

У цілому винахід стосується білків, які зветься гліоцитопохідними нейротрофічними факторами (GDNF), які характеризуються своєю спроможністю активувати поглинання дофаміну дофамінергічними нейронами і підтримувати виживання нейронів, які гинуть при хворобі Паркінсона, Більш конкретно, винахід стосується нових зрізаних ГНФ-білків.

Передумови до створення винаходу

Нейротрофічні фактори являють собою білки, які знаходяться у нервовій системі або в ненервових тканинах, іннервованих нервовою системою, і функцією яких є активувати виживання і підтримання фенотипічної диференціації нервових і/або гліальних клітин (гліоцитів) [Varon et al., Ann. Rev. Neuroscience 1:327, 1979; Thoenen et al., Science 229:238, 1985]. Завдяки цій фізіологічній ролі, нейротрофічні фактори можна застосовувати при лікуванні дегенерації нервових клітин і втрати диференційованої функції внаслідок різного роду нейродегенеративних захворювань.

Для того щоб той чи інший нейротрофічний фактор був потенційно придатним у лікуванні нервових розладів, пошкоджені нервові клітини даного класу або класів повинні бути чутливими до цього фактора. Різні нейротрофічні фактори, як правило, діють на класи нервових клітин, що суттєво різняться один від одного. Таким чином, було б корисним мати у розпорядженні різноманітні нейротрофічні фактори для лікування пошкоджених нейронів будь-якого класу, що може стати потрібним у різних випадках захворювань або травмувань.

Нейротрофічні фактори спроможні захищати чутливі нейрони від різноманітних неспоріднених інсультів. Наприклад, фактор росту нервової тканини (ФРН) дозволяє врятувати значну частину чутливих нейронів від смерті, зумовленої відрізанням їхніх аксонних процесів [Rich et al., J. Neurocytol. 16:261, 1987; Otto et al. J. Neurosci. 83:156, 1987], від онтогенетичної смерті під час ембріонального розвитку [Hamburger et al., J. Neurosci. 4:767, 1984] і від смерті, зумовленої введенням таксолу або цисплатину [Apfel. et al., Ann. Neurol. 29: 87, 1991]. Ця очевидна універсальність захисту привела до концепції, згідно з якою якщо нейротрофічний фактор захищає чутливі нейрони від пошкоджень в експериментах, він може бути корисним і при лікуванні захворювань, які викликають пошкодження цих нейронів у пацієнтів, навіть якщо етіологія захворювання є невідома.

Даний нейротрофічний фактор повинен, окрім правильності своєї нейронної специфічності, знаходитися у кількості, достатній для використання його у якості фармацевтичного засобу. Оскільки нейротрофічні фактори, як правило, наявні в тканинах у малих кількостях, див., наприклад, [Hofer et Barde, Nature 331:261; Un et al., Science 246:1023, 1989], виготовляти їх у фармацевтичних кількостях безпосередньо із тканин тварин було б незручно. У якості альтернативи для виробу потрібного білка бажано застосовувати рекомбінантну експресію.

Раніше Lin et al. описали спосіб скринінгу біологічних зразків за нейротрофічною дією на ембріональні попередники дофамінергічних нейронів чорної субстанції [Заявка на патент США №08/182183 від 23 травня 1994р. та її родові заявки; PCT/US92/07888 від 17 вересня 1992р. (WO 9306116); і заявка на Європейський патент №92921022.7 (публікація №EP 610254)], розкриття яких введене у даному опису посиланням. Цей біотест можна застосовувати для ідентифікації нейротрофічних факторів, які можуть бути використані у лікуванні хвороби Паркінсона [Friedman et al., Neurosci. Lett. 79:65-72, 1987], оскільки ця хвороба характеризується дегенерацією дофамінергічних нейронів середнього мозку, який іннервує смугасте тіло.

Lin et al. також дали характеристику нового нейротрофічного фактора, очищеного від одного такого джерела - кондиційованого культурного середовища від клітинної лінії гліобластоми B49 [Schubert et al., Nature 249:224-27, 1974]. Як повідомлялось раніше, кондиційоване середовище із цієї клітинної лінії вказує дофамінергічну нейротрофічну активність [Bonn et al., Soc. Neurosci. Abs. 15:277, 1989]. Раніше, до цього відкриття, зробленого Un et al., гліоцитопохідний нейротрофічний фактор (GDNF) не був ідентифікований як дискретна, біологічно активна речовина або як виділений, практично чистий білок. Крім того, Lin et al. описали способи клонування кодуючих GDNF людських генів, нуклеїнокислотної послідовності кодуючих GDNF людських генів, і амінокислотних послідовностей GDNF білка. Ген GDNF було субклоновано в вектор експресії, який було використано для експресії біологічно активного GDNF. GDNF білок є гомодимером, який складається з двох 134 амінокислотних (масою 22 kDa) субодиниць, об'єднаних дисульфідною в'яззю. Описане також використання GDNF для попередження і лікування нервових розладів і таких, пов'язаних з нервами захворювань, як хвороба Паркінсона.

GDNF терапія є ефективною при лікуванні нервових розладів, викликаних умовами, які ставлять під загрозу виживання і/або власну функцію одного або більше типів нервових клітин. Таке нервово ураження може виникати внаслідок найрізноманітніших причин. Нервово ураження може виникати в одному і більше типах нервових клітин внаслідок: (1) фізичного травмування, яке викликає дегенерацію аксонних процесів і/або тіл нервових клітин поблизу місця травмування; (2) тимчасового або постійного припинення кровотоку до частин нервової системи, наприклад, при ударі; (3) навмисного або випадкового піддання дії нейротоксинів, таких як гемотерапевтичні агенти (наприклад, цисплатин) при лікуванні раку, або дідеоксицитидину (ддЦ) при лікуванні СНІДу; (4) хронічних метаболічних хвороб, таких як діабет або ниркова дисфункція; (5) нейродегенеративних хвороб, таких як хвороба Паркінсона, хвороба Альцгеймера і бічний аміотрофічний склероз (ALS), які виникають внаслідок дегенерації специфічних нейронних популяцій.

GDNF терапія є особливо ефективною при лікуванні нейродегенеративних станів, таких як хвороба Паркінсона, які викликають дегенерацію дофамінергічних нейронів чорної субстанції. Єдиними на сьогоднішній день способами лікування хвороби Паркінсона є паліативні способи, які спрямовані на підвищення рівнів дофаміну у смугастому тілі. Ефект, що очікується від GDNF- терапії, полягає не просто у підвищенні дофамінергічної нейротрансмісії на дофамінергічних нервових закінченнях у смугастому тілі (результатом чого є поліпшення симптомів), але також у сповільненні і навіть зупинці розвитку дегенеративних процесів, і відновленні пошкодженого чорносмугастого шляху та його функції. GDNF може бути також використаний у лікуванні інших форм розладів або невідповідності функціонування дофамінергічних нервових клітин у людей. Такі розлади або погане функціонування можуть виникати при шизофренії та інших формах психозу. Для лікування таких станів у розпорядженні нині є лише симптоматичні способи, які потребують ліків, діючих на

рецептори або центри поглинання дофаміну, відповідно до тієї точки зору, що невластиве функціонування дофамінергічних нейронів, іннервуючих ці нейронні популяції-носії рецепторів, може бути притягнуте до процесу розладу.

Сутність винаходу

Згідно з одним із варіантів винаходу пропонуються нові зрізані білкові продукти, які є гліцитопохідним нейротрофічним фактором (GDNF білки). В одному з варіантів практичного втілення зрізані GDNF білки виробляються методами рекомбінантної генної інженерії. В альтернативному варіанті зрізані GDNF білки синтезуються хімічними методами або комбінацією рекомбінантних і хімічних методів.

До числа зрізаних GDNF білкових продуктів за винаходом входять білки, представлені амінокислотною послідовністю $X-[Cys^{41}-Cys^{133}]-Y$. На Фіг.1 наведена схема переліку амінокислотних залишків (SEQ ID NO:2), призначена до полегшення порівняння зі зрілим GDNF білком. Формула $[Cys^{41}-Cys^{133}]$ виражає амінокислотну послідовність від Cys^{41} до Cys^{133} , як показано на Фіг.1 (SEQ ID NO:2). Y виражає карбоксильну кінцеву групу Cys^{133} або карбоксикінцевий амінокислотний залишок He^{134} . X виражає метіонільовану або неметіонільовану аміногрупу Cys^{41} або амінокінцевий амінокислотний залишок (чи залишки), вибраний (чи вибрані) із групи:

G
RG
NRG
KNRG (SEQ ID NO:3)
GKNRG (SEQ ID NO:4)
RGKNRG (SEQ ID NO:5)
QRGKNRG (SEQ ID NO:6)
GQRGKNRG (SEQ ID NO:7)
RGQRGKNRG (SEQ ID NO:8)
RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:9)
G RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:10)
KG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:11)
GKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:12)
RGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:13)
SRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:14)
NSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:15)
ENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:16)
PENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:17)
NPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:18)
ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:19)
A ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:20)
AA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:21)
AAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:22)
QAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:23)
RQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:24)
NRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:25)
RNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:26)
ERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:27)
RERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:28)
RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:29)
P RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:30)
LP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:31)
VLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:32)
AVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:33)
MAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:34)
QMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:35)
KQMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:36)
DKQMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:37)
PDKQMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:38)

Вважається, що такі зрізані GDNF білкові продукти включають у себе зрізаний GDNF білок з амінокислотною послідовністю, вираженою формулою $X-[Cys^{41}-Cys^{133}]-Y$, його варіанти і похідні. Таким чином, зрізані GDNF білкові продукти за винаходом включають у себе також варіанти з добавками, заміщеннями і

внутрішніми делеціями, а також похідні амінокислотних послідовностей, виражених формулою $X-[Cys^{41}-Cys^{133}]_Y$. Крім того, зрізані GDNF білкові продукти включають у себе метіонільовані або неметіонільовані, а також глікозилізовані або неглікозилізовані форми зрізаного GDNF білка.

Типовими зрізаними GDNF білками за винаходом є: зрізані метіонільовані або неметіонільовані GDNF білки $[Arg^{16}-Ile^{134}]$, $[Asn^{22}-Ile^{134}]$, $[Pro^{23}-Ile^{134}]$, $[Ser^{26}-Ile^{134}]$, $[Arg^{32}-Ile^{134}]$, $[Gly^{33}-Ile^{134}]$, $[Lys^{37}-Ile^{134}]$ і $[Asn^{38}-Ile^{134}]$ або їхні варіанти і похідні. До числа кращих на сьогоднішній день зрізаних GDNF білків за винаходом належать: зрізані метіонільовані або неметіонільовані GDNF білки $[Lys^{37}-Ile^{134}]$ і $[Asn^{38}-Ile^{134}]$, їхні варіанти і похідні. Типовими варіантами заміщень є зрізані GDNF білки $[Asn^{22}\Delta Ser^{26}-Ile^{134}]$ і $[Pro^{23}-Lys^{37}\Delta Asn^{37}-Ile^{134}]$. Типовим варіантом добавлень є зрізаний GDNF білок $Ser-[Pro^{23}-Lys^{37}\Delta Asn^{37}-Ile^{134}]$.

Згідно з іншим аспектом даного винаходу зрізані GDNF білки можуть бути виготовлені у глікозилізованій або неглікозилізованій формі. Одержання похідних зрізаного GDNF білка, як правило, пов'язане з приєднанням GDNF білка до водорозчинного полімера. Наприклад, зрізаний GDNF білок може бути кон'югований за однією і більше молекулами поліетиленгліколю для зниження преципітації зрізаного GDNF білкового продукту у водному середовищі.

Винаходом пропонуються також різноманітні полінуклеотиди, які кодують зрізані GDNF білки. Ці нуклеїнокислотні послідовності, взагалі, вживаються для експресії зрізаного GDNF в еукаріотичній або прокаріотичній клітині-хазяїні, де продукт експресії або його похідна характеризується спроможністю підвищувати поглинання дофаміну дофамінергічними клітинами. Полінуклеотиди можна використовувати також в клітинній або генній терапії. Відповідні до цього амінокислотні послідовності можуть бути такі, як показано на фігурах, що додаються, так само, як додаткові вироджені послідовності і виникаючі природним шляхом алельні варіанти.

Ще один аспект винаходу залучає вектори, які містять полінуклеотиди, що кодують зрізані GDNF білки, операбельно зв'язані з послідовностями регулювання ампліфікації і/або експресії. Як прокаріотичні, так і еукаріотичні клітини-хазяїни можуть стабільно трансформуватися або трансфектуватися такими векторами для експресії зрізаного гліцитопохідного нейротрофічного фактора. Крім того, винахід включає у себе рекомбінантне вироблення зрізаного GDNF білка, де такі трансформовані або трансфектовані клітини-хазяїни ростуть у живильному середовищі, а експресований цими клітинами зрізаний GDNF за необхідністю відділяється від клітин-хазяїнів і/або живильного середовища. Далі, винахід включає у себе використання полінуклеотидів, кодуючих зрізаний GDNF, і векторів, які містять такі полінуклеотиди, у генній або клітинній терапії.

Згідно з ще одним своїм аспектом, даний винахід передбачає залучення виготовленої рекомбінантним методом GDNF композиції, яка містить суміш зрілого GDNF білка з одним або більше введених із нього зрізаних GDNF білків, де зрілий GDNF білок має молекулярну масу приблизно 44kDa, а зрізаний GDNF білок має молекулярну масу приблизно 36-40kDa. GDNF композиція може містити принаймні два види зрізаного GDNF, де перший вид має молекулярну масу приблизно 36kDa, а другий вид має молекулярну масу приблизно 40kDa. Зрізаний GDNF вид з молекулярною масою приблизно 40kDa є гетеродимером GDNF мономера з молекулярною масою приблизно 22kDa і зрізаного GDNF мономера з молекулярною масою приблизно 18kDa. Передбачається також, що один або більше зрізані GDNF види можуть бути відділені від такої суміші для використання у терапії.

Ще один аспект даного винаходу включає у себе фармацевтичні композиції, які містять зрізаний GDNF білковий продукт. До складу зрізаного GDNF білкового продукту, зазвичай, входить також фармацевтично прийнятний носій. Можуть вживатися також різноманітні фармацевтичні матеріали з метою полегшення процесів вироблення, зберігання, вантажно-розвантажувальних робіт, постачання і терапевтичної дії. Згідно з винаходом, зрізані GDNF білкові продукти підвищують засвоєння дофаміну і виживання дофамінергічних нейронів. Таким чином, зрізані GDNF білкові продукти є особливо ефективними для лікування розладів нервової системи, обумовлених травмами або захворюваннями, такими як хвороба Паркінсона.

Решту характерних ознак і переваг даного винаходу буде з'ясовано у подальшому описі з докладним розгляданням його практичного аспекту.

Стислий опис ілюстрацій

Характерні ознаки і переваги даного винаходу стають очевидними при розгляді наступних ілюстрацій, що додаються.

Фиг.1: нуклеїнокислотна послідовність (SEQ ID NO:1), яка кодує зрілий гліцитопохідний нейротрофічний фактор людини (hGDNF). Показана також амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:2) зрілого GDNF білка людини.

Фиг.2: діаграма плазмідної конструкції, виготовленої для експресії рекомбінантних зрізаних GDNF білків.

Фиг.3: рестрикційна карта альтернативної нуклеїнокислотної послідовності (SEQ ID NO:39), що кодує GDNF і зрізані GDNF полінуклеотиди.

Фиг.4: рестрикційна карта ще однієї нуклеїнокислотної послідовності (SEQ ID NO:40), кодуєчої iGDNF і зрізані GDNF полінуклеотиди.

Фиг.5: нуклеїнокислотна послідовність (SEQ ID NO:41), яка кодує заміщений варіант зрізаного GDNF білка $[Pro^{23}-Lys^{37}\Delta Asn^{37}-Ile^{134}]$ (SEQ ID NO:42). Цей білок може бути описаний також як варіант з добавленням/заміщенням зрізаного GDNF білка $Met-Ser-[Pro^{23}-Lys^{37}\Delta Asn^{37}-Ile^{134}]$.

Фиг.6: нуклеїнокислотна послідовність (SEQ ID NO:43), яка кодує зрізаний GDNF білок $[Arg^{32}-Ile^{134}]$ (SEQ ID NO:44).

Фиг.7: нуклеїнокислотна послідовність (SEQ ID NO:45), яка кодує зрізаний GDNF білок $[Gly^{33}-Ile^{134}]$ (SEQ ID NO:46).

9 Фиг.8: амінокислотна послідовність зрілого hGDNF (SEQ ID NO:47) у порівнянні з кількома типовими зрізаними GDNF білками: $Met-[Arg^{32}-Ile^{134}]$ (SEQ ID NO:48), $Met-[Gly^{33}-Ile^{134}]$ (SEQ ID NO:49) і $Met-Ser-[Pro^{23}-Lys^{37}\Delta Asn^{37}-Ile^{134}]$ (SEQ ID NO:50).

Докладний опис винаходу

Гліцитопохідний нейротрофічний фактор людини hGDNF) синтезується як попередник, який піддається обробці і секреції у якості зрілого білка із 134 амінокислот. Вище було визначено, що зрілий GDNF людини має амінокислотну послідовність, зображену на Fig.1 (SEQ ID NO:2).

Даний винахід оснований на відкритті того факту, що зрілий GDNF білок може бути зменшеним у розмірі (і зватися «відсіченим» або «зрізаним»), але при цьому зберігати свою біологічну активність. Уперше зрізаний білок було відкрито при рекомбінантному виробленні GDNF в клітинах яєчника китайського хом'яка (CHO). Коротко, рекомбінантний GDNF людини (rhGDNF) приготували наступним чином. Нуклеїно кислотну послідовність, кодує повну, відкриту рамку зчитування зрілого GDNF білка людини, було клоновано у плазмиду експресії. Після підтвердження правильності нуклеїно кислотної послідовності (секвенуванням білка як еквівалента послідовності rhGDNF у генному банку) її було трансльовано в амінокислотну послідовність, ідентичну опублікованій послідовності зрілого GDNF людини [Lin et al., Science 260, 1130-1132, 1993]. Плазмідна ДНК була піддана лінеаризації і трансфектуванню у дефіцитні за дигідрофолатредуктазою клітини CHO (клітини CHO⁻) методом преципітації фосфатом кальцію. Трансфектовані клітини піддали культивуванню у селективному середовищі, і колонії, які виживали у процесі селекції, відбиралися для індивідуального аналізу експресії hGDNF.

Безсироваточні кондиційовані середовища від індивідуальних клонів відбиралися і аналізувалися за допомогою вестерн-блотінгу, використовуючи імунні сироватки, специфічні до hGDNF, імунні сироватки залучали кролячі поліклональні антитіла, витягнуті у кролів, імунізованих рекомбінантним hGDNF, експресованим в *Escherichia coli*. В умовах відновлення, hGDNF наявний в цих зразках, був відокремлений по двох головних смугах з уявними молекулярними масами приблизно 22kDa і 18kDa. Кожна смуга складалася із близько розташованого дублету приблизно 22+22,5kDa і 18+18,5kDa відповідно (для спрощення ці дублети помічаються як смуги або види 22kDa і 18kDa).

Як повідомлялось раніше, GDNF існує як гомодимер з дисульфідною в'яззю, який складається з двох ідентичних субодиниць зрілого GDNF білка з молекулярною масою приблизно 20-22kDa. Повідомлялося, що при аналізі GDNF у невідновлюючих умовах ідентифікувалася широка смуга 32-42kDa [Lin et al., Science 260, 1130-1132, 1993] або 33-45kDa [Lin et al., J. Neurochem. 63(2), 758-768, 1994]. Існування цього діапазону інтерпретувалося як зумовлене гетерогенністю глікозилювання на зрілих мономерах і у подальшому одержало підтвердження експериментами з деглікозилювання.

У той час як дана смуга 22kDa відповідає зрілому GDNF білку, про який повідомлялося в літературі, про смугу 18kDa в літературі жодні повідомлення відсутні. Відносні кількості білків 22kDa і 18kDa в зразках, зібраних від індивідуальних клонів, помітно варіювали. Крім того, було знайдено, що багато врожаїв від того ж самого клону показували різні величини співвідношення цих двох смуг. Більш того, було знайдено, що зберігання білка, експресованого у CHO, часто приводить до збільшення смуги 18kDa при одночасному зменшенні смуги 22kDa.

Аналіз кондиційованого середовища від трансформованих клітин CHO⁻ вестерн-блотам и у невідновлюючих умовах показав три добре виокремлених смуги з уявними молекулярними масами 36, 40 і 44kDa. Це спостереження також йшло у супереч з попередніми повідомленнями. Відносна інтенсивність цих смуг змінювалася, але добре корелювали з мономерними смугами 22 і 18kDa, наявними у кожного зі зразків. Подальший аналіз з використанням моноклональної імунної сироватки визначив, що ці три смуги у невідновлюючому гелі відповідають трьом можливим димерам, що складаються з двох мономерів. Як доповідалось раніше, найбільший білок 44kDa являє собою димер двох зрілих GDNF білків з молекулярною масою 22kDa. Проміжний білок 40kDa складається із димера, в якому один зрілий білок був відновлений за молекулярною масою у форму 18kDa. Найменший димер 36kDa містить, очевидно, два білки 18kDa, тобто обидві форми 22kDa у ньому були відновлені у молекулярній масі. Ці дані уперше показали не тільки наявність нової форми GDNF мономеру, але також наявність зрізаного GDNF білка у димерній конфігурації. Було знайдено також, що при зберіганні мономерна композиція зразків змінюється у напрямку композиції зі зрізаною формою і відповідного димерного виду, тобто кількість білка 36kDa у неї вказує збільшення.

Далі, були проведені дослідження з метою визначення того, яка частина білка була елімінована або змінена для того, щоб викликати зменшення молекулярної маси порівняно з масою зрілого GDNF білка, про який повідомлялося раніше. Було уперше визначено, що зменшення молекулярної маси було зумовлене не змінами у глікозилюванні.

GDNF містить два потенціальних N-зв'язаних сайти глікозилювання і, згідно з повідомленнями, піддавався глікозилюванню. Проте, зрізаний білок не є простою неглікозилюваною або недоглікозилюваною формою зрілого GDNF. Це було продемонстровано в експериментах з деглікозилювання, де зразки піддавалися обробці N-гліканазою, O-гліканазою і нейрамінідазою. На відновлюючих гелях білок 18kDa внаслідок перетравлення N-гліканазою зменшувався до 13,5kDa, вказуючи на наявність еквівалентності N-зв'язаного цукру 4,5kDa. Обробка нейрамінідазою і O-гліканазою викликала невелике зменшення смуги 18kDa до 17kDa. Це вказує на наявність O-зв'язаних цукрів у білку. Доповідалося, що зріла смуга 22kDa піддавалася глікозилюванню і також відновлювалася до 18kDa (тобто також на 4,5kDa) N-гліканазою. Потім це було підтверджено за допомогою моноклонального антитіла, специфічного до смуги 22kDa на гелі. Картина перетравлення невідновленого димеру гліканазою була більш складною, але піддавалася інтерпретації і збігалася з первинним розподіленням цих трьох форм.

У результаті цього, зменшення молекулярної маси білка на 4,5kDa далі розглядалося як таке, що виникає внаслідок делеції приблизно 30-35 амінокислотних залишків, а не як зумовлене змінами у глікозилюванні. Вважалося найбільш правдоподібним, що делеція відбувається на амінокінці зрілого GDNF білка з наступних причин. Зрілий GDNF містить у цілому 7 цистеїнів. Якщо б делеція відбувалася на карбоксильному кінці, то втрачалося б від 2 до 4 з 7 цистеїнів, наслідком чого, з очевидністю, була б інактивація білка. Проте, біопробування зразка, який складався переважно із зрізаної форми, з метою вимірювання їхнього нейротрофічної активності дофамінергічних нейронів, показали, що активність їхнього зрівнюється з активністю зразка, який містив пропорційно більші кількості зрілої форми GDNF.

Далі, шляхом аналізу амінокислотної послідовності очищеного білка був визначений сайт розщеплення. Зразки піддавалися секвенуванню згідно з інструкціями виробника за допомогою секвенатора білків Applied Biosystems 494A протягом 10 циклів. Оскільки техніка і методика секвенування добре відомі фахівцям у даній галузі, більш докладне ознайомлення з секвенуванням білків можна отримати в літературі [Fausset et al., Electrophoresis 12:22-27, 1991; заявка на Патент США №576316 від 24 серпня 1990р. (заявка на європейський патент №90310899, публікація №EP 423980 від 4 жовтня 1990р під назвою «Stem Cell Factor» - «Фактор стовбурових клітин»)], розкриття яких введене у даному опису посиланням. Цей аналіз показав, що амінокінець зрізаного білка мав послідовність «RGQRGK» або Arg-Gly-Gln-Arg-Gly-Lys. Таким чином, перші 31 амінокислота були видалені із зрілого білка у кондиційованому середовищі. Решта амінокислотної послідовності зрілого GDNF, зображеною на фіг.1 (SEQ ID NO:2).

Зрізаний GDNF білок [Arg³²-Ile¹³⁴] виявляв активність (на якісній основі) у випробуваннях дофамінергічних нейронів. Випробування активності дофамінергічних нейронів використовувалися для визначення нейротрофічних факторів, які можуть бути корисними при лікуванні хвороби Паркінсона. Базуються вони на випробуваннях, описаних раніше в [Friedman et al., Neuro. Sci. Lett. 79:65-72, 1987, розкриті у даному опису посиланням], і можуть включати у себе модифікації, описані Lin et al. [Заявка на Патент США №08/182183 від 23 травня 1994 та її родові заявки; PCT/US92/07888 від 17 вересня 1992р. (WO 93/06116); і заявка на європейський патент №92921022.7 (публікація №EP 610254)]. Докладний опис цих випробувань наданий нижче у Прикладі 5.

Процедура очищення з наступним амінокислотним секвенуванням привели до винайдення іншого білка, у якого з N-кінця зрілого GDNF були видалені перші 36 амінокислотних залишків: зрізаний GDNF білок [Lys³⁷-Ile¹³⁴] з N-кінцевою послідовністю KNRG(C)VL---. Тут також решта амінокислотних залишків зрізаного білка іншим чином співпадала з рештою амінокислотної послідовності зрілого GDNF людини. Біовипробуванням на засвоєння дофаміну був підданий також зрізаний GDNF білок [Lys³⁷-Ile¹³⁴]. Його активність з ED50 становила приблизно 50пг/мл і, таким чином, була подібною до активності очищеного рекомбінантного зрілого GDNF, експресованого в E. Coli.

Далі було знайдено, що бактеріально експресований зрілий GDNF може бути замінений на зрізану форму. Зрілий GDNF, експресований в трансформовану E. Coli, як описано в [Lin et al., заявка на Патент США №08/182183, див. вище], був інкубований у кондиційованому середовищі, одержаному із клітин CHO. Рекомбінантний GDNF із E Coli мав уявну рекомбінантну масу 17kDa на відновлюючому гелі. Коли матеріал змішували з кондиційованим середовищем клітин CHO і інкубували на протязі 5 днів при 4°C, білок зрізувався повністю до 12,5kDa. Це зрізання було менш повним при інкубації на протязі 1 години або 24 годин, що вказує на залежність процесу від часу у цих умовах. Було також знайдено, що проста інкубація рекомбінантного GDNF із E. Coli на протязі ночі у середовищі з 0,1% фетальної бичачої сироватки не дає зрізаної форми. Таким чином, для того щоб відбувався процес зрізання, очевидно, необхідною є наявність живих клітин в культурі. Отже, можливо, що подія зрізання може також виникати у певних тканинах in vivo.

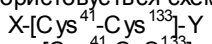
Крім того, було знайдено, що похідні зрілого lGDNF, експресованого в E Coli, такі як пегільований GDNF (описані також в [Lin et al., Заявка на Патент США №08/182183, див. вище]), можуть бути процесовані у зрізану форму при наявності кондиційованого середовища, виведеного із CHO. Зрілий GDNF може бути пегільований на амінокінці з тим, щоб збільшити час виведення при кровообігу. Петлювання збільшує розмір білка, і модифікований зрілий GDNF мігрує при масі біля 45kDa у відновлених умовах. Як і з непегільованою зрілою формою, інкубація пегільованого GDNF із E Coli у кондиційованому (нетрансфектованому) середовищі клітин CHO дає смугу 12,5kDa. В обох випадках вид 12,5kDa був наявним у якості дисульфідно зв'язаного димеру, як показано на невідновлюючих гелях. Генерація цієї зрізаної форми із пегільованого на N-кінці зрілого білка ^свідчить також про те, що подія зрізання відбувається на N-кінці білка, оскільки пегільований залишок під час процесу зрізання втрачається.

Виходячи з цих фактів і з того, що подія зрізання може виникати також in vivo, зрізана форма GDNF білка може бути остаточною формою hGDNF, процесованою природним шляхом у фізіологічних умовах. Отже, було визнане за корисне виробляти зрізаний GDNF білок або його похідну для використання у терапевтичних цілях. Наприклад, безпосередньо експресований або синтезований зрізаний GDNF білок, такий як [Arg³²-Ile¹³⁴], повинен бути стійким до вищеописаної протеолітичної активності. Більш того, якщо бажано виробляти зрізану GDNF похідну, таку як пегільований зрізаний GDNF білок [Arg³²-Ile¹³⁴], похідна, що у результаті цього одержується, не повинна бути легкопіддатливою до специфічного зрізання, що спостерігалось на зрілий GDNF похідній.

Додаткові переваги можна очікувати також від зрізаних GDNF білкових продуктів. По-перше, рІ зрізаного білка, такого як зрізаний GDNF білок [Arg³²-Ile¹³⁴], буде зменшуватися від 10 до приблизно 8,0-8,5. Це робить білок значно менш основним, що, у свою чергу, може давати цілий ряд корисних ефектів, включаючи краще рецепторне зв'язування і зменшення цитотоксичності у місці введення медикаменту, наприклад, у місці інтратикальної ін'єкції. По-друге, у межах перших 26 амінокислот послідовності зрілого GDNF знаходяться два сайти деамідування; Arg-Asn-Arg (амінокислоти 14-16) і Glu-Asn-Ser (амінокислоти 24-26). Відсутність одного або обох з цих сайтів у зрізаному GDNF білку повинна була б підвищити стабільність білка.

Зрізані GDNF білкові продукти

В основному варіанті практичного втілення зрізані GDNF білки за винаходом можуть бути представлені наступною амінокислотною послідовністю, де для полегшення порівняння зі зрілим GDNF білком використовується схема нумерації амінокислотних залишків, наведена на Фіг. 1:



де [Cys⁴¹-Cys¹³³] є послідовністю амінокислот від Cys⁴¹ до Cys¹³³, як зображено на Фіг.1 (SEQ ID NO:2);

Y - карбоксильна кінцева група Cys¹³³ або амінокислотний залишок Ile¹³⁴ на карбоксильному кінці;

X - метіонільована або неметіонільована аміногрупа Cys⁴¹ або амінокінцевий амінокислотний залишок (чи залишки), який вибирається із групи:

G
 RG
 NRG
 KNRG (SEQ ID NO:3)
 GKNRG (SEQ ID NO:4)
 RGKNRG (SEQ ID NO:5)
 QRGKNRG (SEQ ID NO:6)
 GQRGKNRG (SEQ ID NO:7)
 RGQRGKNRG (SEQ ID NO:8)
 RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:9)
 G RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:10)
 KG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:11)
 GK G RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:12)
 RGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:13)
 SRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:14)
 NSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:15)
 ENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:16)
 PENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:17)
 NPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:18)
 ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:19)
 A ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:20)
 AA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:21)
 AAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:22)
 QAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:23)
 RQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:24)
 NRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:25)
 RNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:26)
 ERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:27)
 RERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:28)
 RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:29)
 P RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:30)
 LP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:31)
 VLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:32)
 AVL P RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:33)
 MAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:34)
 QMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:35)
 KQMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:36)
 DKQMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:37)
 PDKQMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO:38)

Терміном «зрізаний GDNF білковий продукт», що використовується у даному описі, охоплюються біологічно активні, синтетичні або рекомбінантні зрізані GDNF білки, зрізані GDNF білки, одержані із зрілого GDNF, біологічно активні зрізані GDNF варіанти (включно вставки, заміщення і делеції) і їхні хімічно модифіковані похідні. Цей термін стосується також зрізаних GDNF білків, які є по суті гомологічними GDNF білку людини з амінокислотною послідовністю, встановленою далі в (SEQ ID NO:2).

Термін «біологічно активний», який використовується у даному опису, означає, що зрізаний GDNF білок демонструє подібні нейротрофічні властивості, але не обов'язково усі ті ж самі властивості і не обов'язково того ж самого ступеню, що й GDNF білок, який має амінокислотну послідовність, встановлену далі в (SEQ ID NO:2). Вибір потрібних нейротрофічних властивостей залежить від тієї терапевтичної цілі, з якою вводиться даний зрізаний GDNF білковий продукт. Зрізаний GDNF білкові продукти є біологічно активними і демонструють характеристики виживання дофамінергічних нейронів, подібні до тих, що демонструються зрілим GDNF білком при оцінці за поглинанням дофаміну і експресією тирозингідроксилази (ТГ), як у типових біовипробуваннях, описаних у нижченаведених прикладах.

Термін «по суті гомологічний», який використовується у даному описі, означає ступінь гомології з людським GDNF, що має амінокислотну послідовність, встановлену далі в (SEQ ID NO:2), і який складає не менш як 70%, краще, якщо більше 80%, і найкраще, якщо більше 90% або навіть 95%. Ступінь гомології

розраховувався як відсоток амінокислотних залишків, що знаходяться у меншій з двох послідовностей, які вишиковуються у ряд з ідентичними амінокислотними залишками у послідовності, що порівнюється, коли для надання допомоги у цьому порівнянні можуть бути введені чотири розриви завдовжки 100 амінокислотних залишків, як це встановлено в [Dayhoff, in Atlas of Protein Sequence and Structure Vol.5, p.124, 1972, National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C.], введене у даному опису посиланням. Під термін «по суті гомологічний» підпадає будь-який зрізаний GDNF білок, який може бути виділений завдяки перехресній реактивності з антитілами проти GDNF за послідовністю (SEQ ID NO:2) або гени якого можуть бути виділені шляхом гібридизації з геном або сегментами гена, кодуєчими GDNF за послідовністю (SEQ ID NO:1).

Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що по суті гомологічні білки можуть містити одну і більше делецій, добавлень і заміщень в амінокислотних залишках зрізаного GDNF білка, вираженого формулою X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y. Виготовлення таких варіантів білків докладно описано нижче. Із нижчевикладеного можна буде побачити, що оскільки даний винахід чітко адресований до «зрізаних» GDNF білків, то варіанти з амінокінцевими добавленнями розглядаються як такі, що включають добавлення метіонінового залишку або іншого ніж GDNF амінокислотного залишку чи послідовності, але не включають добавлення амінокислотного залишку чи залишків, яке б призвело до реконструкції зрілого GDNF білка. Об'ємом даного винаходу охоплюються також зрізані GDNF білки, основані на виникаючих природним шляхом алельних мутантах чи варіантах. Виготовлення варіантного зрізаного GDNF білка докладно описане нижче.

Лін та ін. [Lin et al., Заявка на Патент США №08/182183, див. вище] описують зрізання зрілого GDNF на карбоксильному кінці шляхом протеолітичного процесінгу залишків Lys-Arg, які є відповідно шостим і п'ятим залишками від карбоксильного кінця зрілого GDNF (тобто Lys¹²⁹-Arg¹³⁰ згідно з нумерацією амінокислотних залишків на Fig.1, також як в (SEQ ID NO:1) або (SEQ ID NO:2). Таке зрізання видалило би із зрілого GDNF білка два цистеїнових залишки. Це б, з очевидністю, призвело до неприйнятної складчастості білка і, таким чином, до утворення неактивного білка. У протилежність цьому, зрізані GDNF білкові продукти X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y за винаходом утримують залишки Cys⁴¹ і Cys¹³³ і за результатами випробувань на поглинання дофаміну є активними білками.

В одному з варіантів практичного втілення даного винаходу кращі зрізані GDNF білкові продукти є дефіцитними за одним і більше сайтами деамідування. Результатом такого дефіциту є, очевидно, підвищення біохімічної стабільності очищеного білка і зменшення можливих продуктів деградації, що дозволяє виробляти білок, більш стабільний при зберіганні. Типовим зрізаним GDNF білковим продуктом є зрізаний GDNF білок [Ser²⁶-Ile¹³⁴] з дефіцитом сайтів, наявність яких могла б привести до деамідування зрілого білка. В альтернативному варіанті зрізаний GDNF білок [Arg¹⁶-Ile¹³⁴] не має принаймні першого сайту деамідування, який є у зрілому білку.

Кращим на сьогоднішній день зрізаним GDNF білковим продуктом є зрізаний GDNF білок [Arg³²-Ile¹³⁴]. У цьому білку відсутній сайт, в якому або поблизу якого відбувається протеолітичне зрізання зрілого білка. Отже, цей GDNF білок повинен бути стійким до події процесінгу, яка може відбуватися також *in vivo*. Іншим прикладом кращого зрізаного GDNF білкового продукту є зрізаний GDNF білок [Lys³⁷-Ile¹³⁴]. Це зрізання ще більше зменшує *pI* зрізаного білка, що спостерігалось і при інших зрізаннях, при яких залишки до Gly⁴⁰ і Ile¹³⁴, а також вони самі, видалялися відповідно із N- і C-кінців. Найкращі на сьогоднішній день зрізані GDNF білкові продукти утримують усі цистеїнові залишки, які знаходяться у зрілому GDNF білку, проте не мають жодних відрізнених сайтів для швидкого протеолітичного процесінгу зрізаного GDNF білка під час експресії і вироблення або після введення *in vivo*. До цих кращих варіантів білків належать зрізані GDNF білкові продукти [Arg³²-Ile¹³⁴], [Gly³³-Ile¹³⁴], [Gly³⁴-Ile¹³⁴], [Arg³⁵-Ile¹³⁴], [Gly³⁶-Ile¹³⁴], [Lys³⁷-Ile¹³⁴], [Asn³⁸-Ile¹³⁴] і [Arg³⁹-Ile¹³⁴].

Подібно результатам, описаним раніше для зрілого GDNF [Un et al., Заявка на Патент США №07/855413, див. вище], зрізані GDNF білки за винаходом виявляють спроможність до підвищення поглинання дофаміну ембріональними попередниками дофамінергічних нейронів чорної субстанції. Біовипробування зрізаних GDNF білків описані нижче у Прикладі 4.

Нові зрізані GDNF білки, як правило, виділяються і очищуються для утворення зрізаних GDNF білків, які є по суті вільними від інших (не-GDNF)білкових матеріалів. Краще, якщо зрізані GDNF білкові продукти є приблизно на 80% вільними від інших білків, які можуть бути наявними в них завдяки технології, що використовується при виготовленні зрізаних GDNF білкових продуктів. Більш прийнятно, якщо зрізані GDNF білкові продукти є вільні від інших білків приблизно на 90%, а ще краще - на 95%, і найкраще, якщо більше ніж на 98%. Крім того, винахід несе з собою унікальну перевагу при одержанні поліпшених послідовностей для вироблення гомогенних зрізаних GDNF білків. Наприклад, використання поліпшених послідовностей, кодуєчої зрізаний GDNF білок [Arg³²-Ile¹³⁴], дозволяє здійснювати рекомбінантне вироблення зрізаного GDNF білка в *E. Coli* і інших відповідних системах експресії. Іншими словами, нові поліпшені послідовності дозволяють виробляти зрізані GDNF білки, які є несприйнятливими до протеолітичного процесінгу або які мають знижену чутливість до такого процесінгу чи інших біохімічних технологічних ефектів, як описано вище. Таким чином, нові поліпшені послідовності дозволяють легко виготовляти і/або відділяти зрізані GDNF білки одичного виду і, отже, зрізані GDNF білки і/або їхні продукти не містять або містять у знижених кількостях вищезгадані суміші гетеро- і гомодимерів. Проте, зрозуміло, що кінцеві зрізані GDNF білкові продукти можуть бути скомбіновані з іншими факторами, хімічними композиціями і/або відповідними матеріалами фармацевтичної рецептури до медикаментозного введення, як докладно описано нижче.

Згідно з одним з аспектів даного винаходу, зрізані GDNF білки вигідно виробляти за рекомбінантною технологією, оскільки вона дозволяє одержувати порівняно великі кількості білка високої чистоти. Рекомбінантні зрізані GDNF білкові форми включають у себе глікозильовані і неглікозильовані форми білка та білка, експресованого у бактеріальних, ссавцевих або інсектицидних клітинних системах. В альтернативному варіанті зрізані GDNF білки можуть бути синтезовані хімічним шляхом. Кращі на сьогоднішній день способи виробництва докладно описані нижче.

Варіанти і похідні зрізаного GDNF

A. Варіанти зрізаного GDNF

Ще один аспект даного винаходу стосується варіантів- зрізаного GDNF білка. Термін «зрізані GDNF білкові продукти», який використовується у даному опису, охоплює собою варіанти білків, у яких амінокислоти були видалені із залишків («делеційні варіанти»), вставлені до залишків («адитивні варіанти») або замінені залишками («субститутивні варіанти») у межах амінокислотної послідовності природно виникаючого GDNF. Білки за такими варіантами виробляються шляхом введення відповідних нуклеотидних змін у ДНК, кодуєчий білок, або шляхом хімічного синтезу *in vitro* бажаного білка. Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що реалізувати можна багато комбінацій делецій, вставок і заміщень за умов, що кінцевий білок буде мати біологічну активність GDNF.

Фахівцям у даній галузі добре відомі способи мутагенезу при здійсненні заміщень, вставок або делецій одного чи більше вибраних амінокислотних залишків, наприклад, [Патент США №4518584], розкриття якого введене у даному опису посиланням. Існують дві принципові змінності у конструюванні варіантів амінокислотних послідовностей: розміщення сайту мутації і природа мутації. У розробленні варіантів зрізаних GDNF білків розміщення сайту мутації і природа мутації залежать від біохімічних характеристик, що підлягають зміні. Сайти мутації можуть модифікуватися індивідуально або групами, наприклад, (1) заміщенням спочатку консервативним добіром амінокислот і потім більш радикальною селекцією, залежно від досягнутих результатів; (2) делецією амінокислотного залишку-мішені і (3) вставкою амінокислотних залишків, що прилягають до розміщеного у певному місці сайту.

Делеції амінокислотних послідовностей зазвичай охоплюють проміжки від 1 до 30 амінокислотних залишків, а частіше - від 1 до 10 залишків, і найчастіше - від 1 до 5 залишків. Наприклад, делеції «Х»-ділянки амінокислотних залишків, розміщених на N-кінці до Cys⁴¹, можуть простягатися приблизно від 1 до 30 залишків, у той час як делеції між цистеїновими залишками [Cys⁴¹-Cys¹³³], як правило, охоплюють від 1 до 5 залишків, залежно від їхнього місця знаходження, так, щоб не пошкодити складчастості білка. Делеції в зрізаних GDNF білках можуть бути здійснені на ділянках низької гомології з членами родини трансформуючого β-фактора росту (TGF-β). Делеції із зрізаних GDNF білків в зонах значної гомології з іншими послідовностями родини TGF-β будуть, очевидно, змінювати біологічну активність у більш значній мірі. Кількість повних і/або послідовних делецій вибирається так, щоб зберегти третинну структуру зрізаного GDNF білка на зачепленій ділянці, наприклад, цистеїнову перехресну зв'язку.

Додавання амінокислотних послідовностей можуть включати у себе аміно- і/або карбокси-кінцеві злиття, що простягаються на довжині від 1 до 100 і більше залишків, а також внутрішні вставки поодиноких або багатьох амінокислотних залишків усередині послідовностей. Внутрішні додавання можуть, у загальному випадку, складати від 1 до 10, а частіше - від 1 до 5, і найчастіше - від 1 до 3 амінокислотних залишків. Як зазначалось вище, варіант з амінокінцевою добавкою за винаходом розглядається як такий, що включає у себе добавку метіоніну (наприклад, як артефакт прямої експресії GDNF у бактеріальній рекомбінантній клітинній культурі) або не GDNF амінокислотного залишку чи послідовності. Варіанти з амінокінцевими добавками не включають у себе додавання амінокислотних залишків, яке б могло викликати реконструкцію зрілого GDNF білка. Серед інших прикладів кінцевих вставок можна назвати злиття гетерологічної N-кінцевої сигнальної послідовності з N-кінцем для полегшення секреції білка із рекомбінантних клітин-хазяїнів. Такі сигнальні послідовності у загальному випадку повинні одержуватися із призначених видів клітин-хазяїнів і, таким чином, бути їм гомологічними. Вставки або додавання можуть бути також амінокислотними послідовностями, введеними із послідовності інших нейротрофічних факторів.

Іншою групою варіантів є білки з амінокислотними заміщеннями. В цих варіантах зрізаних GDNF білків принаймні один амінокислотний залишок видалений, а на його місце вставлений інший, відмінний від нього залишок. Наприклад, на Фіг.5 показано як утворений природним шляхом Asn²² був замінений на Ser для того, щоб полегшити подальше видалення залишку Met. Використовуючи представлення амінокислотної послідовності X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y і нинішнє визначення зрізаних GDNF білкових продуктів, такий зрізаний GDNF білок можна відносити як до варіанта з заміщенням Met-[Asn²²ΔSer²²-Ile¹³⁴], так і до варіанта з додаванням Met-Ser-[Pro²³-Ile¹³⁴]. Заміщені білки включають у себе альельні варіанти, які характеризуються природно виникаючими замінами нуклеотидних послідовностей у популяції виду, які як можуть, так і не можуть приводити до заміни амінокислот.

Специфічні мутації послідовностей зрізаних GDNF білків можуть включати у себе модифікації сайту глікозилювання (наприклад, серін, треонін або аспарагін). Відсутність глікозилювання або тільки часткове глікозилювання можуть викликатися заміщенням або делецією амінокислот у будь-якому сайті узнання аспарагін-зв'язаного глікозилювання або у будь-якому сайті білка, модифікованого додаванням О-зв'язаного вуглеводу. Сайт узнання аспарагін-зв'язаного глікозилювання містить трипептидну послідовність, яка специфічно розпізнається відповідними клітинними ферментами глікозилювання. Цими трипептидними послідовностями є Asn-Xaa-Thr або Asn-Xaa-Ser, де Xaa може бути будь-якою амінокислотою, відмінною від Pro. Багато заміщень або делецій амінокислот в одному чи обох з перших чи третіх амінокислотних положень сайту узнання глікозилювання (і/або делеції амінокислоти у другому положенні) дають неглікозильований стан у модифікованій трипептидній послідовності. Таким чином, експресія відповідним чином змінених нуклеотидних послідовностей дає варіанти білків, неглікозильованих у такому сайті. В альтернативному варіанті послідовність може бути модифікована таким чином, щоб додати сайти глікозилювання до зрізаного GDNF білка.

Один з методів ідентифікації зрізаних GDNF амінокислотних залишків або ділянок для мутагенезу зветься «аланіно-схануючий мутагенез» [Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085, 1989]. Згідно з цим методом ідентифікується амінокислотний залишок або група залишків-мішеней (тобто заряджені залишки, такі як Arg, Asp, His, Lys, Glu), які потім заміщуються нейтральними або негативно зарядженими амінокислотами (у найкращому варіанті - аланіном або поліаланіном) з тим, щоб провести взаємодію амінокислот з водняним оточенням в клітині або зовні неї. Ті домени, які демонструють функціональну чутливість до заміщень, потім очищуються введенням додаткових або альтернативних залишків до сайтів заміщення. Таким чином, тут спочатку визначається сайт для введення модифікації амінокислотної послідовності, а для оптимізації

здійснення мутації у даному сайті можуть проводитися аланінові сканування, або випадковий мутагенез і варіанти можуть відбиратися за оптимальною комбінацією бажаної активності і ступеню активності.

Сайти, які являть собою найбільший інтерес для заміщувального мутагенезу, включають до свого числа такі, де амінокислоти, знайдені в GDNF білках від різних видів, суттєво відрізняються за об'ємом бічних ланцюгів, зарядом і/або гідрофобністю; Цікавими сайтами є також такі, в яких ідентичними є окремі залишки GDNF-подібних білків, одержаних із різних видів. Такі положення мають загальну важливість для біологічної активності білка. Спочатку ці сайти модифікуються заміщеннями порівняно консервативним шляхом. Такі консервативні заміщення показані у колонці «Кращі заміщення» Табл. Якщо такі заміщення дають зміни біологічної активності, то тоді проводяться більш суттєві зміни (типові заміщення) і/або можуть бути зроблені інші доповнення і/або делеції, а одержані продукти піддані відбору.

Таблиця

Амінокислотні заміщення

Початковий залишок	Кращі заміщення	Типові заміщення
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин;
Leu(L)	Ile	норлейцин; He; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Leu	Leu; Val; He; Ala
Pro (P)	Gly	Gly
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	He; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин

Передбачається, що консервативні модифікації амінокислотних послідовностей (і відповідні модифікації кодуєчих амінокислотних послідовностей) дозволять виробляти зрізані GDNF білки з функціональними і хімічними характеристиками, подібними до характеристик зрізаних GDNF білків, описаних у Прикладах нижче. У протилежність цьому, суттєві зміни функціональних і/або хімічних характеристик зрізаних GDNF білків можуть бути здійснені відбором заміщень, які значно відрізняються одне від одного за своїм ефектом щодо підтримання (а) структури поліпептидного остову у зоні заміщення, такої, наприклад, як складчаста або спіральна конформація, (б) заряду або гідрофобності білка в сайті-мішені, (в) об'єму бічного ланцюга. Залишки, що виникають природним шляхом, діляться на наступні групи за загальними властивостями бічних ланцюгів:

1. гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
2. нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr;
3. кислотні: Asp, Glu;
4. основні: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
5. залишки, які впливають на зорієнтування ланцюгів: Gly, Pro;
6. ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміщення можуть залучати взаємозаміну членів цих класів. Такі заміщені залишки можуть бути введені у ділянки зрізаних GDNF білків, які є гомологічними іншим TGF- β білкам, або у негомологічні ділянки білків.

Б. Зрізані GDNF похідні

Хімічно модифіковані похідні зрізаних GDNF або варіантів зрізаних GDNF можуть бути приготовлені фахівцем у даній галузі за наданим нижче описом. Серед хімічних компонентів, найбільш прийнятних для одержання похідних зрізаних GDNF білків знаходяться водорозчинні полімери. Бажаність використання водорозчинного полімеру пояснюється тим, що білок, до якого він приєднується, не випадає до осаду у водному, тобто фізіологічному середовищі. Краще, якщо полімер є фармацевтично прийнятним для приготування терапевтичного продукту або композиції. Фахівець у даній галузі буде у спроможності вибрати потрібний полімер, виходячи з того, чи буде даний полімер - білковий кон'югат терапевтично корисним і, якщо так, то які будуть потрібні дози, час циркуляції, стійкість до протеолізу і под. Ефективність дериватизації може бути підтверджена введенням даної похідної пацієнту у потрібній формі (тобто шляхом осмотичного насоса або краще ін'єкції чи інфузії, або ж приготуванням рецептів для перорального прийому, прийому крізь органи

дихання та іншими шляхами введення) і оцінкою її ефекту.

До прийнятних водорозчинних полімерів належать, але без будь-яких обмежень, наступні: поліетиленгліколь (ПЕГ), співполімери етиленгліколю і пропіленгліколю, монометоксиполіетиленгліколь, карбоксиметилцелюлоза, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1,3-диоксолан, полі-1,3,6-триоксан, співполімер етилену і малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (як гомополімери, так і випадкові співполімери), полі(н-вінілпіролідон)-поліетиленгліколь, гомополімери поліпропіленгліколю, співполімери оксидів поліпропілену і етилену, поліоксидетильовані поліолі (наприклад, гліцерол), пропіональдегід поліетиленгліколю та їхні суміші. У даному опису терміном «поліетиленгліколь» (ПЕГ) охоплюються усі форми ПЕГ, такі як моно(C1-C10)алкокси- або арилокси-поліетиленгліколь, які були використані для дериватизації інших білків. Більших переваг у виробництві може надавати пропіональдегід поліетиленгліколю завдяки його стабільності у воді. Цей полімер може мати будь-яку молекулярну вагу і бути як розгалуженим, так і нерозгалуженим.

Винахід, зокрема, стосується зрізаних GDNF білкових продуктів і, у тому числі, зрізаного GDNF білка, зв'язаного принаймні з однією молекулою ПЕГ. В іншому своєму аспекті винахід стосується зрізаного GDNF білка, приєднаного принаймні до однієї молекули ПЕГ крізь ацильний або алкільний зв'язок.

Пегілювання можна проводити шляхом будь-якої відомої реакції пегілювання, див., наприклад, [Focus on Growth Factors 3(2); 4-10, 1992; EP 0154316; EP 0401384; Malik et al., Exp. Hematol. 20: 1028-1035, 1992 (повідомляє про пегілювання GM-CSF за допомогою трезилхлориду)]. Краще, якщо пегілювання здійснюється шляхом реакції ацилювання або реакції алкілювання реакційно спроможним водорозчинним полімером. Ці засоби дериватизації, що пропонуються як кращі, докладно розглянуто нижче. Для реакції ацилювання відбираються переважно полімери, у яких єдиною реакційно спроможною групою є ефірна група. Для відновлюючих реакцій алкілювання відбираються переважно полімери, в яких єдиною реакційно спроможною є альдегідна група. Крім того, відібраний полімер може бути модифікований у форму з однією реакційно спроможною групою, таку як активний ефір для ацилювання або альдегід для алкілювання, таким чином, щоб можна було контролювати ступінь полімеризації. У загальному випадку, водорозчинний полімер не вибирається серед глікозилевих залишків, які утворюються природним шляхом, оскільки зазвичай їх більш спідручно одержувати за допомогою рекомбінантних експресорних систем ссавців.

Ацилювання

Згідно з винаходом, пегілювання шляхом ацилювання у загальному випадку включає у себе здійснення реакції активної ефірної похідної поліетиленгліколю зі зрізаним GDNF білком. Для здійснення процесу пегілювання може використовуватися будь-яка відома або ще невідкрита реакційно спроможна молекула ПЕГ. Кращим активованим ПЕГ-ефіром є ПЕГ, етерифікований на N-гідроксисукцинімід (NHS). Термін «ацилювання», який використовується у даному описі, включає у себе без обмежень наступні типи зв'язку між зрізаним GDNF білком і водорозчинним полімером, таким як ПЕГ: амідний, карбаматний, уретановий і под. [Bioconjugate Chem, 5: 133-140, 1994]. Умови реакції можуть бути вибрані серед будь-яких відомих у техніці петлювання умов, або ще невідомих умов, які можуть бути розроблені, але при цьому потрібно виключати або обмежувати такі умови реакції - температури, розчинники і рівні pH, - які можуть викликати інактивацію зрізаного GDNF білка, що модифікується.

Петлювання шляхом ацилювання у загальному випадку дає поліпегільований зрізаний GDNF білок, у якому ε-аміногрупи лізину пегільовані групою ацильного зв'язку. Краще, якщо зв'язок є амідним. Краще також, якщо вироблений продукт є переважно (наприклад, $\geq 95\%$) тільки моно-, ди- або три-пегільований. Проте, можуть бути утворені також деякі кон'югати з більш високими ступенями пегілювання, у кількостях, які залежать від специфічних умов реакції, що використовуються. У разі необхідності можуть бути приготовлені більш очищені, пегільовані кон'югати із сумішей за допомогою стандартних способів очищення, у тому числі, діалізу, висолювання, надфільтрації, іонообмінної хроматографії, гель-фільтрації і електрофорезу.

Алкілювання

Згідно з даним винаходом, пегілювання шляхом алкілювання у загальному випадку включає у себе реакцію кінцевої альдегідної похідної ПЕГ зі зрізаним GDNF білком при наявності відновлюючого агента. Пегілювання шляхом алкілювання може також давати поліпегільований зрізаний GDNF білок. Крім того, можна варіювати умовами реакції для сприяння пегілюванню практично тільки на α-аміногрупі N-кінця білка (тобто монопегільований вид). Як при монопегілюванні, так і при поліпегілюванні краще, якщо ПЕГ-групи приєднуються до білка крізь групу -CH₂-NH-. Зокрема, щодо групи -CH₂-, то цей тип зв'язку у даному опису зветься «алкільним».

Селективна N-кінцева хімічна модифікація може бути виконана шляхом відновлюваного алкілювання, при якому використовується диференціальна реактивність різних типів первинних аміногруп (лізину відносно N-кінця), доступних для дериватизації у певному білку. У відповідних умовах реакції досягається по суті селективна дериватизація білка на N-кінці полімером з карбонільною групою. Наприклад, можна здійснити селективне N-кінцеве пегілювання білка шляхом реакції при величині pH, яка дозволяє використовувати різницю в pK_a між ε-аміногрупами лізинових залишків і α-аміногрупою N-кінцевого залишку білка. Така селективна дериватизація дозволяє контролювати приєднання водорозчинного полімеру до білка: кон'югація з полімером відбувається, головним чином, на N-кінці білка, і при цьому не виникає значних змін інших реакційних груп, таких як аміногрупи бічного ланцюга лізину. При використанні відновлюваного алкілювання краще, якщо водорозчинний полімер має один реакційно спроможний альдегід для зв'язування з білком. Може бути використаний поліпропіональдегід поліетиленгліколю, який містить один реакційно спроможний альдегід.

Винахід включає у себе пегільовані зрізані GDNF білки, в яких група або групи ПЕГ приєднані крізь ацильні або алкільні групи. Як згадувалось вище, такі зрізані GDNF білкові продукти можуть бути як монопегільованими, так і поліпегільованими (наприклад, містити 2-6, краще - 2-5 груп ПЕГ). Групи ПЕГ зазвичай приєднуються до білка на α- або ε-аміногрупах амінокислот. Проте необхідно також розглядати можливість приєднання груп ПЕГ до реакційної групи білка, яка має реакційну спроможність, достатню для того, щоб приєднатися до групи ПЕГ у відповідних умовах реакції. Таким чином, поліетиленгліколь може бути

ковалентно зв'язаний з білком за посередництвом реакційної групи, такої як вільна аміно- чи карбоксильна група. Реакційні групи є такими, з якими може зв'язуватися активована молекула ПЕГ. Амінокислотними залишками з вільною аміногрупою можуть бути лізинові залишки і N-кінцевий амінокислотний залишок. До числа тих, які мають вільну карбоксильну групу, можуть входити залишки аспарагінової кислоти, залишки глутамінової кислоти і C-кінцевий амінокислотний залишок. Для приєднання молекули (чи молекул) ПЕГ можуть у якості реакційної групи використовуватися також сульфогідрильні групи. У терапевтичних цілях, як правило, більш прийнятним є приєднання до аміногрупи, таке як приєднання на N-кінці або лізиновій групі. Приєднання на залишках, які є важливими для рецепторного зв'язування, слід уникати, якщо рецепторне зв'язування є бажаним.

Згідно з одним зі своїх аспектів, даний винахід пропонує по суті гомогенне вироблення кон'югату типу «моно-полімер/зрізаний GDNF білок», в якому молекула полімеру приєднується практично (тобто на $\geq 95\%$) лише в одному місці. Більш конкретно, у випадку використання ПЕГ винахід пропонує пегільований зрізаний GDNF-білок, дефіцитний за можливими антигенними зв'язуючими групами, що мають молекулу ПЕГ, безпосередньо зв'язану зі зрізаним GDNF білком.

Крім того, похідні можуть бути одержані і з глікозильованих, неглікозильованих або деглікозильованих зрізаних GDNF білків. Як правило, використовуються неглікозильовані зрізані GDNF білки. Наприклад, прокаріотично експресований зрізаний GDNF білок [Arg³²-Ile¹³⁴] може бути хімічно дериватизований до включення у нього, наприклад, 2-4 моно- або полічастин ПЕГ, приєднаних ацильною або алкільною групою.

У загальному випадку хімічна дериватизація може здійснюватися у будь-яких відповідних умовах, що використовуються для реагування біологічно активних субстанцій з активованою полімерною молекулою. Способи вироблення пегільованих зрізаних GDNF білків у загальному випадку включають у себе етапи (а) реагування зрізаного GDNF білка з поліетиленгліколем (таким, як реакційно-спроможний ефір або альдегід, похідний від ПЕГ) в умовах, в яких зрізаний GDNF білок приєднується до однієї і більше груп ПЕГ, і (б) одержання реакційного продукту. Взагалі, оптимальні умови реакції для ацилювання визначаються для кожного випадку окремо, виходячи із відомих параметрів і потрібних результатів. Наприклад, чим більше співвідношення ПЕГ:білок, тим більше відсотковий вміст поліпегільованого продукту. Оптимальне (з огляду на ефективність реакції, в якій відсутній надлишок непрореагованого білка або полімеру) співвідношення може бути визначено такими факторами як потрібний ступінь дериватизації (наприклад, моно-, ди-, три- і т.д.), молекулярна маса вибраного полімеру, розгалуженість полімеру, тобто чи є полімер розгалужений чи нерозгалужений, і даними умовами реакції.

Відновлювальне алкілювання для одержання по суті гомогенної популяції кон'югату «моно-полімер/зрізаний GDNF білок» у загальному випадку складається з наступних етапів: (а) реагування зрізаного GDNF білка з реакційно спроможною молекулою ПЕГ в умовах відновлювального алкілювання при величині рН, відповідній до потрібного забезпечення можливостей здійснення селективної модифікації ос-аміногрупи на амінокінці зрізаного GDNF білка; (б) одержання продукту реакції.

Для практично гомогенної популяції кон'югату «моно-полімер/зрізаний GDNF білок» умови реакції відновлювального алкілювання є такими, які дозволяють селективне приєднання водорозчинної полімерної частини до N-кінця зрізаного GDNF білка. Такі умови реакції у загальному випадку дають різницю в рK_a між аміногрупами лізину і α-аміногрупою на N-кінці (де рK_a є рН, при якій 50% аміногруп протонізується, а 50% - ні). Величина рН впливає також на співвідношення полімеру до білка, що використовується. У загальному випадку, чим нижчою є рН, тим більший потрібен бути надлишок полімеру відносно білка (тобто, чим меншою є реактивність N-кінцевої α-аміногрупи, тим більше потрібно полімеру для досягнення оптимальних умов). Якщо рН підвищується, то потреби у такому великому співвідношенні полімер/білок немає (тобто, чим більше є реакційних груп, тим менше потрібно молекул полімеру). Для цілей даного винаходу рН, зазвичай, знаходиться у межах 3-9, і краще - у межах 3-6.

Іншим фактором є молекулярна маса полімеру. Взагалі, чим більше молекулярна маса полімеру, тим менша кількість його молекул зможе приєднатися до білка. Подібним чином, при оптимізації цих параметрів до уваги треба приймати розгалуження полімеру. У загальному випадку, чим більшою є молекулярна маса (або чим більшим є розгалуження), тим більшим є співвідношення полімер/білок. Як правило, для реакцій пегілювання, які тут розглядаються, краще, якщо середня молекулярна маса знаходиться у межах приблизно від 2kDa до 100kDa (термін «приблизно» означає, що при приготуванні поліетиленгліколю деякі молекули мають масу, більшу або меншу за встановлену). Краще, якщо середня молекулярна маса становить приблизно від 5kDa до 50kDa, і ще краще, якщо приблизно від 12kDa до 25kDa. Співвідношення водорозчинного полімеру до зрізаного GDNF білка у загальному випадку знаходиться у межах від 1:1 до 100:1, краще - від 1:1 до 20:1 (для поліпегілювання) і від 1:1 до 5:1 (для монопегілювання).

При використанні вищезазначених умов відновлювальне алкілювання дає селективне приєднання полімеру до зрізаного GDNF білка, який має α-аміногрупу на амінокінці, і дозволяє практично гомогенне приготування кон'югату «моно-полімер/зрізаний GDNF білок». Терміном «кон'югат моно-полімер/зрізаний GDNF білок» тут називається похідна, яка містить одну молекулу полімеру, приєднану до зрізаного GDNF білка. Кон'югат «моно-полімер/зрізаний GDNF білок» у кращому варіанті має полімерну молекулу, розміщену на N-кінці, а не на боці аміногруп лізину. Краще, якщо одержаний продукт містить більше 90% кон'югату «моно-полімер/зрізаний GDNF білок» і ще краще, якщо він містить більше 95% кон'югату «моно-полімер/зрізаний GDNF білок», у той час як решта білків, що спостерігаються, залишається непрореагованою (тобто, білок з дефіцитом полімерної частини).

При відновлювальному алкілюванні відновлюючий агент повинен бути стійким у водному розчині, і краще, якщо він є спроможний відновлювати тільки основу Шіффа, що утворилася у початковому процесі відновлювального алкілювання. Типові відновлюючі агенти можуть бути вибрані із групи, яка складається із боргідриду натрію, цианоборгідриду натрію, борану диетиламіну, борану триетиламіну і борану піридину. Серед відновлюючих агентів особлива перевага віддається ці аноборгідриду натрію. Решта параметрів реакції, таких як розчинник, тривалість реакції, температура та ін., а також засоби очищення продуктів можуть

визначатися у кожному випадку окремо, виходячи із загальної інформації щодо дериватизації білків водорозчинними полімерами.

За допомогою методів ацилювання і/або алкілювання можна готувати також суміші полімер-білкових кон'югатів, використовуючи при цьому нову можливість вибирати потрібну частину кон'югату моно-полімер/білок для введення до суміші. Таким чином, якщо потрібно, можна приготувати суміш білків, що мають різні кількості приєднаних до них молекул полімеру (тобто ди-, три-, тетра-, і т.д.), і комбінувати її з матеріалом кон'югату моно-полімер/білок, виготовленого за допомогою даних способів, і в результаті одержати суміш з заданою пропорцією моно-полімер/білкового кон'югату.

Полінуклеотиди, що кодують зрізані GDNF білки.

У відповідності з даним винаходом, пропонуються нові полінуклеотиди, які кодують зрізані GDNF білки. Нуклеїно кислотна послідовність, якщо її використовують у якості зонда гібридизації або праймера ампліфікації, повинна бути практично вільною від усіх інших амінокислотних послідовностей. Для того, щоб використовувати нуклеїно кислотну послідовність у рекомбінантній експресії білків, вона у загальному випадку не повинна мати нуклеїно кислотних послідовностей, кодуючих інші білки, якщо метою процесу не є одержання злитого білка. Користуючись даним описом і універсальною кодовою таблицею, фахівець зможе легко визначити усі нуклеїно кислотні послідовності, які кодують амінокислотні послідовності зрізаних GDNF білків. На сьогоднішній день перевага віддається нуклеїно кислотним послідовностям, які містять полінуклеотиди, які кодують зрізані GDNF білки [Arg¹⁶-Ile¹³⁴], [Ser²⁶-Ile¹³⁴], [Arg³²-Ile¹³⁴] і [Lys³⁷-Ile¹³⁴]. Ряд прикладів полінуклеотидів наведений на Фіг. 5, 6 і 7, а їхніх частин, які кодують зрізані GDNF білки, - на Фіг.1, 3 і 4. Фахівцеві зрозуміло також, що нові полінуклеотиди, що кодують зрізані GDNF білки, включають у себе нуклеїно кислотні послідовності, які кодують різні зрізані GDNF білки, які можуть бути одержані як штучним, так і природним шляхом.

Для виготовлення таких полінуклеотидів і експресії різноманітних зрізаних GDNF білків можна вживати рекомбінантні методи експресії відповідно до наданого нижче опису. Наприклад, інсерцією нуклеїно кислотної послідовності, яка кодує зрізаний GDNF білок, до відповідного вектора фахівцеві може легко продуктувати великі кількості потрібної нуклеотидної послідовності. Ці послідовності можуть потім бути використані для генерації детекторних зондів або ампліфікаційних праймерів. Полінуклеотид, який кодує зрізаний GDNF білок, можна ввести до вектора експресії. Введенням вектора експресії до відповідного хазяїна можна потрібний зрізаний GDNF білок продукувати у великих кількостях.

Як описано нижче, існує багато систем хазяїн/вектор, які можна використовувати для вирощування нуклеїно кислотних послідовностей і/або вироблення зрізаних GDNF білків. До них зараховуються без будь-якого обмеження плазмідні, вірусні і інсерційні вектори, прокаріотичні і еукаріотичні клітини-хазяїни. Фахівцеві у даній галузі нескладно буде адаптувати систему хазяїн/вектор, спроможну до культивування або експресії змішаних ДНК для вироблення або експресії послідовностей за винаходом.

За допомогою таких рекомбінантних методів можна дуже легко виробляти зрізані GDNF білки за винаходом у промислових кількостях. Більш того, зрозуміло, що з огляду на даний опис, до числа нових нуклеїно кислотних послідовностей входять вироджені нуклеїно кислотні послідовності, які кодують зрізані GDNF білки, конкретно визначені нижче на ілюстраціях, варіанти таких зрізаних GDNF білків і такі нуклеїно кислотні послідовності, які гібридизуються, причому переважно у жорстких умовах, з комплементами цих нуклеїно кислотних послідовностей [Maniatis et al., Molecular Cloning (A Laboratory Manual); Cold Spring Harbor Laboratory, page 387-389, 1982]. Типовими жорсткими умовами гібридизації є наступні: гібридизація у 4 x SSC при 62-67°C з наступним промиванням у 0,1 x SSC при 62-67°C на протязі 1 години. У якості альтернативних типових умов можуть використовуватися; гібридизація у 45-55% формаміді, 4 x SSC при 40-45°C. Сюди включаються також ДНК послідовності, які гібридизуються у послаблених умовах з послідовностями, комплементарними зрізаному GDNF білку, і кодують зрізаний GDNF білок за винаходом. Такими послабленими умовами гібридизації можуть бути, наприклад: 4 x SSC при 45-55°C або гібридизація у 30-40% формаміді при 40-45°C.

Винаходом пропонуються також рекомбінантні GDNF конструкції, куди входить вектор ДНК разом з ДНК послідовністю, кодующею зрізаний GDNF білок. У такій ДНК конструкції нуклеїно кислотна послідовність, що кодує зрізаний GDNF білок (з сигнальними пептидами або без них), знаходиться в оперативній сукупності з відповідною послідовністю контролю чи регулювання експресії, спроможною скеровувати реплікацію і/або експресію зрізаного GDNF білка у вибраному хазяїні.

Рекомбінантна експресія зрізаного GDNF білка

Одержання полінуклеотидів, кодуючих зрізаний GDNF

Нуклеїно кислотну послідовність, кодующею зрізаний GDNF; або зрілий первинний GDNF матеріал, можна легко одержати найрізноманітнішими способами, і у тому числі, без обмежень, шляхом хімічного синтезу, скринінгу кДНК або геномної бібліотеки, скринінгу бібліотеки експресії і/або ампліфікації ДНК за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Ці та інші способи, прийнятні для виділення таких нуклеїно кислотних послідовностей, описані, наприклад, в [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; Ausubel et al., eds Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press, 1994; Berger and Kimmel, Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques, Vol.152, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1987], При цьому кращими нуклеїно кислотними послідовностями, кодуючи ми GDNF, є послідовності ссавців.

Хімічний синтез нуклеїно кислотної послідовності, кодующею зрізаний GDNF білок, може бути здійснений також за допомогою добре відомих способів, наприклад, описаного в [Engels et al., Angew. Chem. Intl. Ed. 28: 716-734, 1989]. До числа цих способів, поряд з іншими, належать фосфотриєфірний, фосфорамідний і Н-фосфонатний способи синтезу нуклеїно кислотних послідовностей. Нуклеїно кислотна послідовність, що кодує зрізаний GDNF білок, має довжину, яка вимірюється кількома сотнями основних пар (bp) або еуклеотидів. Великі нуклеїно кислотні послідовності, наприклад, довжиною більше ніж 100 нуклеотидів можуть бути синтезовані кількома фрагментами. Ці фрагменти потім можуть бути об'єднані разом і утворювати

нуклеїнокислотну послідовність, кодує зрізаний GDNF білок. При цьому кращим є полімерно-підтримуваний синтез за стандартною фосфорамідною хімічною технологією.

Потрібна нуклеїнокислотна послідовність може бути одержана також шляхом скринінгу відповідної бібліотеки кДНК (тобто бібліотеки, приготовленої із одного або більше джерел тканин, спроможних експресувати білок) або геномної бібліотеки (бібліотеки, виготовленої із повністю геномних ДНК). Джерелом бібліотеки кДНК, як правило, є тканина від будь-якого біологічного виду, спроможна експресувати GDNF у потрібних кількостях. Джерелом геномної бібліотеки може бути будь-яка тканина або тканини ссавця або іншого біологічного виду, в котрій може знаходитися ген, кодує GDNF або гомолог GDNF. Така бібліотека може бути піддана скринінгу на наявність кДНК/гена GDNF, з використанням одного і більше нуклеїнокислотних зондів (олігонуклеотидів, кДНК або геномних ДНК фрагментів, які мають прийнятний рівень гомологічності з GDNF або гомологічними GDNF кДНК чи гена, що клонуються), які селективно гібридизуються з GDNF або гомологічними GDNF кДНК чи генами, наявними в бібліотеці. Зонди, які знаходять використання для такого скринінгу, зазвичай кодує малі ділянки ДНК послідовності GDNF від виду, того ж самого або подібного тому, із якого була утворена бібліотека. В альтернативному варіанті зонди можуть бути вироджені, як розглянуто нижче.

Скринінг бібліотеки, зазвичай, здійснюється шляхом відпалювання олігонуклеотидного зонда або кДНК у клони в жорстких умовах, які запобігають неспецифічному зв'язуванню, але дозволяють зв'язування тих клонів, які мають значний рівень гомології з зондом або праймером. Типові умови гібридизації і промивання залежать частково від розміру (тобто кількості нуклеотидів по довжині) кДНК олігонуклеотидного зонда, а також від того, чи є зонд вироджений. При розробці розчину гібридизації до уваги приймається також імовірність одержання клону або клонів (тобто те, яка бібліотека повинна бути піддана скринінгу - кДНК чи геномна?; якщо це бібліотека кДНК, то високою є імовірність наявності потрібної кДНК).

Там, де використовуються фрагменти ДНК (такі як кДНК), типові умови гібридизації включають у себе такі, які зазначені в [Ausubel et al., див. вище]. Після гібридизації, блот, який містить бібліотеку, промивається з ретельністю, яка залежить від кількох факторів, таких як розмір зонда, очікувана гомологія зонда з клоном, тип бібліотеки, що піддається скринінгу, кількість клонів, що піддаються скринінгу, і под. У якості розчинів ретельної промивки (які зазвичай є низькоіонізованими і вживаються при відносно високих температурах) можуть використовуватися наступні: 0,015 M NaCl, 0,005 M Na-цитрат і 0,1% SDS при 55-65°C; буфер 1mM Na₂EDTA, 40mM NaHPO₄, pH 7,2 і 1% SDS при приблизно 40-50°C; промивочний розчин 0,2 X SSC і 0,1% SDS при приблизно 50-60°C.

Існують також типові протоколи для умов ретельної промивки, де олігонуклеотидні зонди використовуються для скринінгу кДНК- або геномних бібліотек. Наприклад, згідно з першим протоколом використовується 6 X SSC з 0,05% пірофосфату натрію при температурі у межах приблизно від 35 до 62°C залежно від довжини зонда. Наприклад, 14 основних зондів промиваються при 35-40°C, 17 основних зондів - при 45-50°C, 20 основних зондів - при 52-57°C і 23 основних зонди - при 57-63°C. Температура може бути підвищена на 2-3 градуси там, де фонове неспецифічне зв'язування видається високим. Згідно з іншим протоколом, для промивання використовується хлорид тетраметиламонію (TMAC). Одним з таких розчинів ретельної промивки є 3 M TMAC, 50mM Tris-HCl, pH 8,0, і 0,2% SDS.

Іншим прийнятним способом одержання нуклеїнокислотної послідовності, кодує GDNF білок, є полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР). Згідно з цим способом, із тканини, що експресує GDNF, екстрагується полі(А)+РНК або повна РНК. Потім із РНК одержують кДНК за допомогою зворотної транскриптази. Далі, до кДНК разом з полімеразою, такою як TAQ, додаються 2 праймери, як правило, комплементарні до двох окремих ділянок кДНК (олігонуклеотидів) GDNF і полімераза ампліфікує ділянку кДНК між двома праймерами.

Там, де спосіб вибору для приготування нуклеїнокислотної послідовності, кодує потрібний зрізаний GDNF білок, потребує використання олігонуклеотидних праймерів або зондів (наприклад, полімеразно-ланцюгова реакція, скринінг кДНК або геномної бібліотеки), олігонуклеотидні послідовності, вибрані у якості зондів або праймерів, повинні мати адекватну довжину і бути достатньо недвозначні, щоб звести до мінімуму кількість неспецифічного зв'язування, яке виникає під час скринінгу бібліотеки або ПЛР ампліфікації. Фактична послідовність зонда або праймера зазвичай базується на консервованих або високогомологічних послідовностях або ділянках від того самого або подібного йому гена із іншого організму. При необхідності, зонди або праймери можуть бути повністю або частково вироджені, тобто містити суміш «зонди/праймери», кожен з яких кодує одну й ту ж саму амінокислотну послідовність, але за допомогою різних кодонів. У якості альтернативного способу одержання вироджених зондів можна помістити інозин у деякі або усі ті кодонові позиції, що у різних видів є різними. Олігонуклеотидні зонди або праймери можуть бути приготовлені методами хімічного синтезу ДНК, як описано вище.

Зрізані GDNF білки, основані на цих кодує GDNF нуклеїнокислотних послідовностях, а також їхні мутантні або варіантні послідовності також охоплюються об'ємом даного винаходу. Як указувалось вище, мутантною або варіантною послідовністю, є така, яка містить одне або більше нуклеотидних заміщень, делецій і/або вставок порівняно з послідовністю дикого типу, і яка приводить до експресії варіантів амінокислотних послідовностей порівняно з амінокислотною послідовністю дикого типу. У деяких випадках можуть існувати амінокислотні мутанти або варіанти GDNF, які виникають природним шляхом завдяки наявності природної алельної варіації. Зрізані GDNF білки, основані на таких виникаючих природним шляхом мутантах або варіантах, також охоплюються об'ємом даного винаходу. Способи приготування штучних мутантних послідовностей також добре відомі фахівцям уданій галузі і описані, наприклад, в [Wells et al., Gene 34:315, 1985; Sambrook et al., див. вище].

Вектори

Комплементарна ДНК або геномна ДНК, яка кодує зрізаний GDNF білок, вставляється у вектор для подальшого клонування (ампліфікації ДНК) або експресії. Відповідні вектори виробляються серійно, і їх можна придбати на ринку, або ж потрібний вектор може бути сконструйований окремо. Селекція або конструювання відповідного вектора залежить від (1) того, для чого він призначений - для ампліфікації ДНК або експресії ДНК;

(2) розміру ДНК, яка вставляється до вектора; і (3) клітини-хазяїна (наприклад, клітини ссавців, комах, дріжджові клітини, грибові клітини, рослинні та бактеріальні клітини), яка трансформується даним вектором. Кожний вектор містить різноманітні компоненти залежно від його функції (ампліфікація або експресія ДНК) і сумісності з даною клітиною-хазяїном. До числа компонентів вектора у загальному випадку включаються, без обмеження, сигнальна послідовність, ориджин реплікації, один або більше селективних або маркерних генів, підсилюючі елементи, промотори, послідовність завершення транскрипції і под. Ці компоненти можуть бути одержані із природних джерел або синтезовані відомими способами. До числа векторів за винаходом включається нуклеїнокислотна послідовність, яка кодує потрібний зрізаний GDNF білок, операбельно зв'язаний з однією або більше із наступних послідовностей контролю або регулювання експресії, спроможних скеровувати, контролювати або іншим чином впливати на експресію зрізаного GDNF білка вибраною клітиною-хазяїном.

Сигнальна послідовність

Сигнальна послідовність може бути компонентом вектора або частиною ДНК GDNF, яка вставляється до вектора. Нативна ДНК GDNF кодує сигнальну послідовність на амінокінці білка, який під час посттрансляційного процесінгу білка розщеплюється з утворенням зрілого GDNF білка. Об'ємом винаходу охоплюються зрізані GDNF полінуклеотиди з нативною сигнальною послідовністю та іншими послідовностями-попередниками, а також зрізані GDNF полінуклеотиди, в яких нативна сигнальна послідовність видалена і заміщена гетерологічною сигнальною послідовністю. Вибраною гетерологічною сигнальною послідовністю повинна бути така, яка розпізнається і піддається процесінгу клітиною-хазяїном, тобто розщеплюється сигнальною пептидазою. У випадку прокаріотичних клітин-хазяїнів, які не розпізнають і не піддають процесінгу нативну сигнальну послідовність GDNF, сигнальна послідовність заміщується прокаріотичною сигнальною послідовністю, вибраною, наприклад, із групи лідерних послідовностей лужної фосфатази, пеніцилінази або термостійкого ентеротоксину II. У випадку дріжджевої секреції нативна сигнальна послідовність GDNF може бути заміщена лідерами дріжджевої інвертази, α -фактора або кислої фосфатази. При експресії в клітинах ссавців достатньою є нативна сигнальна послідовність, хоч прийнятними можуть бути також інші сигнальні послідовності ссавців.

Ориджин реплікації

Вектори експресії і клонування зазвичай включають у себе нуклеїнокислотну послідовність, яка робить вектор спроможним до реплікації в одній або більше вибраних клітинах хазяїна. У векторах клонування ця послідовність є, зазвичай, такою, яка дозволяє вектору реплікацію незалежно від хромосомної ДНК хазяїна і включає у себе ориджин реплікації або автономно реплікуючі послідовності. Добре відоме існування таких послідовностей в численних видах бактерій, дріжджів і вірусів. Ориджин реплікації із плазмід рBR322 є підходящим для більшості грам-негативних бактерій, а різноманітні ориджини (наприклад, SV40, поліома, аденовірус, VSV і BPV) можна використовувати для векторів клонування в клітинах ссавців. У загальному випадку, для векторів експресії ссавців ориджин компонента реплікації не потребується (наприклад, ориджин SV40 часто використовується тільки тому, що він містить ранній промотор).

Ген селекції

Вектори експресії і клонування, як правило, містять ген селекції. Цей ген кодує «маркерний» білок, необхідний для виживання або росту трансформованих клітин-хазяїнів при рості у селективному культурному середовищі. Клітини-хазяїни, які не були трансформовані цим вектором, не містять ген селекції і, отже, не виживуть у культурному середовищі. Типові гени селекції кодують білки, які (а) надають стійкості антибіотикам та іншим токсинам, наприклад, ампіциліну, неоміцину, метотрексату, тетрацикліну; (б) поповнюють ауксотропну недостатність; (в) постачають критичні живильні речовини, відсутні у культурному середовищі.

Інші гени селекції можуть бути використані для ампліфікації гена, призначеного до експресії. Ампліфікація є процес, в якому гени, які є дуже потрібні для вироблення критичного для росту білка, багаторазово повторюються в tandemі у хромосомах послідовних генерацій рекомбінантних клітин. У якості прикладів прийнятних селективних маркерів для клітин-хазяїнів можна назвати дигідрофолатредуктазу (ДГФР) і тимідинкіназу. Клітинні трансформанти ссавців піддаються тиску селекції, під яким можуть вижити тільки дані трансформанти завдяки маркеру, наявному у векторі. Застосування тиску селекції входить у програму культивування трансформованих клітин в умовах, в яких концентрація агента селекції у середовищі послідовно змінюється, приводячи тим самим до ампліфікації як гена селекції, так і ДНК, яка кодує зрізаний GDNF. У результаті, із ампліфікованої ДНК синтезуються підвищені кількості зрізаного GDNF.

Наприклад, клітини, трансформовані геном селекції ДГФР, спочатку ідентифікуються культивуванням всіх трансформантів в культурному середовищі, яке містить метотрексат - конкурентний антагоніст ДГФР. При використанні ДГФР дикого типу відповідною клітиною-хазяїном є дефіцитна за активністю ДГФР клітинна лінія яєчника китайського хом'яка, див., наприклад [Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 77(7): 4216-4220, 1980]. Трансформовані клітини потім піддаються дії підвищених рівнів метотрексату. Це веде до синтезу численних екземплярів гена ДГФР і, водночас, численних екземплярів інших ДНК, присутніх у векторі експресії, таких як ДНК, кодуючих зрізаний GDNF білок.

Промотор

Вектори експресії і клонування за винаходом, як правило, містять промотор, який розпізнається організмом-хазяїном і операбельно зв'язаний з нуклеїнокислотою послідовністю, кодуючою зрізаний GDNF білок. Промотори є нетрансльованими послідовностями, розміщеними у зворотному напрямку (5') до стартового кодона структурного гена (у загальному випадку, у межах приблизно 100-1000 bp), які контролюють транскрипцію і трансляцію особливої нуклеїнокислотної послідовності, яка кодує зрізаний GDNF. Промотори умовно групують за одним або двома класами: індукційні промотори і конститутивні промотори. Індукційні промотори ініціюють підвищені рівні транскрипції від ДНК під їхнім контролем у відповідь на деякі зміни в умовах культури, таких як наявність або відсутність живильної речовини, або на зміну температури. Добре відомою є велика кількість промоторів, які розпізнаються різноманітними потенціальними клітинами-хазяїнами. Ці промотори операбельно зв'язані з ДНК, кодуючими зрізаний GDNF, шляхом видалення

промотора із ДНК джерела рестрикційним ферментативним розщепленням і вставлення потрібної промоторної послідовності у вектор. Нативна промоторна послідовність GDNF може бути використана для скерування ампліфікації і/або експресії ДНК зрізаного GDNF. Проте, кращим є гетерологічний промотор, якщо він дозволяє більшу транскрипцію і більш високий вихід експресованого білка порівняно з нативним промотором, і якщо він є сумісний з системою клітини-хазяїна, яка була вибрана для використання.

До числа промоторів, придатних до використання з прокаріотичними і хазяїнами, належать бета-лактамазні і лактозні промоторні системи; лужнофосфатазні і триптофанові (TRP) промоторні системи, а також гібридні системи, такі як TAC промотори. Прийнятними також є інші відомі бактеріальні промотори. Їхні нуклеотидні послідовності були опубліковані, що дозволяє фахівцеві зшивати їх з потрібною ДНК послідовністю (або послідовностями), використовуючи для цього лінкери або адаптори, необхідні для утворення потрібних сайтів рестрикції.

Відомі також відповідні промоторні послідовності для використання з дріжджевими хазяїнами. Дріжджеві енхансери головним чином використовуються з дріжджевими промоторами. Добре відомі відповідні промотори для використання з клітинами-хазяїнами ссавців, що включають до свого числа такі промотори, які одержуються із геномів вірусів, таких як вірус полііоми, вірус птишиної оспи, аденовірус (наприклад, аденовірус II), вірус бичачої папіломи, вірус птишиної саркоми, цитомегаловірус, ретровірус, вірус гепатиту В і, найкраще, мавпячий вірус 40 (SV40). До інших прийнятних промоторів ссавців належать гетерологічні промотори, наприклад, теплошоківі і актинові системи. Сьогодні у виробництві GDNF білків в клітинах CHO використовується промотор SR α [Takebe et al., *Mol. Cell. Biol.* 8(1): 466-472, 1988]. Підходящим вектором експресії є pDSR α 2, який буде описано нижче.

Енхансерний елемент

Енхансерна послідовність може бути вставлена у вектор для підвищення транскрипції ДНК послідовності, кодуєщої зрізаний GDNF білок за винаходом більш високими еукаріотами. Енхансерами є Cys-діючі елементи ДНК завдовжки приблизно 10-300 бп, які діють на промотор, підвищуючи його транскрипцію. Енхансери орієнтаційно і позиційно є відносно незалежні. Вони були знайдені у положеннях 5' і 3' до транскрипційної одиниці. Відомо декілька енхансерних послідовностей від генів ссавців (наприклад, глобін, еластаза, альбумін, альфа-фето-протеїн і інсулін). Проте, як правило, використовується енхансер від вірусу. Типовими підсилюючими елементами для активації еукаріотичних промоторів є енхансер SV40, цитомегаловірусний ранній промоторний енхансер, поліомний енхансер і аденовірусні енхансери. Оскільки енхансер може бути підданий сплайсінгу у вектор у положенні 5' або 3' до ДНК зрізаного GDNF, він зазвичай розміщується у сайті 5' від промотора.

Термінація транскрипції

Вектори експресії, що використовуються в еукаріотичних клітинах-хазяїнах (клітинах дріжджів, грибків, комах, рослин, тварин, людини або маючих ядра клітинах інших багатоклітинних організмів), також містять послідовності, необхідні для термінації транскрипції і стабілізації мРНК. Такі послідовності, зазвичай, можна одержати із нетрансльованих ділянок 5' і можливо 3' еукаріотичних ДНК або кДНК. Ці ділянки містять нуклеотидні сегменти, транскрибовані як поліаденильовані фрагменти в нетрансльованій частині мРНК, кодуєщої зрізаний GDNF.

Конструювання підходящих векторів, які містять один або більше вищеперелічених компонентів разом з потрібною послідовністю, кодуєщою зрізаний GDNF, здійснюється за стандартною технологією лігування. Виділені плазмідні або фрагменти ДН(С відщеплюють, кроють і знову зшивають у бажаному порядку для утворення потрібних плазмід. Для підтвердження того, що у результаті цих операцій були сконструйовані правильні послідовності, суміші лігування можуть бути використані для трансформування *E. Coli*, і одержані трансформанти можуть бути відібрані відомими способами, використовуючи стійкість до ампіциліну або тетрацикліну, як описано вище. Далі, із трансформантів приготують плазмідні, які потім аналізують розщепленням ендонуклеазою рестрикції і/або піддають секвенуванню для підтвердження наявності бажаної конструкції.

Можуть бути використані також вектори, які забезпечують перехідну експресію ДНК, кодуєчих зрізаний GDNF. У загальному випадку перехідна експресія потребує використання вектора експресії, який спроможний ефективно реплікувати в клітині-хазяїні так, що клітина-хазяїн акумулює багато копій вектора експресії і, у свою чергу, синтезує високі рівні бажаного білка, кодованого цим вектором. Системи перехідної експресії, які містять підходящий вектор експресії і клітину-хазяїна, забезпечують прийнятну позитивну ідентифікацію білків, кодованих клонованими ДНК, а також швидкий скринінг таких білків за бажаними біологічними або фізіологічними властивостями. Таким чином, системи перехідної експресії є особливо корисними при ідентифікації варіантів білка.

Відбір і трансформація клітин-хазяїнів

Даним винаходом пропонуються також клітини-хазяїни (наприклад, клітини бактерій, ссавців, комах, дріжджів, рослин), трансформовані нуклеїнокислотними послідовностями для використання в експресії рекомбінантного зрізаного GDNF білка. Трансформована клітина-хазяїн культивується у відповідних умовах, дозволяючих експресію нуклеїнокислотної послідовності. Вибір відповідних клітин-хазяїнів і способів трансформації, культивування, ампліфікації, скринінгу, вироблення продукту і очищення добре відомі фахівцям у даній галузі [Gething and Samrook, *Nature* 293: 620-625, 1981; або Kaufman et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5(7): 1750-1759, 1985; Howly et al., Патент США №4419446]. Зрізаний GDNF може бути експресований в *E. Coli* відповідно до опису Lin et al., [Заявка на патент США №07/855413; заявка №PCT/US92/07888; WO 93/06116], де згадується експресія зрілого GDNF. Інші типові матеріали і способи описані більш докладно нижче. Трансформована клітина-хазяїн культивується у відповідному середовищі, а експресований фактор потім може бути відновлений, виділений і очищений від культурного середовища (або від клітини, якщо експресія була внутрішньоклітинною) за допомогою відомих фахівцям відповідних засобів.

Відповідними клітинами-хазяїнами для клонування або експресії в них векторів, як зазначалося вище, є прокаріотичні, дріжджеві або більш еукаріотичні клітини. До числа прокаріотичних клітин відносяться без

обмеження еубактерії, такі як грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад, *E. coli*, *Bacilli*, такі як *B. subtilis*, види *Pseudomonas*, такі як *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* або *Serratia marcescens*. Можуть бути використані також способи клонування *in vitro*, наприклад, ПЛР або інші полімеразні реакції синтезу нуклеїнових кислот.

Окрім прокаріотичних клітин-хазяїнів, підходящими хазяїнами для експресії зрізаних GDNF білків можуть бути еукаріотичні мікроби, такі як ниткоподібні грибки або дріжджі. Серед найнижчих еукаріотичних мікроорганізмів-хазяїнів найбільш уживаними є *Saccharomyces cerevisiae* і звичайні пекарські дріжджі. Крім того, добре відомі і широко застосовуються також інші роди, види і штами.

Клітини-хазяїни, придатні для експресії глікозильованого зрізаного GDNF білка, виводяться із багатоклітинних організмів. Такі клітини-хазяїни спроможні до складних видів активності у процесінгу і глікозилюванні. Принципово можна використовувати більш високоеукаріотичні клітинні культури, незалежно від того, містять такі культури клітини хребетних або безхребетних, включно клітини рослин і комах. Добре відомо, що клітини хребетних використовуються для їх розмноження в культурах (тканин). У якості прикладів використання ліній клітин-хазяїнів ссавців можна назвати лінію CV1 нирки мавпи, трансформовану вірусом SV40 (COS-7), лінію ембріональної нирки людини (клітини 293 або 293, субклоновані для росту в суспензійній культурі), клітини нирки дитинчати хом'яка і клітини яєчника китайського хом'яка. До числа інших підходящих клітинних ліній ссавців належать, такі, як HeLa, клітини L-929 миші, лінії 3T3 із мишей Swiss, Balb-c або NIH, клітинні лінії BHK або HaK хом'яка.

Подібним чином використовувати у якості клітин-хазяїнів згідно з винаходом можна також бактеріальні клітини. Наприклад, у галузі біотехнології добре відоме використання у якості клітин-хазяїнів різноманітних штамів *E. coli* (наприклад, HB101, DH5 α , DH10 і MC1061). Можна вживати також різноманітні штами *Streptomyces spp.* і под. На сьогоднішній день кращими клітинами-хазяїнами для вироблення зрізаних GDNF білків вважаються бактеріальні клітини (наприклад, *Escherichia coli*) і клітини ссавців, такі як клітини яєчника китайського хом'яка, клітини COS і под.

Клітини-хазяїни трансфікуються і краще трансформуються вищеописаними векторами експресії або клонування і культивуються у відповідному живильному середовищі. Це середовище може бути модифіковане під відповідне для індукції промоторів, селекуючих трансформантів, або під ампліфікацію генів, кодуєчих бажані послідовності. Трансфікування і трансформація здійснюються добре відомими стандартними методами, які підбираються відповідно до певних клітин-хазяїнів. Наприклад, для клітин ссавців без клітинних стінок може бути використаний метод преципітації фосфатом кальцію. Вживати можна також такі добре відомі методи, як електропорація, мікроін'єкція та ін.

Культивування клітин-хазяїнів

Трансформовані клітини, що використовуються для продукування зрізаних GDNF білків за винаходом, культивуються у відповідному середовищі. Це середовище при необхідності може бути доповнене гормонами і/або іншими факторами росту (такими, як інсулін, трансферін, фактор епідермального росту та ін.), солями (такими як хлориди натрію, кальцію, магнію і фосфати), буферами (такими як HEPES), нуклеозидами (такими як аденозин і тимідін), антибіотиками (такими як гентаміцин), мікроелементами (що визначаються як неорганічні сполуки, зазвичай наявні у мікромолярних кінцевих концентраціях), а також глюкозою та іншими джерелами енергії. Можуть бути введені також інші добавки у відповідних концентраціях, як це добре відомо фахівцям у даній галузі. Відповідні умови культивування відібраних клітин-хазяїнів, такі як температура, pH та ін., також добре відомі фахівцям.

Зрізані GDNF білки виробляти можна також за допомогою способів гомологічної рекомбінації або рекомбінантної технології з використанням регулюючих елементів, введених у клітини, які вже містять ДНК, що кодує GDNF. Спосіб гомологічної рекомбінації первісно був розроблений для націлювання генів з метою індукції або корекції мутацій у транскрипційно активних генах [Kucherlapati, Prog. In Nuc. Acid Res. And Mol. Biol. 36:301, 1989]. У якості базового був розроблений спосіб введення специфічних мутацій до специфічних ділянок генома ссавця [Thomas et al., Cell. 44:419-428, 1986; Tomas and Capecchi, Cell. 51:503-512, 1987; Doetschman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8583-8587, 1988] або для корекції специфічних мутацій у дефективних генах [Doetschman et al., Nature 330:576-578, 1987]. Типові способи гомологічної рекомбінації описані в [US 5272071 (EP 91 90 3051, Публікація EP №505500; PCT/US90/07642, Міжнародна публікація №WO 91/09955], розкриття яких введене у даному опису посиланням.

Шляхом гомологічної рекомбінації ДНК послідовність, яка повинна бути введена до генома, може бути спрямована у специфічну ділянку певного гена приєднанням її до націлюючої ДНК. Націлюючою є ДНК, комплементарна (гомологічна) ділянці геномної ДНК. Малі частки націлюючої ДНК, комплементарні до специфічної ділянки генома, вводяться у контакт з батьківською ниткою під час реплікації ДНК. Це є загальною властивістю ДНК, введеною до клітини для гібридизації, а отже й для рекомбінації з іншими частками ендогенної ДНК крізь спільні гомологічні ділянки. Якщо ця комплементарна нитка приєднана до олігонуклеотиду, який містить мутацію або відмінну послідовність ДНК, то внаслідок рекомбінації вона також вводиться до новосинтезованої нитки. Завдяки функції корекції читування нова послідовність ДНК може служити у якості темплата. Таким чином, перенесена ДНК вводиться у геном.

Якщо послідовність конкретного гена є відомою і являє собою, наприклад, нуклеїноокислотну послідовність GDNF пре-про-послідовність або послідовність регулювання експресії, то частина ДНК, комплементарна вибраній ділянці гена, може бути синтезована або одержана іншим чином, наприклад, шляхом відповідної рестрикції нативної ДНК в специфічних сайтах узнавання, межуючих з даною ділянкою. Ця частина служить як націлююча послідовність після вставки в клітину і гібридизується з її гомологічною ділянкою у геномі. Якщо ця гібридизація виникає під час реплікації ДНК, то ця частина ДНК і будь-які додаткові зв'язані з нею послідовності будуть діяти як фрагмент Okazaki і будуть вшиті до новосинтезованої дочірньої нитки ДНК.

Згідно з винаходом, до цих частин націлюючої ДНК приєднуються ділянки ДНК, які можуть взаємодіяти з експресією GDNF білка. Наприклад, промотор/енхансер, супресор або модуляторний елемент екзогенної транскрипції вставляється у геном даної клітини-хазяїна у просторовій близькості і з орієнтацією, достатніми

для впливання на транскрипцію ДНК, кодуючої бажаний зрізаний GDNF. Регулюючий елемент не кодує зрізаний GDNF; а здійснює регулювання частини ДНК, яка знаходиться у геномі клітини-хазяїна. Таким чином, експресія зрізаних GDNF білків може досягатися не трансфікуванням ДНК, яка кодує сам ген зрізаного GDNF, а використанням націлюючої ДНК (яка містить ділянки, гомологічні з даним ендегенним геном), зв'язаної з ДНК регулюючими сегментами, які забезпечують послідовність ендегенного гена з розпізнаваними сигналами для транскрипції зрізаного GDNF білка.

Згідно з винаходом, способи гомологічної рекомбінації можуть також використовуватися для модифікації клітини, яка містить транскрипційно німий у нормальному стані GDNF ген для вироблення клітини, яка експресує GDNF. GDNF білок потім може бути процесований для утворення зрізаного GDNF білка (чи білків).

Фармацевтичні композиції зрізаного GDNF

Фармацевтичні композиції зрізаного GDNF білкового продукту, як правило, включають у себе терапевтично ефективну кількість зрізаного GDNF білка у суміші з одним і більше фармацевтично і фізіологічно прийнятними допоміжними матеріалами рецептури. У якості допоміжних матеріалів можуть використовуватися, але не обмежуються цим, наприклад, антиоксиданти, консерванти, забарвлюючі, смакові і розріджуючі агенти, емульгатори, суспензуючі агенти, розчинники, наповнювачі, об'ємонарошуючі агенти, буфери, доставляючі носії, розріджувачі, ексципієнти і фармацевтичні ад'юванти. Наприклад, у якості носія можуть бути використані вода для ін'єкцій, фізіологічний розчин, штучна цереброспінальна рідина (ЦСР), можливо доповнені іншими матеріалами, які, зазвичай, вживаються у композиціях для парентерального введення. Широке застосування у якості носіїв знаходять також нейтральний забуферений фізіологічний розчин і фізіологічний розчин, змішаний зі сироваточним альбуміном.

Первинний розчинник у носії за своєю природою може бути як водним, так і неводним. Крім того, носій може містити також інші фармацевтично прийнятні ексципієнти для модифікації або підтримання рН, осмотичних властивостей, в'язкості, світлості, кольору, стерильності, стабільності, швидкості розчинення, запаху фармацевтичного препарату. Подібним чином, носій може містити також інші фармацевтично прийнятні ексципієнти для модифікації або підтримання стабільності, швидкості розчинення або швидкості виведення зрілого GDNF білкового продукту, або для стимулювання поглинання чи penetрації зрізаного GDNF білкового продукту крізь гематоенцефалічний бар'єр. Такими ексципієнтами є речовини, які зазвичай вживаються для готування доз препаратів для парентерального введення як в одиничній, так і багатодозовій формі, або для прямої інфузії в ЦСР безперервною чи періодичною інфузією від імплантованого насосу.

Приготовлену терапевтичну композицію можна зберігати в стерильних посудинах у формі розчину, суспензії, гелю, емульсії, твердого тіла або зневодненого чи ліофілізованого порошку. Такі препарати можуть зберігатися як у формі, готовій до вживання, так і у формі, що потребує відновлення перед введенням, наприклад ліофілізований форми.

Оптимальна форма фармацевтичного препарату визначається фахівцем і залежить від шляху введення та потрібної дози, див., наприклад, [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042), pages 1435-1712], розкриття якої введене у даному опису посиланням. Композиція може бути приготовлена також у формі порошкових препаратів полімерних сполук, таких як полімолочна кислота, полігліколева кислота і под., або у ліпосомах. Може бути використана також гілауринова кислота, яка надає ефект затримки препарату у кровообізі. Такі композиції можуть справляти вплив на фізичний стан, стабільність, швидкість виділення *in vivo* і швидкість виведення *in vivo* вданих білків та їхніх похідних.

Передбачено також інші ефективні форми введення препаратів, такі як парентеральні препарати пролонгованої дії, інгаляційні аерозолі, орально активні препарати і свічі. Готуються також препарати звичайних фармацевтичних композицій зрізаного GDNF білкового продукту для парентерального введення, наприклад, шляхом інтрацеребровентрикулярної ін'єкції. Такі фармацевтичні композиції, зазвичай, мають форму апірогенного, парентерально прийнятного водного розчину, який містить зрізаний GDNF білковий продукт у фармацевтично прийнятному носії. Одним з кращих носіїв є фізіологічний розчин.

До уваги приймається також те, що деякі препарати, що містять зрізаний GDNF білковий продукт, повинні вводитися перорально. Для цього даний продукт можна заключати у капсулу і готувати із нього препарат як з застосуванням носіїв, що зазвичай вживаються для приготування твердих фармацевтичних форм, так і без них. Капсула може бути розрахована на вивільнення активної долі фармацевтичного препарату у місці гастроінтестинального тракту, коли його біодоступність буде максимальною, а предсистематична деградація - мінімальною. Додаткові ексципієнти можуть бути включені також для полегшення поглинання зрізаного GDNF білкового продукту. Можуть використовуватися також розріджувачі, смакові добавки, легкорозтопний віск, рослинні масла, змазуючі агенти, суспензуючі агенти, агенти дезінтеграції таблеток і зв'язуючі агенти.

Введення зрізаного GDNF білкового продукту

Зрізаний GDNF білковий продукт може вводитися парентеральним шляхом підшкірно, внутрішньом'язово, внутрішньовенно, крізь легені, трансдермально і інтратекально або інтрацеребрально. Білкові фактори росту, які не пройшли крізь гематоенцефалічний бар'єр, можуть бути введені безпосередньо інтрацеребральним шляхом або ж разом з іншими елементами, які транспортують їх крізь цей бар'єр. Вважається за краще, якщо зрізаний GDNF білковий продукт вводиться інтрацеребровентрикулярно або до субарахноїдального простору головного чи спинного мозку. Зрізаний GDNF білковий продукт можна вводити також інтрацеребрально безпосередньо до паренхіми мозку. Постачати зрізаний GDNF білковий продукт можуть також повільно секретируючі імпланти у мозку, в яких нейротрофічний фактор заключений у біорозчинній полімерній матриці. Зрізаний GDNF білковий продукт можна вводити також екстрацеребрально у формі, модифікований хімічно або упакований таким чином, що цей продукт проходить крізь гематоенцефалічний бар'єр, або ж він може вводитися у поєднанні з одним і більше агентами, спроможними співдіяти penetрації зрізаного GDNF білкового продукту крізь цей бар'єр. Наприклад, було показано, що кон'югат NGF і моноклональних антитіл проти трансферінових рецепторів транспортується у мозок шляхом зв'язування рецепторами трансферту. Для введення зрізаного GDNF білкового продукту у бажаних дозах можна використовувати щоденні або з більшим періодом ін'єкції, або ж цей продукт може вводитися шляхом безперервної чи періодичної інфузії із

імплантованого насосу з постійним або програмованим потоком. Частота введення доз препарату із зрізаного GDNF білкового продукту буде залежати від його фармакокінетичних параметрів і шляху введення.

Незалежно від способу введення, питома доза, зазвичай, розраховується відносно маси або площі поверхні тіла. У випадку захворювань, зачіплюючих мозок, питома доза, зазвичай, розраховується відносно приблизної маси мозку пацієнта, яка може бути оцінена також за масою тіла або площею його поверхні. Уточнення розрахунків, необхідне для визначення правильного дозування при лікуванні з використанням будь-якого з вищезгаданих препаратів, на практиці здійснюється фахівцями з прийняттям до уваги наданої тут інформації щодо дозування і випробувань. Упевнитися у правильності дозування можна шляхом встановлених випробувань для визначення доз, а також відповідних даних щодо ефекту дози. Остаточний режим дозування, який використовується при лікуванні конкретного захворювання, визначається лікарем з урахуванням різноманітних факторів, впливаючих на дію ліків, у тому числі, віку, загального стану, маси тіла, статі і дієти пацієнта, ступеня інфекування, часу введення ліків та інших клінічних факторів.

Зрізаний GDNF білковий продукт за винаходом, один або у комбінації з іншими факторами росту, може бути також використаний для., лікування нервових захворювань. Наприклад, його можна вживати при лікуванні деяких форм нервового розладу у комбінації з фактором росту нервів. Крім того, разом зі зрізаним GDNF білковим продуктом можуть вживатися також інші фактори або молекули і, у тому числі хімічні композиції. При лікуванні хвороби Паркінсона зрізаний GDNF білковий продукт може вживатися один або разом з введенням леводопи (Levodopa), де зрізаний GDNF підсилює вироблення ендogenousного дофаміну і нейронне сприйняття його підвищених концентрацій.

Як указувалось вище, передбачається також, що для лікуючої дії на деякі популяції нейронних клітин або деякі типи травм чи захворювань корисними або необхідними будуть додаткові нейротрофічні або нейронно-живлячі фактори. Серед інших факторів, які можуть бути використані разом зі зрізаним GDNF, можна назвати без будь-якого обмеження наступні: мітогени, такі як інсулін, інсуліноподібні фактори росту, епідермальний фактор росту, вазоактивний фактор росту, активуючий гіпофітарну аденіліклазу поліпептид, інтерферон і соматостатин; нейротрофічні фактори, такі як одержані з мозку нейротрофін-3, нейротрофін-4/5, нейротрофін-6, інсуліноподібний фактор росту, віковий нейротрофічний фактор, кислий і основний фактори росту фібробластів, фактор-5 росту фібробластів, трансформуючий фактор- β росту, CART - транскрипт, регульований кокаїнамфетаміном, і зрілий GDNF; інші фактори росту, такі як епідермальний фактор росту, фактор гальмування лейкемії, інтерлейкіни, інтерферони і колонієстимулюючі фактори; а також молекули і матеріали, які є функціонально еквівалентними цим факторам.

Передбачається, що для певного лікування ефективним було б безперервне введення або підтримуване достачання зрізаного GDNF білкового продукту. Оскільки безперервне введення може здійснюватися за допомогою механічних засобів, таких як інфузійний насос, до уваги приймається також можливість застосування на практиці інших способів цілком або майже безперервного введення. Наприклад, хімічна дериватизація може давати підтримано секретуючі форми білка, які мають ефект безперервної їх наявності у кровотоці у прогнозованих кількостях згідно з визначеним режимом дозування. Таким чином, до числа зрізаних GDNF білкових продуктів входить також зрізаний GDNF білок, дериватизований для здійснення такого безперервного введення.

Передбачається також клітинна терапія за допомогою зрізаного GDNF білка. Наприклад, шляхом інтрацеребральної імплантації клітин, виробляючих зрізаний GDNF білок. У цьому варіанті здійснення винаходу пацієнтам можуть імплантуватися клітини, спроможні синтезувати і секретувати біологічно активну форму зрізаного GDNF білка. Такі клітини, які виробляють зрізаний GDNF білок, можуть бути такими, що у нормальному стані не виробляють нейротрофічний фактор, але були модифіковані так, щоб бути у спроможності виробляти зрізаний GDNF, або ж спроможність їхня виробляти GDNF була підвищена трансформацією полінуклеотидом, підходящим для експресії і секреції зрізаного GDNF білка. Для того, щоб звести до мінімуму потенціальну імунологічну реакцію у пацієнтів на введення GDNF стороннього виду, перевагу слід віддавати клітинам людського походження, які б виробляли зрізаний GDNF білок людини.

Клітини, що імплантуються, можуть бути заключені у капсули для запобігання інфільтрації їх у мозкову тканину. Клітини людини або тварини можуть бути імплантовані пацієнтам у біологічно сумісних, напівпроникних полімерних оболонках або мембранах, які б дозволяли виділяти зрізаний GDNF білковий продукт, але при цьому запобігати деструкції клітин імунною системою пацієнта або іншими шкідливими факторами із навколишньої тканини. В альтернативному варіанті пацієнтові можуть бути імплантовані безпосередньо, без такого заключення у капсулу, його власні клітини, трансформовані *ex vivo* для продукування зрізаного GDNF.

Методи мембранного інкапсулювання живих клітин добре відомі фахівцям у даній галузі і дозволяють без будь-яких утруднень заключати клітини у капсули і імплантувати їх пацієнтам, див., наприклад, [Патенти США №4892538; 5011472 і 5106627, розкриття яких введене у даному опису посиланням]. Система для інкапсулювання живих клітин описана також у заявці [Aebischer et al., Заявка PCT WO 91/10425, розкриття якої введене у даному опису посиланням]; див. також [Aebischer et al., Заявка PCT WO 91/10470; Winn et al., Exper. Neurol., 113:322-329, 1991; Aebischer et al., Exper. Neurol., 111:269-275, 1991; Tresco et al., ASAO, 38:17-23, 1992], розкриття яких введене у даному опису посиланням.

Передбачена також генна терапія *in vivo* за допомогою зрізаних GDNF білків, де пацієнтові безпосередньо вводиться нуклеїноокислотна послідовність, яка кодує зрізаний GDNF білок. Наприклад, така послідовність вводиться клітинам-мішеням шляхом локальної ін'єкції нуклеїноокислотної конструкції з відповідним вектором доставки, таким як аденоасоційований вірусний вектор. Можуть використовуватися також інші, але без обмежень, вірусні вектори, такі, наприклад, як ретровірусний вектор, аденовірусний вектор, вектори на основі вірусів простого герпеса і папіломи. Фізичне перенесення може здійснюватися *in vivo* шляхом локальної ін'єкції потрібної нуклеїноокислотної конструкції або іншого відповідного вектора доставки, які містять бажану амінокислотну послідовність, або ж шляхом ліпосомерно-опосередненого переносу, прямої ін'єкції (депротеїнізованої ДНК), рецепторно-опосередненого переносу (комплексом ліганд-ДНК) або ж

бомбардуванням мікрочастками (генною гарматою).

Слід зауважити, що описані тут фармацевтичні препарати на основі зрізаноного GDNF білкового продукту можуть використовуватися як у ветеринарії, так і для лікування людей, і що термін «пацієнт» не несе з собою будь-якого обмежувачого розуміння. При застосуванні у ветеринарії діапазони дозування повинні бути такими ж самими, як указано вище.

У якості засобів подальшої характеристики зрізаних GDNF білків за винаходом можуть бути розроблені антитіла, що зв'язуються зі зрізаним GDNF білком, такі як епітопи з амінокислотною послідовністю X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y. За допомогою добре відомих з публікацій способів можна одержувати моноклональні і поліклональні антитіла або рекомбінантні антитіла, які спроможні специфічно розпізнавати і зв'язуватися з різними білками, що кодуються амінокислотними послідовностями за винаходом. Такі антитіла можна потім використовувати для очищення і характеристики зрізаноного GDNF білка. Антитіла можна вживати також у якості терапевтичних інгібіторів білків, на які вони спрямовані.

Інші особливості і переваги даного винаходу буде з'ясовано при розгляді наданих нижче прикладів практичного втілення винаходу, маючих виключно ілюстративне спрямування. Приклад 1 стосується експресії зрілого GDNF в клітинній системі ссавця і приготування зрілого GDNF білка. Приклад 2 стосується експресії зрілого GDNF у бактеріальній клітинній системі. У Прикладі 3 розглянута експресія різних зрілих GDNF білків у бактеріальній клітинній системі. У Прикладі 4 порівнюється біологічна активність зрілого GDNF білка і зрілого GDNF білка в випробуваннях на нейротрофічну активність дофамінергічних нейронів.

Приклади

Приклад 1

Експресія зрілого GDNF людини в клітинах CHO і очищення зрілого GDNF білка, одержаного із клітин CHO

Матеріали

Для експресії GDNF людини в дефіцитних за дигідрофолатредуктазою клітинах CHO (наприклад, в клітинах CHO^d, як описано в [Urlaub and Chasm, Proc. Natl. Acad. Sci., US 77(7):4216-4220, 1980]) використовували наступні матеріали.

Середовище CHO^d містило: модифіковане способом Дульбеко середовище Ігла (DMEM) з високим вмістом глюкози (Gibco/BRL); 5% ембріональну бичачу сироватку (HyClone); замінні амінокислоти мінімального підтримуючого середовища (1%) (Gibco/BRL); гіпоксантин/тимідин (1%) (Gibco/BRL); глутамін/пеніцилін/стрептоміцин (1%) (Irvine Scientific).

Селективне середовище містило: середовище DMEM (вискокоглюкозне); 5% діагнзовану ембріональну бичачу сироватку (HyClone); замінні амінокислоти мінімального підтримуючого середовища; глутамін/пеніцилін/стрептоміцин.

Фізіологічний розчин, буферизований 2X HEPES (HBS) містив: 280мМ NaCl; 10мМ KCl; 1,5мМ Na₂HPO₄; 12мМ декстрози; 50мМ HEPES.

Трис-буферизований фізіологічний розчин плюс Tween (TBST) містив: 137мМ NaCl; 20мМ трис/HCl, pH 7,5; 0,1% Tween-20.

Методика

Трансфікування і селекція

Клітини CHO^d (пасаж 20) висівали у 60мм чашки Петрі (Falcon) з густиною 8x10⁵ клітин на чашку у культурному середовищі CHO^d. Наступного дня приблизно за три години до трансфекції середовище на клітинах було замінено свіжим середовищем.

Добре відомими методами були приготовлені плазмідні конструкції, які містили відповідні кДНК GDNF. Наприклад, плазмідну конструкцію pDSRα2 готували за методикою, описаною в одночасній Заявці, що є співвласністю [Заявка на Патент США №501904 від 29 березня 1990р. (див. також Заявку на Європейський патент №90305433, Публікація №EP 398753 від 18 травня 1990р. і WO 90/14363, 1990)], розкриття яких введене у даному описі посиланням. Типова плазмідна карта, яка ілюструє структурну організацію вектора, показана на Фіг.2. Зрозуміло, що можуть бути використані також інші, найрізноманітніші нуклеїнокислотні послідовності, які кодують зрілий GDNF білок, тобто такі як показано на Фіг.1, 3 і 4.

Фрагмент ДНК HindIII-XbaI з послідовностями, кодуючими GDNF людини, і консенсусними послідовностями Козака CCACC(ATG) реабілітували перетравленням фрагментом рестрикції із вектора експресії, оснований на рсДНК3 (Invitrogen, San Diego, CA). Цей фрагмент ДНК був безпосередньо клонований у pDSRα2 розрізу HindIII/XbaI. Плазмідна, що утворилася, була названа рSW5. Плазмідна ДНК рSW5 перед трансфекцією була лінеаризована на сайті PvuI.

pDSRα2 (Фіг.2) є похідною плазмиди pCD [Okayama and Berg, Mol. Cell. Biol. 3:280-289, 1983] з трьома головними модифікаціями: (1) сигнал поліаденилювання SV40 був заміщений сигналом від α-субодиниці бичачого фолікулярного стимулюючого гормону α-bFSH [Goodwin et al., Nucleic Acids Res. 11:6873-6882, 1983]; (2) мишачий дигідрофолатредуктазний мінірен [Gasser et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 79:6522-6526, 1982] був вставлений у прямому напрямку від полігенного експресуючого кластера, для того щоб дозволити селекцію і ампліфікацію трансформантів; (3) 267 бп фрагмент, з «R-елементом» і частиною послідовностей «U5» довгокінцевого повтору (LTR) вірусу людського Т-клітинного лейкозу типу I (HTLV-I) був клонований і вставлений між промотором SV40 і факторами сплайсінгу, як описано вище [Takebe et al., Mol. Cell. Biol. 8:466-472, 1988].

Були приготовлені розчини ДНК з кінцевим вмістом GDNF плазмідної ДНК 3,0мкг/чашка, ДНК геномного носія мишиної нирки (Clontech) 7,0мкг/чашка, 2,5 М CaCl₂ 25мкл/чашка і стерильної дистильованої води до кінцевого об'єму 250мкл/чашка. З метою позитивного і негативного контролю були приготовлені розчини ДНК, які містили відповідно ДНК вектора pDSRα2 і ДНК носія. Ці розчини по краплям добавляли до однакового об'єму 2X HEPES-буферизованого фізіологічного розчину при барботуванні його повітрям. Розчини ДНК/HBS було піддано інкубуванню при кімнатній температурі на протязі 30 хвилин.

Живильне середовище із CHO^d клітинних культур було видалено, і до кожної чашки було добавлено

500мкл розчинів ДНК. Чашки піддали інкубуванню при кімнатній температурі на протязі 30 хвилин, після чого до кожної з них було добавлено середовище CHOd' (5,0мл). Потім чашки інкубували при 37°C на протязі ночі.

Наступного дня середовище в чашках було замінено свіжим середовищем CHOd'. Ще через день, коли клітини досягли конфлюентного стану, культури піддали трипсинізації і переклали до 100мл чашок (Falcon) зі співвідношенням: 1х60мм чашка на 8х100мм чашок. Клітини були перекладені до селективного середовища. Кожні 2-3 дні середовище культур поновлювалося.

Через 15 днів колонії трансфектованих клітин виділили за допомогою скляних циліндрів для клонування, піддали трипсинізації і переклали до 24 ямочних планшетів (Falcon). Усі 40 колоній було ізольовано від IGF1/pSW5- трансфектованих клітин. Решту клітин на планшеті піддали трипсинізації, об'єднали у пули і переклали до двох 100мм чашок (1 пул на кожну ДНК конструкцію).

Скринінг трансфектованих клітин

24 ямочні і згруповані у пули культури піддали культивуванню до конфлюентного стану, по досягненню якого культурне середовище було видалено і замінено на безсироваточне середовище (400мкл/ямка або 4мл/чашка). Клітини інкубувалися на протязі 48 годин, після чого кондиційоване середовище було зібране. Зразки кондиційованого середовища були проаналізовані вестерн-блотінгом на експресію GDNF білка. Аліквоти (20мкл і 40мкл) кондиційованого середовища розділили буфером для зразків електрофорезу (з β -меркаптоетанолом і без нього). Зразки, які містили β -меркаптоетанол, кип'ятили на протязі 3 хвилин (умови відновлення). Як відновлені, так і невідновлені зразки вилили на 16% Трис-гліцинові гелі (Novex). Гелі піддали електроблотінгу на мікроцелюлозних фільтрах (Schleicher and Schuell BA-83, 0,2мкм). Блоти промили розчином TBST і потім інкубували у блокуючому розчині із 5% сухого молока (Carnation) в TBST на протязі 30 хвилин при кімнатній температурі. Потім блоти обробили антисироваткою проти GDNF (кроляча поліклональна антисироватка, індукована проти E. Coli - похідного GDNF; 1:1000 у 5% молоко/TBST) на протязі 1 години при кімнатній температурі. Блоти потім ополоснули розчином TBST і промили 1 раз 10 хвилин і 2 рази по 5 хвилин розчином 1% молока/TBST. Далі їх піддали обробці на протязі 20 хвилин вторинним протикролячим антитілом, кон'югованим з пероксидазою Ig-хріна (1:15000 в 1% молока/TBST). Блоти ополоснули і промили розчином TBST 1 раз 20 хвилин і 2 рази по 10 хвилин, а потім піддали обробці реагентами ECL (Amersham) на протязі 1 хвилини і гіперплівкою Hyperfilm-ECL (Amersham).

Нижче описаний процес очищення CHO-експресованого GDN Fi CHO-похідного, вирізаного GDNF гомодимеру із одного літра кондиційованого середовища. У зв'язку із сильною дією протеази у CHO середовищі, що вирізає ланцюг на залишку 31, цей процес може включати у себе використання інгібітора протеази під час очищення.

Етап 1. Хроматографія на біогранулах

Було приготовлене безсироваточне кондиційоване середовище із 20мМ 2[N-морфоліно]етансульфонату (MES), pH 6,0, добавленням 1/5(об.) 1 М MES, pH 6,0. До середовища добавили 25мл великогранульної смоли SP сефарози (Pharmacia), зрівноваженої 20мМ MES, pH 6,0, і перемішували при 4°C на протязі 1 години. Смоли зібрали, надаючи їй можливості осісти і зцідуючи кондиційоване середовище. Зціджене середовище було перепущене крізь фільтр на печених дисках для відновлення неосадженої смоли. Осаджена смола і смола, відновлена фільтрацією, були піддані повторному суспендуванню і вилиті до колонки діаметром 2,5см і промиті буфером А із 0,15 М NaCl, 20мМ MES, pH 6,0, у кількості 3 об'ємів колонки (OK). Білок був елюйований із буфера А з 300мл градієнтом у 1,0 М NaCl, 20мМ MES, pH 6,0, (буфер В) при швидкості потоку 0,20К/хв з моніторингом спектральної поглинаючої спроможності на 280нм. Були зібрані фракції, які містили 1,10К. Наявність GDNF у фракціях визначали за допомогою вестерн-блотінга. Фракції, які містили GDNF, були згруповані для подальшого очищення. GDNF елюювали з градієнтом між 0,3 і 0,6 М NaCl.

Етап 2. Рідинна хроматографія високої розрізняючої спроможності (HPLCC4)

Пул з етапу 1 був оброблений трифтороцтовою кислотою (ТФК) у кількості 0,1%(об.), перепущений у вакуумі крізь 0,45мкм фільтр і поміщений до колонки Vydac C4 (0,46х25см), кондиційованої водним 10% ацетонітрилом і 0,1% ТФК (буфер А). Білок елюювали з лінійним градієнтом 2%/хв на протязі 50 хвилин із буфера А до водного 90% ацетонітрилу, 0,1% ТФК (буфер В) при вимірюванні спектральної поглинаючої спроможності на 280нм. Була зібрана 1мм фракція, а наявність GDNF визначали за допомогою вестерн блотінгу. GDNF елюювали між 45% і 55% ацетонітрилу. Фракції просували у вакуумі.

Етап 3. S хроматографія високої розрізняючої спроможності

Фракції із етапу 2, які містили GDNF, були піддані пептизації в 1мл 0,15 М NaCl, 10мМ Трис, pH 8,0, і поміщені до S колонки 0,75х7,5см TSK-Gel 5WP високої розрізняючої спроможності (Toso Haas). Лінійний градієнт 0,4%/хв проходив від 0,15 М NaCl, 10мМ Трис, pH 8,0, (буфер А) до 1,0 М NaCl, 10мМ Трис, pH 8,0, (буфер В), на протязі 50 хвилин за швидкістю потоку 1мл/хв. 1 хвилинні фракції були зібрані при вимірюванні спектральної поглинаючої спроможності на 280нм. При 30% буфері В градієнт було змінено на 6,5%/хв х 10 хвилин. Вестерн-блотінг фракцій показав 4 головних GDNF компоненти. Три з цих компонентів елюювали з градієнтом 0,4%/хв, а четвертий - з градієнтом 6,5%/хв. Зі схожих компонентів були утворені пули, які було піддано секвенуванню. Секвенування дозволило ідентифікувати пул приблизно 29-36кД як зрізаний GDNF білок [Arg³²-Ile¹³⁴]. Компонент приблизно 38-40кД був ідентифікований як гетеродимер зрізаного GDNFi зрілого GDNF [Arg³²-Ile¹³⁴]. І нарешті, компонент приблизно 41-44кД, який був виділений при останньому з цих двох градієнтів, був ідентифікований секвенуванням як гомодимер зрілого GDNF.

Приклад 2 Зрілий GDNF людини, продукований в E Coli

Бактеріальну експресію зрілого GDNF людини можна здійснювати способом, описаним в [Lin et al., Заявка на Патент США №08/182183 від 23 травня 1994р. та родові заявки; PCT/US 92/07888 від 17 вересня 1992р. (WO 93/06116); і заявка на Європейський патент №92921022.7 (Публікація №EP 610254)], розкриття яких введене у даний опис посиланням. Із опису до даного винаходу з очевидністю слідує, що для експресії в E Coli та інших бактеріях можна без будь-яких утруднень використовувати або адаптувати найрізноманітніші матеріали і способи. Інші варіанти поліпшень, які можна вживати для експресії, показані, наприклад, на Фіг.1,3 і 4.

Повторна укладка і очищення експресованого зрілого GDNF

Трансформовані клітини були оброблені при температурі 5°C (якщо не зазначено іншого) наступним чином: клітинна паста (30г) була суспендована у кінцевому об'ємі 200мл у розчині 25мМ Трис, рН 8,5, який містив 5мМ EDTA, у результаті чого була одержана кінцева клітинна пульпа у кількості 15% (об.). Клітини були ретельно дисперговані за допомогою ручного гомогенізатора з низьким зсувом Biospec. Пульпу двічі перепустили крізь мікрофлюїдаїзер під тиском 14500фунтів/кв. дюйм (1015кгс/см²) для розриву клітин і вивільнення тіл включень. Потім одержаний гомогенат було піддано центрифугуванню на протязі 30 хвилин при 16000ж. Утворений внаслідок центрифугування дебрис тіл включень промили шляхом ресуспендування у холодній воді до кінцевого об'єму 240мл за допомогою гомогенізатора Biospec, як вище, з утворенням пульпи. Зразок цієї пульпи було взято на HPLC аналіз рівня експресії GDNF. Решта пульпи була піддана центрифугуванню на протязі 30 хвилин при 16000ж. Супернатант злили, а до посудини центрифугування добавили трохи холодної води і обережно перемішали для видалення вільно утвореного мембранного шару на поверхні дебрису з тіл включень. Дебрис суспендовали повторно гомогенізатором Biospec з об'ємом холодної води, достатнім для одержання концентрації GDNF 2мг/мл. Потім тіла включень були розчинені перемішуванням кінцевої суспензії тіл включень (25мл) з 8 М гуанідін-HCl (25мл), який містив 180мМ цистеїн-HCl і 50мМ Трис-HCl, рН 8,7. Розчинену суміш перемішували при 25°C на протязі 60-90 хвилин, після чого її при помішуванні вилили до 2 М сечовини (450мл) при 5°C, яка містила 20мМ Трис-HCl, рН 8,75, і 0,2 М гуанідін-HCl. Одержану суміш повторної укладки поволі перемішали при 5°C на протязі 72 годин.

Повторно укладений GDNF був частково очищений наступним чином: 20мМ натрій-ацетатний буфер (250мл, рН 5) при 5°C був добавлений при швидкому перемішуванні до суміші повторної укладки, і рН була доведена до 5 льодяною оцтовою кислотою. Одержаний преципітат був видалений шляхом центрифугування при 13600ж на протязі 45 хвилин при 5°C. Супернатант, одержаний після центрифугування, було вжито у якості завантажувального розчину для наступного етапу очищення із залученням катіонообмінної хроматографії з грубогранульованою SP-смолою (Pharmacia). У колонці при 5°C у якості⁴ буферного розчину зрівноваження, промивки і елюції використовувався 20мМ ацетат натрію (рН 5). Смоляний шар (5мл) був промитий 5 об'ємами колонки (OK) 0,2 N NaOH і потім зрівноважений ацетатним буфером 5OK. Завантажувальний розчин (190мл) залили до колонки зі швидкістю 0,5OK/хв з наступною промивкою 10OK ацетатного буфера з тією ж самою швидкістю потоку. Далі GDNF елювали із смоли 20OK лінійним градієнтом NaCl від 0,3 М до 0,9 М в ацетатному буфері зі швидкістю потоку 0,1OK/хв. Елюат колонки контролювали за спектральним поглинанням на 280нм і збирали у формі фракцій, які піддавали SDS-PAGE аналізу (аналіз методом електрофорезу у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію). Фракції, які містили GDNF/були згруповані від переднього фронту піка GDNF на 10% висоті піка до заднього фронту піка на 10%-й його висоті. Білок у цьому пулі був повністю GDNF і, залежно від вжитого продукційного штаму, містив від 32% до 12% забруднень у вигляді модифікованих форм GDNF. Потім пул піддавали діалізу проти PBS та інших препаратних буферів і у деяких випадках концентрували шляхом суперфільтрування до 25мг/мл. Обидві форми GDNF, дикого типу і аналогова, очищені цією процедурою піддавалися аналізу методами обернено-фазової HPLC хроматографії, катіонообмінної HPLC хроматографії, маспектрометрії, і вимірювали рівні ендотоксину з метою порівняння чистоти препаратів з чистотою відповідних продукційних штамів.

Приклад 3

Рекомбінантне продукування зрілого GDNF в E. Coli

Типові зрізані GDNF білки виробляли згідно зі способами, описаними в [Lin et al., Заявка на Патент США №08/182183 від 23 травня 1994, див. вище]. Можуть бути використані також інші матеріали і способи бактеріальної експресії, наприклад, такі як описано вище. Експресовані в E Coli зрізані GDNF білки включають у себе білки [Pro²³-Ile¹³⁴], [Arg³²-Ile¹³⁴] і [Gly³³-Ile¹³⁴], показані відповідно на Фіг.5, 6 і 7. Полінуклеотиди, які кодуєть ці типові зрізані GDNF білки, мали конструкції, показані на Фіг.5, 6 і 7. Але можуть використовуватися також інші відповідні полінуклеотиди, такі як показано на Фіг.1, 3 і 4. Полінуклеотиди були сконструйовані стандартними ПЛР способами, описаними в [PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, Henry A, Erlich, ed., Stockton Press, NY, 1989 (Chapter 6, Using PCR to Engineer DNA)], розкриття яких введене у даному описі посиланням.

Приклад 4

Біологічні випробування на нейротрофічну активність дофамінергічних нейронів

Експресовані в E Coli зрізані GDNF білки [Pro²³-Ile¹³⁴], [Arg³²-Ile¹³⁴], [Gly³³-Ile¹³⁴] і [Lys³⁷-Ile¹³⁴] за Прикладом 3 і CHO-похідний зрізаний GDNF білок [Arg³²-Ile¹³⁴] за Прикладом 1 були якісно оцінені щодо їх спроможності стимулювати поглинання дофаміну дофамінергічними нейронами чорної субстанції.

Матеріали

У випробуваннях для оцінки виживання дофамінергічних нейронів при наявності зрізаних GDNF білків використовувалися наступні матеріали.

Клітинне культурне середовище

Високоглюкозне, модифіковане способом Дульбеко середовище Ігла (DMEM; каталог №11965-092), середовище F12 Хема (Ft2, №11765-021), середовище L15 Лейбовица без бікарбонату натрію (№41300-039), культурний конглютинін середовища B27 (№17504-010), пеніцилін/стрептоміцин (№15070-014), L-глутамін (№25030-016), фосфат-буферизований фізіологічний розчин Дульбеко (D-PBS, №14190-052, збалансований солевий розчин Хенка з солями кальцію і магнію (HBSS, №24020-026), N-2-гідроксиетилпіперазин-N'-2-етансульфо кислота (HEPES, №15630-015), мишачий ламінін (№23017-015) і альбумінова фракція V бичачої сироватки (№110-18-017) - всі ці матеріали були виробами фірми GIBCO, Grand Island, NY. Крім того, використовувалися термодезактивована кінська сироватка фірми HyClone, Logan, Utah; кональбумін (C-7786), гідробромід полі-L-орнітину (P-3655), бичачий інсулін (I-5500), людський трансферін (T-2252), путресцин (P-6024), прогестерон (P-6149), селеніт натрію (S-9133), метризамід (M-3383) виробництва фірми Sigma Chemical Company, Saint-Louis, MO; папаїн, дезоксирибонуклеаза I і овальбумін (продукт диссоціації папаїну) виробництва фірми Worthington Biochemicals, Freehold, NJ.

Були також використані стерильні 96 ямочні мікропланшети Falcon (№3072), пластмасовий посуд для культивування тканин і поліпропіленові пробірки для центрифуги виробництва фірми Becton-Dickinson, Oxnard, CA; покривне скло для камер культивування тканин Nunc Lab-Tek (№136439) фірми Baxter, Irvine, CA; 20мкм нейлонові сита (№460) фірми Tetko, Elmsford, NY; 4 дюймові щипці і ножиці для розсічення м'яких тканин фірми Roboz Surgical, Washington, DC.

Антитіла і відповідні реагенти

Використовувалися поліклональні антитіла кроля проти тирозингідроксилази (TE101) фірми Eugene Tech, Ridgefield Park, NJ; поліклональні антитіла кроля проти нейроспецифічної енолази (NSE, AB951) фірми Chemicon, Temecula, CA; авідинбіотиновий комплекс, кон'югований з біотинильованим козячим IgG проти кроля і пероксидазою (ABC Elite; комплект Vectastain PK-6100) фірми Vector Laboratories, Burlingame, CA; 3'-3'-діамінобензидин фірми Cappel Laboratories, West Chester, PA; суперблокуючий буфер в PBS (№37515) фірми Pierce Chemical Company, Rockford, IL; Triton X-100 (X100), Nonidet P-40 (N6507) і перекис водню (30%, об.; H1009) фірми Sigma; інгібітор поглинання дофаміну GBR-12909 (D-052) фірми RBL, Natick, MA; ³H-дофамін (дофамін, мічений тритієм, NE-131; 21 Ci/моль) фірми New England Nuclear, Boston, MA; сцинтиляційний коктейль Opttphase Supemix фірми Wallac, Turku, Finland; білі мікропланшети ViewPlate-96 (№60Q5182) фірми Packard Instruments Corporation, Meriden, CT; у разі відсутності інших даних, решта компонентів - від фірми Sigma Chemical Company.

Приготування середовища

Базальне культурне середовище являло собою суміш DMEM і середовища F12 у співвідношенні 1:1, доповнену конглютиніном середовища B27, який вводився у формі 50-кратно концентрованого розчину. L-глутамін добавляли з кінцевою концентрацією приблизно 2мМ, пеніцилін - приблизно 100 IU/л (IU - імунізуюча одиниця), і стрептоміцин - приблизно 100мг/л. Термодезактивовану кінську сироватку добавляли до кінцевої концентрації приблизно 15%. Після перемішування рН доводили до 7,3, а середовища витримували при температурі 4°C. Середовища приготувляли свіжими, безпосередньо перед використанням, з тим щоб звести до мінімуму розходження між експериментами. В усіх експериментах використовувалися пластмасові піпетки і контейнери для того, щоб зробити мінімальним адсорбцію білка.

Субстрат культури

Для забезпечення оптимального прикріплення нейронів і нейритних відростків субстрату, поверхні титраційного мікропланшету (субстрат культури) були модифіковані послідовним покриттям полі-L-орнітином і ламініном наступним шляхом. Поверхні планшету були повністю покриті стерильним 0,1мг/мл розчином полі-L-орнітину у 0,1 М борній кислоті (рН 8,4) на протязі прийнятної 1год. при кімнатній температурі з наступною стерильною промивкою водою Super-Q надвисокої якості. Потім промивочну воду відсмоктали, добавили 1,0 мкг/мл розчин мишачого ламініну в PBS і термостатували при 37°C на протязі 2 год. Ці процедури проводили безпосередньо перед використанням планшетів з метою забезпечення відтворюваності результатів.

Приготування культур чорної субстанції ембріонального щура

У якості джерела дофамінергічних нейронів чорної субстанції був використаний мозок ембріона щура. Для цього брали самок щурів Sprague-Dawley з розрахованою у часі вагітністю на 15-й день віку ембріона. Для експерименту було підготовлено максимум 36 ембріонів (приблизно три приплоди). Вагітних самок щурів умертвляли газом CO₂. Їхні черевні порожнини розтинали хірургічними ножицями, і ембріони виймали із утроб. Мозок ембріонів розсікали і очищали від крові і оболонок, і за чіткими анатомічними орієнтирами розсікали вентральну оболонкову ділянку, яка містила чорну субстанцію [Aitman and Bayer, Atlas of Prenatal Rat Brain Development, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995]. Тканини збирали до охолодженого на льоду розчину D-PBS, переносили до 10мл дисоціаційного середовища (120 одиниць папаїну і 2000 одиниць дезоксирибонуклеази в HBSS) і потім інкубували на протязі 45хв. при 37°C на шейкер-платформі, що оберталася з частотою приблизно 200об/хв. Потім клітини диспергували гомогенізацією крізь оплавлені на вогні піпетки Пастера, просіяли крізь 20мкм сита Nitex для відділення недисоційованої тканини, і піддали центрифугуванню на протязі 5хв. при 200жг на клінічній центрифугі IEC. Утворений дебрис знову піддали суспендуванню в HBSS з овальбуміном і 500 одиницями дезоксирибонуклеази, з поверхневим шаром 4%-го розчину овальбуміну (в HBSS) і центрифугували на протязі приблизно 10 хвилин при 500жг. Одержаний дебрис був знову суспендований у повному культурному середовищі (див. вище), відрегульований приблизно до 28000клітин/мл і висіяний аліквотами (90мкл) до 6мм ямок 96-ямочних мікропланшетів, перед тим покритих поліорнітином і ламініном. Прикріплення клітин відбувалося швидко, а ефективність культивування складала приблизно 75%.

Імуногістохімія дофамінергічних нейронів

Для визначення властивостей дофамінергічних нейронів в культурах чорної субстанції був використаний трохи змінений, непрямий імунопероксидазний спосіб, описаний Луїсом [Louis et al., J. Pharmacol. Exp. Therap., 262:1274-1283, 1992; Science, 259:689-692, 1993]. Культури піддали закріпленню на протязі 30хв. при кімнатній температурі 4% параформальдегідом в D-PBS, рН 7,4, з трьома наступними промивками в D-PBS (200мкл на 6мм ямку). Потім фіксовані культури інкубували у блокуючому буфері Superblock в PBS з 1% NP-40 для підвищення penetрації антитіл. Потім до них добавили розріджені у тому ж самому буфері, у співвідношенні 1:2000, первинні кролячі антитіла проти тирозингідроксилази і інкубували на протязі 1год. при 37°C на обертаному шейкері. Після трьох промивок буфером D-PBS були визначені зв'язані антитіла за допомогою біотинильованого IgG коза проти кролика при розрідженні 1:500. Ці вторинні антитіла піддали інкубуванню з клітинами на протязі приблизно 1год. при 37°C. Потім клітини промили 3 рази буфером D-PBS, вторинні антитіла визначили авідін-біотин-пероксидазним комплексом, розрідженим у співвідношенні 1:500, і клітини інкубували на протязі 4 хв. при 37°C. Після 3 і більше промивок буфером D-PBS культури реагували на протязі 5-20хв. у розчині 0,1 М Трис-HCl, рН 7,4, який містив 0,04% 3'-3'-діамінобензидин-(HCl)₄, 0,06% NiCl₂ і 0,02% перекису водню.

Визначення виживаності нейронів

Культури чорної субстанції були закріплені і піддані імунному забарвленню так, як описано вище, і потім досліджені під просвітленою оптикою при 200 кратному збільшенні. По всіх 6мм ямках 96-ямочних

мікропланшетів була підрахована кількість нейронів, забарвлених тирозингідроксилазою. Життєздатні нейрони мали тіло клітини правильної форми з головним аксоноподібним відростком і кількома дендритоподібними відростками. Нейрони, що мали ознаки виродження, такі як неправильної форми вакуольовані перикарії або фрагментовані нейрити, були виключені із підрахунку (проте більшість вироджених нейронів була відділена від субстрату культури). Кількості клітин дофамінергічних нейронів були виражені або числом ТН позитивних нейронів на 6мм ямку, або зміною укладки відносно густини контрольних дофамінергічних нейронів.

Визначення поглинання дофаміну

Поглинання дофаміну визначали в культурах нейронів чорної субстанції 15 добового ембріону щура, які були одержані в білих мікропланшетах ViewPlate-96. Культури промивали підігрітим буфером для поглинання (приблизно 100мкл), який складався із модифікованого розчину Кребса-Рінгера, рН 7,4, що містив приблизно 120мМ NaCl, 4,7мМ KCl, 1,8мМ CaCl₂, 1,2мМ MgSO₄, 32мМ NaHPO₄, 1,3мМ EDTA і 5,6мМ D-глюкози. Буфер для поглинання також містив 1мМ аскорбінової кислоти і 5 мкМ паргіліну для запобігання окислення дофаміну. Клітини були піддані попередньому інкубуванню при 37°C на протязі приблизно 10хв. у буфері для поглинання. Потім до культур чорної субстанції був добавлений мічений тритієм дофамін (³H-DA, 21 Ci/мМ) з концентрацією приблизно 50нМ у 75мкл буфера для поглинання, і культури піддані інкубуванню на протязі 60хв. при 37°C. Неспецифічне поглинання дофаміну визначали шляхом інкубування культур з буфером для поглинання, який містив інгібітор поглинання дофаміну GBR-12909 (1мкМ). Неспецифічне поглинання складало менше ніж 1% від загального поглинання. Випробування на поглинання зупиняли висмоктанням культурного середовища з наступними трьома швидкими промивками охолодженим на льоду буфером поглинання (приблизно 120мкл). Потім клітини піддали лізису доданням сцинтиляційного коктейлю Optiphasе Supremix (200мкл), і була визначена радіоактивність за допомогою сцинтиляційного спектрометра з лічильником на 96-ямочному мікропланшеті Wallac Microbeta Plus (тобто поглинання дофаміну вимірювали шляхом підрахування сцинтиляції тритію, що утримувався в культурах). Результати вимірювань виражали в одиницях dpm/6мм ямка або як зміну укладки відносно контрольних культур.

Випробування

Вживання дофамінергічних нейронів і морфологічний розвиток

Для демонстрації ефекту зрізаних GDNF білків щодо виживання дофамінергічних нейронів були використані культури збагаченої на дофамінергічні нейрони чорної субстанції 15 денного ембріонального щура. Культури вирощувались на покритих поліорнітином і ламініном 96-ямочних мікропланшетах на протязі 6 днів без білків і при наявності наступних видів білків з різними концентраціями: (в діапазоні від 1пг/мл до 10нг/мл): зрілий лGDNF, експресований в E Coli, зрізані GDNF білки [Pro²³-Ile¹³⁴], [Arg³²-Ile¹³⁴], [Gly³³-Ile¹³⁴] і [Lys³⁷-Ile¹³⁴], експресовані в E Coli, зрілий лGDNF, експресований в клітинах CHO; зрізаний GDNF білок [Arg³²-Ile¹³⁴], виведений із клітин CHO. Культурне середовище складалося із DMEM/F12, доповненого 15% термодезактивованої кінської сироватки (культури E15) або 2,5% термодезактивованої кінської сироватки, D-глюкозою, розчином HEPES, інсуліном і трансферіном (культури P6). У якості маркера для дофамінергічних нейронів використовували імунне забарвлення на тирозингідроксилазу (ТГ) - обмежуючий швидкість фермент у біосинтезі дофаміну. Оскільки норадренергічні нейрони у ромбовидному мозку також позитивно забарвлюються на ТГ, було вжито чималих застережних заходів до того, щоб розсічення обмежувалося вентральною оболонкою середнього мозку і щоб не зачепити більш каудальні ділянки, де містяться тіла норадренергічних клітин. Через 6 днів культури E15, як правило, складалися приблизно із 70% нейронів, ідентифікованих імунним забарвленням на нейронспецифічну енолазу (як описано вище) і 30% ненейронних клітин (які мали сплюснений, фазово-темний зовнішній вигляд); дофамінергічні нейрони складали приблизно 10-15% нейронної популяції.

Через 6 днів культури були закріплені параформальдегідом і імунно забарвлені на тирозингідроксилазу - маркер, який ідентифікує дофамінергічні нейрони в цих культурах. Всі позитивні на тирозингідроксилазу нейрони, наявні у 6мм ямці, підраховувались під просвітленою оптикою. Було проаналізовано від 3 до 6 різних ямок для кожної з умов експерименту. Одержані результати були виражені у відсотках кількості позитивних на тирозингідроксилазу нейронів, знайдених в контрольних культурах.

Культури чорної субстанції E15, оброблені 1,0нг/мл GDNF, GDHF, експресованим в клітинах CHO, і GDNF, експресованим в клітинах E Coli, містили ТГ імунореактивні нейрони відповідно на 38% і 27% більше, ніж необроблені контрольні культури, вказуючи на те, що обидва види GDNF стимулюють життєздатність дофамінергічних нейронів. Культури чорної субстанції E15, оброблені 1,0нг/мл зрізаного GDNF білка, показали такий самий зріст кількості в них ТГ-позитивних нейронів через 6 днів in vitro: 42% для зрізаного GDNF білка [Arg³²-Ile¹³⁴], виведеного із клітин CHO; 26% і 17% для зрізаних GDNF білків відповідно [Arg³²-Ile¹³⁴] і [Gly³³-Ile¹³⁴], експресованих в E Coli.

Порівняння контрольних культур з культурами, обробленими зрілими і зрізаними GDNF білками, також виявляє виразний ефект всіх GDNF білків на морфологічну диференціацію дофамінергічних нейронів. Ефект від зрізаних GDNF білків [Arg³²-Ile¹³⁴] і [Gly³³-Ile¹³⁴] був ідентичним до їхніх аналогів зрілого GDNF білка. ТГ-імунореактивні нейрони у всіх оброблених GDNF культурах мали значно більш складну і широкую древовидність нейритної структури, а також більший ступінь нейритного розгалуження і більший загальний розмір, ніж ТГ-позитивні нейрони в контрольних культурах.

Поглинання дофаміну

Поглинання дофаміну є мірою кількості і активності високоспоріднених сайтів повторного поглинання і транспорту дофаміну і відзеркалює функціональну диференціацію дофамінергічних нейронів. Поглинання дофаміну вимірювали на культурах чорної субстанції E15 щурів через 6 днів in vitro зі зрілими або зрізаними GDNF білками і без них. В цих культурах поглинання дофаміну мало фармакологічний профіль, характерний для дофамінергічних нейронів, тобто він був майже цілком блокований (більше, ніж на 98%) 1мкМ інгібітору GBR-12909 транспортування дофаміну, специфічного для дофамінергічних нейронів (ID50=20нМ). Це свідчить про те, що вимірювання поглинання дофаміну не віддзеркалюють наявності забруднюючих норадренергічних нейронів, які можуть поглинати дофамін крізь транспортери норепінефрину, але не є чутливі до гальмування

інгібітором GBR-12909. Ефект від зрілого GDNF, експресованого в клітинах CHO, і від зрілого GDNF білка [Arg³²-Ile¹³⁴], виведеного із клітин CHO, був ідентичний: приблизно 65%-й зріз при ED50 близько 20пг/мл. Зрізаний GDNF білок [Pro²³-Lis³⁷AAsn³⁷-Ile¹³⁴], експресований в E Coli, показаний на Фіг.5, дає 65%-й зріст при ED50 близько 40пг/мл. Вплив на поглинання дофаміну з боку зрілого білка, експресованого в E Coli, і з боку зрізаних GDNF6mKiB [Arg³²-Ile¹³⁴], [Gly³³-Ile¹³⁴] і [Lys³⁷-Ile¹³⁴], експресованих в E. Coli, був однаковий: близько 50%-й зріст при ED50 приблизно 50мкг/мл.

Одержані результати вказують на те, що зрізані GDNF білки діють як сильні, стимулюючі виживаність і викликаючі, диференціацію фактори для дофамінергічних нейронів чорної субстанції. У зв'язку з цим, вони розглядаються як особливо корисні у лікуванні хвороби Паркінсона - нейрологічного розладу, який характеризується зниженою емоціональністю, сповільненням як навмисного, так і ненавмисного м'язового руху, м'язовою ригідністю і тримором. Такі симптоми зв'язуються з прогресивним виродженням виробляючих дофамін нейронів, розміщених у чорній субстанції. Виродження цих нейронів («дофамінергічних нейронів») приводить до зниження дофаміну в суміжній ділянці мозку, яка називається смугастим тілом.

Перелік послідовностей

(1) Загальна інформація

(i) Заявник: Хью, Сильвія

(ii) Назва винаходу: Зрізаний гліоцитоподібний нейротрофічний фактор.

(iii) Кількість послідовностей: 50

(iv) Поштова адреса:

(A) Адресат: Амген Інк.

(B) Вулиця: 1840 ДеХевіпенд Драйв

(C) Місто: Таусенд Оукс

(D) Штат: Каліфорнія

(E) Країна: США

(F) Поштовий індекс: 91320

(v) Форма для зчитування комп'ютером

(A) Тип носія: гнучкий диск

(B) Комп'ютер: сумісний з EOM фірми IBM

(C) Операційна система: PC-DOS/MS-DOS

(D) Програмне забезпечення: Patent In Release #1, Version #1.25

(vi) Дані про заявку:

(A) Номер заявки:

(B) Дата подання:

(C) Класифікація:

(viii) Інформація щодо патентного повіреного/агенства:

(A) Им'я та прізвище: Каррі, Даніель Р.

(B) Реєстраційний номер: 32, 727

(C) Номер діла: A-357

(ix) Інформація щодо телекомунікації:

(A) Телефон: 805-447-8102

(B) Телефакс: 805-499-8011

(C) Телекс:

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:1:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 402 основних пари

(B) Тип: нуклеїнокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна (ii) Тип молекули: білок

(ix) Особливості:

(A) Найменування/ключ: CDS

(B) Місцезнаходження: 1...402

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:1:

TCA CCA GAT AAA CAA ATG GCA GTG CTT CCT AGA AGA GAG CGG AAT CGG	48
Ser Pro Asp Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg	
1 5 10 15	
CAG GCT GCA GCT GCC AAC CCA GAG AAT TCC AGA GGA AAA GGT CGG AGA	96
Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg	
20 25 30	
GGC CAG AGG GGC AAA AAC CGG GGT TGT GTC TTA ACT GCA ATA CAT TTA	144
Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu	
35 40 45	
AAT GTC ACT GAC TTG GGT CTG GGC TAT GAA ACC AAG GAG GAA CTG ATT	192
Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile	
50 55 60	
TTT AGG TAC TGC AGC GGC TCT TGC GAT GCA GCT GAG ACA ACG TAC GAC	240
Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp	
65 70 75 80	
AAA ATA TTG AAA AAC TTA TCC AGA AAT AGA AGG CTG GTG AGT GAC AAA	288
Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys	
85 90 95	
GTA GGG CAG GCA TGT TGC AGA CCC ATC GCC TTT GAT GAT GAC CTG TCG	336
Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser	
100 105 110	
TTT TTA GAT GAT AAC CTG GTT TAC CAT ATT CTA AGA AAG CAT TCC GCT	384
Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala	
115 120 125	
AAA AGG TGT GGA TGT ATC	402
Lys Arg Cys Gly Cys Ile	
130	

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:2:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 134 амінокислоти

(B) Тип: амінокислотний

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: білок

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:2:

Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile	
50 55 60	
Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp	
65 70 75 80	
Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys	
85 90 95	
Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser	
100 105 110	
Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala	
115 120 125	
Lys Arg Cys Gly Cys Ile	
130	

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:3:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 4 амінокислоти

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:3:

Lys Asn Arg Gly

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:4:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 5 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:4:

Gly Lys Asn Arg Gly

1

5

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:5:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 6 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:5:

Arg Gly Lys Asn Arg Gly

1

5

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:6:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 7 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:6

Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

1

5

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:7:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 8 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:7:

Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

1

5

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:8:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 9 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:8:

Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

1

5

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:9:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 10 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:9:

Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

1

5

10

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:10:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 11 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:10:

Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

1

5

10

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:11:

- (i) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 12 амінокислот
(B) Тип: амінокислотний
(C) Кількість ниток: одна
(D) Топологія: лінійна
(ii) Тип молекули: пептид
(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:11:

Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

- 1 5 10
- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:12:
(i) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 13 амінокислот
(B) Тип: амінокислотний
(C) Кількість ниток: одна
(D) Топологія: лінійна
(ii) Тип молекули: пептид
(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:12:

Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

- 1 5 10
- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:13:
(i) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 14 амінокислот
(B) Тип: амінокислотний
(C) Кількість ниток: одна
(D) Топологія: лінійна
(ii) Тип молекули: пептид
(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:13:

Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

- 1 5 10
- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:14:
(i) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 15 амінокислот
(B) Тип: амінокислотний
(C) Кількість ниток: одна
(D) Топологія: лінійна
(ii) Тип молекули: пептид
(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:14:

Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

- 1 5 10 15
- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:15:
(i) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 16 амінокислот
(B) Тип: амінокислотний
(C) Кількість ниток: одна
(D) Топологія: лінійна
(ii) Тип молекули: пептид
(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:15:

Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

- 1 5 10 15
- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:16:
(i) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 17 амінокислот
(B) Тип: амінокислотний
(C) Кількість ниток: одна
(D) Топологія: лінійна
(ii) Тип молекули: пептид
(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:16:

Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

- 1 5 10 15
- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:17:
(i) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 18 амінокислот
(B) Тип: амінокислотний

- (C) Кількість ниток: одна
- (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули: пептид
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:17:

Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn

1 5 10 15

Arg Gly

- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:18:
- (i) Характеристики послідовності:
- (A) Довжина: 19 амінокислот
- (B) Тип: амінокислотний
- (C) Кількість ниток: одна
- (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули: пептид
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:18:

Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn

1 5 10 15

Arg Gly

- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:19:
- (i) Характеристики послідовності:
- (A) Довжина: 20 амінокислот
- (B) Тип: амінокислотний
- (C) Кількість ниток: одна
- (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули: пептид
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:19:

Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys

1 5 10 15

Asn Arg Gly

20

- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:20:
- (i) Характеристики послідовності:
- (A) Довжина: 21 амінокислоту
- (B) Тип: амінокислотний
- (C) Кількість ниток: одна
- (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули: пептид
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:20:

Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly

1 5 10 15

Lys Asn Arg Gly

20

- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:21:
- (i) Характеристики послідовності:
- (A) Довжина: 22 амінокислоти
- (B) Тип: амінокислотний
- (C) Кількість ниток: одна
- (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули: пептид
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:21:

Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg

1 5 10 15

Gly Lys Asn Arg Gly

20

- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:22:
- (i) Характеристики послідовності:
- (A) Довжина: 23 амінокислоти
- (B) Тип: амінокислотний
- (C) Кількість ниток: одна
- (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули: пептид
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:22:

Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln

1 5 10 15

Arg Gly Lys Asn Arg Gly

20

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:23:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 24 амінокислоти

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:23:

Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly

1 5 10 15

Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

20

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:24:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 25 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:24:

Arg Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg

1 5 10 15

Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

20

25

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:25:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 26 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:25:

Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg

1 5 10 15

Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

20

25

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:26:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 27 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:26:

Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly

1 5 10 15

Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

20

25

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:27:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 28 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:27:

Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys
1 5 10 15

Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly
20 25

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:28:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 29 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:28:

Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly
1 5 10 15

Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly
20 25

(2) інформація щодо послідовності SEQ ID NO:29;

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 30 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:29:

Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg
1 5 10 15

Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly
20 25 30

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:30:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 31 амінокислота

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:30:

Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser
1 5 10 15

Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly
20 25 30

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:31:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 32 амінокислоти

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:31:

Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn
1 5 10 15

Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly
20 25 30

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:32:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 33 амінокислоти

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:32:

Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu
1 5 10 15

Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly
20 25 30

- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:33:
- (i) Характеристики послідовності:
- (A) Довжина: 34 амінокислоти
- (B) Тип: амінокислотний
- (C) Кількість ниток: одна
- (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули: пептид
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:33:

Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Asn Pro

1 5 10 15

Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

20 25 30

- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:34:
- (i) Характеристики послідовності:
- (A) Довжина: 35 амінокислот
- (B) Тип: амінокислотний
- (C) Кількість ниток: одна
- (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули: пептид
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:34:

Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Asn

1 5 10 15

Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg

20 25 30

Gly

35

- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:35:
- (i) Характеристики послідовності:
- (A) Довжина: 36 амінокислот
- (B) Тип: амінокислотний
- (C) Кількість ниток: одна
- (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули: пептид
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:35:

Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala

1 5 10 15

Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn

20 25 30

Arg Gly

35

- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:36:
- (i) Характеристики послідовності:
- (A) Довжина: 37 амінокислот
- (B) Тип: амінокислотний
- (C) Кількість ниток: одна
- (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули: пептид
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:36:

Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala

1 5 10 15

Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys

20 25 30

Asn Arg Gly

35

- (2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:37:
- (i) Характеристики послідовності:
- (A) Довжина: 38 амінокислот
- (B) Тип: амінокислотний
- (C) Кількість ниток: одна
- (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули: пептид
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:37:

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

35

(2) Інформація щодо послідовності SEQ Ю NO:38:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 39 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:38:

Pro Asp Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala

1 5 10 15

Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg

20 25 30

Gly Lys Asn Arg Gly

35

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:39:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 417 основних пар

(B) Тип: нуклеїнокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: ДНК

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:39:

CATATGCTCT CGGATAAACA AATGGGTGTT CTTCACGTC GTGAACGTAA CCGTCAGGCG 60

GCCGCTGCTA ACCCGGAGAA TTCCCGTGGT AAAGGTGCTC GTGGTCAGCG TGGTAAAAAC 120

CGCGTTGCG TTCTGACCGC TATCCACCTG AACGTTACCG ACCTGGGTCT CGGTTACGAA 180

ACCAAGAAG AATTAATCTT CGGTACTGCG TCGGTTCTCT GCGACGCTGC TGAACCCACG 240

TACGACAAAA TCCTGAAAAA CCTGTCCCGT AACGTCGTC TGGTTCCGA CAAAGTTGGT 300

CAAGCTTGCT GCCGTCCGAT CGCTTTCGAC GACGACCTGT CCTTCTTGA CGACAACTG 360

GTTTACCACA TCCTGCGTAA ACACTCCGCT AAGCGTTGCG GTTGACCTA AGGATCC 417

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:40:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 417 основних пар

(B) Тип: нуклеїнокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: ДНК

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:40:

CATATGAGCC CGGACAAACA GATGGCAGTA CTTCACGTC GTGAACGTAA TCGCCAGGCA 60

GCAGCTGCAA ACCCGGAAAA CTCCCGTGGT AAAGGTGCGC GTGGCCAGCG CGGCAAAAAC 120

CGTGGTTGCG TTCTGACTGC AATCCACCTG AACGTTACTG ACCTGGGTCT GGGCTACGAA 180

ACCAAGAAG AACTGATCTT CCGCTACTGC AGCGGCTCTT GCGACGCAGC TGAACCACT 240

TACGACAAAA TCCTGAAAAA CCTGTCCCGT AACCGCCGTC TGGTAAGCGA CAAAGTAGGT 300

CAGGCATGCT GCCGTCCGAT CGCATTCGAC GATGACCTGA GCTTCCTGGA TGACAACCTG 360

GTTTACCACA TCCTGCGTAA ACACTCCGCT AACGCTGCG GTTGACCTA AGGATCC 417

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:41:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 345 основних пар

(B) Тип: нуклеїнокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: білок

(ix) Особливості:

(A) Найменування/ключ: CDS

(B) Місцезнаходження: 1...342

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:41:

ATG TCC CCA GAA AAT TCT CGT GGT AAA GGT CGT CGT GGT CAG CGT GGT 48
 Met Ser Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly
 135 140 145 150
 AAT AAC CGC GGT TGC GTT CTG ACC GCT ATC CAC CTG AAC GTT ACC GAC 96
 Asn Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp
 155 160 165
 CTG GGT CTC GGT TAC GAA ACC AAA GAA GAA TTA ATC TTC CGT TAC TGC 144
 Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys
 170 175 180
 TCC GGT TCC TGC GAC GCT GCT GAA ACC ACG TAC GAC AAA ATC CTG AAA 192
 Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Lys
 185 190 195
 AAC CTG TCC CGT AAC CGT CGT CTG GTT TCC GAC AAA GTT GGT CAA GCT 240
 Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala
 200 205 210
 TGC TGC CGT CCG ATC GCT TTC GAC GAC GAC CTG TCC TTC CTG GAC GAC 288
 Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp
 215 220 225 230
 AAC CTG GTT TAC CAC ATC CTG CGT AAA CAC TCC GCT AAG CGT TGC GGT 336
 Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly
 235 240 245
 TGC ATC TAA 345
 Cys Ile

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:42:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 114 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: білок

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:42:

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

Cys Ile

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:43:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 315 основних пар

(B) Тип: нуклеїнокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: білок

(ix) Особливості:

(A) Найменування/ключ: CDS

(B) Місцезнаходження: 1 ...312

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:43:

ATG CGT GGT CAA CGT GGT AAA AAC CGC GGT TGC GTT CTG ACT GCA ATC 48
 Met Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile
 115 120 125 130
 CAC CTG AAC GTT ACT GAC CTG GGT CTG GGC TAC GAA ACC AAA GAA GAA 96
 His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu
 135 140 145
 CTG ATC TTC CGC TAC TGC AGC GGC TCT TGC GAC GCA GCT GAA ACC ACT 144
 Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr
 150 155 160
 TAC GAC AAA ATC CTG AAA AAC CTG TCC CGT AAC CGC CGT CTG GTA AGC 192
 Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser
 165 170 175
 GAC AAA GTA GGT CAG GCA TGC TGC CGT CCG ATC GCA TTC GAC GAT GAC 240
 Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp
 180 185 190
 CTG AGC TTC CTG GAT GAC AAC CTG GTT TAC CAC ATC CTG CGT AAA CAC 288
 Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His
 195 200 205 210
 TCC GCT AAA CGC TGC GGT TGC ATC TAA 315
 Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
 215

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:44:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 104 амінокислоти

(B) Тип: амінокислотний

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: білок

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:44:

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

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:45:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 312 основних пар

(B) Тип: нуклеїнокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: білок

(ix) Особливості:

(A) Найменування/ключ: CDS

(B) Місцезнаходження: 1...309

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:45:

```
ATG GGT CAA CGT GGT AAA AAC CGT GGT TGT GTT CTG ACT GCA ATC CAC 48
Met Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His
105      110      115      120
CTG AAC GTT ACT GAC CTG GGT CTG GGC TAC GAA ACC AAA GAA GAA CTG 96
Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu
125      130      135
ATC TTC CGC TAC TGC AGC GGC TCT TGC GAC GCA GCT GAA ACC ACT TAC 144
Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr
140      145      150
GAC AAA ATC CTG AAA AAC CTG TCC CGT AAC CGC CGT CTG GTA AGC GAC 192
Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp
155      160      165
AAA GTA GGT CAG GCA TGC TGC CGT CCG ATC GCA TTC GAC GAT GAC CTG 240
Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu
170      175      180
AGC TTC CTG GAT GAC AAC CTG GTT TAC CAC ATC CTG CGT AAA CAC TCC 288
Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser
185      190      195      200
GCT AAA CGC TGC GGT TGC ATC TAA 312
Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
205
```

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:46:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 103 амінокислоти

(B) Тип: амінокислотний

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: білок

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:46:

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

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:47:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 135 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: білок

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:47:

```

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

Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
130     135

```

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:48:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 104 амінокислоти

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: білок

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:48:

```

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

Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
100

```

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:49:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 103 амінокислоти

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: білок

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:49:

```

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

Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
100

```

(2) Інформація щодо послідовності SEQ ID NO:50:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 114 амінокислот

(B) Тип: амінокислотний

(C) Кількість ниток: одна

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: білок

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

Фіг.1

Зрілий ГНФ людини

TCA CCA GAT AAA CAA ATG GCA GTG CTT CCT AGA AGA GAG CGG AAT
Ser Pro Asp Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn
5 10 15
CGG CAG GCT GCA GCT GCC AAC CCA GAG AAT TCC AGA GGA AAA GGT
Arg Gln Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly
20 25 30
CGG AGA GGC CAG AGG GGC AAA AAC CGG GGT TGT GTC TTA ACT GCA
Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala
35 40 45
ATA CAT TTA AAT GTC ACT GAC TTG GGT CTG GGC TAT GAA ACC AAG
Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys
50 55 60
GAG GAA CTG ATT TTT AGG TAC TGC AGC GGC TCT TGC GAT GCA GCT
Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala
65 70 75
GAG ACA ACG TAC GAC AAA ATA TTG AAA AAC TTA TCC AGA AAT AGA
Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg
80 85 90
AGG CTG GTG AGT GAC AAA GTA GGG CAG GCA TGT TGC AGA CCC ATC
Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile
95 100 105
GCC TTT GAT GAT GAC CTG TCG TTT TTA GAT GAT AAC CTG GTT TAC
Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr
110 115 120
CAT ATT CTA AGA AAG CAT TCC GCT AAA AGG TGT GGA TGT ATC
His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
125 130

фiг.2

Дiаграма плазмiдної конструкцiї, виготовленої для експресiї рекомбiнатних зрiзаних ГНФ бiлків

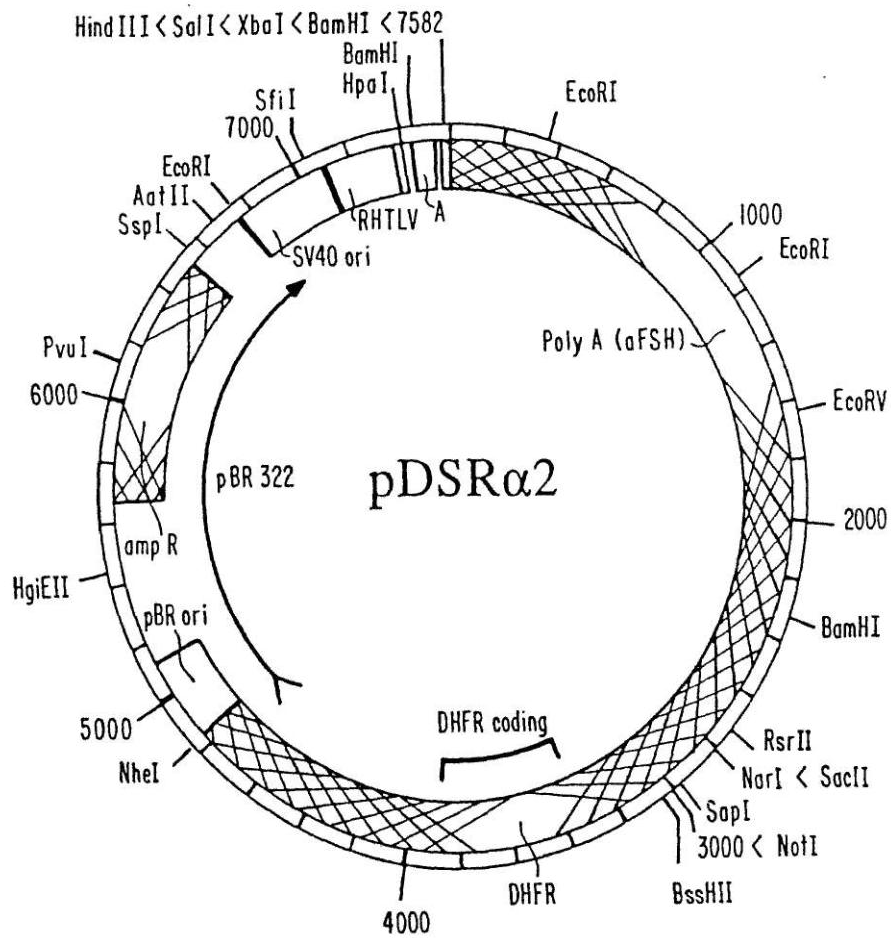


fig.3a

Рестрикційна карта альтернативної нуклеїнокислотної послідовності (SEQ ID NO:39), що кодує ГНФ і зрізані ГНФ полінуклеотиди.

N B
 d s
 e p
 I E
 I I
 CATATGTCCTCCGGATAAACAAATGGCTGTTCTTCCAC
 1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 MetSer
 N c
 o o
 t R
 I I
 GTCGTGAACGTAACCGTCAGGCGGCCGCTGCTAACCCGGAGAATTCCCGTGGTAAAGGTC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 S
 a
 c
 I
 I
 GTCGTGGTCAGCGTGGTAAAAACCGCGGTTGCGTTCTGACCGCTATCCACCTGAACGTTA
 121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
 P
 s
 h
 A
 I
 CCGACCTGGGTCTCGGTTACGAAACCAAGAAGAAATTAATCTTCCGTTACTGCTCCGTT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240

P
 S
 h
 A
 I
 CCGACCTGGGTCTCGGTTACGAAACCAAGAAGAAATTAATCTTCCGTTACTGCTCCGTT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240

(продовження)

S
u
n
I

E

H
i
n
d
I
I
IP
V
U
I

am 1105 I

GT

В
а
м
н
и

421 GCGGTTGCATCTAAGGATCC 440

fig.4

Рестрикційна карта нуклеїнокислотної послідовності (SEQ ID NO:40), що кодує ГНФ і зрізані ГНФ полінуклеотиди.

```

                                     N
                                     d
                                     e
                                     I
                                     CATATGAGCCCGGACAAACAG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
                                     MetSer

ATGGCAGTACTTCCACGTCGTGAACGTAATCGCCAGGCAGCAGCTGCAAACCCGGAAAAAC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120

TCCCGTGGTAAAGGTCGCCGTGGCCAGCGCGGCAAAAACCGTGGTTGTGTTCTGACTGCA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180

                                     P
                                     s
                                     h
                                     A
                                     I
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240

                                     P
                                     s
                                     t
                                     I
CGCTACTGCAGCGGCTCTTGCGACGCAGCTGAAACCACTTACGACAAAATCCTGAAAAAC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300

                                     P
                                     v
                                     u
                                     I
CTGTCCCGTAACCGCCGTCTGGTAAGCGACAAAGTAGGTCAGGCATGCTGCCGTCCGATC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360

B
s
m
I
GCATTGACGATGACCTGAGCTTCCTGGATGACAACCTGGTTTACCACATCCTGCGTAAA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420

                                     B
                                     a
                                     m
                                     H
                                     I
CACTCCGCTAAACGCTGCGGTTGCATCTAAGGATCC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480

```


фiг.5

[Pro²³-Lys³⁷ΔAsn³⁷-Ile¹³⁴] Зрізаний ГНФ-білок

```

ATGTCCCCAGAAAATTCTCGTGGTAAAGGTCGTCTGGTCAGCGTGGTAATAACCGCGGT
21 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 80
M S P E N S R G K G R R G Q R G N N R G

TGCGTTCTGACCGCTATCCACCTGAACGTTACCGACCTGGGTCTCGGTTACGAAACCAAA
81 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 140
C V L T A I H L N V T D L G L G Y E T K

GAAGAATTAATCTTCCGTTACTGCTCCGGTTCCTGCGACGCTGCTGAAACCACGTACGAC
141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 200
E E L I F R Y C S G S C D A A E T T Y D

AAAATCCTGAAAAACCTGTCCCGTAACCGTCGTCTGGTTTCCGACAAAGTTGGTCAAGCT
201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 260
K I L K N L S R N R R L V S D K V G Q A

TGCTGCCGTCCGATCGCTTTCGACGACGACCTGTCTTCCTGGACGACAACCTGGTTTAC
261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 320
C C R P I A F D D D L S F L D D N L V Y

CACATCCTGCGTAAACACTCCGCTAAGCGTTGCGGTTGCATCTAA
321 -----+-----+-----+-----+-----+
H I L R K H S A K R C G C I *

```

фiг.6

[Arg³²-Ile¹³⁴] Зрізаний ГНФ-білок

```
ATGCGTGGTCAACGTGGTAAAAACCGCGGTTGCGTTCTGACTGCAATCCACCTGAACGTT
41 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 100
M R G Q R G K N R G C V L T A I H L N V

ACTGACCTGGGTCTGGGCTACGAAACCAAGAAGAACTGATCTTCCGCTACTGCAGCGGC
101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 160
T D L G L G Y E T K E E L I F R Y C S G

TCTTGCGACGCAGCTGAAACCACTTACGACAAAATCCTGAAAAACCTGTCCCGTAACCGC
161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 220
S C D A A E T T Y D K I L K N L S R N R

CGTCTGGTAAGCGACAAAGTAGGTCAGGCATGCTGCCGTCCGATCGCATTCGACGATGAC
221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 280
R L V S D K V G Q A C C R P I A F D D D

CTGAGCTTCCTGGATGACAACCTGGTTTACCACATCCTGCGTAAACACTCCGCTAAACGC
281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 340
L S F L D D N L V Y H I L R K H S A K R

TGCGGTTGCATCTAA
341 -----+----- 355
C G C I *
```

фіг.7

[Gly³³-Ile¹³⁴] Зрізаний ГНФ-білок

```

ATGGGTCAACGTGGTAAAAACCGTGGTTGTGTTCTGACTGCAATCCACCTGAACGTTACT
41 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 100
M G Q R G K N R G C V L T A I H L N V T

GACCTGGGTCTGGGCTACGAAACCAAAGAAGAACTGATCTTCCGCTACTGCAGCGGCTCT
101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 160
D L G L G Y E T K E E L I F R Y C S G S

TGCGACGCAGCTGAAACCACTTACGACAAAATCCTGAAAAACCTGTCCCGTAACCGCCGT
161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 220
C D A A E T T Y D K I L K N L S R N R R

CTGGTAAGCGACAAAGTAGGTCAGGCATGCTGCCGTCCGATCGCATTCGACGATGACCTG
221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 280
L V S D K V G Q A C C R P I A F D D D L

AGCTTCCTGGATGACAACCTGGTTTACCACATCCTGCGTAAACACTCCGCTAAACGCTGC
281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 340
S F L D D N L V Y H I L R K H S A K R C

GGTTGCATCTAA
341 -----+--- 352
G C I *
```

фіг.8

Порівняння послідовностей білків

						50
	GDNF	MSPDKQMAVL	PRRERNRQAA	AANPENSERGK	GRRGQRGKNR	GCVLTAIHLN
-31	GDNFMRGQRGKNR	GCVLTAIHLN
-32	GDNFMGQRGKNR	GCVLTAIHLN
-22	GDNFMSPENSERGK	GRRGQRGNRR	GCVLTAIHLN
		51				100
	GDNF	VTDLGLGYET	KEELIFRYCS	GSCDAAETTY	DKILKNLSRN	RRLVSDKVGQ
-31	GDNF	VTDLGLGYET	KEELIFRYCS	GSCDAAETTY	DKILKNLSRN	RRLVSDKVGQ
-32	GDNF	VTDLGLGYET	KEELIFRYCS	GSCDAAETTY	DKILKNLSRN	RRLVSDKVGQ
-22	GDNF	VTDLGLGYET	KEELIFRYCS	GSCDAAETTY	DKILKNLSRN	RRLVSDKVGQ
		101			135	
	GDNF	ACCRPIAFDD	DLSFLDDNLV	YHILRKHSK	RCGCI	
-31	GDNF	ACCRPIAFDD	DLSFLDDNLV	YHILRKHSK	RCGCI	
-32	GDNF	ACCRPIAFDD	DLSFLDDNLV	YHILRKHSK	RCGCI	
-22	GDNF	ACCRPIAFDD	DLSFLDDNLV	YHILRKHSK	RCGCI	