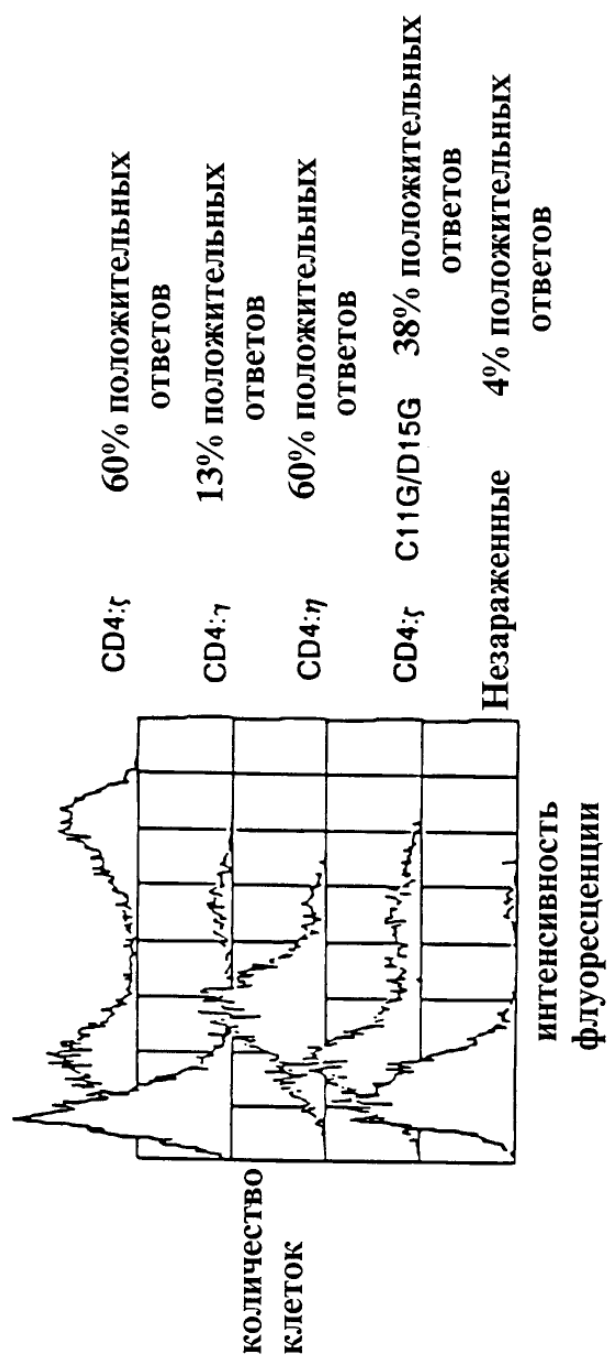
42760



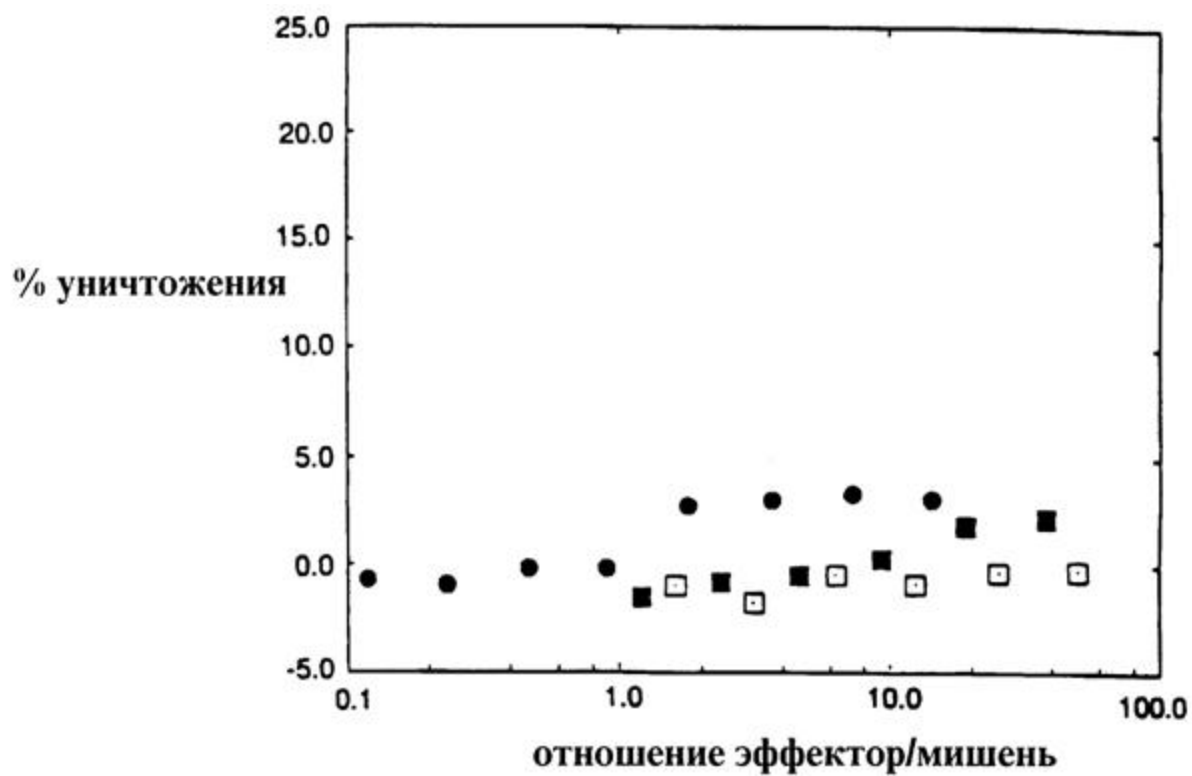
Фиг. 5а



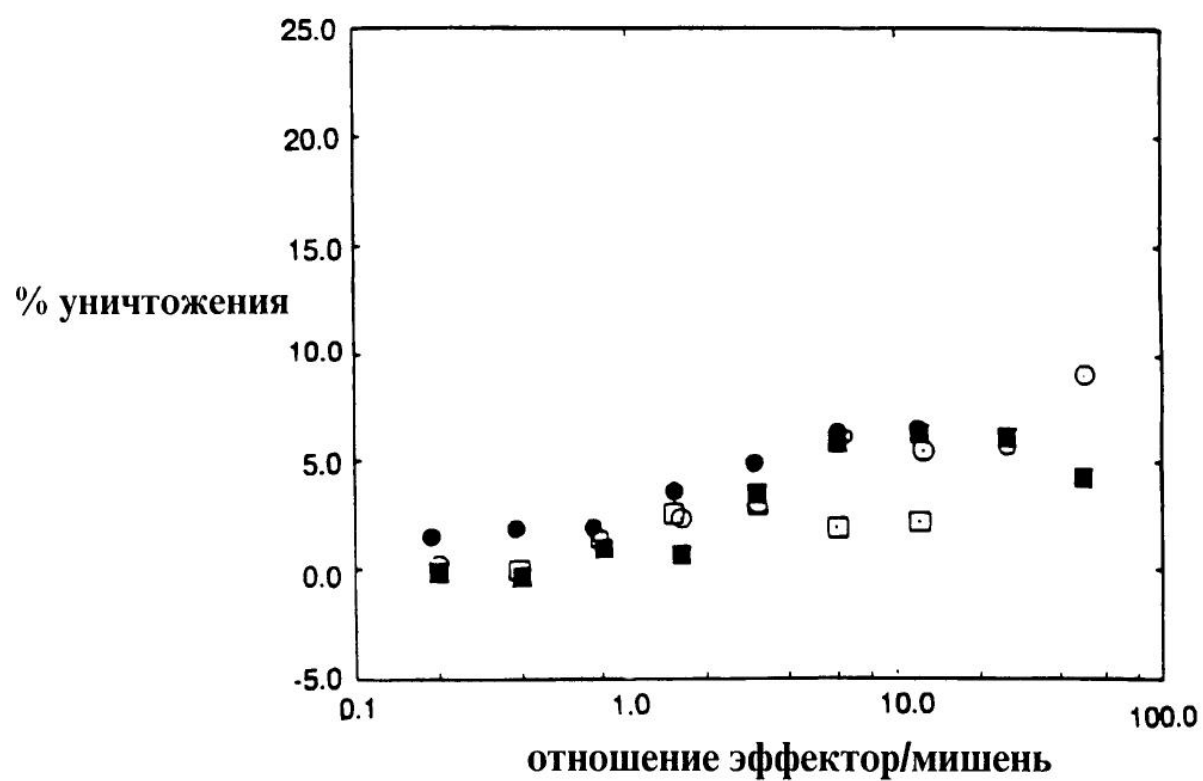
Фиг. 5b



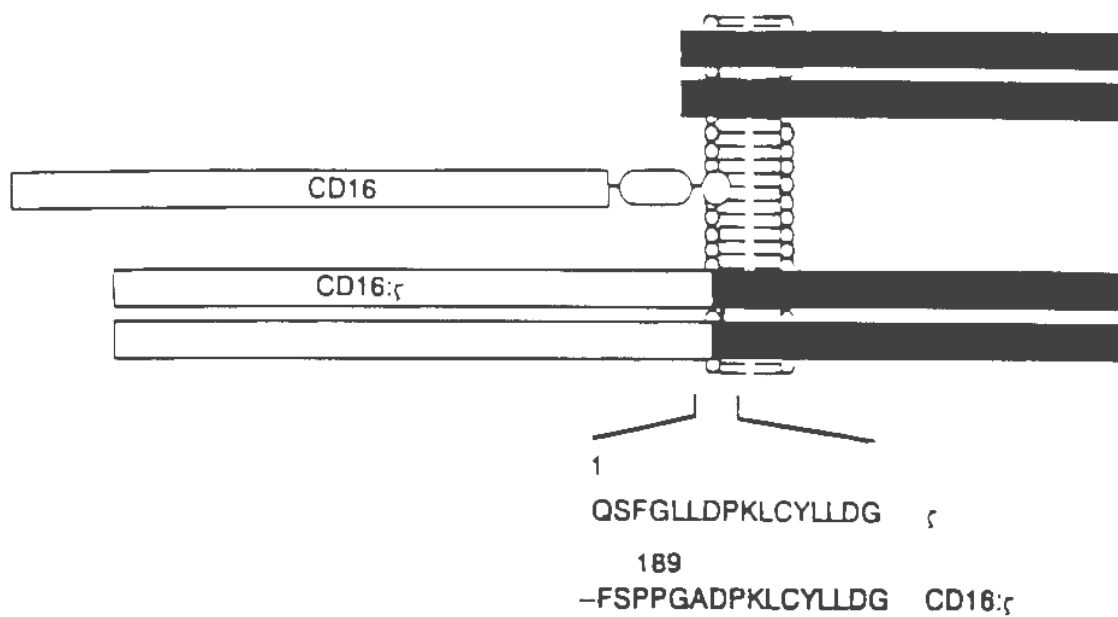
Фиг. 5с



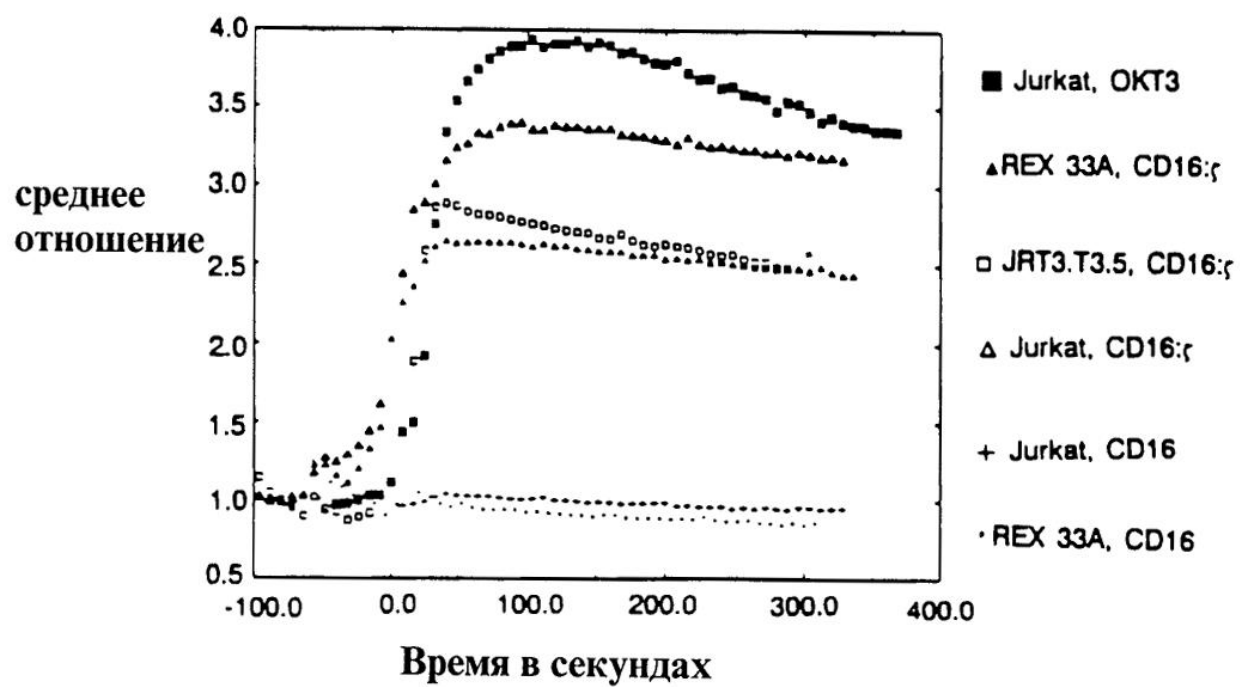
Фиг. 6а



Фиг. 6б



Фиг. 7a

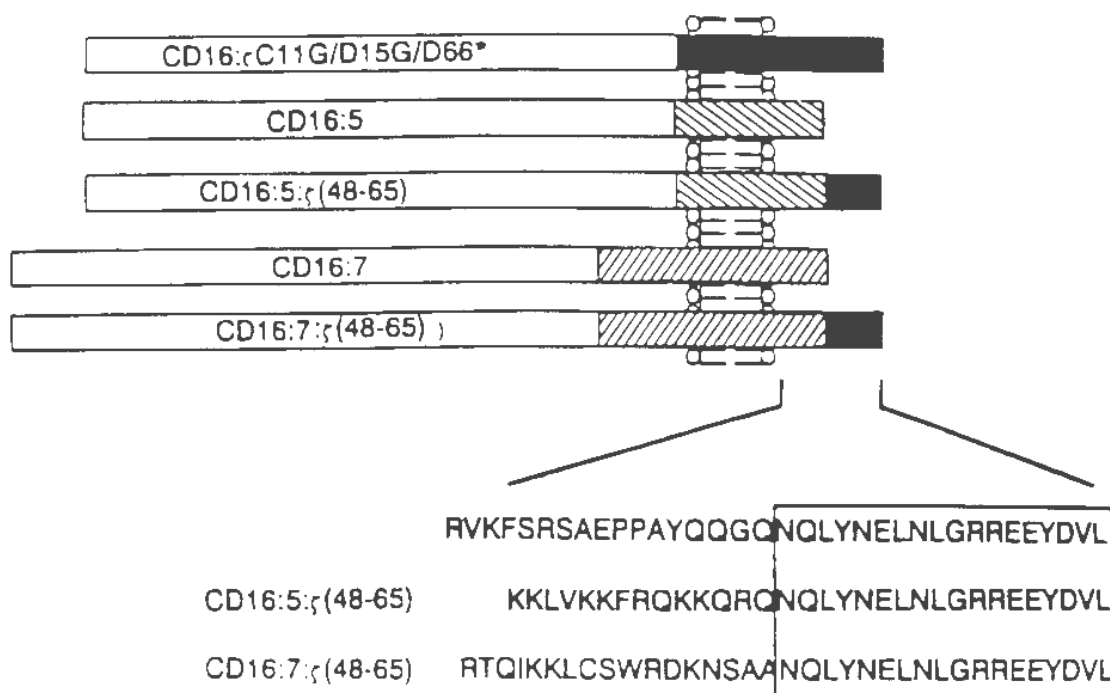


Фиг. 7b

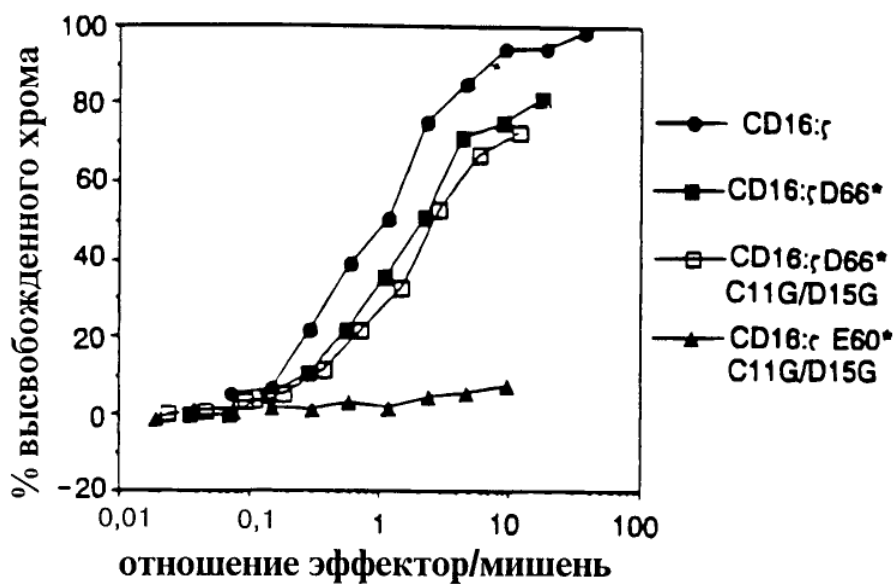
отношение эфektor/мишень	CD16:ζ	CD16:ζ D66*	CD16:ζ E60*	CD16:ζ Y51*	CD16:ζ F34*	CD16
0,1	0	0	-2	0	0	0
1	10	10	2	0	0	0
10	55	55	22	10	5	5
100	62	60	45	25	25	5

Фиг. 8b

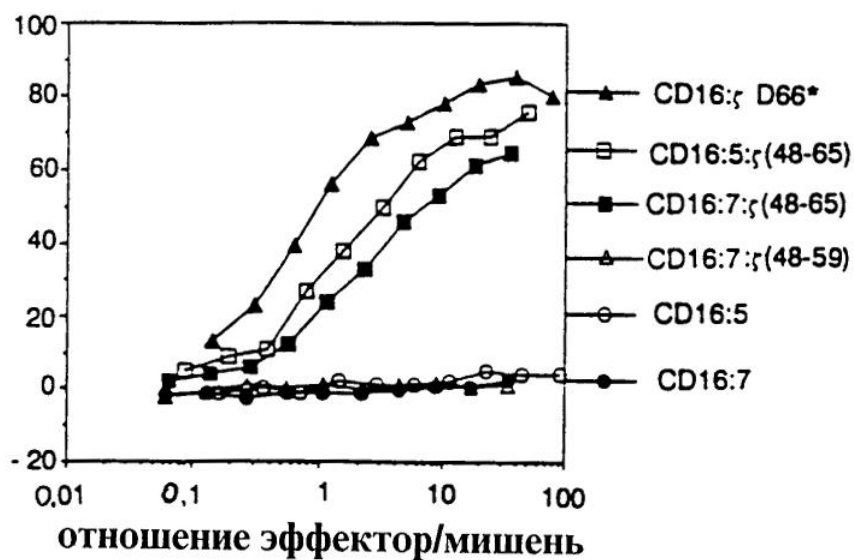
42760



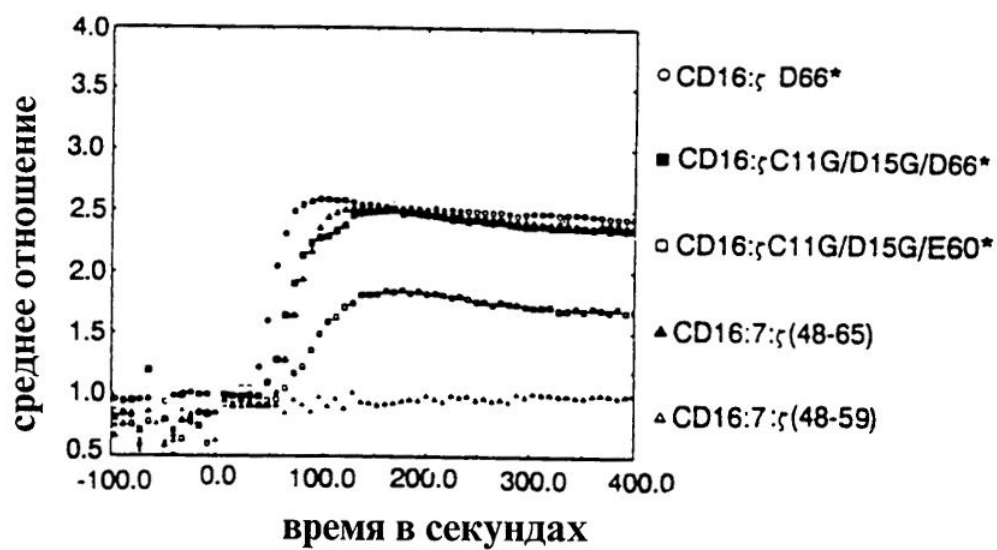
Фиг. 9а



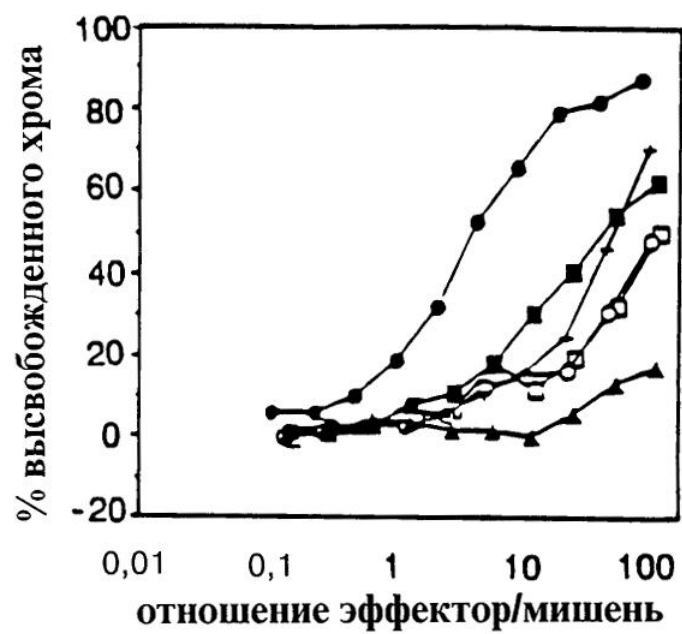
Фиг. 9b



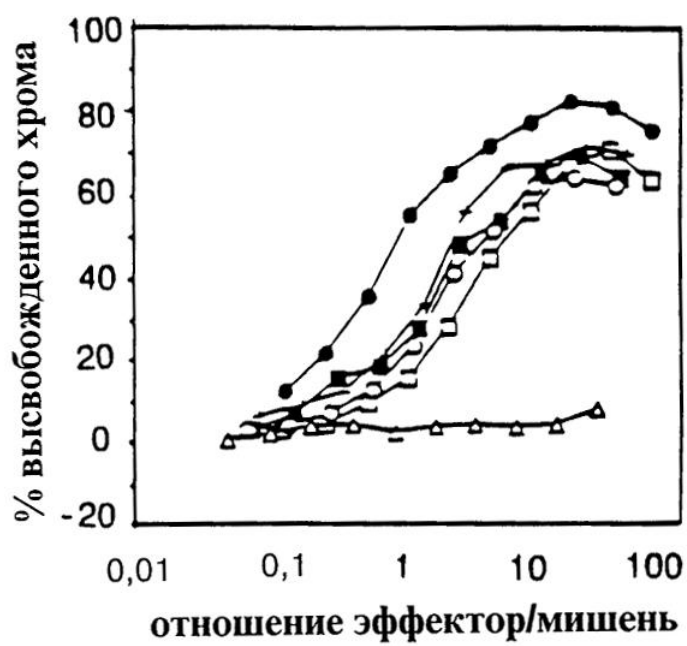
Фиг. 9с



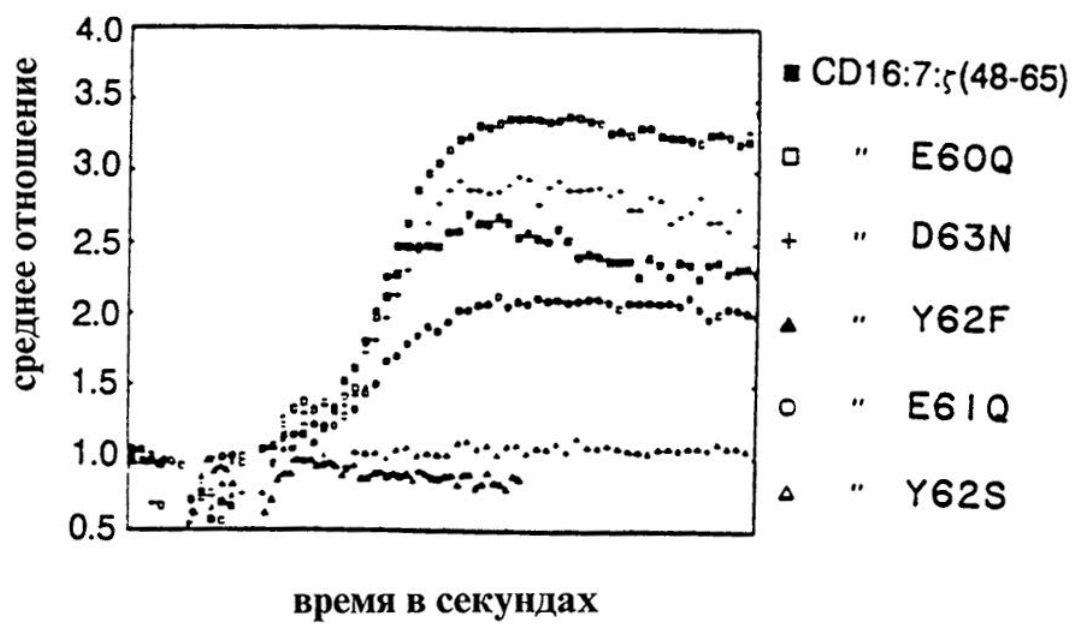
Фиг. 9d



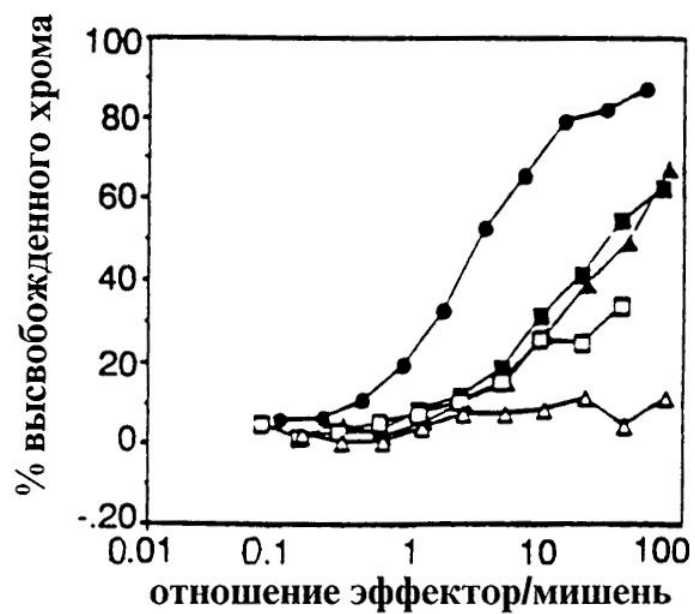
Фиг. 10а



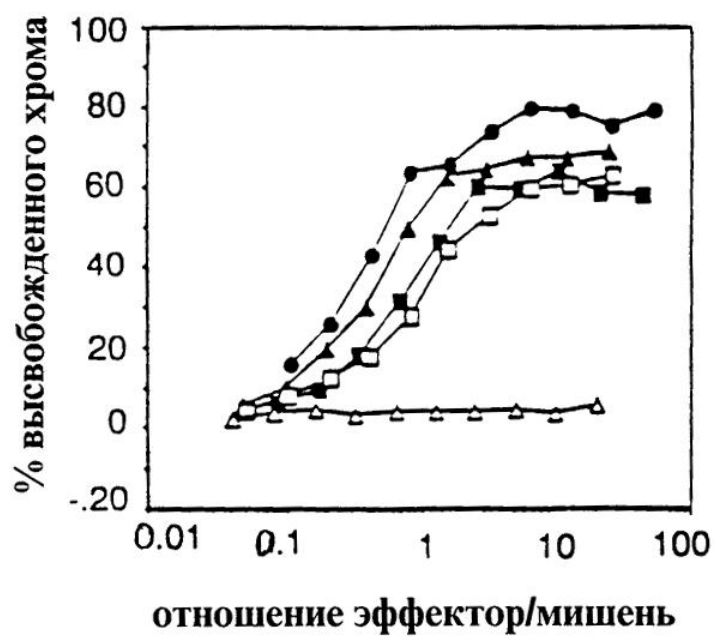
Фиг. 10б



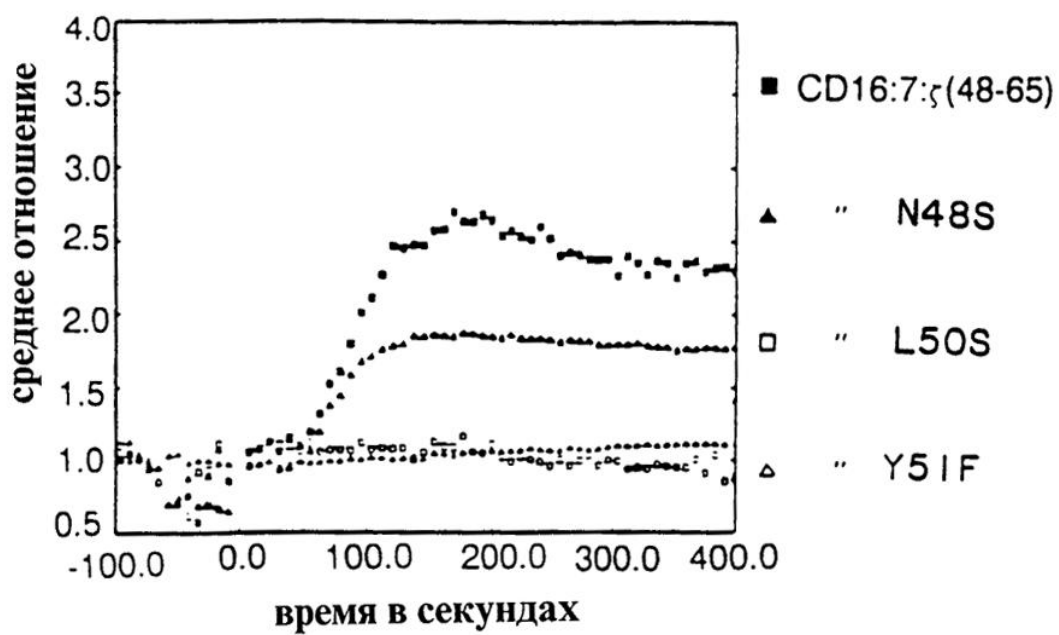
Фиг. 10с



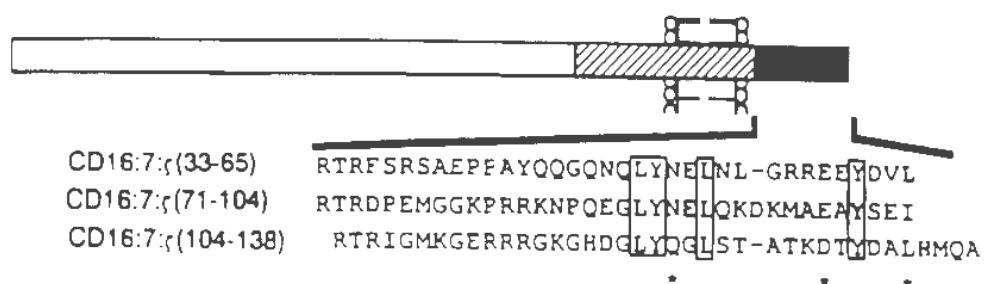
Фиг. 10d



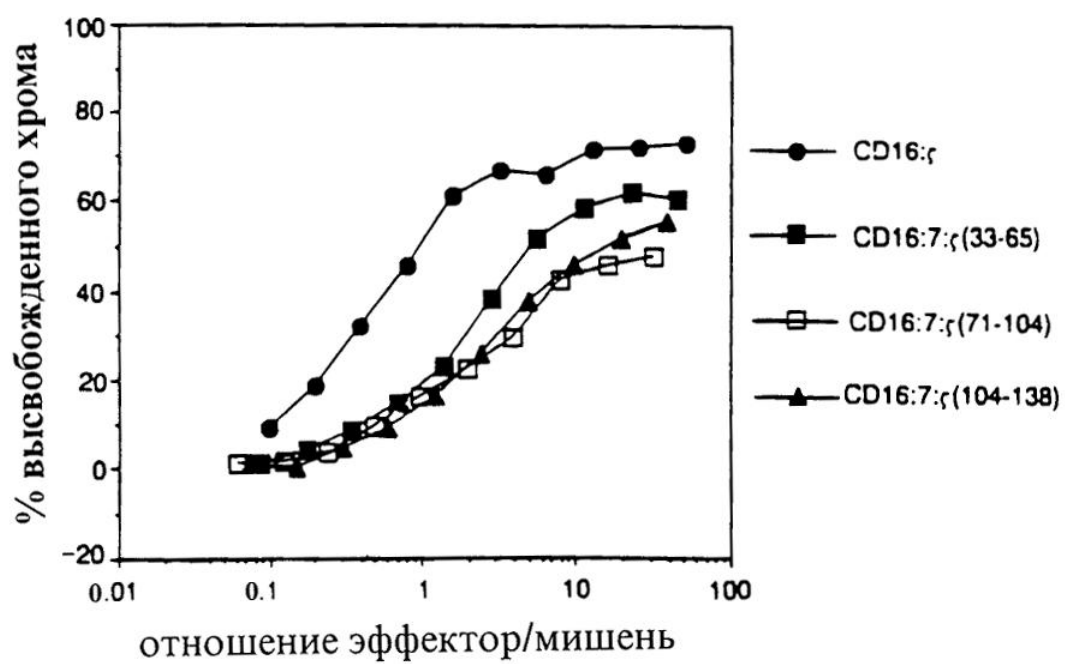
Фиг. 10е



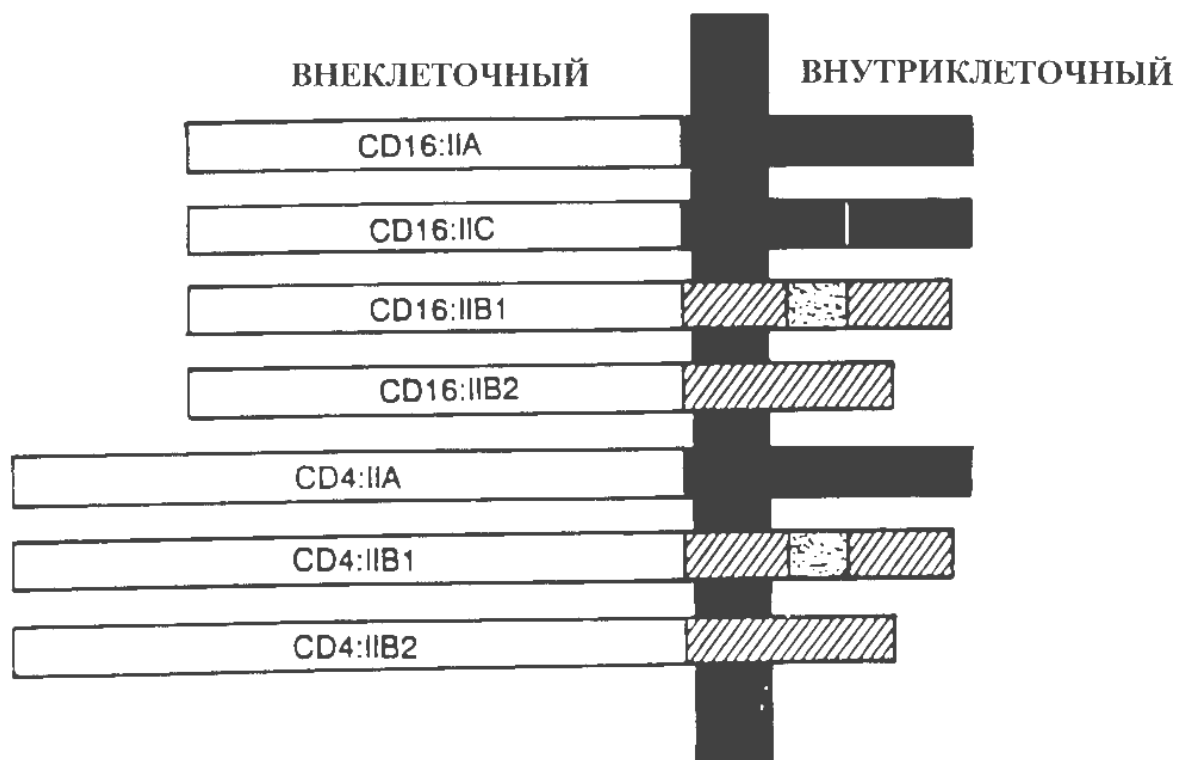
Фиг. 10f



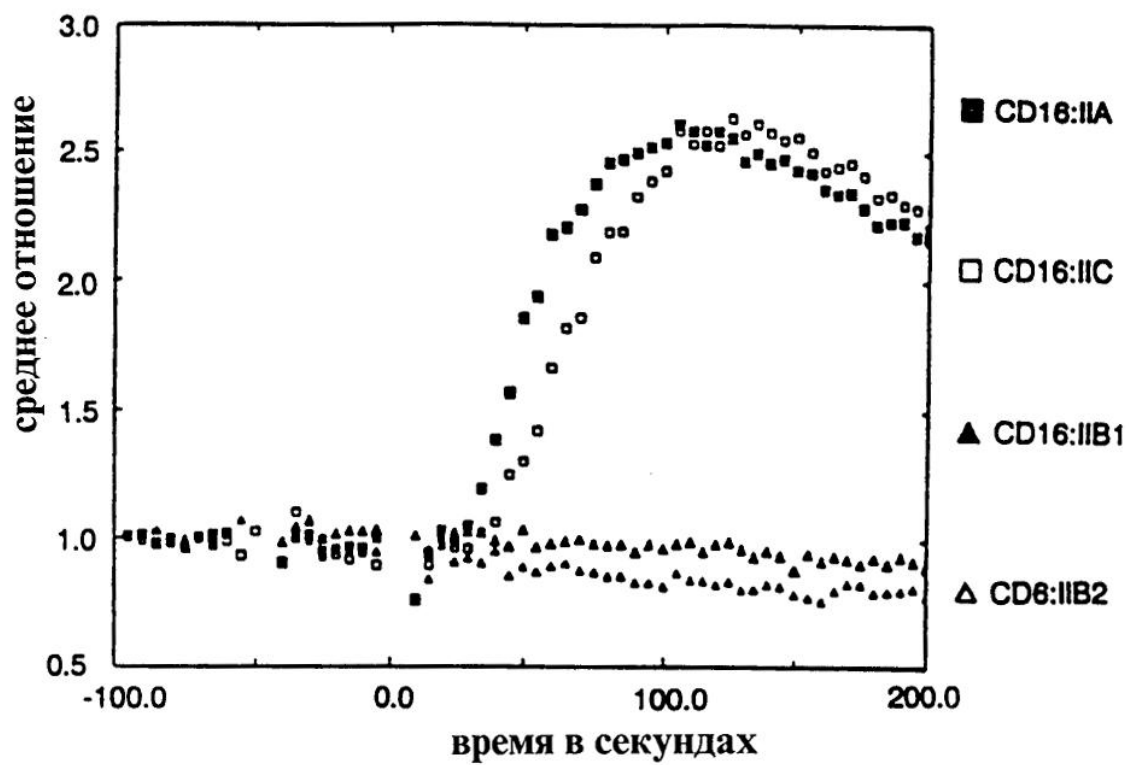
Фиг. 11а



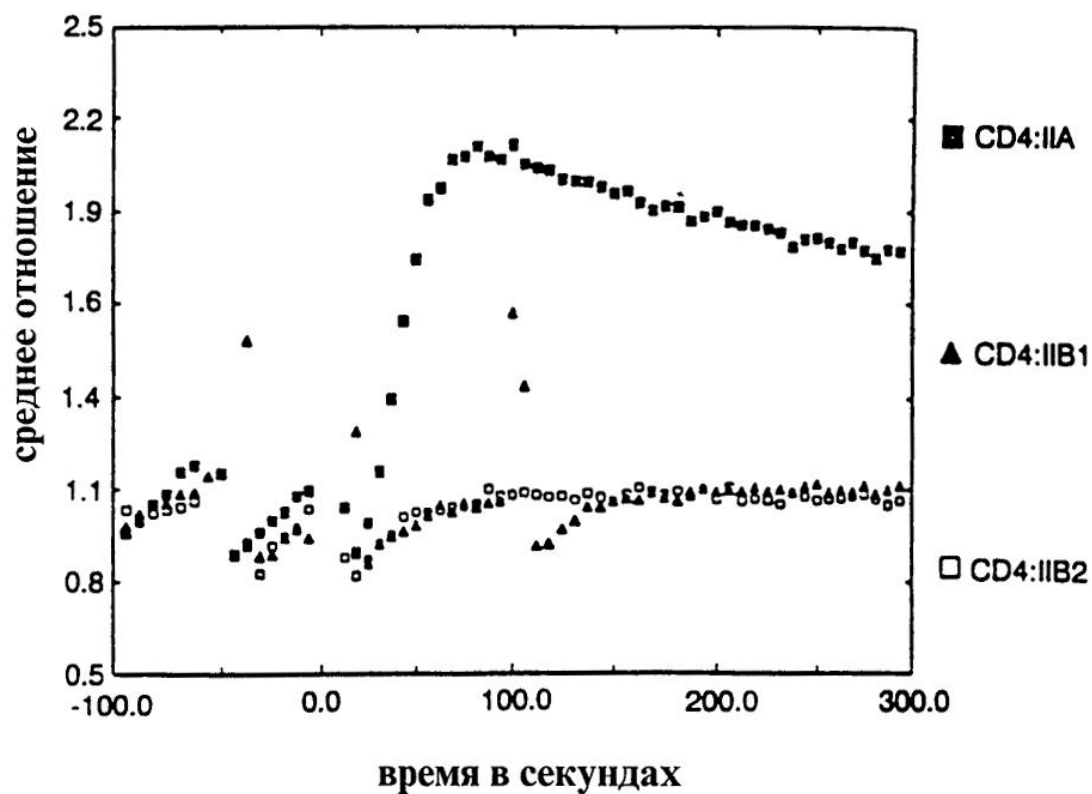
Фиг. 11b



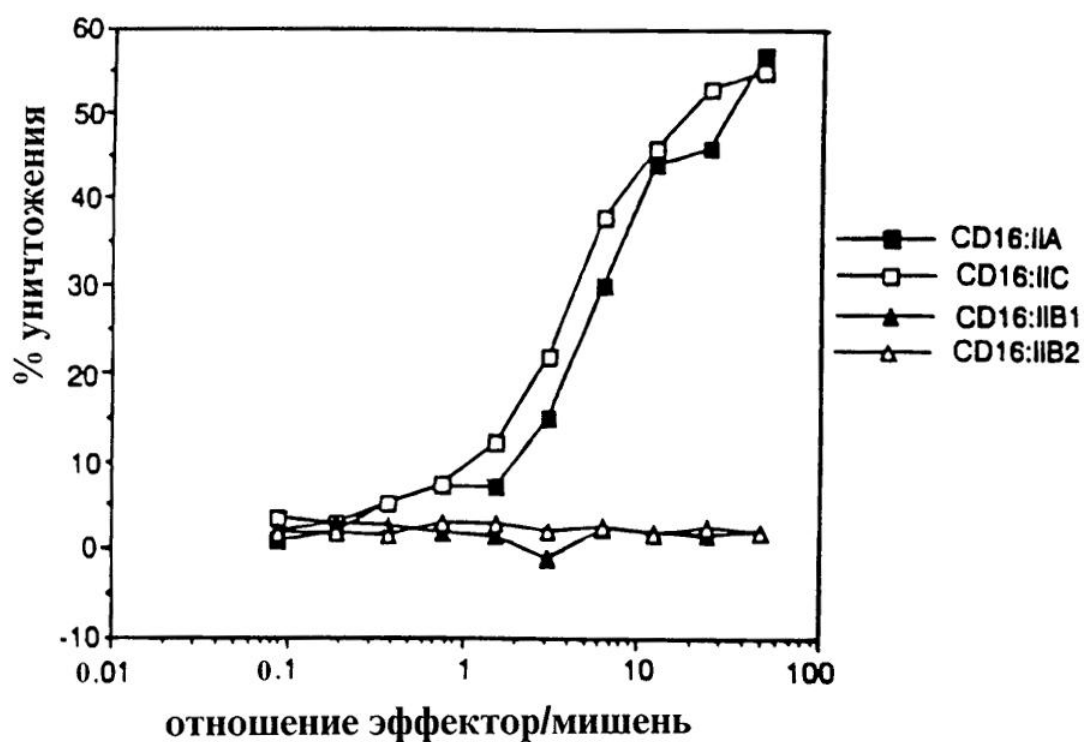
Фиг. 12



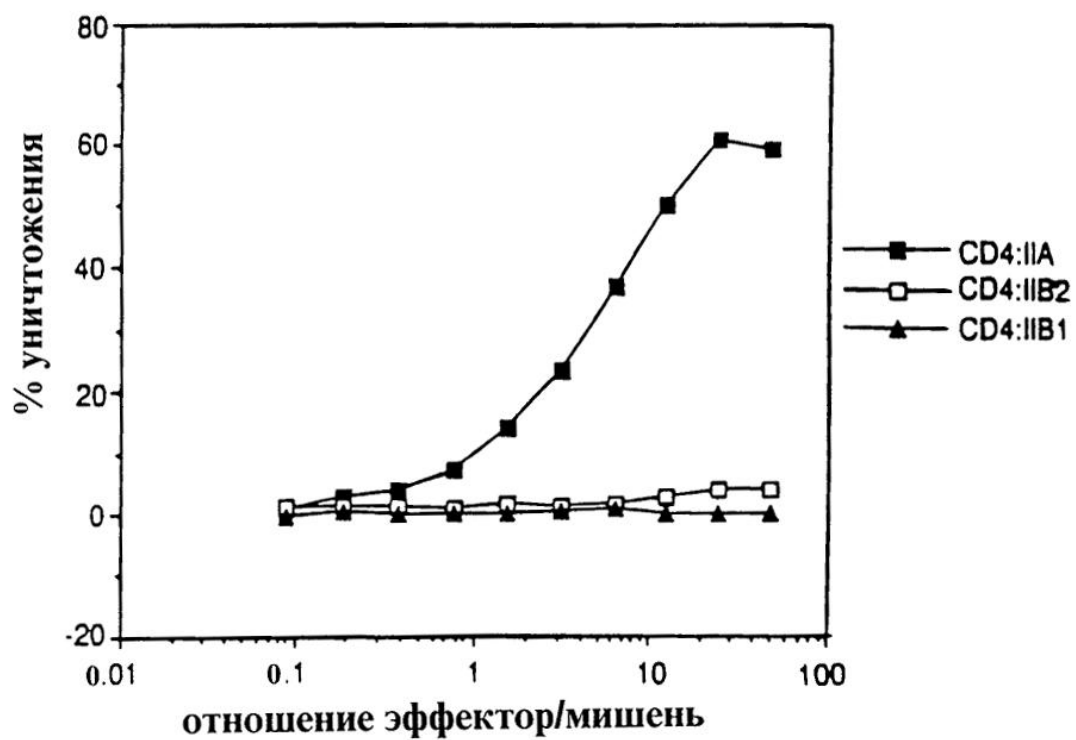
Фиг. 13а



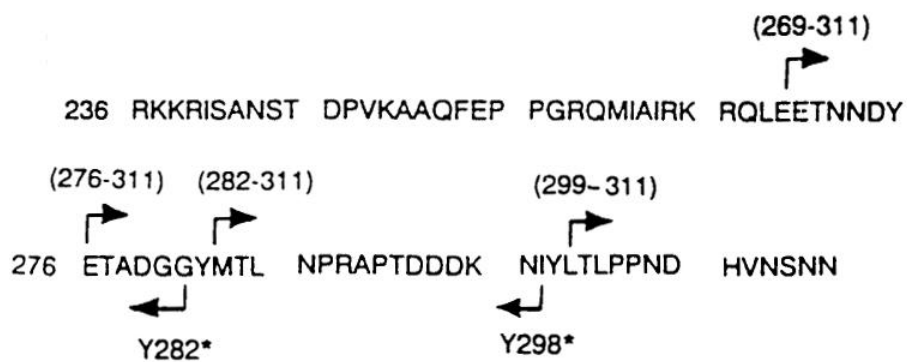
Фиг. 13b



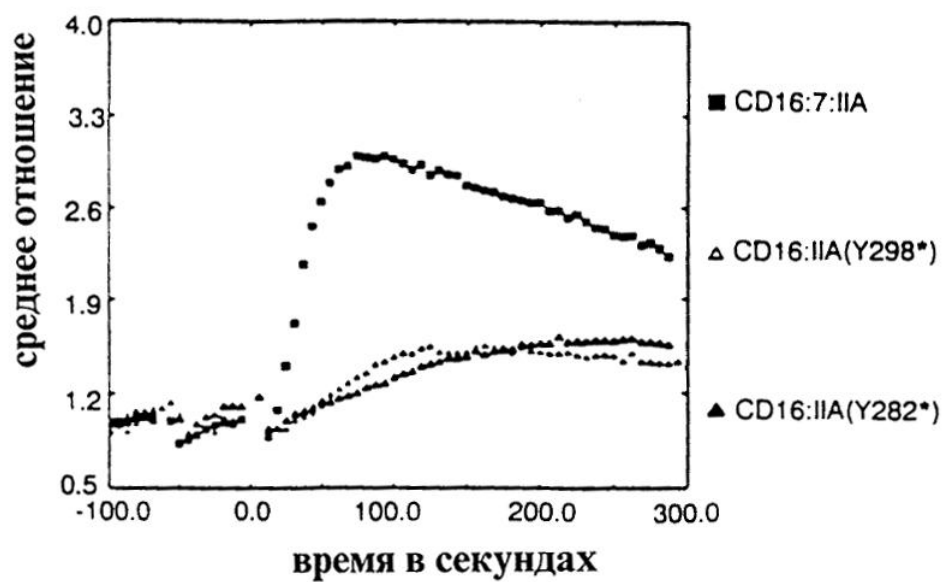
Фиг. 14a



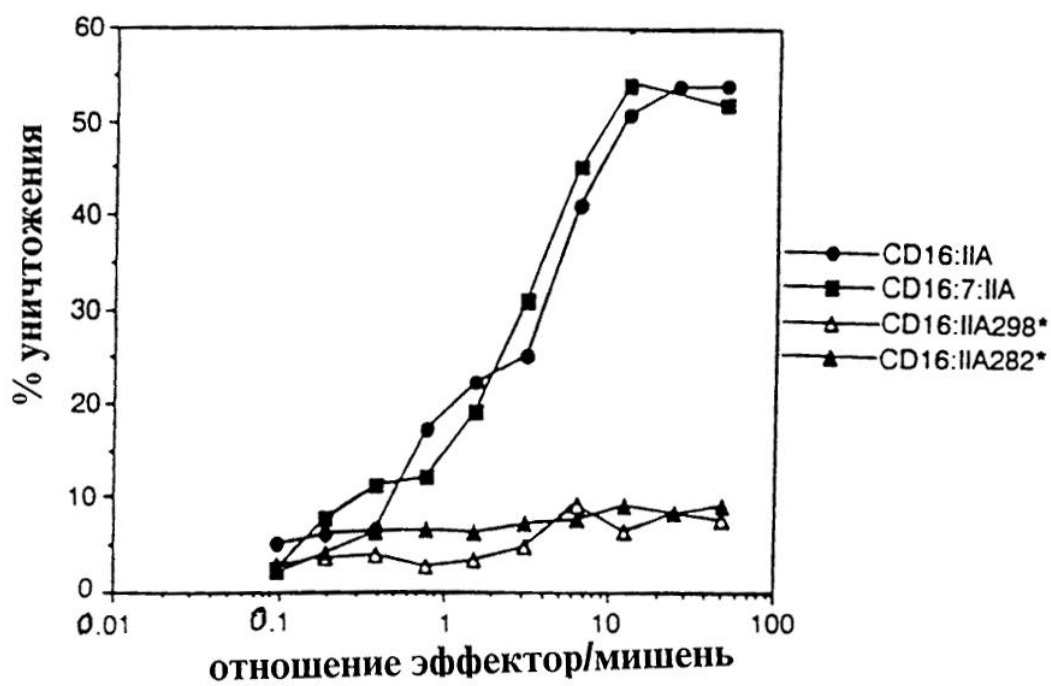
Фиг. 14b



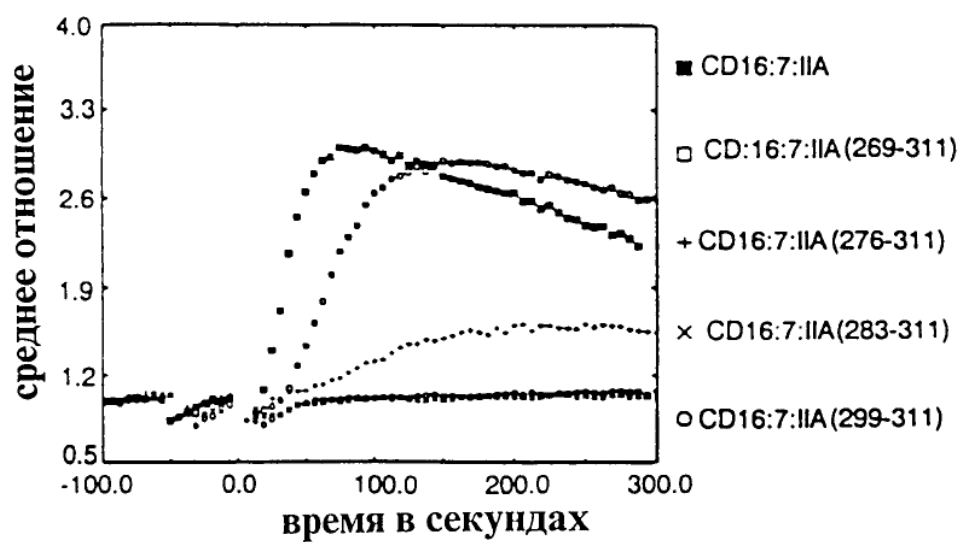
Фиг. 15a



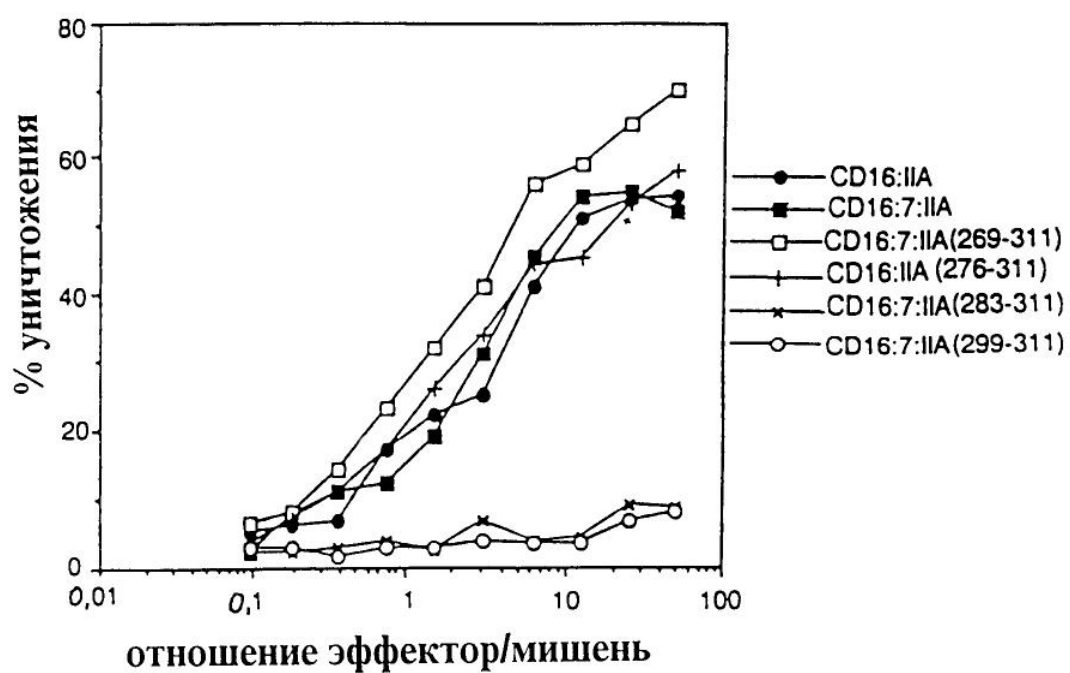
Фиг. 15b



Фиг. 15с



Фиг. 15d



Фиг. 15е

```

1   MEHSTFLSGL  VLATLLSQVS  PFKIPIEELE  DRVFNVCNTS  ITWVEGTVGT
51  LLSGITRLDL  GKRILDPRGI  YRCNGTDIYK  DKESTVQVHY  RMCQSCVELD
101 PATVAGIIVT  DVIATLLLAL  GVFCFAGHET  GRLSGAADTQ  ALLRNDQVYQ
151 PLRDRDDAQY  SHLGGNWARN  K*

```

Последовательность № 24

Фиг. 16

```

1   MEQGKGLAVL  ILAIILLQGT  LAQSIKGNHL  VKVYDYQEDG  SVLLTCDAEA
51  KNITWFKDGK  MIGFLTEDKK  KWNLGSKAKD  PRGMYQCKGS  QNKSKPLQVY
101 YRMCQNCIEL  NAATISGFLF  AEIVSIFVLA  VGVYFIAGQD  GVRQSRASDK
151 QTLLPNDQLY  QPLKDREDDQ  YSHLQGNQLR  RN*

```

Последовательность № 25

Фиг. 17

```

1   MPGGLEALRA  LPLLLFLSYA  CLGPGCQALR  VEGGPPSLTV  NLGEEARLTC
51  ENNGRNPNT  WWFSLQSNIT  WPPVPLGPGQ  GTTGQLFFPE  VNKNTGACTG
101 CQVIENNILK  RSCGTYLRVR  NPVPRPFLOM  GEGTKNRIIT  AEGIIILLFCA
151 VVPGTLLFR  KRWQNEKFGV  DMPDDYEDEN  LYEGLNLDDC  SMYEDISRGL
201 QGTYYQDVGNL  HIGDAQLEKP  *

```

Последовательность № 26

Фиг. 18

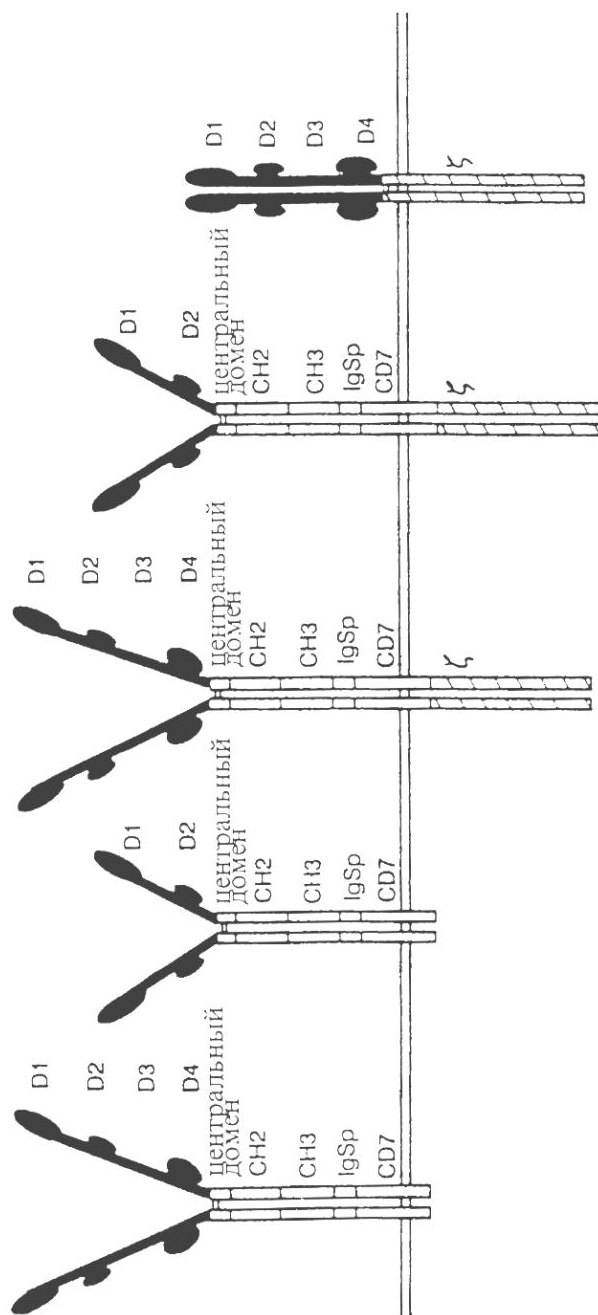
```

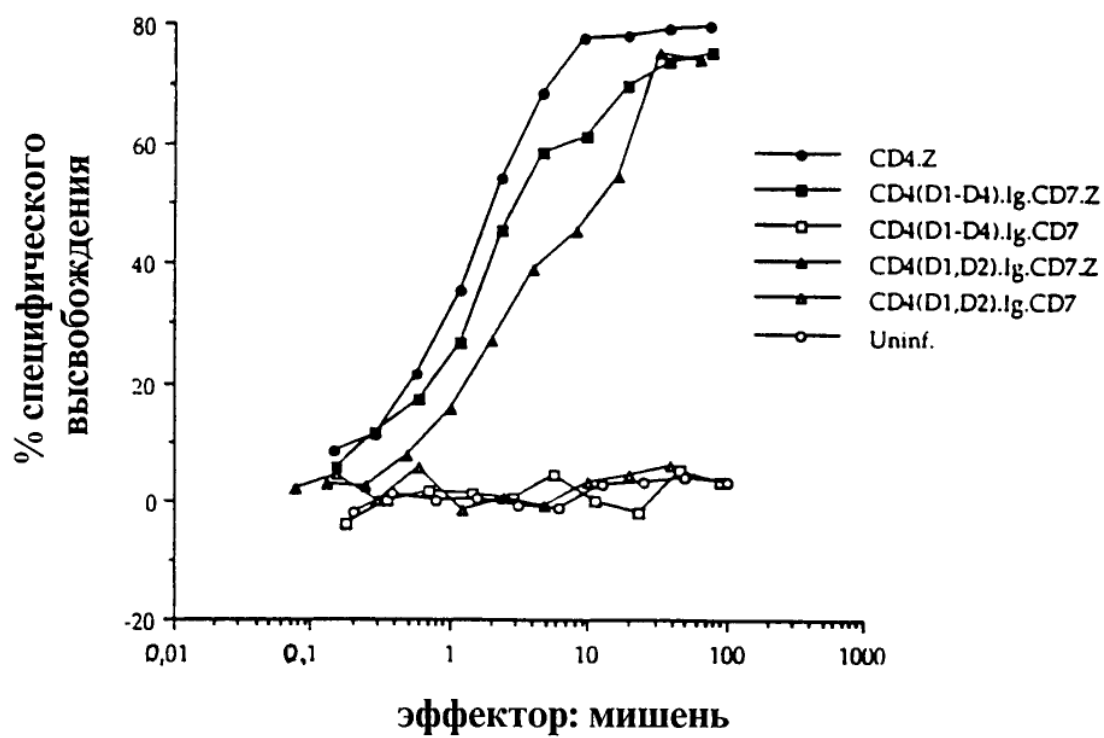
1   MATLVLSMP  CHWLLFLLLL  FSGEPVPAMT  SSDLPLNFQG  SPCSQIWQHP
51  RFAAKKRSSM  VKFHCYTNHS  GALTWFRKRG  SQQPQELVSE  EGRIVQTQNG
101 SVYTLTIQNI  QYEDNGIYFC  KQKCDSANHN  VTDSCGTELL  VLGFTSLDQL
151 KRRNTLKDGI  ILIQTLLIIL  FIIVPIFLLL  DKDDGKAGME  EDHTYEGLNI
201 DQTATYEDIV  TLRTGEVKWS  VGEHPGQE*

```

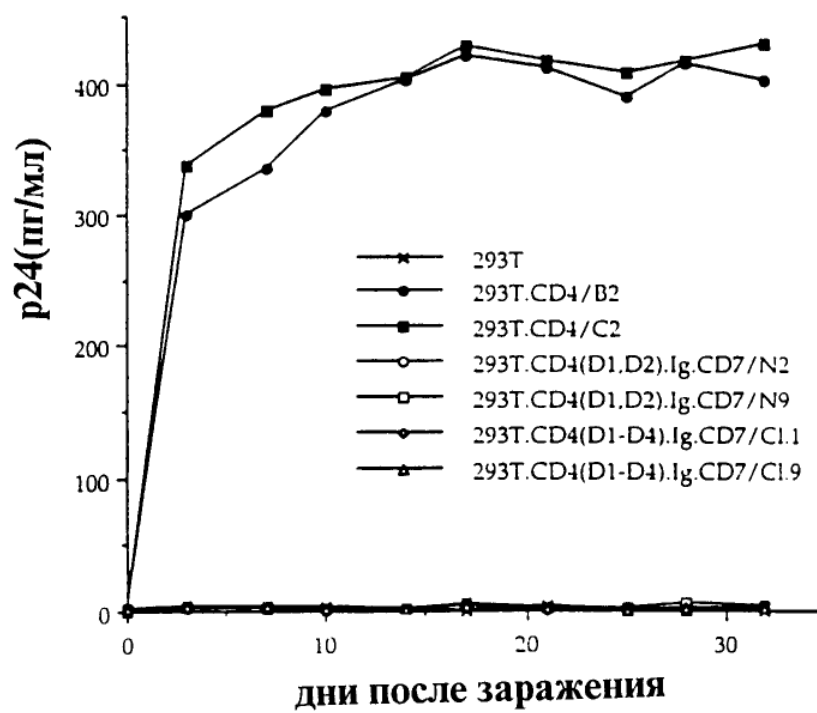
Последовательность № 27

Фиг. 19

Фиг.
20eФиг.
20dФиг.
20cФиг.
20bФиг.
20a



Фиг. 21



Фиг. 22

Последовательность нуклеиновых кислот

GCCTGTTTGA	GAAGCAGCGG	GCAAGAAAGA	CGCAAGCCCA	GAGGCCCTGC	51
CATTTCTGTG	GGCTCAGGTC	CCTACTGGCT	CAGGCCCTTG	CCTCCCTCGG	101
CAAGGCCACA	ATGAACCGGG	GAGTCCCTTT	TAGGCACTTG	CTTCTGGTGC	151
TGCAACTGGC	GCTCCTCCCA	GCAGCCACTC	AGGGAAACAA	AGTGGTGCTG	201
GGCAAAAAAG	GGGATACAGT	GGAAGTGAAC	TGTACAGCTT	CCCAGAAGAA	251
GAGCATACAA	TTCCACTGGA	AAAACTCCAA	CCAGATAAAG	ATTCTGGGAA	301
ATCAGGGCTC	CTTCTTAACT	AAAGGTCCAT	CCAAGCTGAA	TGATCGCGCT	351
GACTCAAGAA	GAAGCCTTTG	GGACCAAGGA	AACTTCCCCC	TGATCATCAA	401
GAATCTTAAG	ATAGAAGACT	CAGATACTTA	CATCTGTGAA	GTGGAGGACC	451
AGAAGGAGGA	GGTGCAATTG	CTAGTGTTTCG	GATTGACTGC	CAACTCTGAC	501
ACCCACCTGC	TTCAGGGGCA	GAGCCTGACC	CTGACCTTGG	AGAGCCCCCC	551
TGGTAGTAGC	CCCTCAGTGC	AATGTAGGAG	TCCAAGGGGT	AAAAACATAC	601
AGGGGGGGAA	GACCTCTCTC	GTGTCTCAGC	TGGAGCTCCA	GGATAGTGGC	651
ACCTGGACAT	GCACTGTCTT	GCAGAACCAG	AAGAAGGTGG	AGTTCAAAAT	701
AGACATCGTG	GTGCTAGCTT	TCCAGAAGGC	CTCCAGCATA	GTCTATAAGA	751
AAGAGGGGGA	ACAGGTGGAG	TTCTCCTTCC	CACTCGCCTT	TACAGTTGAA	801
AAGCTGACGG	GCAGTGGCGA	GCTGTGGTGG	CAGGCGGAGA	GGGCTTCCTC	851
CTCCAAGTCT	TGGATCACCT	TTGACCTGAA	GAACAAGGAA	GTGTCTGTAA	901
AACGGGTTAC	CCAGGACCCT	AAGCTCCAGA	TGGGCAAGAA	GCTCCCGCTC	951
CACCTCACCC	TGCCCCAGGC	CTTGCCCTCAG	TATGCTGGCT	CTGGAAACCT	1001
CACCCTGGCC	CTTGAAGCGA	AAACAGGAAA	GTTGCATCAG	GAAGTGAACC	1051
TGGTGGTGAT	GAGAGCCACT	CAGCTCCAGA	AAAATTTGAC	CTGTGAGGTG	1101
TGGGGACCCA	CCTCCCCTAA	GCTGATGCTG	AGCTTGAAAC	TGGAGAACAA	1151
GGAGGCAAAG	GTCTCGAAGC	GGGAGAAGCC	GGTGTGGGTG	CTGAACCCTG	1201
AGGCGGGGAT	GTGGCAGTGT	CTGCTGAGTG	ACTCGGGACA	GGTCCTGCTG	1251
GAATCCAACA	TCAAGGTTCT	GCCCACATGG	TCCACCCCGG	TGCACGCGGA	1301
TCCC (Последовательность № 28)					

Аминокислотная последовательность

MNRGVPFRLH	LLVLQLALLP	AATQGNKVVL	GKKGDTVELT	CTASQKKSIIQ	51
FHWKNSNQIK	ILGNQGSFLT	KGPSKLNDRA	DSRRSLWDQG	NFPLIIKNLK	101
IEDSDTYICE	VEDQKEEVQL	LVFGLTANS	THLLQGQSLT	LTLESPPGSS	151
PSVQCRSPRG	KNIQGGKTLS	VSQLELQDSG	TWTCTVLQNO	KKVEFKIDIV	201
VLAFAQKASSI	VYKKEGEQVE	FSFPLAFTVE	KLTGSGELWW	QAERASSSKS	251
WITFDLKNKE	VSVKRVTQDP	KLQMGKKLPL	HLTLPQALPQ	YAGSGNLTLA	301
LEAKTGKLIHQ	EVNLVVMRAT	QLQKNLTCEV	WGPTSPKLML	SLKLENKEAK	351
VSKREKPVVW	LNPEAGMWQC	LLSDSGQVLL	ESNIKVLPTW	STPVHADP	
(Последовательность № 29)					

Фиг. 23

D1-D2 из CD4

Последовательность нуклеиновых кислот

GCCTGTTTGA	GAAGCAGCGG	GCAAGAAAAG	CGCAAGCCCCA	GAGGCCCTGC	51
CATTTCTGTG	GGCTCAGGTC	CCTACTGGCT	CAGGCCCTTG	CCTCCCTCGG	101
CAAGGCCACA	ATGAACCGGG	GAGTCCCTTT	TAGGCACTTG	CTTCTGGTGC	151
TGCAACTGGC	GCTCCTCCCA	GCAGCCACTC	AGGGAAACAA	AGTGGTGCTG	201
GGCAAAAAAG	GGGATACAGT	GGAAGTGACC	TGTACAGCTT	CCCAGAAGAA	251
GAGCATACAA	TTCCACTGGA	AAAAGTCCAA	CCAGATAAAG	ATTCTGGGAA	301
ATCAGGGGCTC	CTTCTTAACT	AAAGGTCCAT	CCAAGCTGAA	TGATCGCGCT	351
GACTCAAGAA	GAAGCCTTTG	GGACCAAGGA	AACTTCCCCC	TGATCATCAA	401
GAATCTTAAG	ATAGAAGACT	CAGATACTTA	CATCTGTGAA	GTGGAGGACC	451
AGAAGGAGGA	GGTGCAATTG	CTAGTGTTTG	GATTGACTGC	CAACTCTGAC	501
ACCCACCTGC	TTCAAGGGGCA	GAGCCTGACC	CTGACCTTGG	AGAGCCCCCC	551
TGGTAGTAGC	CCCTCAGTGC	AATGTAGGAG	TCCAAGGGGT	AAAAACATAC	601
AGGGGGGGAA	GACCCTCTCC	GTGTCTCAGC	TGGAGCTCCA	GGATAGTGGC	651
ACCTGGACAT	GCACTGTCTT	GCAGAACCAG	AAGAAGGTGG	AGTTCAAAAT	701
AGACATCGTG	GTGCTAGCT	(Последовательность № 30)			

Аминокислотная последовательность

MNRGVPFRHL	LLVLQLALLP	AATQGNKVVL	GKKGDTVLT	CTASQKRSIQ	51
FHWKNSNQIK	ILGNQGSFLT	KGPSKLNDR	DSRRSLWDQG	NFPLIIKNLK	101
IEDSDTYICE	VEDQKEEVQL	LVFGLTANS	THLLQGQSLT	LTLESPPGSS	151
PSVQCRSPRG	KNIQGGKTL	VSQLELQDS	TWTCTVLQNG	KKVEFKIDIV	201
VLA	(Последовательность № 31)				

Фиг. 24

Центральный домен и домены CH2, CH3 IgG человека

Последовательность нуклеиновых кислот

GCTAGCAGAG	CCCAAAATCTT	GTGACAAAAC	TCACACATGC	CCACCGTGCC	51
CAGCACCTGA	ACTCCTGGGG	GGACCGTCAG	TCTTCCTCTT	CCCCCAAAA	101
CCCAAGGACA	CCCTCATGAT	CTCCCGGACC	CCTGAGGTCA	CATGCGTGGT	151
GGTGGACGTG	AGCCACGAAG	ACCCTGAGGT	CAAGTTCAAC	TGGTACGTGG	201
ACGGCGTGGA	GGTGCATAAT	GCCAAGACAA	AGCCGCGGGA	GGAGCAGTAC	251
AACAGCACGT	ACCGGGTGGT	CAGCGTCCTC	ACCGTCCTGC	ACCAGGACTG	301
GCTGAATGGC	AAGGAGTACA	AGTGCAAGGT	CTCCAACAAA	GCCCTCCCAG	351
CCCCCATCGA	GAAAACCATC	TCCAAAGCCA	AAGGGCAGCC	CCGAGAACCA	401
CAGGTGTACA	CCCTGCCCCC	ATCCCGGGAT	GAGCTGACCA	AGAACCAGGT	451
CAGCCTGACC	TGCCTGGTCA	AAGGCTTCTA	TCCCAGCGAC	ATCGCCGTGG	501
AGTGGGAGAG	CAATGGGCAG	CCGGAGAACA	ACTACAAGAC	CACGCCTCCC	551
GTGCTGGACT	CCGACGGCTC	CTTCTTCCTC	TACAGCAAGC	TCACCGTGGA	601
CAAGAGCAGG	TGGCAGCAGG	GGAACGTCTT	CTCATGCTCC	GTGATGCATG	651
AGGCTCTGCA	CAACCACTAC	ACGCAGAAGA	GCCTCTCCCT	GTCTCCGGGG	701
CTGCAACTGG	ACGAGACCTG	TGCTGAGGCC	CAGGACGGGG	AGCTGGACGG	751
GCTCTGGACG	ACGGATCC	(Последовательность № 32)			

Аминокислотная последовательность

EPKSCDKTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	51
VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVWSV	LTVLHQDWLN	101
GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	151
TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTPP	PVLDSGGSFF	LYSKLTVDKS	201
RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GLQLDETCAE	AQDGELDGLW	251
TTDP	(Последовательность № 33)				

Фиг. 25

Трансмембранный домен CD7

Последовательность нуклеиновых кислот

CCAAGGGCCT	CTGCCCTCCC	TGCCCCACCG	ACAGGCTCCG	CCCTCCCTGA	51
CCCGCAGACA	GCCTCTGCCC	TCCCTGACCC	GCCAGCAGCC	TCTGCCCTCC	101
CTGCGGCCCT	GGCGGTGATC	TCCTTCCTCC	TGGGGCTGGG	CCTGGGGGTG	151
GCGTGTGTGC	TGGCGAGGAC	GCGT	(Последовательность № 34)		

Аминокислотная последовательность

PRASALPAPP	TGSALPDPQT	ASALPDPPAA	SALPAALAVI	SFLLGLGLGV	51
ACVLARTR	(Последовательность № 35)				

Фиг. 26

Внутриклеточный домен дзета
Последовательность нуклеиновых кислот

ACGCGTTTCA	GCAGGAGCGC	AGAGCCCCC	GCGTACCAGC	AGGGCCAGAA	51
CCAGCTCTAT	AACGAGCTCA	ATCTAGGACG	AAGAGAGGAG	TACGATGTTT	101
TGGACAAGAG	ACGTGGCCCG	GACCCTGAGA	TGGGGGGAAA	GCCGAGAAGG	151
AAGAACCCTC	AGGAAGGCCT	GTACAATGAA	CTGCAGAAAG	ATAAGATGGC	201
GGAGGCCTAC	AGTGAGATTG	GGATGAAAGG	CGAGCGCCCG	AGGGGCAAGG	251
GGCACGATGG	CCTTTACCAG	GGTCTCAGTA	CAGCCACCAA	GGACACCTAC	301
GACGCCCTTC	ACATGCAGGC	CCTGCCCCCT	CGCTAAAGCG	GCCGC	

(Последовательность № 36)

Аминокислотная последовательность

TRFSRSAEPP	AYQQGQNQLY	NELNLGRREE	YDVLDKRRGR	DPENGGKPRR	51
KNPQEGLYNE	LQDKMAEAY	SEIGMKGERR	RGKGHDGLYQ	GLSTATKDTY	101
DALHMQALPP	R	(Последовательность № 37)			

Фиг. 27

BamHI/BstY1

Bgl2/BstY1

G GAT CCC AAG GCC AGG CTA AAG CCG AAG CCG CGA AGG CCG AGG CTA AGG CCG AAG CAG ATC IG

DPKAEAKAEAKAEAKAEADL

Фиг. 28