

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 023913

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2016.07.29

(21) Номер заявки  
201101523

(22) Дата подачи заявки  
2010.05.11

(51) Int. Cl. A61K 31/122 (2006.01)  
A61K 31/12 (2006.01)  
A61K 31/194 (2006.01)  
A61K 31/19 (2006.01)  
A61P 3/00 (2006.01)

---

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ  
ЭПИМЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛИ, МНОГОАСПЕКТНЫЕ  
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МОЛЕКУЛЫ ИЛИ ФАКТОРЫ ВЛИЯНИЯ

---

(31) 61/177,241; 61/177,243; 61/177,244;  
61/177,246

(32) 2009.05.11

(33) US

(43) 2012.10.30

(86) PCT/US2010/034447

(87) WO 2010/132502 2010.11.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
БЕРГ ФАРМА ЭЛЭЛСИ (US)

(72) Изобретатель:  
Нэрейн Найвен Раджин, Маккук  
Джон Патрик, Сарангараджан  
Рангапрасад (US)

(74) Представитель:  
Соболев А.Ю. (RU)

(56) WO-A2-2008156654  
US-A1-20030235812  
US-A1-20040101874  
US-A1-20020049176

---

(57) Описаны способы и композиции для лечения метаболических нарушений у людей с использованием эпиметаболических переключателей, многоаспектных внутриклеточных молекул или факторов влияния.

---

B1

023913

023913

B1

### Родственные заявки

Настоящая заявка заявляет о приоритете предварительной заявки на патент США №61/177241, поданной 11 мая 2009, озаглавленной "Способы лечения онкологических нарушений, использующие эпиметаболический переключатель (Коэнзим Q10)" (Attorney Docket No.: 117732-00601), предварительной заявки на патент США № 61/177243, поданной 11 мая 2009, озаглавленной "Способы лечения онкологических нарушений, использующие эпиметаболические переключатели, многоаспектные внутриклеточные молекулы или факторы влияния" (Attorney Docket No.: 117732-00701), предварительной заявки на патент США № 61/177244, поданной 11 мая 2009, озаглавленной "Способы диагностики онкологических нарушений, использующие эпиметаболические переключатели, многоаспектные внутриклеточные молекулы или факторы влияния" (Attorney Docket No.: 117732-00801), предварительной заявки на патент США № 61/177245, поданной 11 мая 2009, озаглавленной "Способы лечения метаболических расстройств, использующие эпиметаболические переключатели, многоаспектные внутриклеточные молекулы или факторы влияния" (Attorney Docket No.: 117732-00901), и предварительной заявки на патент США № 61/177246, поданной 11 мая 2009, озаглавленной "Способы диагностики метаболических расстройств, использующие эпиметаболические переключатели, многоаспектные внутриклеточные молекулы или факторы влияния" (Attorney Docket No.: 117732-01001). Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок включено в настоящую заявку путем ссылки.

### Уровень техники

Исследование относится к лечению, предотвращению и уменьшению метаболических расстройств, таких как диабет и ожирение.

Когда уровень глюкозы в крови возрастает после еды, инсулин секретируется и стимулирует клетки периферийных тканей (скелетной мускулатуры и жировые) активно поглощать глюкозу из крови в качестве источника энергии. Потеря гомеостаза глюкозы в результате дисрегуляции секреции или действия инсулина обычно приводит к метаболическим расстройствам, таким как диабет, который может запускаться или осложняться ожирением. Поскольку такое состояние часто приводит к смерти, необходимо выработать стратегии для восстановления адекватного выведения глюкозы из кровотока.

Хотя диабет может возникать вторично при любом состоянии, которое приводит к сильному повреждению поджелудочной железы (например, панкреатит, опухоли, прием определенных лекарств, таких как кортикостероиды или пентамидин, передозировка железа (например, гемохроматоз), приобретенные или генетические эндокринные нарушения и хирургическое вмешательство), наиболее распространенные формы диабета обычно возникают из первичных нарушений инсулиновой сигнальной системы. Существуют два основных типа диабета, называемые диабет типа 1 (также известный как инсулинзависимый диабет (ИЗД)) и диабет типа 2 (также известный как инсулиннезависимый диабет (ИНЗД)). И тот, и другой тип диабета создают одинаковые долговременные проблемы, несмотря на различные механизмы патогенеза.

Диабет типа 1, который отвечает за примерно 10% всех случаев первичных диабетов, является органом-специфичным аутоиммунным заболеванием, характеризующимся обширным разрушением инсулин-вырабатывающих бета-клеток панкреатической железы. Последующее уменьшение выработки инсулина неизбежно приводит к дерегуляции метаболизма глюкозы. Хотя введение инсулина приносит значительную пользу пациентам, страдающим от этого нарушения, короткий период полувыведения инсулина из сыворотки является главным препятствием для поддержания нормогликемии. Альтернативным лечением является трансплантация островковых клеток, но эта стратегия имеет ограниченный успех.

Диабет типа 2, который встречается чаще всего, характеризуется дерегуляцией секреции инсулина и/или пониженной реакцией периферийных тканей на инсулин, т.е. резистентностью к инсулину. Хотя патогенез диабета типа 2 остается неясным, эпидемиологические исследования подтверждают, что эта форма диабета возникает из совокупности множества генетических дефектов или полиморфизмов, каждый из которых вносит свой вклад в риск развития нарушения и модифицируется факторами окружения, включая избыточный вес, питание, отсутствие активности, лекарства и избыточное потребление алкоголя. Хотя доступны различные терапевтические средства для лечения диабета типа 2, они связаны с различными вредными для здоровья побочными эффектами. Соответственно, пациентам, у которых диагностируется диабет типа 2 или риск его развития, часто советуют поменять образ жизни, включая потерю веса, изменения в питании, физические упражнения и умеренное потребление алкоголя. Однако таких изменений образа жизни недостаточно для восстановления того ущерба, который диабет причинил сосудам и внутренним органам.

Коэнзим Q10, также называемый здесь CoQ10, Q10, убихинон или убидекаренон, является популярной пищевой добавкой, и в капсульной форме может продаваться в продуктовых магазинах, магазинах здоровой пищи, аптеках и тому подобных магазинах, в качестве витаминоподобной добавки, помогающей защитить иммунную систему благодаря антиоксидантным свойствам убихинона, восстановленной формы CoQ10. CoQ10 известен специалистам и описан в международной публикации № WO 2005/069916, включенной в данное описание в полном объеме путем ссылки.

CoQ10 обнаруживается в большинстве тканей человеческого тела и тканях других млекопитаю-

щих. Тканевое распределение и окислительно-восстановительный потенциал CoQ10 у людей рассмотрены в обзорной статье Bhagavan and Chopra (2006, *Free Radical Research* 40(5), 445-453). Авторы сообщают, что "как общее правило, ткани с высокими энергетическими требованиями или метаболической активностью, такие как сердце, почки, легкие и мускулы, содержат сравнительно большие концентрации CoQ10." Авторы в дальнейшем сообщают, что "[а] основное количество CoQ10 в тканях находится в восстановленной форме в виде гидрохинона или уникхинона, исключение составляют мозг и легкие," что "видимо, отражает повышенный окислительный стресс в этих двух тканях." В частности, Bhagavan сообщает, что в сердце, почках, легких, мускулах, кишечнике и крови (плазма), около 61, 75, 95, 65, 95 и 96%, соответственно, CoQ10 находится в восстановленной форме. Подобным образом, Ruiz-Jiminez, et al. (2007 *J. Chroma A*, 1175, 242-248) сообщает, что при оценке количества Q10 и восстановленной формы Q10 (Q10H2) в плазме человека большинство (90%) молекул было обнаружено в восстановленной форме.

CoQ10 очень липофилен и практически нерастворим в воде. Вследствие его нерастворимости в воде, ограниченной растворимости в жирах и сравнительно большого молекулярного веса эффективность перорального приема CoQ10 является низкой. Bhagavan и Chopra сообщают, что "в одном исследовании на крысах сообщалось, что было усвоено только около 2-3% орально введенного CoQ10." Bhagavan и Chopra также сообщают, что "данные исследований на крысах показывают, что CoQ10 восстанавливается до убихинола или во время, или сразу же после абсорбции в кишечнике."

Поскольку имеющиеся в настоящее время стратегии лечения диабета не являются оптимальными, существует настоятельная потребность в лекарствах, которые являются более эффективными и не имеют таких вредных побочных эффектов.

### **Сущность изобретения**

Настоящее исследование частично основано на том открытии, что митохондриальная дисфункция связана с широким спектром болезней, включая метаболические болезни (такие как диабет и ожирение), и что определенные эндогенные молекулы, такие как CoQ10, играют ключевую роль в успешной диагностике, лечении и предотвращении таких метаболических болезней. Изобретение также частично основано на том открытии, что эти ключевые эндогенные молекулы играют важную роль в поддержании нормальной митохондриальной функции путем прямого влияния на окислительное фосфорилирование, и что восстановление или стимуляция более близкого к норме митохондриального окислительного фосфорилирования может эффективно лечить или предотвращать прогрессию метаболических болезней. Изобретение также основано на открытии, что определенный тип факторов влияния (например, CoQ10) может избирательно вызывать, в больных клетках при метаболических болезнях, переключение клеточного энергетического метаболизма в направлении более близкого к норме (нормализованного) митохондриального окислительного фосфорилирования. Эти факторы влияния способны модулировать внутриклеточные мишени, которые служат ключевыми индикаторами метаболических болезней (таких как диабет) в зависимости от соответствующих терапевтических критериев.

Настоящее исследование также основано, по меньшей мере частично, на открытии, что применение эндогенного Коэнзима Q10 (также называемого здесь CoQ10 или Q10) к клеткам приводит к апоптозной реакции. Апоптозная реакция предпочтительно вызывается в раковых клетках. Наблюдался время- и дозозависимый эффект уровней митохондриального Q10, где через 48 ч уровень в митохондриях клеток возрос в шесть раз. Настоящее изобретение дополнительно основано на неожиданном открытии, что Q10 сохраняется в замещенной окисленной форме (про-оксидантной) и не превращается в восстановленную (анти-оксидантную) форму Q10H2 в каком-либо значительном количестве. Изобретение основывается также на открытии, что уровни значительного числа белков и мРНК модулируются в клетках, подвергавшихся воздействию Q10. Было обнаружено, что эти модулированные белки группируются в несколько клеточных путей метаболизма, включая апоптозы, биологию рака и рост клеток, гликолиз и метаболизм, молекулярный транспорт и клеточный сигналинг.

Данные заявителей, описанные здесь, дают новый взгляд на механизм действия Q10. В особенности, не имея намерения ограничиваться теорией, открытия заявителей показывают, что Q10 вызывает метаболический сдвиг в микроокружении клеток. Про многие болезни известно, что они связаны с измененным метаболическим статусом. Например, известно, что у раковых клеток особый метаболизм (эффект Варбурга), вследствие чего большинство раковых клеток вырабатывают энергию преимущественно путем гликолиза с последующей ферментацией молочной кислоты в цитозоле, а не путем окислительного фосфорилирования (окисления пирувата) в митохондриях. В другом примере метаболические нарушения, такие как диабет и ожирение, связаны с измененным метаболизмом глюкозы.

Соответственно, в изобретении предложен, в первом аспекте, способ лечения, облегчения симптомов, подавления прогрессии или предотвращения поддающихся влиянию CoQ10 нарушений у млекопитающих, способ включает введение при необходимости млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей, по меньшей мере, один фактор влияния (фактор-в), где фактор влияния избирательно вызывает в больных клетках млекопитающих переключение клеточного энергетического метаболизма в направлении уровней гликолиза и митохондриального окислительного фосфорилирования, наблюдаемые в нормальных клетках млекопитающих при

нормальных физиологических условиях.

В одном воплощении изобретения поддающееся влиянию CoQ10 нарушение является метаболическим заболеванием.

Изобретение предоставляет в другом аспекте способ лечения, облегчения симптомов, подавления прогрессии или предотвращения метаболического нарушения у млекопитающих, способ включает введение при необходимости млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один фактор влияния (фактор-в), где фактор влияния избирательно вызывает в больных клетках млекопитающих переключение клеточного энергетического метаболизма в направлении нормализованного окислительного фосфорилирования.

В одном воплощении изобретения фактор влияния, по большей части, не вызывает переключения клеточного энергетического метаболизма в направлении митохондриального окислительного фосфорилирования в нормальных клетках млекопитающих.

В одном воплощении изобретения млекопитающим является человек (или не являющееся человеком млекопитающее).

В одном воплощении изобретения метаболическое нарушение реагирует или чувствительно к лечению коэнзимом Q10 или его метаболитами или аналогами.

В одном воплощении изобретения метаболическое нарушение характеризуется дисрегуляцией функции митохондриального окислительного фосфорилирования, которая приводит к изменению регуляции генов и/или взаимодействия белок-белок, что способствует или непосредственно приводит к метаболической болезни.

В одном воплощении изобретения фактор влияния включает в себя: (а) бензохинон или, по меньшей мере, одну молекулу, которая способствует биосинтезу бензохинонового кольца, и (b) по меньшей мере, одну молекулу, которая способствует синтезу и/или присоединению изопреноидных частиц к бензохиноновому кольцу.

В одном воплощении изобретения, по меньшей мере, одна вышеупомянутая молекула, которая способствует биосинтезу бензохинонового кольца, включает в себя: L-фенилаланин, DL-фенилаланин, D-фенилаланин, L-тирозин, DL-тирозин, D-тирозин, 4-гидрокси-фенилпируват, 3-метокси-4-гидроксиманделат (ванилилманделат или VMA), ванилиновую кислоту, пироксин или пантенол.

В одном воплощении изобретения, по меньшей мере, одна вышеупомянутая молекула, которая способствует синтезу и/или прикреплению изопреноидных единиц к бензохиноновому кольцу, включает в себя: фенилацетат, 4-гидроксибензоат, мевалоновую кислоту, ацетилглицин, ацетил-CoA или фарнезил.

В одном воплощении изобретения фактор влияния включает в себя: (а) один или несколько из L-фенилаланина, L-тирозина и 4-гидроксифенилпирувата; и, (b) один или несколько из 4-гидроксибензоата, фенилацетата и бензохинона.

В одном воплощении изобретения фактор влияния: (а) ингибирует экспрессию Bcl-2 и/или стимулирует экспрессию каспазы-3; и/или, (b) ингибирует клеточную пролиферацию.

В одном воплощении изобретения фактор влияния является многоаспектной внутриклеточной молекулой (MBM). В одном воплощении изобретения MBM выбирается из: альфа-кетоглутарата/ альфа-кетоглутаровой кислоты, малата/яблочной кислоты, сукцината/янтарной кислоты, глюкозамина, аденозина, аденозиндифосфата, глюкоуридина/глюкуроновой кислоты, никотиновой кислоты, динуклеотида никотиновой кислоты, аланина/фенилаланина, пиридоксина, тиамина или флавинаденидинуклеотида. В одном воплощении изобретения многоаспектная внутриклеточная молекула выбирается из группы, состоящей из ацетил Co-A, пальмитоил Co-A, L-карнитина и аминокислот (например, тирозина, фенилаланина и цистеина).

В одном воплощении изобретения фактор влияния является эпиметаболическим переключателем (эпи-переключателем). В одном воплощении изобретения эпиметаболический переключатель выбирается из трансалдолазы, транскетолазы, сукцинил CoA синтазы, пируваткарбоксилазы или рибофлавина. В одном воплощении изобретения эпиметаболический переключатель выбирается из группы, состоящей из коэнзима Q10, витамина D3 и компонентов внеклеточного матрикса. В одном воплощении изобретения, эпиметаболический переключатель является коэнзимом Q10. В одном воплощении изобретения компоненты внеклеточного матрикса выбираются из группы, состоящей из фибронектина, иммуномодуляторов (TNF $\alpha$  или интерлейкина), ангиогенных факторов; и факторов апоптоза.

В одном воплощении изобретения лечение получила выборка людей, и по меньшей мере 25% выборки имели системный уровень фактора влияния, который был терапевтическим для болезни, на которую было направлено лечение. В других воплощениях лечение получила выборка людей, и по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или более из выборки имели системный уровень коэнзима Q10, который был терапевтическим для болезни, на которую было направлено лечение. Следует понимать, что диапазоны значений, в которых границами является любая из этих величин, также следует считать частью этого изобретения, например, от 10 до 25%, от 15 до 35%, от 25 до 50%, от 35 до 60%, от 40 до 70%, от 50 до 75%, от 60 до 85% или от 70 до 90%.

В одном воплощении изобретения метаболическое нарушение, которое подвергают лечению, не

является заболеванием, которое обычно лечат путем местного воздействия, например, раком молочной железы или простаты, с ожиданием системной доставки активного агента на терапевтически эффективных уровнях.

В одном воплощении изобретения концентрация фактора влияния в тканях человека, подвергающегося лечению, отличается от концентрации в контрольном стандарте ткани человека, находящейся в здоровом или нормальном состоянии.

В одном воплощении изобретения форма фактора влияния, введенного человеку, отличается от преобладающей формы, находящейся в общей системе циркуляции у человека. В одном воплощении изобретения фактор влияния вводится человеку в окисленной форме.

В одном воплощении изобретения количество, достаточное для лечения метаболического нарушения у человека, повышающе регулирует или понижающе регулирует митохондриальное окислительное фосфорилирование.

В одном воплощении изобретения количество, достаточное для лечения метаболического нарушения у человека, модулирует анаэробное использование глюкозы и/или биосинтез лактата.

В другом аспекте изобретения предоставлен способ лечения или профилактики метаболического нарушения у людей, включающий в себя введение фактора влияния людям в количестве, достаточном для лечения или предотвращения метаболического нарушения, где фактор влияния вводится таким образом, что в течение лечения сохраняет свою окисленную форму, тем самым лечит или предотвращая метаболическое нарушение.

В одном воплощении изобретения, форма фактора влияния, вводимого человеку, отличается от преобладающей формы, находящейся в общей системе циркуляции у человека.

Изобретение предоставляет, в еще одном аспекте, способ лечения или профилактики метаболического нарушения у людей, включающий отбор пациентов, подверженных метаболическому заболеванию, и введение вышеупомянутым людям терапевтически эффективного количества фактора влияния, способного усиливать митохондриальное окислительное фосфорилирование и опционально блокировать анаэробное использование глюкозы, тем самым лечит или предотвращая метаболическое нарушение.

Изобретение предоставляет, в другом аспекте, способ для избирательного усиления митохондриального окислительного фосфорилирования в больных клетках млекопитающих, нуждающихся в лечении метаболического нарушения, способ включает в себя: введение вышеупомянутому млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтического состава, содержащего, по меньшей мере, один фактор-в, тем самым избирательно усиливая митохондриальное окислительное фосфорилирование в вышеупомянутых больных клетках млекопитающего.

В одном воплощении способов изобретения способ также включает в себя повышающее регулирование экспрессии одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из молекул, перечисленных в таблицах 2-4, таблицах 6-28 и таблицах 63-68, имеющих позитивное кратное изменение; и/или понижающее регулирование экспрессии одного или более генов, выбранных из молекул, перечисленных в таблицах 2-4, таблицах 6-28 и таблицах 63-68, имеющих негативное кратное изменение, тем самым лечит или предотвращая метаболическое нарушение. В одном воплощении изобретения способ также включает в себя модуляцию экспрессии одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из HNF4-альфа, Bcl-xl, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L, XIAP, BRAF, Vax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, трансалдозы 1, COQ1, COQ3, COQ6, пренилтрансферазы, 4-гидробензоата, нейтрофильного цитозольного фактора 2, оксида азота синтазы 2A, супероксида дисмутаза 2, VDAC, Vax канала, ANT, Цитохрома c, комплекса I, комплекса II, комплекса III, комплекса IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C и Cam Киназы II.

В одном воплощении способов изобретения лечение происходит посредством взаимодействия фактора влияния с молекулой, выбранной из группы, состоящей из молекул, перечисленных в таблицах 2-4, таблицах 6-28 и таблицах 63-68. В одном воплощении изобретения лечение происходит посредством взаимодействия фактора влияния с белком, выбранным из группы, состоящей из HNF4-альфа, Bcl-xl, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Vax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, трансалдозы 1, COQ1, COQ3, COQ6, пренилтрансферазы, 4-гидробензоата, цитозольного фактора нейтрофилов 2, синтазы оксида азота 2A и супероксиддисмутаза 2, VDAC, Vax канала, ANT, цитохрома c, комплекса I, комплекса II, комплекса III, комплекса IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C и Cam Киназы II. В одном воплощении изобретения, лечение происходит посредством взаимодействия фактора-в с HNF4-альфа. В одном воплощении изобретения лечение происходит посредством взаимодействия фактора-в с трансалдозой.

В одном воплощении способов изобретения метаболическое нарушение выбирается из группы, состоящей из диабета, ожирения, преддиабета, Метаболического Синдрома и любого ключевого элемента метаболического расстройства.

В одном воплощении изобретения метаболическое нарушение является диабетом, и фактор-в влияет на функцию бета-клеток, метаболизм инсулина и/или депонирование глюкагона.

В одном воплощении изобретения, метаболическое нарушение является ожирением, и фактор-в

действует на окисление в митохондриях бета-клеток, уменьшает размер адипоцитов и/или контролирует уровни кортизола.

В одном воплощении изобретения метаболическое нарушение является кардиоваскулярной болезнью, и действие фактора-в уменьшает пролиферацию клеток гладкой мускулатуры в средней оболочке стенки аорты, перикисное окисление липидов, синтез тромбксана- $\alpha\text{х}2$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1B}$ , агрегацию тромбоцитов, снижение образования оксида азота (NO), депонирование тромбоцитов и/или нормализует гликемический контроль.

В одном воплощении изобретения, ключевые элементы метаболического нарушения включают нарушенную гликемию натошак, нарушенную толерантность к глюкозе, увеличенный объем талии, повышенное содержание внутреннего жира, повышенный уровень глюкозы в плазме натошак, повышенный уровень триглицеридов в плазме натошак, пониженный уровень липопротеина высокой плотности натошак, повышенное кровяное давление, резистентность к инсулину, гиперинсулинемию, нарушения сердечно-сосудистой системы, застойную сердечную недостаточность, повышенный уровень норэпинефрина в плазме, повышенный уровень связанных с сердечно-сосудистой системой факторов воспаления, повышенный уровень в плазме факторов, усиливающих дисфункцию сосудистого эндотелия, гиперлипидемию, артериосклероз или атеросклероз, гиперфагию, гиперглицемию, гиперлипидемию и гипертензию или повышенное кровяное давление, повышенные уровни в плазме постпрандиального триглицерида или свободных жирных кислот, повышенный клеточный окислительный стресс или его маркеры в плазме, повышенный гиперкоагуляционный статус в плазме, жировой гепатоз, болезнь почек, включая почечную недостаточность.

В одном воплощении способов изобретения способ также включает введение дополнительного терапевтического агента, например агентов для лечения сахарного диабета, агентов для лечения осложнений диабета, антигиперлипемических агентов, гипотензивных или антигипертензивных агентов, агентов от ожирения, диуретиков, химиотерапевтических агентов, иммунотерапевтических агентов и иммуносупрессоров. В одном воплощении способов изобретения метаболическое нарушение выбирается из группы, состоящей из диабета, ожирения, преддиабета, Метаболического Синдрома и любого ключевого элемента метаболического расстройства. В одном воплощении изобретения, ключевые элементы метаболического нарушения выбираются из группы, состоящей из нарушенной гликемии натошак, нарушенной толерантности к глюкозе, увеличенного объема талии, повышенного содержания внутреннего жира, повышенного уровня глюкозы в плазме натошак, повышенного уровня триглицеридов в плазме натошак, пониженного уровня липопротеина высокой плотности натошак, повышенного кровяного давления, резистентности к инсулину, гиперинсулинемии, нарушения сердечно-сосудистой системы, застойной сердечной недостаточности, повышенного уровня норэпинефрина в плазме, повышенного уровня связанных с сердечно-сосудистой системой факторов воспаления, повышенного уровня в плазме факторов, усиливающих дисфункцию сосудистого эндотелия, гиперлипидемию, артериосклероза или атеросклероза, гиперфагии, гиперглицемии, гиперлипидемии и гипертензии или повышенного кровяного давления, повышенных уровней в плазме постпрандиального триглицерида или свободных жирных кислот, повышенного клеточного окислительного стресса или его маркеров в плазме, повышенного гиперкоагуляционного статуса в плазме, жирового гепатоза, болезни почек, включая почечную недостаточность.

В одном воплощении способов изобретения способ также включает введение дополнительного терапевтического агента, например, агента для лечения сахарного диабета, агента для лечения осложнений диабета, антигиперлипемического агента, гипотензивного или антигипертензивного агента, агента от ожирения, диуретиков, химиотерапевтических агентов, иммунотерапевтических агентов и иммуносупрессоров.

В дальнейшем аспекте изобретения предоставлен способ идентификации агента, который эффективен в лечении метаболического нарушения, способ включает выбор фактора влияния, идентификацию фактора влияния, способного переключать метаболический статус клетки, и определение того, эффективен ли фактор влияния в лечении метаболического нарушения; таким образом идентифицируется агент, эффективный в лечении метаболического нарушения.

В одном воплощении изобретения фактор влияния идентифицируется как способный переключать метаболический статус клетки путем оценки изменений в хотя бы одном из следующих параметров: экспрессии мРНК, экспрессии белка, концентрации липидов или метаболитов, уровнях биоэнергетических молекул, клеточной энергетике, функции митохондрий и числу митохондрий.

В одном воплощении изобретения фактор влияния, эффективный в лечении метаболического нарушения, может уменьшать уровни глюкозы или уровни липидов у пациента.

В еще одном аспекте изобретения предоставлен способ идентификации многоаспектной внутриклеточной молекулы, включающий в себя контакт клетки с эндогенной молекулой; мониторинг действия эндогенной молекулы на профиль клеточного микроокружения; и идентификацию эндогенной молекулы, которая вызывает изменение профиля клеточной микросреды, таким образом идентифицируется многоаспектная внутриклеточная молекула.

В одном воплощении изобретения способ также включает в себя сравнение влияния эндогенной

молекулы на профиль клеточного микроокружения больной клетки и нормальной контрольной клетки; и идентификацию эндогенной молекулы, которая вызывает различные изменения в профиле клеточной микросреды больной клетки и нормальной контрольной клетки; таким образом идентифицируется MBM.

В одном воплощении изобретения действие на профиль клеточного микроокружения определяется путем оценки изменения уровня или активности клеточной молекулы, выбранной из группы, состоящей из мРНК, белков, липидов и метаболитов.

В еще одном аспекте изобретения предоставлен способ идентификации эпиметаболического переключателя, включающий в себя сравнение молекулярных профилей двух или более клеток или тканей, где две или более клеток или тканей находятся на различных стадиях нарушения; идентификацию молекулы из молекулярных профилей, для которых изменение уровня коррелирует со стадией нарушения; введение молекулы в клетку и оценку возможности молекулы переключить метаболический статус клетки; где молекула, способная переключить метаболический статус клетки, идентифицируется как эпиметаболический переключатель.

В одном воплощении изобретения молекулярный профиль выбирается из группы, состоящей из профиля метаболитов, профиля липидов, профиля белков или профиля РНК.

В одном воплощении изобретения молекула не оказывает негативного воздействия на здоровье или рост нормальных клеток.

В другом аспекте изобретения предоставлена композиция, включающая агента, идентифицированного в соответствии с любым из способов изобретения. Изобретение также предоставляет, в родственном аспекте, набор, включающий состав изобретения.

В другом аспекте изобретения предоставлен способ уменьшения уровней глюкозы у пациентов, включающий введение пациенту эффективного количества состава изобретения. Изобретение также предоставляет, в родственном аспекте, способ уменьшения уровней липидов у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества состава изобретения.

#### **Краткое описание фигур**

Фиг. 1 - чувствительность SK-MEL-28 к 24 ч воздействия Q10, оцененная по количеству ранних и поздних апоптозных клеток.

Фиг. 2 - чувствительность SKBR3 к 24 ч воздействия Q10, оцененная по количеству ранних и поздних апоптозных клеток.

Фиг. 3 - чувствительность PaCa2 к 24 ч воздействия Q10, оцененная по количеству ранних и поздних апоптозных клеток.

Фиг. 4 - чувствительность PC-3 к 24 ч воздействия Q10, оцененная по количеству ранних и поздних апоптозных клеток.

Фиг. 5 - чувствительность HepG2 к 24 ч воздействия Q10, оцененная по количеству ранних и поздних апоптозных клеток.

Фиг. 6 - чувствительность MCF-7 к 24 ч воздействия Q10, оцененная по количеству ранних и поздних апоптозных клеток.

Фиг. 7 - оценка апоптозных клеток после 24 ч воздействия Q10, оцененная по методу Apostrand ELISA.

Фиг. 8 - пример гель-анализа на 2-D гель-электрофорезе. Отмечены точки, выбранные для идентификации.

Фиг. 9 - сеть взаимодействий между белками, идентифицированными в 2-D гель электрофорезе, модулированными Q10 в SK-MEL-28 клетках.

Фиг. 10 - пентозофосфатный путь, адаптированный по Verhoeven et al. (Am. J. Hum. Genet. 2001 68(5): 1086-1092).

Фиг. 11 - 2-D гель богатого митохондриями материала SK-MEL-28 клеток. Отмечены точки, исключенные и идентифицированные путем масс-спектропии.

Фиг. 12 - сравнительный график относительных количеств Q10, присутствующего в митохондриях SK-MEL-28 после экзогенного добавления 100 мкМ Q10 в культуральную среду.

Фиг. 13 - карта известных процессов апоптозного пути.

Фиг. 14 - анализ иммуноблоттингом Bcl-xl.

Фиг. 15 - анализ иммуноблоттингом образцов SK-MEL-28, обработанных антителами Виментин.

Фиг. 16 - анализ иммуноблоттингом лизиса клеток из различных клеточных линий, оцененный с помощью пяти антител к комплексам окислительного фосфорилирования (MitoSciences #MS601).

Фиг. 17 - сравнение с помощью иммуноблоттинга уровней F1-альфа.

Фиг. 18 - сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на C-III-Core 2.

Фиг. 19 - сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на C-II-30.

Фиг. 20 - сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на C-IV-COX II.

Фиг. 21 - сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на C-I-20 (ND6).

Фиг. 22 - анализ иммуноблоттингом различных типов клеток на пять митохондриальных белков.

Фиг. 23 - сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на комплекс V белка C-V-α.

- Фиг. 24 - сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на C-III-Core 1.  
 Фиг. 25 - сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на Порин(VDAC1).  
 Фиг. 26 - сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на Циклофилин D.  
 Фиг. 27 - сравнение с помощью иммуноблоттинга реакции на Q10 и на Цитохром C.  
 Фиг. 28 - теоретическая модель Q10 (сферическая), входящего в липидсвязывающий канал HNF4альфа (1M7W.pdb) в открытую конформацию Helix 10.  
 Фиг. 29 - OCR в HDFa клетках в разном глюкозном состоянии в норме и при гипоксии.  
 Фиг. 30 - OCR в HASMC клетках в разном глюкозном состоянии в норме и при гипоксии.  
 Фиг. 31 - OCR значения в MCF-7 клетках рака молочной железы в отсутствие и в присутствии 31510 и стрессоров.  
 Фиг. 32 - OCR значения в PaCa-2 раковых клетках поджелудочной железы в отсутствие и в присутствии 31510 и стрессоров.

### Подробное описание изобретения

#### 1. Определения.

При использовании здесь каждый из следующих терминов имеет значение, соответствующее ему в этом разделе.

Термины в единственном числе, используемые в настоящем документе, относятся к одному или более (т.е., по меньшей мере, к одному) грамматическому объекту статьи. Например, "один элемент" обозначает один элемент или более одного элемента.

Термин "включая" используется здесь в значении и взаимозаменяемо с фразой "включая, но не ограничиваясь".

Термин "или" используется здесь в значении и взаимозаменяемо с термином "и/или," если только контекст прямо не указывает на другое.

Термин "такой как" используется здесь в значении и взаимозаменяемо с фразой "такой как, но не ограничиваясь".

"Пациент" или "субъект", подвергнутый лечению по способу изобретения, может означать или человека, или не являющееся человеком животное, предпочтительно млекопитающее.

"Терапевтически эффективное количество" означает количество соединения, которое, будучи введено пациенту для лечения болезни, достаточно для оказания эффекта лечения болезни. Если соединение вводится для профилактики болезни, количество достаточно для избежания или отсрочки наступления болезни. "Терапевтически эффективное количество" будет варьировать в сильной зависимости от соединения, болезни и ее серьезности и возраста, веса и тому подобного у пациента, подвергаемого лечению.

"Профилактика" или "предотвращение" относится к уменьшению риска развития болезни или нарушения (т.е., причиной того, что по крайней мере один из клинических симптомов болезни не разовьется у пациента, который может быть подвержен или предрасположен к болезни, но еще не имеет ее или не показывать симптомов болезни).

Термин "профилактическое" или "терапевтическое" количество относится к введению субъекту одной или более композиций, о которых идет речь. Если введение предшествует клиническому проявлению нежелательного состояния (например, болезни или другого нежелательного состояния организма), тогда воздействие является профилактическим, т.е. оно предотвращает развитие в организме нежелательного состояния, а в случае если введение происходит после проявления нежелательного состояния, воздействие является терапевтическим (т.е., имеет своей целью уменьшить, улучшить или поддержать существующее нежелательное состояние или его побочные эффекты).

Термин "терапевтический эффект" относится к местному или системному эффекту у животных, особенно млекопитающих, и в первую очередь человека, причиной которого является фармакологически активное вещество. Термин таким образом относится к любому веществу, которое намереваются использовать для диагностики, курса лечения, облегчения, лечения или предотвращения болезни или в увеличении желаемого физического или ментального развития и условий у животных или людей. Фраза "терапевтически эффективное количество" означает, такое количество вещества, которое производит определенное желаемое местное или системное действие в приемлемом соотношении польза/риск, применимом к любому лечению. В некоторых вариантах воплощения терапевтически эффективное количество вещества будет зависеть от его терапевтического индекса, растворимости и тому подобного. Например, определенные композиции, раскрытые в способах настоящего изобретения, могут вводиться в достаточном количестве для получения обоснованного соотношения преимущество/риск, применимого к такому лечению.

"Пациент" означает любое животное (например, человек), включая лошадей, собак, кошек, свиней, коз, кроликов, хомяков, обезьян, морских свинок, крыс, мышей, ящериц, змей, коров, рыб и птиц.

"Метаболический путь" относится к последовательности фермент-опосредованных реакций, которые трансформируют одно соединение в другое и представляют промежуточные продукты и энергию для клеточных функций. Метаболический путь может быть линейным или циклическим.

"Метаболический статус" относится к молекулярному содержанию в определенной клеточной,



многоклеточной или тканевой среде в определенный момент времени, оцененному по различным химическим и биологическим показателям, которые имеют отношение к состоянию здоровья или болезни.

Термин "микрочип" относится к совокупности определенных полинуклеотидов, олигонуклеотидов, полипептидов (например, антител) или пептидов, синтезированных на субстрате, таком как бумага, нейлон или другой тип мембраны, фильтра, тонкой пластинки, стеклянной пластинки или любой другой твердой подложки.

Термины "нарушения" и "болезни" используются взаимозаменяемо и относятся к любому отклонению от нормальной структуры или функции любой части, органа или системы организма (или любой их комбинации). Определенная болезнь выражается по характерным симптомам и признакам, включая биологические, химические и физические изменения и часто связывается с множеством других факторов, включая, но не ограничиваясь, демографическим, окружающей среды, генетическим и медицинским историческим факторами. Определенные характерные признаки, симптомы и соответствующие факторы могут быть подсчитаны различными методами для получения важной диагностической информации.

Термин "экспрессия", используемый здесь, означает процесс, по которому полипептид образуется из ДНК. Процесс включает транскрипцию на гене мРНК и трансляцию на этой мРНК полипептида. В зависимости от контекста, в котором это выражение используется, "экспрессия" может относиться к образованию РНК, белка или и того, и другого.

Термин "уровень экспрессии гена" относится к уровню мРНК, а также пре-мРНК, образующихся транскриптов РНК, промежуточных транскриптов, зрелой(ых) мРНК и продуктов распада, или к уровню белка, кодируемого этим геном в клетке.

Термин "модуляция" относится к повышающему регулированию (т.е. активации или стимуляции), понижающему регулированию (т.е. ингибированию или супрессии) в качестве реакции, или к тому и другому в комбинации или отдельно. "Модулятор" является композицией или молекулой, которая модулирует, и может быть, например, агонистом, антагонистом, активатором, стимулятором, супрессором или ингибитором.

Термин "промежуточный продукт биосинтеза коэнзима", используемый здесь, характеризует те соединения, которые образуются при химическом/биологическом превращении тирозина и Ацетил-СоА в убихинон. Промежуточные продукты биосинтеза коэнзима включают 3-гексапренил-4-гидроксibenзоат, 3-гексапренил-4,5-дигидроксibenзоат, 3-гексапренил-4-гидрокси-5-метоксibenзоат, 2-гексапренил-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-гексапренил-3-метил-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-гексапренил-3-метил-5-гидрокси-6-метокси-1,4-бензохинон, 3-октапренил-4-гидроксibenзоат, 2-октапренилфенол, 2-октапренил-6-метоксифенол, 2-октапренил-3-метил-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-октапренил-3-метил-5-гидрокси-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-декапренил-3-метил-5-гидрокси-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-декапренил-3-метил-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-декапренил-6-метокси-1,4-бензохинон, 2-декапренил-6-метоксифенол, 3-декапренил-4-гидрокси-5-метоксibenзоат, 3-декапренил-4,5-дигидроксibenзоат, 3-декапренил-4-гидроксibenзоат, 4-гидроксифенилпируват, 4-гидроксифенил-лактат, 4-гидроксibenзоат, 4-гидроксициннамат и гексапренилдифосфат.

Используемый здесь термин "анаэробное использование глюкозы" или "анаэробный гликолиз" относится к клеточному вырабатыванию энергии путем гликолиза, следующего после молочнокислой ферментации в цитозоле. Например, многие раковые клетки вырабатывают энергию путем анаэробного гликолиза.

Используемый здесь термин "аэробный гликолиз" или "митохондриальное окислительное фосфорилирование" относится к клеточному вырабатыванию энергии путем гликолиза, следующего после окисления пирувата в митохондриях.

Используемая здесь фраза "может блокировать анаэробное использование глюкозы и усиливать митохондриальное окислительное фосфорилирование" относится к способности фактора влияния (например, эпиметаболического переключателя) вызывать переключение или изменение в метаболическом статусе клетки от анаэробного гликолиза к аэробному гликолизу или митохондриальному окислительному фосфорилированию.

Теперь будет сделана детальная ссылка на предпочитаемые воплощения изобретения. Хотя изобретение будет описано в соответствии с предпочтительными воплощениями, следует понимать, что изобретение не следует ограничивать этими предпочтительными воплощениями. Напротив, изобретение включает альтернативы, модификации и эквиваленты, которые можно включить в объем и область изобретения, как определено в приложенной формуле.

## II. Факторы влияния на внутреннюю среду

В настоящем изобретении представлены способы лечения метаболических нарушений путем введения фактора влияния на внутреннюю среду. "Факторы влияния на внутреннюю среду" (факторы влияния, В-факторы) являются молекулами, которые благотворным образом влияют или модулируют болезненную внутреннюю среду, давая возможность болезненной внутренней среде измениться, восстановив или поддерживая нормальную или здоровую внутреннюю среду, что приводит к нормальному со-

стоянию. Факторы влияния включают как многоаспектные внутриклеточные молекулы (МВМ), так и эпиметаболические переключатели (эпи-переключатели), определенные ниже.

#### 1. Многоаспектная внутриклеточная молекула (МВМ).

Термин "многоаспектная внутриклеточная молекула (МВМ)", является выделенной версией или синтезированной версией эндогенной молекулы, которая в природе образуется в организме и/или присутствует, по меньшей мере, в одной клетке человека. МВМ характеризуется одной или более, двумя или более, тремя или более или всеми следующими функциями. МВМ способны проникать в клетку, и проникновение в клетку включает полное или частичное проникновение в клетку, пока биологически активная часть молекулы полностью не войдет в клетку. МВМ способны запускать механизмы сигнальной трансдукции и/или экспрессии генов в клетке. МВМ являются многоаспектными, поскольку молекулы одновременно обладают как терапевтическим действием, так и являются носителем, т.е. переносчиком лекарства. МВМ также являются многоаспектными, поскольку молекулы одним образом действуют на состояние болезни и другим образом на нормальное состояние. Например, в случае CoQ-10, введение CoQ-10 в клетки меланомы в присутствии VEGF приводит к снижению уровня Bcl2, который, в свою очередь, приводит к снижению онтогенетического потенциала клеток меланомы. Напротив, в нормальной фибробласте, при одновременном введении CoQ-10 и VEGF эффект на уровне Bcl2 не оказывается. Предпочтительно, МВМ избирательно действует на клетки в состоянии болезни, и по большей части не оказывает эффекта на (соседние) клетки в нормальном состоянии. Предпочтительно, МВМ избирательно оказывает влияние на клетки в болезненном состоянии, близкие по фенотипу, метаболическому статусу, генотипу, уровням экспрессии мРНК/белков, и т.д., приближая клетки к нормальному состоянию.

В одном варианте воплощения, МВМ является также эпи-переключателем. В другом варианте воплощения МВМ не является эпи-переключателем. Специалист в данной области техники поймет, что подразумевается, что МВМ изобретения также включает в себя смесь двух или более эндогенных молекул, где смесь характеризуется одной или более вышеупомянутых функций. Эндогенные молекулы в смеси представлены в таком соотношении, что смесь действует как МВМ.

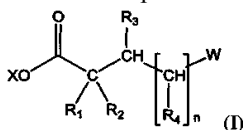
МВМ могут быть молекулами, имеющими липидную основу, или не имеющими липидной основы. Примеры МВМ включают, не ограничиваясь, CoQ10, ацетил Co-A, пальмитил Co-A, L-карнитин, аминокислоты, такие как, например, тирозин, фенилаланин и цистеин. В одном воплощении МВМ является маленькой молекулой. В одном воплощении изобретения МВМ не является CoQ10. МВМ может идентифицировать обычным образом любой специалист, используя любой из анализов, подробно описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах воплощения МВМ включает соединения семейства витаминов В, или нуклеотиды, мононуклеотиды или динуклеотиды, которые содержат соединения семейства витаминов В. Соединения семейства витаминов В включают, например, тиамин (витамин В1), ниацин (также известный как никотиновая кислота или витамин В3), или пиридоксин (витамин В6), а также провитамины, такие как пантенол (провитамин В5). В некоторых вариантах воплощения МВМ выбирается из тиамина, ниацина или пиридоксина. Нуклеозиды, мононуклеотиды или динуклеотиды, в состав которых входят соединения семейства витаминов В, включают, например, нуклеозиды, мононуклеотиды или динуклеотиды, в состав которых входит молекула аденина или ниацина (никотиновой кислоты). В некоторых вариантах воплощения МВМ выбирается из аденозина, аденозиндифосфата (АДФ), флавин аденозин динуклеотида (ФАД, который содержит части витамина В2 и АДФ) и динуклеотид никотиновой кислоты.

В других вариантах воплощения МВМ включает аминокислоты. Примеры аминокислот включают, например, тирозин (напр, L-тирозин), цистеин, фенилаланин (например, L-фенилаланин) и аланин. В некоторых вариантах воплощения, аминокислотой является фенилаланин или аланин. В некоторых вариантах воплощения, МВМ включает производные аминокислот, такие как 4-гидроксифенилпируват или ацетилглицин.

В некоторых вариантах воплощения МВМ является аналогом глюкозы, напр, молекулой глюкозы, где одна группа -ОН или -CH<sub>2</sub>ОН замещена группой -COOH, -COO<sup>-</sup> или -NH<sub>2</sub>. Примеры аналогов глюкозы включают глюкозамин, глюциронид и глюкуронат.

В некоторых вариантах воплощения МВМ выбирается из соединений формулы (I)



где n является целым числом из 0 или 1;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup>, при их наличии, каждый независимо выбирается из водорода и гидроксила, или R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> вместе с углеродом, к которому они присоединяются, образуют карбонильную (C=O) группу;

W является -COOH или -N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>; и

X является водородом, отрицательно заряженным или катионом щелочного металла, такого как

Na<sup>+</sup>.

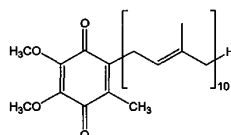
Понятно, что когда  $n$  равно 0, CHR<sup>3</sup> группа связана с заместителем W.

В некоторых вариантах воплощения W является  $-N(CH_3)_3^+$ . В некоторых вариантах воплощения MBM является карнитином, таким как L-карнитин.

В некоторых вариантах воплощения MBM является дикарбоновой кислотой. В некоторых вариантах воплощения W является  $-COOH$ . В некоторых вариантах воплощения R<sup>3</sup> является водородом. В некоторых вариантах воплощения  $n$  равно 0. В некоторых вариантах воплощения каждый из R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо являются водородом. В некоторых вариантах воплощения W является  $-COOH$ , R<sup>3</sup> является водородом,  $n$  равно 0, и каждый из R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо являются водородом. В некоторых вариантах воплощения  $n$  равно 1. В некоторых вариантах воплощения R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> берутся вместе с углеродом, к которому они присоединены, образуя карбонильную (C=O) группу. В некоторых вариантах воплощения, R<sup>4</sup> является водородом. В некоторых вариантах воплощения, R<sup>4</sup> является гидроксильной группой. В некоторых вариантах воплощения, W является  $-COOH$ , R<sup>3</sup> является водородом,  $n$  равно 1 и R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> берутся вместе с углеродом, к которому они присоединены, образуя карбонильную (C=O) группу.

В некоторых вариантах воплощения MBM является промежуточным продуктом цикла Кребса, излишки которого сдвигают цикл Кребса в направлении окислительного фосфорилирования. Примеры промежуточных продуктов цикла Кребса, которые являются MBM, включают янтарную кислоту или сукцинат, яблочную кислоту или малат, и  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту или  $\alpha$ -кетоглутарат.

В некоторых вариантах воплощения MBM является строительным блоком CoQ10, который имеет следующую структуру



Таким образом, строительные блоки CoQ10 включают, не ограничиваясь, фенилаланин, тирозин, 4-гидроксифенилпируват, фенилацетат, 3-метокси-4-гидроксиманделат, ванилиновую кислоту, 4-гидроксibenзоат, мевалоновую кислоту, фарнезил, 2,3-диметокси-5-метил-п-бензохинон, а также их соответствующие кислоты или ионы. В некоторых вариантах воплощения MBM выбирается из фенилаланина, тирозина, 4-гидроксифенилпирувата, фенилацетата и 4-гидроксibenзоата.

#### (i) Способы идентификации MBM.

В настоящем изобретении представлены способы идентификации MBM. Способы идентификации MBM включают, в целом, экзогенное добавление к клетке эндогенной молекулы и оценку действия на клетку, например, на профиль микроокружения клетки, которое производит эндогенная молекула. Действие на клетку оценивается по следующим параметрам (один или несколько): клеточное строение, мРНК, белки, липиды и/или метаболический уровень, для идентификации изменений в профиле клеточной микросреды. В одном варианте воплощения клетки являются культивируемыми клетками, например, *in vitro*. В одном варианте воплощения клетки находятся в организме. Эндогенная молекула может быть добавлена в клетку в одной концентрации или может быть добавлена в клетку в различных концентрациях. В одном варианте воплощения эндогенная молекула добавляется к клеткам так, что уровень эндогенной молекулы в клетках поднимается (например, поднимается в 1,1 раза, 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раза, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раза, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 35 раз, 40 раз, 45 раз, 50 раз или больше) по сравнению с уровнем эндогенной молекулы в контрольной клетке, не подвергавшейся воздействию.

Молекулы, которые вызывают изменение в клетке, как определяется по изменениям, например, в следующих параметрах (одному или нескольким): морфологии, физиологии и/или составу (например, мРНК, белки, липиды, метаболиты), могут, кроме того, оцениваться для определения, различаются ли вызываемые изменения в профиле клеточной микросреды между болезненным клеточным состоянием и нормальным клеточным состоянием. Клетки (например, линии клеточных культур) различного тканевого происхождения, клеточного типа или состояния, могут быть оценены путем сравнительной оценки. Например, изменения, вызванные в профиле клеточной микросреды раковой клетки, могут быть сравнимы с изменениями, вызванными в нераковой или нормальной клетке. Эндогенная молекула, которая, как наблюдается, вызывает изменения в профиле микросреды клетки (например, вызывает изменения в морфологии, физиологии и/или составу, например, мРНК, белки, липиды или метаболиты в клетке и/или различным образом (например, предпочтительно) вызывает изменения в профиле клеточной микросреды в болезненной клетке по сравнению с нормальной клеткой, идентифицируется как MBM.

MBM изобретения могут быть MBM, имеющими липидную основу, или MBM, не имеющими липидной основы. Способы идентификации MBM, имеющих липидную основу, включают вышеописанные базовые клеточные способы, в которых имеющая липидную основу эндогенная молекула экзогенно добавляется к клетке. В предпочтительном варианте воплощения, имеющая липидную основу эндогенная молекула добавляется к клетке таким образом, что уровень имеющей липидную основу эндо-

генной молекулы в клетке повышается. В одном варианте воплощения уровень имеющей липидную основу эндогенной молекулы повышается в 1,1 раза, 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раза, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раза, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 35 раз, 40 раз, 45 раз, 50 раз или больше по сравнению с уровнем в контрольных клетках, не подвергавшихся воздействию. Формула и доставка молекулы с липидной основой в клетку зависит от свойств каждой исследуемой молекулы, но многие способы известны специалистам. Примеры формулы и доставки молекул с липидной основой, включают, не ограничиваясь, солубилизацию корастворителями, молекулы-переносчики, липосомы, дисперсии, суспензии, дисперсии наночастиц, эмульсии, например, эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле", мультифазные эмульсии, например, эмульсии типа "масло в воде в масле", полимерный захват и инкапсуляцию. Доставка МВМ с липидной основой в клетку может быть подтверждена экстракцией клеточных липидов и количественным определением МВМ с помощью обычных способов, известных специалистам, таких как масс-спектрометрия.

Способы идентификации не имеющих липидной основы МВМ включают вышеописанные базовые клеточные способы, в которых не имеющая липидной основы эндогенная молекула экзогенно добавляется к клетке. В предпочтительном варианте воплощения не имеющая липидной основы эндогенная молекула добавляется к клетке таким образом, что уровень имеющей липидную основу эндогенной молекулы в клетке повышается. В одном варианте воплощения, уровень не имеющей липидную основу эндогенной молекулы повышается в 1,1 раза, 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раза, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раза, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 35 раз, 40 раз, 45 раз, 50 раз или больше по сравнению с уровнем в контрольных клетках, не подвергавшихся воздействию. Формула и доставка не имеющей липидной основы молекулы в клетку зависит от свойств каждой исследуемой молекулы, но многие способы известны специалистам. Примеры формулы и доставки не имеющих липидной основы молекул, включают, не ограничиваясь, солубилизацию корастворителями, молекулы-переносчики, активный транспорт, полимерный захват или адсорбцию, полимерную прививку, липосомную инкапсуляцию, и композицию с направленными системами доставки. Доставка МВМ с липидной основой в клетку может быть подтверждена экстракцией клеточных липидов и количественным определением МВМ с помощью обычных способов, известных специалистам, таких как масс-спектрометрия.

## 2. Эпиметаболические переключатели (эпи-переключатели).

При использовании здесь, "эпиметаболический переключатель" (эпи-переключатель) является молекулой (эндогенной или экзогенной), которая модулирует метаболическое переключение от здорового (или нормального) состояния к болезненному состоянию и наоборот, тем самым поддерживая или восстанавливая здоровье клеток, тканей, систем и/или здоровье человека в целом. Эпи-переключатели способны к эффективной нормализации в тканевой микросреде. Например, эпи-переключатель включает любую молекулу, которая способна, при добавлении или извлечении из клетки, влиять на микросреду (например, на метаболический статус) клетки. Специалисты поймут, что под эпи-переключателем изобретения также может подразумеваться смесь из двух или более молекул, где смесь характеризуется одной или более из вышеупомянутых функций. Молекулы в смеси представлены в таком соотношении, что смесь действует как эпи-переключатель. Примеры эпи-переключателей включают, не ограничиваясь, соQ-10; витамин D3; ECM компоненты, такие как фибронектин; иммуномодуляторы, такие как TNFα и любые интерлейкины, например, IL-5, IL-12, IL-23; факторы ангиогенеза и факторы апоптоза.

В некоторых вариантах воплощения, эпи-переключатель является энзимом, таким как энзим, который или прямо принимает участие в катализации одной или более реакций в цикле Кребса, или вырабатывает промежуточные продукты цикла Кребса, избыток которых запускает цикл Кребса. В некоторых вариантах воплощения энзим является энзимом неокислительной фазы пентозофосфатного пути, таким как трансальдолаза или транскетолаза. В других вариантах воплощения энзим является компонентом энзима или энзимного комплекса, который способствует циклу Кребса, таким как синтаза или лигаза. Примеры энзимов включают сукцинил СоА синтазу (энзим цикла Кребса) или пируват карбоксилазу (лигазу, которая катализирует обратимую карбоксиляцию пирувата с образованием оксалоацетата (ОАА), промежуточного продукта цикла Кребса).

В некоторых вариантах воплощения эпи-переключатель является строительным блоком СоQ10. Строительные блоки СоQ10 включают, не ограничиваясь, фенилаланин, тирозин, 4-гидроксифенилпируват, фенилацетат, 3-метокси-4-гидроксиманделат, ванилиновую кислоту, 4-гидроксибензоат, мевалоновую кислоту, фарнезил, 2,3-диметокси-5-метил-п-бензохинон, а также их соответствующие кислоты или ионы. В некоторых вариантах воплощения эпи-переключатель выбирается из фенилаланина, тирозина, 4-гидроксифенилпирувата, фенилацетата и 4-гидроксибензоата.

В некоторых вариантах воплощения эпи-переключатель является соединением семейства витаминов В. В семейство витаминов В входят, например, рибофлавин (витамин В2) или его аналоги. Эпи-переключатели также включают любые аналоги или неактивные формы лекарства, которые могут превращаться в ходе метаболизма *in vivo* в любые эндогенные МВМ, такие как описанные здесь.

В одном варианте воплощения эпи-переключатель является также МВМ. В одном варианте воплощения эпи-переключатель не является СоQ10. Специалисты в данной области могут обычным обра-

зом идентифицировать эпи-переключатели с помощью анализов, подробно описанных в настоящем документе.

(i) Способы идентификации эпи-переключателей.

Эпиметаболические переключатели (эпи-переключатели) являются молекулами, способными модулировать метаболический статус клетки, например, вызывать метаболическое переключение со здорового (или нормального) состояния на болезненное состояние и наоборот, и тем самым способными поддерживать или восстанавливать здоровье клеток, тканей, органов, систем и/или здоровье человека в целом. Эпи-переключатели изобретения, таким образом, полезны для диагностической оценки болезненного состояния. Кроме того, эпи-переключатели изобретения полезны для терапевтических применений, где применение или введение эпи-переключателя (или модуляция эпи-переключателя другими терапевтическими молекулами) приводит к нормализации клеточной микросреды и болезненного состояния.

Идентификация эпи-метаболического переключателя включает, в общем, установление молекулярного профиля, например, метаболитов, липидов, белков или РНК (их индивидуальные профили или в комбинации) для совокупности клеток или тканей, которые демонстрируют различные болезненные состояния, прогрессию или агрессивность. Молекула из профиля(ей), у которой изменение уровня (напр, возрастание или уменьшение уровня) коррелирует с болезненным состоянием, прогрессией или агрессивностью, идентифицируется как потенциальный эпи-переключатель.

В одном варианте воплощения эпи-переключатель является также МВМ. Потенциальные эпи-переключатели можно оценить по их способности проникать в клетки путем экзогенного присоединения к клетке при использовании любого количества обычных способов, известных специалистам в данной области, и при использовании любого способа, описанного здесь. Например, проникновение потенциального эпи-переключателя в клетку можно подтвердить экстракцией клеточного содержимого и оценкой количества потенциального эпи-переключателя обычными способами, известными специалистам в данной области, такими как масс-спектрометрия. Потенциальный эпи-переключатель, способный проникать в клетку, тем самым идентифицируется как МВМ.

Для идентификации эпи-переключателя, потенциальный эпи-переключатель затем оценивается по способности переключать метаболический статус клетки. Способность потенциальных эпи-переключателей переключать метаболический статус клеточной микросреды оценивается по вхождению (например экзогенному присоединению) в клетку потенциального эпи-переключателя и мониторингу в клетке одного или более признаков: изменений экспрессии генов (например, изменения в мРНК или экспрессии белков), изменений концентрации липидов или уровней метаболитов, изменений уровней биоэнергетических молекул, изменений клеточной энергетики и/или изменений функции или числа митохондрий. Способность потенциальных эпи-переключателей переключать метаболический статус клеточной микросреды обычно может быть идентифицирована специалистом в данной области при использовании любого из способов, подробно описанных в настоящем документе. Потенциальные эпи-переключатели в дальнейшем оцениваются по способности переключать метаболический статус больной клетки в направлении нормального здорового состояния (или напротив, по способности переключать метаболический статус нормальной клетки в направлении состояния болезни). Потенциальный эпи-переключатель, способный переключать метаболический статус больной клетки в направлении нормального здорового состояния (или переключать метаболический статус нормальной клетки в направлении состояния болезни) таким образом идентифицируется как эпи-переключатель. В предпочтительных вариантах воплощения, эпи-переключатель не оказывает негативного влияния на здоровье и/или рост нормальных клеток.

Эпиметаболические переключатели изобретения включают, не ограничиваясь, низкомолекулярные метаболиты, молекулы с липидной основой и белки и РНК. Для идентификации метаболического переключателя в классе низкомолекулярных эндогенных метаболитов, устанавливаются метаболитные профили совокупности клеток или тканей, которые демонстрируют различные болезненные состояния, прогрессию или агрессивность. Метаболитный профиль для каждой клетки или ткани определяется путем экстракции метаболитов из клетки или ткани и последующих идентификации и количественной оценки метаболитов с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области, включающих, например, методы жидкостной хроматографии в совокупности с масс-спектрометрией или газовой хроматографии в совокупности с масс-спектрометрией. Метаболиты, у которых изменение уровня (например, возрастание или уменьшение уровня) коррелирует с болезненным состоянием, прогрессией или агрессивностью, идентифицируются как потенциальные эпи-переключатели.

Для идентификации эпи-метаболических переключателей в классе эндогенных молекул, имеющих липидную основу, устанавливаются липидные профили для совокупности клеток или тканей, которые демонстрируют различные болезненные состояния, прогрессию или агрессивность. Липидный профиль для каждой клетки или ткани определяется путем экстракции метаболитов из клетки или ткани и последующих идентификации и количественной оценки метаболитов с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области, включающих, например, методы жидкостной хроматографии в совокупности с масс-спектрометрией или газовой хроматографии в совокупности с масс-

спектрометрией. Липиды, у которых изменение уровня (например, возрастание или уменьшение уровня основной массы или следов) коррелирует с болезненным состоянием, прогрессией или агрессивностью, идентифицируются как потенциальные эпигенетические переключатели.

Для идентификации эпигенетических переключателей в классе белков и РНК, устанавливаются профили экспрессии генов для совокупности клеток или тканей, которые показывают различные болезненные состояния, прогрессию или агрессивность. Профиль экспрессии для каждой клетки или ткани определяется по уровню(ям) мРНК или белка с использованием стандартных протеомических методов, анализа мРНК или генома, напр, подробно описанных в настоящем документе. Гены, у которых возрастание экспрессии (например, возрастание или уменьшение экспрессии мРНК или уровня белка) коррелирует с болезненным состоянием, прогрессией или агрессивностью, идентифицируются как потенциальные эпигенетические переключатели.

Когда молекулярные профили, описанные выше, установлены (например, для растворимых метаболитов, молекул с липидной основой, белков, РНК, или других биологических классов соединений), проводятся анализы клеточных и биохимических путей обмена, для выявления известных связей между идентифицированными потенциальными эпигенетическими переключателями в клеточной среде. Эта информация, полученная благодаря таким анализам клеточных и/или биохимических путей обмена, может быть использована для группирования путей обмена и потенциальных эпигенетических переключателей.

Полезность эпигенетического переключателя для модулирования болезненного состояния может быть в дальнейшем оценена и подтверждена специалистами с использованием любого из способов, известных специалистам в данной области или подробно описанных в настоящем документе. Полезность эпигенетического переключателя для модулирования болезненного состояния может быть оценена путем прямой экзогенной доставки эпигенетического переключателя в клетку или в организм. Полезность эпигенетического переключателя для модулирования болезненного состояния может быть альтернативно оценена путем разработки молекул, которые прямо модулируют эпигенетический переключатель (например, уровень или активность эпигенетического переключателя). Полезность эпигенетического переключателя для модулирования болезненного состояния может также быть оценена путем разработки молекул, которые непрямо модулируют эпигенетический переключатель (например, уровень или активность эпигенетического переключателя) путем регулирования других молекул, таких как гены (например, регулируя РНК или уровень белка), включенных в тот же путь синтеза, что и эпигенетический переключатель.

Эпигенетический подход, описанный здесь, способствует идентификации эндогенных молекул, которые существуют в клеточной среде и уровни которых чувствительны и контролируются генетически, мРНК, или основанными на белках механизмах. Обнаруженные в нормальных клетках регуляторные пути, которые запускаются эпигенетическими переключателями настоящего изобретения, могут предоставлять терапевтическую ценность в регулируемой или болезненной клеточной среде. Кроме того, эпигенетический подход, описанный здесь, идентифицирует эпигенетические переключатели, которые могут предоставлять диагностический индикатор для использования в клиническом отборе пациентов, в наборах для диагностики болезней или как прогностический индикатор.

В определенных вариантах воплощения, МВМ и эпигенетические переключатели, раскрытые здесь, включают те, которые обычно используются в качестве пищевых добавок. В определенных вариантах воплощения, эти МВМ и/или эпигенетические переключатели, раскрытые здесь, являются фармацевтической маркой. В определенных вариантах воплощения, МВМ и/или эпигенетические переключатели, имеющие фармацевтическую марку, имеют чистоту между около 95% и около 100% и включают все значения между 95 и 100%. В определенных вариантах воплощения, чистота МВМ и/или эпигенетических переключателей составляет 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100%. В определенных вариантах воплощения МВМ и/или эпигенетические переключатели свободны от эндотоксинов. В других вариантах воплощения МВМ и/или эпигенетические переключатели свободны от чужеродных белковых веществ. В определенных вариантах воплощения МВМ и/или эпигенетическим переключателем является CoQ10.

### III. Анализы, используемые для идентификации МВМ/эпигенетических переключателей.

Приемы и способы настоящего изобретения, предназначенные для выделения и идентификации представляющих интерес молекул и соединений, включают, не ограничиваясь: жидкостную хроматографию (ЖХ), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), масс-спектрометрию (МС), газовую хроматографию (ГХ), жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию (ЖХ-МС), газовую хроматографию/масс-спектрометрию (ГХ-МС), ядерный магнитный резонанс (ЯМР), магнитную резонансную томографию (МРТ), инфракрасную спектрометрию с преобразованием Фурье (ПФ-ИК), и масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС). Следует понимать, что техники масс-спектрометрии включают, не ограничиваясь, использование магнитных секторов и двухфокусных приборов, трансмиссионных квадрупольных приборов, квадрупольных приборов ионных ловушек, времяпролетных приборов (TOF), приборов ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FT-MS), и времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF MS).

Количественное определение уровней биоэнергетических молекул.

Факторы влияния (например, МВМ или эпигенетические переключатели) могут быть идентифицированы по изменениям в уровнях клеточных биоэнергетических молекул (например, АТФ, пирувата, АДФ,

НАДН, НАД, НАДФН, НАДФ, ацетилCoA, FADH<sub>2</sub>) в клетках, к которым применили возможный эпипереключатель. В типовых методах определения уровней биоэнергетических молекул используется колориметрия, флюоресценция и/или биолюминесцентные способы. Примеры таких способов приведены ниже.

Уровни АТФ внутри клетки могут быть оценены при помощи различных способов и систем, известных специалистам в данной области. Например, в одной системе цитоплазматическая АТФ, вышедшая из лизированных клеток, реагирует с люциферинем и ферментом люциферазой, выделяя свет. Эта биолюминесценция подсчитывается на биолуминометре, и таким образом можно подсчитать концентрацию внутриклеточной АТФ (набор для анализа АТФ EnzyLight™ (EATP-100), BioAssay Systems, Hayward, Калифорния). В другой системе, например, и АТФ, и ее дефосфорилированная форма, АДФ, подсчитываются с помощью биолюминесценции; после того как уровни АТФ подсчитаны, АДФ трансформируется в АТФ и затем определяется и подсчитывается с использованием той же люциферальной системы (набор для анализа отношения АДФ/АТФ ApoSENSOR™, BioVision Inc., Mountain View, Калифорния).

Пируват является важным промежуточным продуктом в клеточных путях обмена. Пируват может превращаться в углевод путем глюконеогенеза, превращаться в жирную кислоту или усваиваться при посредстве ацетил CoA, или превращаться в аланин или этанол, в зависимости от метаболического статуса клетки. Таким образом, определение уровней пирувата дает подсчет метаболической активности и статус клеточного образца. Один способ для определения пирувата, например, использует как колориметрию, так и флюорометрию для определения концентраций пирувата в различных диапазонах (набор для анализа пирувата EnzyChrom™ (Cat# EPYR-100), BioAssay Systems, Hayward, Калифорния).

Факторы влияния (например, MBM или эпипереключатели) могут влиять на процесс окислительного фосфорилирования, проходящий в митохондриях клеток, которые задействованы в образовании и поддержании биоэнергетических молекул в клетках. Кроме способов определения изменений в клеточной энергетике непосредственно в клеточных культурах и образцах (описанных выше), существуют способы, определяющие и подсчитывающие действия компонентов дискретных ферментов и комплексов митохондрий в клетках. Например, анализ полной активности OXPHOS MT-OXC MitoTox™ (MitoSciences Inc., Eugene, Орегон) может определять и подсчитывать действия соединений, примененных непосредственно к комплексам I-V, выделенным из митохондрий. Способы определения и подсчета действий индивидуальных митохондриальных комплексов, таких как НАДН дегидрогеназа (Комплекс I), цитохром с оксидаза (Комплекс IV) и АТФ синтаза (Комплекс V) также доступны (MitoSciences Inc., Eugene, Орегон).

Оценка клеточной энергетики.

Факторы влияния (например, MBM или эпипереключатели) могут также быть идентифицированы по изменениям в клеточной энергетике. Один пример оценки клеточной энергетики - оценка в реальном времени потребления молекулярного кислорода и/или изменений в pH среды клеточной культуры. Например, способность потенциального эпиперекключателя модулировать метаболический статус клетки может быть анализирована с использованием, например, XF24 Анализатора (Seahorse, Inc.). Эта технология позволяет в реальном времени определить изменение кислорода и pH в монослойных клетках для того, чтобы оценить биоэнергетику клеточной микросреды. XF24 Анализатор подсчитывает и сравнивает показатель потребления кислорода (OCR), который является оценкой аэробного метаболизма и внеклеточного окисления (ECAR), который является оценкой гликолиза, и оба служат индикаторами клеточной энергетики.

Оценка окислительного фосфорилирования и митохондриальной функции.

Окислительное фосфорилирование - это процесс, путем которого АТФ образуется при окислении питательных соединений, осуществляющийся у эукариот благодаря белковым комплексам, встроенным в мембраны митохондрий. Поскольку окислительное фосфорилирование является основным источником АТФ в клетках большинства организмов, изменения активности окислительного фосфорилирования могут сильно видоизменить метаболизм и энергетический баланс в клетке. В некоторых вариантах воплощения изобретения факторы влияния (например, MBM или эпиперекключатели) могут определяться и/или идентифицироваться благодаря своему действию на окислительное фосфорилирование. В некоторых вариантах воплощения факторы влияния (например, MBM или эпиперекключатели) могут определяться и/или идентифицироваться благодаря своему действию на специфические аспекты окислительного фосфорилирования, включая, не ограничиваясь, цепь транспорта электронов и синтез АТФ.

Встроенные в мембрану белковые комплексы митохондрий, которые осуществляют процессы, участвующие в окислительном фосфорилировании, выполняют специфические задачи и имеют номера I, II, III и IV. Эти комплексы, вместе с проходящей сквозь мембрану АТФ-синтазой (также известной как Комплекс V), являются ключевыми единицами, участвующими в процессах окислительного фосфорилирования. В дополнение к анализам, которые могут определить действия факторов влияния (например, MBM или эпиперекключателей) на функцию митохондрий в общем и процессы окислительного фосфорилирования в частности, существуют анализы, которые можно использовать для определения

действий эпи-переключателей на отдельный комплекс, выделенный из остальных комплексов.

Комплекс I, также известный как НАДН-коэнзим Q оксидоредуктаза или НАДХ дегидрогеназа, является первым белком в цепи транспорта электронов. В некоторых вариантах воплощения, можно провести определение и подсчет действия эпи-переключателя на образование НАД<sup>+</sup> Комплексом I. Например, комплекс может быть извлечен методом иммунного захвата из образца в 96-луночный планшет; окисление НАДН в НАД<sup>+</sup> происходит одновременно с восстановлением молекулы красителя, у которой коэффициент поглощения возрастает на 450 нМ (набор для микропланшетного анализа активности фермента комплекса I, MitoSciences Inc., Eugene, Орегон).

Комплекс IV, также известный как цитохром с оксидаза (ЦО), является последним белком в цепи транспорта электронов. В некоторых вариантах воплощения можно провести определение и подсчет действия эпи-переключателя на окисление цитохрома с и восстановление кислорода до воды Комплексом IV. Например, ЦО можно извлечь путем иммуносорбции в микролуночный планшет и оценить окисление ЦО с помощью колориметрического анализа (набор для микропланшетного анализа активности фермента комплекса IV, MitoSciences Inc., Eugene, Орегон).

Последним ферментом в процессе окислительного фосфорилирования является АТФ-синтаза (Комплекс V), которая использует протонный градиент, созданный другими комплексами, для синтеза АТФ из АДФ. В некоторых вариантах воплощения можно провести определение и подсчет действия эпи-переключателя на активность АТФ. Например, активность и количество АТФ-синтазы в образце также можно оценить по АТФ-синтазе, которую извлекают путем иммуносорбции в микролуночный планшет. Фермент при определенных условиях может функционировать также как АТФ-аза, таким образом в этом анализе активности АТФ-синтазы степень, в которой АТФ редуцируется до АДФ, оценивается по определению одновременного окисления НАДН до НАД<sup>+</sup>. Количество АТФ подсчитывается с использованием меченого антитела к АТФ-азе (набор для микропланшетного двойного анализа АТФ-синтазы (активность + количество), MitoSciences Inc., Eugene, Орегон). Дополнительные анализы окислительного фосфорилирования включают анализы, которые определяют действие на активность Комплексов II и III. Например, система полного OXPHOS MT-OXC MitoTox™ (MitoSciences Inc., Eugene, Орегон) может использоваться для оценки действия соединения на Комплексы II и III, а также Комплексы I, IV и V, для предоставления данных о действии соединения на всю систему окислительного фосфорилирования.

Как замечено выше, наблюдение в реальном времени образцов интактных клеток может быть проведено с использованием проб на изменение содержания кислорода и pH в клеточной культуральной среде. Эти анализы клеточной энергетики дают широкое представление о митохондриальной функции и действиях потенциальных факторов влияния (например, MBM или эпи-переключателей) на активность митохондрий в клетках образца.

Факторы влияния (например, MBM или эпи-переключатели) могут также действовать на митохондриальную проницаемость (MPT), явление, заключающееся в том, что проницаемость митохондриальных мембран возрастает вследствие образования митохондриальных проницаемых транзитных пор (MPTP). Возрастание митохондриальной проницаемости может приводить к разбуханию митохондрий, неспособности осуществлять окислительное фосфорилирование с образованием АТФ и к гибели клетки. MPT может участвовать в индукции апоптозов (см., например, Halestrap, A.P., Biochem. Soc. Trans. 34:232-237 (2006) и Lena, A. et al. JounPHK1 of Translational Med. 7:13-26 (2009), полное описание которого включено в настоящую заявку путем ссылки).

В некоторых вариантах воплощения осуществляются детекция и количественный подсчет действия фактора влияния (например, MBM или эпи-переключателя) на образование, прекращение и/или действие MPT и MPTP. Например, аналитические исследования могут определить MPT благодаря использованию специальных молекул красителя (кальцеина), локализующихся во внутренней мембране митохондрий и других клеточных структур. Использование другой молекулы, CoCl<sub>2</sub>, служит для подавления флюоресценции красителя кальцеина в цитозоле. CoCl<sub>2</sub>, однако, не может иметь доступ внутрь митохондрий, таким образом флюоресценция в митохондриях не подавляется, пока не появляется MPT и CoCl<sub>2</sub> не получает возможность попадать внутрь митохондрий благодаря MPTP. Потеря митохондриально-специфичного флюоресцентного сигнала говорит о наличии MPT. Проточная цитометрия может быть использована для оценки флюоресценции в клетках и органеллах (набор для анализа переходных пор MitoProbe™, Molecular Probes, Eugene, Орегон). В дополнительных анализах используется флюоресцентный микроскоп для оценки экспериментальных результатов (набор для анализа митохондриальных переходных пор Image-iT™ LIVE, Molecular Probes, Eugene, Орегон).

Измерение клеточной пролиферации и воспалительной реакции.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, факторы влияния (например, MBM или эпи-переключатели) могут быть идентифицированы и оценены по их действию на образование или активность молекул, связанных с клеточной пролиферацией и/или воспалительной реакции. Эти молекулы включают, не ограничиваясь, цитокины, факторы роста, гормоны, компоненты внеклеточного матрикса, хемокины, нейропептиды, нейротрансмиттеры, нейротрофины и другие молекулы, участвующие в



клеточном сигналинге, а также внутриклеточные молекулы, такие как те, которые участвуют в сигнальной трансдукции.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является фактором роста с потенциальными ангиогенными, васкулогенными и митогенными свойствами. VEGF стимулирует проницаемость и разбухание эндотелия, и действие VEGF связано с многочисленными болезнями и расстройствами, включая ревматоидные артриты, метастазирующий рак, возрастную дегенерацию макулы и диабетическую ретинопатию.

В некоторых вариантах воплощения изобретения фактор влияния (например, MBM или эпи-переключатель) может быть идентифицирован и охарактеризован по его действию на образование VEGF. Например, клетки, существующие в условиях гипоксии или имитации ацидоза будут показывать возрастание VEGF образования. VEGF, выделяемый в среду, может быть исследован с использованием ELISA или других основанных на антителах анализах, с использованием имеющихся в продаже анти-VEGF антител (R&D Systems, Minneapolis, Миннесота). В некоторых вариантах воплощения изобретения эпи-переключатель может быть идентифицирован и и/или описан на основе его действия(й) на реакцию клеток на VEGF и/или на основе его действия(й) на экспрессию или активность VEGF рецептора.

Фактор некроза опухолей (TNF), задействованный как в работе здоровой иммунной системы, так и при аутоиммунных болезнях, является ключевым медиатором при воспалении и активности иммунной системы. В некоторых вариантах воплощения изобретения эпи-переключатель может быть идентифицирован и характеризован по его влиянию на образование или активность TNF. Например, TNF, образующийся в культивируемых клетках и секретируемый в среду, может быть подсчитан с использованием иммуноферментного твердофазного анализа и других основанных на антителах способах, известных специалистам. Кроме того, в некоторых вариантах воплощения фактор влияния может быть идентифицирован и охарактеризован по его действию(ям) на экспрессию рецептора к (Human TNF RI DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, Миннесота).

Компоненты внеклеточного матрикса (ECM) играют роль как в структуре клеток и тканей, так и в процессах сигналинга. Например, латентный трансформирующий фактор роста бета связывается с белками, являющимися компонентами ECM, что создает резервуар трансформирующего фактора роста бета(TGFβ) внутри ECM. Матрикс-связывающий TGFβ может высвобождаться во время процессов трансформации матрикса и может влиять на действие фактора роста на близлежащие клетки (Dallas, S. Methods in Mol. Biol. 139:231-243 (2000)).

В некоторых вариантах воплощения фактор влияния (например, MBM или эпи-переключатель) может быть идентифицирован и охарактеризован по его действию на образование ECM в культивируемых клетках. У исследователей есть полноценные технологии, благодаря которым можно исследовать и количественно определить образование ECM в клетках, а также состав ECM. Например, синтез ECM в клетках можно оценить, внедряя клетки в гидрогель перед инкубацией. Биохимические и другие анализы проводились на ECM, образованном клетками после сбора клеток и расщепления в гидрогеле (Strehin, I. и Elisseeff, J. Methods in Mol. Bio. 522:349-362 (2009)).

В некоторых вариантах воплощения может быть идентифицировано или охарактеризовано действие фактора влияния (например, MBM или эпи-переключателя) на образование, наличие или отсутствие ECM или одного из его компонентов в организме. Разработаны техники для получения мышей с заданным нокаутом генов, которые позволяют нокаутировать определенные ECM гены только в отдельных типах клеток или на определенных стадиях развития (Brancaccio, M. et al. Methods in Mol Bio. 522:15-50 (2009)). Таким образом можно оценить действие применения или введения эпи-переключателя или потенциального эпи-переключателя на активность или отсутствие определенных ECM компонентов в определенных тканях на определенных стадиях развития.

Измерение целостности плазматической мембраны и гибели клеток.

Факторы влияния (например, MBM или эпи-переключатели) могут быть идентифицированы по изменениям целостности плазматической мембраны в клеточном образце и/или по изменениям числа или проницаемости клеток, которые подвержены апоптозам, некрозам или клеточным изменениям, которые демонстрируют повышенную или пониженную вероятность гибели клеток.

Анализ лактатдегидрогеназы (LDH) может дать оценку клеточного статуса и уровней повреждения. LDH является стабильным и сравнительно обильным цитоплазматическим ферментом. Когда плазматическая мембрана теряет физическую целостность, LDH выходит в межклеточное пространство. Более высокие концентрации LDH коррелируют с более высокими уровнями повреждения плазматической мембраны и гибели клеток. Примеры анализов LDH включают анализы, которые используют колориметрическую систему для определения и количественного подсчета уровней LDH в образце, а восстановленная форма тетраэоловой соли образуется при активности фермента LDH (набор лактатдегидрогеназы QuantiChrom™ (DLDH-100), BioAssay Systems, Hayward, Калифорния; набор определения цитотоксичности LDH, Clontech, Mountain View, Калифорния).

Апоптоз - это процесс программируемой гибели клеток, который может начинаться с множества

различных событий. Изменения скорости и/или числа клеток, которые подверглись апоптозам, можно определять с помощью различных анализов. Одним типом анализа, который используется для детекции и количественного определения апоптозов, является каспазный анализ. Каспазы - это цистеинпротеиназы, специфичные для аспаргиновой кислоты, которые активируются при протеолитическом расщеплении во время апоптоза. Примеры анализов, которые определяют активированные каспазы, включают аналитические системы PhiPhiLux® (Oncolmmunin, Inc., Gaithersburg, Мэриленд) и Caspase-Glo® 3/7 (Promega Corp., Madison, Висконсин). Дополнительные анализы, которые могут определить апоптозы и изменения процента или числа клеток, подвергшихся апоптозу в сравниваемых образцах, включают TUNEL/ДНК фрагментационные анализы. Эти анализы определяют от 180 до 200 пар оснований ДНК фрагментов, образовавшихся в ядре во время фазы апоптоза.

Примеры TUNEL/ДНК фрагментационных анализов включают набор для определения гибели клеток *in situ* (Roche Applied Science, Indianapolis, Индиана) и TUNEL колориметрические и флюорометрические системы DeadEnd™ (Promega Corp., Madison, Висконсин).

Некоторые апоптозные анализы детектируют и делают количественную оценку белков, связанных с апоптозами и/или неапоптозным состоянием. Например, мультиплексный анализ цитотоксичности MultiTox-Fluor (Promega Corp., Madison, Висконсин) использует один субстрат, флюоресцентную систему для детекции и подсчета протеаз, специфичных для живых и мертвых клеток, тем самым оценивая отношение живых клеток и клеток, подвергшихся апоптозу, в образце клеток или тканей.

В продаже имеются дополнительные способы детекции и количественной оценки апоптозов, которые включают анализы, определяющие клеточную проницаемость (например, анализ апоптоза APO-Percentage™, Biocolor, Великобритания) и анализы для Annexin V (например, набор для определения апоптоза Annexin V-Biotin, BioVision Inc., Mountain View, Калифорния).

#### IV. Лечение метаболических нарушений.

В некоторых воплощениях соединения настоящего изобретения, например, MBM или эпипереклюатели, описанные здесь, могут быть использованы для лечения поддающегося влиянию Коэнзима Q10 состояния у субъектов, нуждающихся в таком лечении. Выражение "поддающееся влиянию коэнзима Q10 состояние," или "поддающееся влиянию CoQ10 состояние," включает болезни, расстройства, состояния, которые можно лечить, предотвращать или иным образом облегчать путем введения коэнзима Q10. Не имея стремления ограничиваться какой-либо определенной теорией, и как будет в дальнейшем описано здесь, полагается, что функции CoQ10, по меньшей мере частично, состоят в вызове метаболического переключения в микроокружении клетки, таком как переключение в направлении типа и/или уровня окислительного фосфорилирования в клетках с нормальным состоянием. Соответственно, в некоторых вариантах воплощения изобретения поддающиеся влиянию CoQ10 состояния являются состояниями, которые возникают вследствие измененного метаболизма в клеточном микроокружении. В одном воплощении изобретения поддающееся влиянию CoQ10 состояние является метаболическим заболеванием. Поддающиеся влиянию коэнзима Q10 состояния включают, например, метаболические расстройства, такие как ожирение, диабет, преддиабетные состояния, метаболический синдром и эндокринные нарушения. Поддающиеся влиянию коэнзима Q10 состояния включают, кроме того, другие метаболические расстройства, описанные здесь.

В некоторых вариантах воплощения изобретения соединения настоящего изобретения, например, MBM или эпипереклюатели, описанные здесь, действуют подобно коэнзиму Q10. При использовании в настоящем документе фраза "действовать подобно коэнзиму Q10" означает способность соединения демонстрировать, по меньшей мере, частично такое же или подобное действие, как коэнзим Q10. В некоторых вариантах воплощения изобретения соединения настоящего изобретения демонстрируют 25% или более от действия коэнзима Q10. В некоторых вариантах воплощения изобретения соединения настоящего изобретения демонстрируют до 130% от действия коэнзима Q10. В некоторых вариантах воплощения изобретения, соединения настоящего изобретения демонстрируют около 30-130% действия коэнзима Q10. Следует понимать, что каждое значение, перечисленное в этом параграфе, можно модифицировать термином "около". Кроме того, следует понимать, что значение в любом диапазоне, который находится между любыми двумя величинами, перечисленными в этом параграфе, тем самым входит в настоящее изобретение. Например, в некоторых вариантах воплощения соединения настоящего изобретения демонстрируют действие коэнзима Q10 между около 50 и около 100%. В некоторых вариантах воплощения действием, которое подобно у коэнзима Q10 и соединений настоящего изобретения, является способность вызывать переключение клеточного метаболизма. В некоторых вариантах воплощения изобретения действие, которое подобно у CoQ10 и у соединений настоящего изобретения, оценивается по НРК (норма расхода кислорода, OCR) и/или НВКО (норма внеклеточного окисления, ECAR).

В настоящем изобретении представлены способы лечения, облегчения симптомов, предотвращения прогрессирования или профилактики поддающихся влиянию CoQ10 нарушений у млекопитающих, способ включает введение млекопитающему при соответствующей необходимости терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей, по меньшей мере, один фактор

влияния (фактор-в), где фактор влияния избирательно вызывает, в больных клетках млекопитающих, переключение клеточного энергетического метаболизма в направлении уровней гликолиза и митохондриального окислительного фосфорилирования, наблюдаемых в нормальных клетках млекопитающих при нормальных физиологических условиях.

В настоящем изобретении представлены также способы лечения, облегчения симптомов, предотвращения прогрессирования или профилактики метаболических нарушений у млекопитающих, включающие введение млекопитающему при соответствующей необходимости терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один фактор влияния (фактор-в), где фактор влияния избирательно вызывает, в больных клетках млекопитающих, переключение клеточного энергетического метаболизма в направлении нормализованного митохондриального окислительного фосфорилирования.

В настоящем изобретении предоставлены также способы для избирательного усиления митохондриального окислительного фосфорилирования в больных клетках млекопитающих, нуждающихся в лечении метаболического нарушения, метод включает введение вышеупомянутым млекопитающим терапевтически эффективного количества фармацевтического состава, содержащего по крайней мере один фактор влияния, тем самым избирательно усиливая митохондриальное окислительное фосфорилирование в вышеупомянутых больных клетках млекопитающих.

В настоящем изобретении предоставлены также способы лечения или предотвращения метаболического нарушения у человека, включая введение фактора влияния человеку в количестве, достаточном для лечения или предотвращения метаболического нарушения, тем самым леча или предотвращая метаболическое нарушение.

В настоящем изобретении предоставлены также способы лечения или предотвращения метаболического нарушения у людей, включающие выявление людей, подверженных метаболическому заболеванию, и введение вышеупомянутым людям терапевтически эффективного количества фактора-в, способного блокировать анаэробное использование глюкозы и усилить митохондриальное окислительное фосфорилирование, тем самым леча или предотвращая метаболическое нарушение.

Настоящее изобретение предоставляет также способ для лечения или предотвращения метаболического нарушения у человека, включая введение фактора влияния (фактора-в) человеку в количестве, достаточном для лечения или предотвращения метаболического нарушения, где фактор влияния (фактор-в) вводится таким образом, что он сохраняется в окисленной форме в течение лечения, тем самым леча или предотвращая метаболическое нарушение.

"Метаболическое нарушение" означает любое паталогическое состояние, являющееся результатом изменения в метаболизме пациента. Такие нарушения включают нарушения, связанные с аберрантными общей глюкозой, жировым и/или белковым метаболизмом и их паталогическими последствиями. Метаболические нарушения включают нарушения, являющиеся результатом изменений в гомеостазе глюкозы, приводящим, например, к гипергликемии. В соответствии с этим изобретением, изменение в уровнях глюкозы обычно является возрастанием уровней глюкозы по крайней мере на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или даже 100% по сравнению с такими уровнями у здоровых пациентов. Метаболические нарушения могут пагубно действовать на клеточные функции, такие как клеточная пролиферация, рост, дифференцировка или миграция, клеточная регуляция гомеостаза, меж- или внутриклеточная коммуникация; тканевая функция, такая как функция печени, мышечная функция, или функция адипоцитов; системные реакции в организме, такие как гормональные реакции (например, инсулиновый ответ). Метаболические нарушения включают, не ограничиваясь, ожирение, диабет (также называемый здесь сахарным диабетом) (например, диабет типа I, диабет типа II, MODY, и гестационный диабет), преддиабет, метаболический синдром, нарушение механизмов насыщения и эндокринные нарушения, например, при старении. Дальнейшие примеры метаболических нарушений включают, не ограничиваясь, гиперфагию, гипофагию, болезнь депонирования триглицерида, синдром Барде-Бидля, синдром Лоренса-Муна, синдром Прадера-Лабхарта-Вилли, синдром Кирнса-Сейра, анорексия, отсутствие средней цепи ацил-СоА дегидрогеназы и кахексия. В некоторых воплощениях изобретения метаболическое нарушение является состоянием, поддающимся влиянию Coenzyme Q10.

"Лечение, уменьшение или предотвращение метаболического нарушения" означает улучшение такого состояния до или после его появления. По сравнению с эквивалентным контролем, не подвергавшимся лечению, такое уменьшение или степень предотвращения составляет по крайней мере 5, 10, 20, 40, 50, 60, 80, 90, 95 или 100% при подсчете по любому стандартному методу. Сахарный диабет является гетерогенной группой метаболических болезней, которая приводит к хроническому повышению глюкозы в крови (гипергликемия). Диабет характеризуется разрушением панкреатических островков или дисфункцией, приводящей к потере регуляции глюкозы. Двумя основными типами сахарного диабета являются тип I, также известный как "инсулин-зависимый диабет" ("ИЗД") или "юношеский диабет", и тип II, также известный как "инсулин-независимый" ("ИНЗД") или "диабет зрелого возраста".

"Диабетом типа I" называется состояние, которое появляется в результате аутоиммунно-опосредованного разрушения панкреатических бета-клеток с последующим уменьшением образования инсулина, что приводит к гипергликемии. Диабет типа I требует инсулинзаместительной терапии для

обеспечения выживания. Хотя медикаменты, такие как инъеклируемый инсулин и оральные гипогликемики, позволяют диабетикам жить дольше, диабет остается третьим главным убийцей, после болезней сердца и рака. Однако эти медикаменты не контролируют уровни сахара в крови достаточно, чтобы предотвратить колебания между высоким и низким уровнями сахара в крови, что в результате повреждает почки, глаза и кровяные сосуды. Данные Исследования по контролю диабета и его осложнений (DCCT) показывают, что интенсивный контроль глюкозы в крови достоверно замедляет осложнения диабета, такие как ретинопатию, нефропатию и нейропатию, по сравнению с конвенциональной терапией, состоящей из одной или двух инъекций инсулина в день. Интенсивная терапия в DCCT включала многократные инъекции инсулина три или более раз в день или непрерывающееся подкожное введение инсулина (НПВИ) при помощи внешней помпы. Инсулиновые помпы являются одним из множества альтернативных вариантов для подкожных многократных ежедневных инъекций, для приближенной физиологической замены инсулина.

"Диабетом типа 2" называется состояние, при котором у пациента концентрация глюкозы в крови натощак или в сыворотке больше чем 125 мг/дл (6,94 ммоль/л). Диабет типа II характеризуется гиперглициемией в присутствии уровней инсулина в плазме выше нормы (гиперинсулинемия), представляет собой около 90% всех случаев диабета и встречается чаще всего у взрослых людей старше 40 лет с лишним весом. Развитие диабета типа II связано с повышенными концентрациями глюкозы в крови, в совокупности с соответствующим уменьшением уровня глюкозо-индуцированной секреции инсулина. Считается, что при диабете типа II тканевые процессы с контролируемым углеводным метаболизмом теряют чувствительность к инсулину и, следовательно, имеет место не недостаток образования инсулина, а пониженная чувствительность к возросшим уровням глюкозы в крови и неспособность реагировать на образование инсулина. Альтернативно, диабет может быть результатом различных дефектов в молекулярном механизме, который опосредует действие инсулина на клетки-мишени, таких как недостаток рецепторов к инсулину на поверхностях этих клеток. Следовательно, лечение диабета типа II зачастую не требует введения инсулина, но может быть основано на изменении диеты и образа жизни, в сочетании с терапией оральными гипогликемическими агентами, такими как, например, сульфонилмочевина.

Преддиабетом называется состояние, когда пациент предрасположен к развитию диабета типа 2. Преддиабет распространяется на определение ухудшенной переносимости глюкозы, включая пациентов с глюкозой в крови натощак в пределах верхней границы нормы 100 мг/дл (Meigs et al., Diabetes 2003 52:1475-1484) и гиперинсулинемией натощак (повышенной концентрацией инсулина в плазме).

"Ожирением" называется состояние, когда у пациента ИМТ эквивалентно или выше чем 30 кг/м. "Ожирением внутренних органов" называется соотношение объема талии к объему бедер более 1,0 у пациентов мужского пола и более 0,8 у пациентов женского пола. В другом аспекте ожирение внутренних органов определяет риск резистентности к инсулину и развития преддиабета.

"Повышенный вес" относится к пациентам с ИМТ более 25 кг/м<sup>2</sup> и менее 30 кг/м<sup>2</sup>. "Прибавление веса" относится к увеличению веса тела в связи с поведенческими привычками или зависимостями, например, перееданием или обжорством, прекращением курения или в связи с биологическими изменениями (в течение жизни), например, прибавление веса, связанное со старением у мужчин и менопаузой у женщин или набор веса после беременности.

"Метаболический синдром" (МС), также называемый Синдром X, относится к метаболическому расстройству, которое действует на другие пути метаболизма и системы в теле. Первоначально метаболический синдром определялся как группа метаболических нарушений (включая ожирение, резистентность к инсулину, гипертензию и дислипидемию, в первую очередь гипертриглицеридемию), которые совместно усиливают риск сердечнососудистых нарушений. Позднее (2001) национальная обучающая программа США по холестерину (NCEP) классифицировала "Метаболический синдром" как соответствующий следующим пяти критериям: уровень глюкозы натощак не менее 110 мг/дл, уровень триглицерида в плазме не менее 150 мг/дл (гипертриглицеридемия), ЛПВП-холестерин менее 40 мг/дл у мужчин или менее 50 мг/дл у женщин, кровяное давление не менее 130/85 мм Hg (гипертензия), и центральное ожирение, определяемое как обхват талии более чем 40 дюймов у мужчин и более чем 35 дюймов у женщин. В настоящее время существуют следующие три других международно признанных определения метаболического синдрома: 1) Всемирной организации здравоохранения 2) Американской кардиологической ассоциации /Национального института болезней сердца, легких и крови (АНА/NHLBI) и 3) Международной федерации диабета (IDF). Определения метаболического синдрома, данные ВОЗ, АНА/NHLBI и IDF, очень похожи на определение NCEP, и во всех для определения синдрома используются одинаковые метаболические параметры, но ВОЗ также включает оценку инсулина по уровням инсулина натощак (Moebus S et al, Cardiovascular Diabetology, 6: 1-10, 2007; Athyros V G et al, Int. J. Cardiology, 117: 204-210, 2007). Но даже значительные различия в пороговых значениях этих метаболических параметров между этими различными определениями, по которым классифицируется наличие метаболического синдрома, могут приводить к различной классификации определенного пациента как имеющего или не имеющего синдром в соответствии с этими различными определениями. Кроме того, распространенность сердечно-сосудистых нарушений (ССЗ) с МС различается в зависимости

сти от используемого определения (Moebs S et al, Cardiovascular Diabetology, 6: 1-10, 2007; Athyros V G et al, Int. J. Cardiology, 117: 204-210, 2007). По оценке Американской ассоциации диабета каждый пятый человек, имеющий лишний вес, страдает от метаболического синдрома.

В других аспектах метаболический синдром описывается по общепринятым симптомам, которые включают, не ограничиваясь, синдром X, синдром резистентности к инсулину, инсулин-резистентную гипертензию, метаболический гипертензивный синдром, дисметаболический синдром. Компоненты метаболического синдрома включают, не ограничиваясь, нарушение толерантности к глюкозе, нарушение концентрации глюкозы в сыворотке натощак, нарушение концентрации глюкозы в крови натощак, гиперинсулинемию, преддиабет, ожирение, ожирение внутренних органов, гипертриглицеридемию, повышенные концентрации в сыворотке свободных жирных кислот, повышенные концентрации в сыворотке С-реактивного белка, повышенные концентрации в сыворотке липопротеина, повышенные концентрации в сыворотке гомоцистеина, повышенные концентрации в сыворотке малых липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в комплексе с холестерином, повышенные концентрации в сыворотке липопротеин-ассоциированной фосфолипазы (A2), пониженные концентрации в сыворотке липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в комплексе с холестерином, пониженные концентрации в сыворотке ЛПВП (2b)-холестерина, пониженные концентрации в сыворотке адипонектина, и альбуминурия (см: Pershadsingh HA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: therapeutic target for diseases beyond diabetes: quo vadis? Expert Opin Investig Drugs. (2004) 13:215-28, и ссылки, цитируемые здесь).

"Ключевые элементы" вышеупомянутых метаболических нарушений включают, не ограничиваясь, нарушенную гликемию натощак или нарушение толерантности к глюкозе, увеличенный объем талии, повышенное содержание внутреннего жира, повышенную глюкозу в плазме натощак, повышенные триглицериды в плазме натощак, пониженный уровень липопротеинов высокой плотности в плазме натощак, повышенное кровяное давление, резистентность к инсулину, гиперинсулинемию, сердечно-сосудистую болезнь (или ее компоненты, такие как атеросклероз, болезнь коронарных артерий, болезнь периферических сосудов, или цереброваскулярная болезнь), застойная сердечная недостаточность, повышенный норэпинефрин в плазме, повышенный уровень факторов воспаления, связанных с сердечно-сосудистой системой, повышенный уровень в плазме факторов, усиливающих дисфункцию сосудистого эндотелия, гиперлипидемию, атеросклероз или атеросклероз, гиперфагия, гипергликемия, гиперлипидемия, и гипертензия или повышенное кровяное давление, повышенные уровни в плазме после еды триглицерида или свободных жирных кислот, повышенный клеточный окислительный стресс или его маркеры в плазме, повышенный гиперкоагулятивный статус кровеносной системы, жировой гепатоз, болезнь почек, включая почечную недостаточность.

"Резистентность к инсулину" называется состояние, при котором для поддержания эугликемического статуса требуются уровни инсулина в системе кровообращения, превышающие нормальную реакцию на поступление глюкозы (Ford et al., JAMA. 2002, 287:356-9). Резистентность к инсулину и реакция на терапию пациента с резистентностью к инсулину могут быть измерены путем модели оценки гомеостаза, оценивающей степень резистентности к инсулину, (HOMA-IR), что является достоверным показателем резистентности к инсулину (Katsuki et al., Diabetes Care 2001, 24:362-5). Оценка резистентности к инсулину по модели оценки гомеостаза (HOMA)-IR может быть подсчитана по формуле, раскрытой у Galvin et al., Diabet Med 1992, 9:921-8, где  $HOMA-IR = \frac{\text{инсулин в сыворотке натощак (мкЕД/мл)} \times \text{время [глюкоза в плазме натощак (ммоль/л)]}}{22.5}$ .

"Гиперинсулинемия" определяется как состояние, при котором у пациента с резистентностью к инсулину, имеющего или не имеющего эугликемию, концентрации инсулина в плазме или сыворотке натощак или после еды превышают концентрации у нормальных, не полных индивидуумов без резистентности к инсулину, имеющих соотношение талии к бедрам  $<1.0$  (для мужчин) или  $<0.8$  (для женщин).

Термин "нарушение толерантности к глюкозе" (IGT) используется для описания человека, у которого при проведении теста на толерантность к глюкозе уровень глюкозы в крови находится между нормой и гипергликемией. У такого человека выше риск развития диабета, хотя не считается, что у него есть диабет. Например, нарушенной толерантностью к глюкозе называется состояние, при котором у пациента концентрация глюкозы в крови натощак или концентрация глюкозы в сыворотке натощак выше, чем 110 мг/дл и меньше чем 126 мг/дл (7.00 ммоль/л), или концентрация глюкозы в крови через 2 ч после еды или глюкозы в сыворотке выше чем 140 мг/дл (7.78 ммоль/л) и меньше чем 200 мг/дл (11.11 ммоль/л).

Состояние "гипергликемии" (высокого сахара в крови) является состоянием, при котором уровень глюкозы в крови слишком высокий. Обычно гипергликемия появляется, когда уровень глюкозы в крови превышает 180 мг/дл. Симптомы гипергликемии включают частое мочеиспускание, чрезмерную жажду и, через продолжительное время, потерю веса.

Состояние "гипогликемии" (низкого сахара в крови) является состоянием, при котором уровень глюкозы в крови слишком низкий. Обычно гипогликемия появляется, когда уровень глюкозы в крови падает ниже 70 мг/дл. Симптомы гипогликемии включают резкие смены настроения, онемение конечностей (особенно в кистях и предплечьях), помрачение сознания, дрожь или головокружение. Посколь-

ку это состояние возникает, когда инсулин превышает количество доступной глюкозы, иногда его называют инсулиновой реакцией.

(i) Диагностика метаболических нарушений.

Методы и составы настоящего изобретения полезны для лечения пациентов, у которых диагностировано метаболическое нарушение, такое как диабет, или имеется риск его развития. Пациент, у которого предотвращается развитие метаболического нарушения (например, диабета или ожирения), может иметь такой диагноз или не иметь его. Специалист поймет, что пациенты изобретения могут быть субъектами стандартных анализов или могут быть идентифицированы, без исследования, как субъекты с повышенным риском вследствие наличия одного или более факторов риска.

Диагноз метаболического нарушения может быть поставлен с использованием любого стандартного метода, известного специалистом, такого как описанные здесь. Методы диагностики диабета, описанные, например, в патенте США № 6,537,806, включены сюда в качестве ссылки. Диабет может быть диагностирован и может наблюдаться с использованием, например, анализа мочи, в котором измеряются уровни глюкозы и кетона (продукта расщепления жиров); анализов, которые измеряют уровни глюкозы в крови; анализы толерантности к глюкозе; и анализы, которые определяют характерные для метаболического нарушения молекулярные маркеры в биологическом образце (напр, крови, сыворотке или моче), собранных у млекопитающих (напр, количественная оценка уровней гемоглобина Alc (HbAlc) в случае диабета).

Пациентом, у которого лечится метаболическое нарушение, является тот, у кого практикующий врач диагностировал наличие такого состояния. Диагноз может быть поставлен при помощи любых подходящих методов, таких как описанные здесь. Пациент, у которого предотвращается развитие диабета или ожирения, может получить или не получить такой диагноз. Специалист поймет, что пациенты изобретения могут быть подвергнуты стандартным анализам или же могут быть идентифицированы без обследования как имеющие высокий риск вследствие присутствия одного или более факторов риска, таких как семейный анамнез, ожирение, особая этническая принадлежность (например, афроамериканцы и испано-американцы), гестационный диабет или вынашивание ребенка, который весит более девяти фунтов, гипертензия, наличие паталогического состояния, предшествующего ожирению или диабету, высокие уровни в крови триглицеридов, высокие уровни в крови холестерина, наличие молекулярных маркеров (напр, наличие аутоантител), и возраст (более 45 лет). Считается, что у пациентов есть ожирение, если их вес на 20% (25% у женщин) или более превышает максимальный вес, желательный для их роста. Взрослые, у которых лишний вес превышает 100 фунтов, считаются имеющими болезненное ожирение. Ожирение также определяется как индекс массы тела (ИМТ), превышающий 30 кг/м.

У пациентов может диагностироваться риск развития диабета или диабет, если случайный анализ глюкозы в плазме (проводимый в любое время дня) показывает значение 200 мг/дл или более, если анализ глюкозы в плазме натощак показывает значение 126 мг/дл или более (после 8 ч), или если оральный тест толерантности к глюкозе (OGTT) показывает значение глюкозы в плазме 200 мг/дл или более в образце крови, взятом через два часа после того, как пациент примет напиток, содержащий 75 грамм глюкозы, растворенной в воде. OGTT измеряет глюкозу в плазме во временные интервалы после 3-часового периода. Желательно, чтобы уровень глюкозы в плазме у пациентов с диабетом, подвергаемых лечению в соответствии с изобретением, находился между 160 и 60 мг/дл, между 150 и 70 мг/дл, между 140 и 70 мг/дл, между 135 и 80 мг/дл и предпочтительно между 120 и 80 мг/дл.

Необязательно, можно применить тест на гемоглобин Alc (HbAlc), который оценивает средние уровни глюкозы в крови в течение периода двух и трех месяцев. У человека, не имеющего диабета, значение HbAlc обычно находится между 4 и 6%. Для каждого 1%, на который возрастает HbAlc, уровень глюкозы в крови возрастает примерно на 30 мг/дл и возрастает риск осложнений. Предпочтительно, значение HbAlc у пациента, подвергаемого лечению в соответствии с настоящим изобретением, уменьшается до значения менее чем 9%, менее чем 7%, менее чем 6%, и наиболее предпочтительно до около 5%. Таким образом уровни HbAlc пациента, подвергаемого лечению, предпочтительно уменьшаются на 10, 20, 30, 40, 50% или более по сравнению с уровнями до лечения.

Гестационный диабет обычно диагностируется на основе значений глюкозы в плазме, подсчитанных во время OGTT. Поскольку уровни глюкозы в во время беременности в норме ниже, пороговые значения для диагностики диабета во время беременности ниже, чем у того же человека перед беременностью. Если у женщины имеются два показателя глюкозы в плазме, которые соответствуют или превышают любое из следующих значений, у нее есть гестационный диабет: уровень глюкозы в плазме натощак 95 мг/дл, 1-часовой уровень 180 мг/дл, 2-часовой уровень 155 мг/дл или 3-часовой уровень 140 мг/дл.

Для диагностики диабета типа I может также быть проведен анализ на кетоны. Поскольку кетоны образуются в крови при нехватке инсулина, они в итоге накапливаются в моче. Высокие уровни кетонов в крови могут приводить к серьезному состоянию, называемому кетоацидозом.

В соответствии с рекомендациями Американской ассоциации диабета для диагностики диабета типа 2 у пациента должен быть уровень глюкозы в плазме натощак, превышающий или равный 126 мг/дл или в 2-часовом оральном тесте на толерантность к глюкозе (OGTT) значение глюкозы в плазме

превышающее или равное 200 мг/дл (Diabetes Care, 26:S5-S20, 2003).

Родственное состояние, называемое преддиабетом, определяется как наличие уровня глюкозы натощак выше чем 100 мг/дл, но менее чем 126 мг/дл или уровня 2-часовой OGTT глюкозы в плазме выше чем 140 мг/дл, но менее чем 200 мг/дл. Растущее количество данных подтверждает, что состояние преддиабета может быть фактором риска для развития сердечно-сосудистой болезни (Diabetes Care 26:2910-2914, 2003). Преддиабет, также называемый нарушенной толерантностью к глюкозе или нарушенной гликемией натощак является основным фактором риска для развития сахарного диабета типа 2, сердечнососудистой болезни и смертности. Основное внимание уделяется разработке терапевтических вмешательств, которые предотвращают развитие диабета типа 2. (Pharmacotherapy, 24:362-71, 2004).

Ожирение (обычно определяемое как Индекс Массы Тела приблизительно  $>30 \text{ кг/м}^2$ ) часто связывается с различными патологическими состояниями, такими как гиперинсулинемия, резистентность к инсулину, диабет, гипертензия и дислипидемия. Каждое из таких состояний вносит свой вклад в риск развития сердечно-сосудистой болезни.

Наряду с резистентностью к инсулину, гипертензией и дислипидемией ожирение рассматривается как часть Метаболического Синдрома (также известного как Синдром X), которые в совокупности увеличивают вероятность сердечно-сосудистой болезни. В последнее время национальная обучающая программа США по холестерину классифицирует Метаболический Синдром как соответствующий трем из следующих пяти критериев: уровень глюкозы натощак не менее 110 мг/дл, уровень триглицерида в плазме не менее 150 мг/дл (гипертриглицеридеми), ЛПВП-холестерин ниже 40 мг/дл у мужчин или ниже 50 мг/дл у женщин, давление крови не менее 130/85 мм рт ст (гипертензия), и центральное ожирение, где центральное ожирение определяется при окружности талии более чем 40 дюймов у мужчин и более чем 35 дюймов у женщин.

(ii) Оценка эффективности лечения метаболического нарушения.

Специалист поймет, что любой из вышеупомянутых анализов или любой другой анализ, известный специалистам, может быть использован для мониторинга эффективности терапевтического лечения изобретения. Поскольку измерение уровней гемоглобина Alc (HbAlc) является показателем средней глюкозы в крови в течение последующих двух-трех месяцев, этот анализ может быть использован для мониторинга реакции пациента на лечение диабета.

Терапевтические способы изобретения эффективны в снижении уровней глюкозы или уровней липидов у пациента. Под "снижением уровней глюкозы" подразумевается уменьшение уровня глюкозы по крайней мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 100% по сравнению с не подвергавшимся воздействию контролем. Желательными являются уровни глюкозы, сниженные до уровней нормогликемии, т.е. между 150 и 60 мг/дл, между 140 и 70 мг/дл, между 130 и 70 мг/дл, между 125 и 80 мг/дл, а также между 120 и 80 мг/дл. Такое снижение уровней глюкозы может быть получено при повышении любой биологической активности, связанной с клиренсом глюкозы из крови. Соответственно, агент, обладающий способностью уменьшать уровни глюкозы, может повышать образование, секрецию или действие инсулина. Действие инсулина может быть повышено, например, путем повышения поглощения глюкозы периферийными тканями и/или путем редукции образования глюкозы печенью. Альтернативно агент изобретения может уменьшать абсорбцию углеводов в кишечнике, изменяя активность транспортера глюкозы (например, путем увеличения экспрессии GLUT4, собственной активности или транслокации), увеличивать количество чувствительной к инсулину ткани (например, увеличивая дифференцировку мышечных клеток или адипоцитов), или изменяя транскрипцию генов в адипоцитах или мышечных клетках (например, изменяя секрецию факторов адипоцитами при экспрессии генов метаболического пути). Желательно, чтобы агент изобретения повышал более чем одну из активностей, связанных с клиренсом глюкозы. Под "уменьшением уровней липидов" подразумевается уменьшение уровней липидов по крайней мере на 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 100% по сравнению с необработанным контролем.

Под "изменением пути сигналинга инсулина, при котором уменьшаются уровни глюкозы" подразумевается изменение (путем повышения или уменьшения) любой из активностей, включенных в сигналинг инсулина, таким образом, что общим результатом будет повышение клиренса глюкозы из плазмы. Например, фактор-в изобретения изменяет путь сигналинга инсулина, приводя к возрастанию образования, секреции или действия инсулина, повышению потребления глюкозы периферийными тканями, уменьшению образования глюкозы печенью или к уменьшению абсорбции углеводов из кишечника.

Способность фактора влияния, например, эпи-переключателя, уменьшать уровни глюкозы и тем самым лечить метаболическое нарушение, может оцениваться с использованием стандартных анализов, известных специалистам. Например, может использоваться основанный на клетках скрининговый анализ, который идентифицирует агенты, увеличивающие потребление глюкозы. В частности, различные адипоциты в клеточной культуре могут использоваться для исследования способности эпи-переключателя увеличивать потребление глюкозы после инсулиновой стимуляции, что определяется при помощи глюкозы с радиоактивной меткой. В другом типовом анализе человеческие миобласты, полученные путем иммортализации клеток, извлеченных из субъектов, не имеющих диабета, могут

использоваться для исследования действия агентов на синтез гликогена, с использованием инсулина как позитивного контроля. Перед воздействием клетки помещаются в бессыворотную среду и затем инкубируются или с эпи-переключателем, или с контролем в течение двух часов в бессыворотной среде, содержащей глюкозу с радиоактивной меткой, после чего делается количественный подсчет синтеза гликогена. Примерные анализы в дальнейшем описываются в примерах.

#### V. Терапевтические мишени при метаболических заболеваниях.

В настоящем изобретении представлены способы идентификации терапевтических мишеней при метаболических заболеваниях. В изобретении также представлены терапевтические мишени, идентифицированные такими способами. Идентификация терапевтической цели включает, в общем, экзогенное применение фактора-В или возможного фактора-В на клетку или группу клеточных линий, и последующую оценку изменений, вызванных в подвергшейся воздействию клетке по сравнению с контрольной клеткой, не подвергавшейся воздействию. Вызванные клеточные изменения, которые прослеживаются, включают, не ограничиваясь, изменения морфологии, физиологии или состава, например, уровня РНК, белков, жиров или метаболитов, в клетке. Вызванные клеточные изменения как результат воздействия возможного фактора-В можно проследить с использованием любого из анализов, описанных в настоящем документе. Например, изменения экспрессии генов по уровню мРНК можно оценить по методу ПЦР в режиме реального времени, в котором изменения в экспрессии генов, влияющие на уровень белка, можно проследить с использованием антительных микропанелей и 2-D гель-электрофореза. Гены, идентифицированные как модулированные возможным фактором-В (например, по мРНК и/или уровню белка) затем оценивались по перспективе системной биологии с использованием анализа метаболизма (программа Ingenuity IPA) и при изучении известной литературы. Гены, идентифицированные как потенциальные терапевтические мишени, затем проходили подтверждающий анализ, такой как иммуноблоттинг, нокаут мРНК или рекомбинантные методы, основанные на выработке и характеристике белка. Затем для идентификации модуляторов мишеней можно использовать скрининговые анализы. Модуляторы терапевтических мишеней полезны как новые терапевтические агенты для метаболических нарушений. Модуляторы терапевтических мишеней можно обычным образом идентифицировать с использованием скрининговых анализов, детально описанных в настоящем документе, или с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области техники.

Гены, идентифицированные здесь как модулированные (например, повышающе или понижающе модулированные, на уровне мРНК или белка) посредством MBM/эпи-переключателя, CoQ10, являются мишенями для лекарства изобретения. Мишени для лекарства изобретения включают, не ограничиваясь, гены, перечисленные здесь ниже в таблицах 2-4 и 6-28 и 63-68. Основанные на результатах экспериментов, описанных здесь в приложениях, ключевые белки, модулированные Q10, связаны с или могут быть классифицированы по различным путям обмена или группам молекул, включая факторы транскрипции, апоптозный ответ, пентозофосфатный путь, путь биосинтеза, окислительный стресс (про-оксиданты), мембранные перестройки и метаболизм окислительного фосфорилирования. На основании полученных здесь результатов ключевыми белками, модулируемыми CoQ10, являются следующие. Ключевой белок, модулируемый CoQ10 и являющийся транскрипционным фактором, HNF4альфа. Ключевые белки, модулируемые CoQ10 и связанные с апоптозным ответом, включают Bcl-xl, Bcl-xl, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, и cMyc. Ключевой белок, модулируемый CoQ10 и связанный с пентозофосфатным путем, является трансальдозазой 1. Ключевые белки, модулируемые CoQ10 и связанные с путями биосинтеза, включают COQ1, COQ3, COQ6, пренилтрансферазу и 4-гидроксibenzoат. Ключевые белки, модулируемые CoQ10 и связанные с окислительным стрессом (про-оксиданты) включают цитозольный фактор нейтрофилов 2, синтазу оксида азота 2A и супероксиддисмутазу 2 (митохондриальную). Ключевые белки, модулируемые CoQ10 и связанные с метаболизмом окислительного фосфорилирования, включают Цитохром с, комплекс I, комплекс II, комплекс III и комплекс IV. Другие ключевые белки, которые прямо или опосредованно модулируются CoQ10, включают Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C и Cam Киназу II.

Соответственно, в одном варианте воплощения изобретения, мишени лекарственного средства могут включать HNF4-альфа, Bcl-xl, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11 (Bim), XIAP, BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, трансальдозазу 1, COQ1, COQ3, COQ6, пренилтрансферазу, 4-гидроbenzoат, цитозольный фактор нейтрофилов 2, синтазу оксида азота 2A и супероксиддисмутазу 2, VDAC, Bax канал, ANT, Цитохром с, комплекс I, комплекс II, комплекс III, комплекс IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C и Cam Киназу II. В предпочитаемых вариантах воплощения, мишени лекарственного средства могут включать HNF4A, трансальдозазу, NM23 и BSCv. В одном варианте воплощения мишенью лекарственного средства является TNF4A. В одном варианте воплощения мишенью лекарственного средства является трансальдозаза. В одном варианте воплощения мишенью лекарственного средства является NM23. В одном варианте воплощения мишенью лекарственного средства является BSCv. Скринирующие анализы, полезные для идентификации модуляторов или идентификации мишеней лекарственных средств, описаны ниже.

#### VI. Скрининговые анализы.

В настоящем изобретении также представлены способы (также называемые здесь "скрининговые



анализы") идентификации модуляторов, т.е., кандидатов или тестируемых соединений или агентов (например, белков, пептидов, пептидомиметиков, пептоидов, маленьких молекул или других веществ), которые модулируют экспрессию и/или активность идентифицированной терапевтической мишени изобретения. Такие анализы обычно включают в себя реакцию между терапевтической мишенью изобретения и одним или более исследуемым соединением. Другие соединения сами могут быть или тестируемыми соединениями, или комбинацией тестируемых компонентов и веществ, естественно связывающихся с маркером изобретения. Соединения, идентифицированные посредством анализов, таких как описанные здесь, могут быть полезны, например, для лечения или профилактики метаболического нарушения.

Исследуемые соединения, используемые в скрининговых анализах настоящего изобретения, могут быть получены из любого доступного источника, включая систематические библиотеки природных и/или синтетических соединений. Исследуемые соединения также могут быть получены путем любого из многочисленных подходов в комбинированных библиотечных способах, известных специалистам, включая: биологические библиотеки; пептоидные библиотеки (библиотеки молекул, имеющих функциональность пептидов, но с новым, не пептидным каркасом, устойчивым к ферментному расщеплению, но тем не менее остающимся биоактивным; см, например, Zuckermann et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678-85); территориально доступные параллельные библиотеки твердой фазы или растворимой фазы; синтетические библиотечные способы, требующие деконволюции; библиотечные способы; и синтетические библиотечные способы, использующие аффинную хроматографию. Подходы биологической библиотеки и пептоидной библиотеки ограничены пептидными библиотеками, в то время как другие четыре подхода пригодны для библиотек пептидов, непептидных олигомеров или низкомолекулярных соединений (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Примеры способов для синтеза молекулярных библиотек можно найти в специальной литературе: DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann et al. (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho et al. (1993) *Science* 261:1303; Carrell et al. (1994) *Angew.*

*Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; и in Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

Библиотеки соединений могут быть представлены в растворах (например, Houghten, 1992, *Bio-techniques* 13:412-421), или в частицах (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), чипах (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), бактериях и/или спорах, (Ladner, USP 5,223,409), плазмидях (Cull et al, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) или фагах (Scott и Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla et al, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382; Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310; Ladner, *supra*.).

Скрининговые способы настоящего изобретения включают в себя контакт клеток с исследуемым соединением и определение способности исследуемого соединения модулировать экспрессию и/или активность терапевтической мишени изобретения в клетке. Экспрессия и/или активность терапевтической мишени изобретения может быть определена, как описано в настоящем документе. Экспрессия и/или активность терапевтической мишени изобретения может также быть определена с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области. В одном варианте воплощения соединение выбирается на основе его способности повышать экспрессию и/или активность терапевтической мишени изобретения. В одном варианте воплощения соединение выбирается на основе его способности повышать экспрессию и/или активность терапевтической мишени, выбранной из белков, перечисленных в таблицах 2-4 и 6-28 и 63-68, где терапевтическая мишень повышающе модулируется CoQ10 (например, показывает положительное кратное изменение). В одном варианте воплощения соединение выбирается на основе его способности понижать экспрессию и/или активность терапевтической мишени изобретения. В одном варианте воплощения соединение выбирается на основе его способности понижать экспрессию и/или активность терапевтической мишени, выбранной из белков, перечисленных в таблицах 2-4 и 6-28 и 63-68, где терапевтическая мишень понижающе модулируется CoQ10 (например, показывает отрицательное кратное изменение).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения представлены способы скринирования возможных или тестируемых соединений, которые являются субстратами терапевтических мишеней изобретения или их биологически активных составляющих. В еще одном варианте воплощения изобретения представлены способы скринирования возможных или тестируемых соединений, которые связываются с терапевтическими мишенями изобретения или их биологически активными составляющими. Определение способности тестируемого вещества прямо связываться с терапевтической мишенью может быть проведено при соединении вещества с радиоизотопной или энзимной меткой таким образом, что такое связывание соединения с терапевтической мишенью можно определить, детектируя меченное маркером соединение в комплексе. Например, соединения (например, маркер к субстрату) можно помечать  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ , или  $^3\text{H}$ , прямо или опосредованно, и радиоактивный изотоп будет детектирован или прямым подсчетом радиоэмиссии, или подсчетом сцинтилляции. Альтернативно, соединения способа могут быть энзимно помечены, например, пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой или люци-

феразой, и энзимная метка детектируется путем определения превращения соответствующего субстрата в продукт.

Это изобретение также относится к новым агентам, идентифицированным по вышеописанным способам скринирования. Соответственно, в объеме этого изобретения для дальнейшего использования находится агент, идентифицированный как описано здесь в соответствующей модели на животных. Например, агент, способный модулировать экспрессию и/или активность маркера изобретения, идентифицированный как описано здесь, может быть использован в модели на животных для определения эффективности, токсичности или побочных эффектов воздействия такого агента. Альтернативно, агент, идентифицированный как описано здесь, может быть использован в модели на животных для определения механизма действия такого агента. Кроме того, это изобретение относится к использованию новых агентов, идентифицированным по вышеописанным способам скринирования, для лечения, как описано выше.

#### VII. Фармацевтические композиции и фармацевтическое введение.

Факторы влияния изобретения могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения субъекту. Типично, фармацевтическая композиция содержит фактор влияния изобретения и фармацевтически приемлемый носитель. При использовании здесь "фармацевтически приемлемый носитель" включает все без исключения растворы, диспергентные среды, покрытия, антибактериальные и антигрибковые агенты, изотонические и абсорбирующие агенты и подобные тому физиологически совместимые. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают один или несколько из воды, солевого раствора, фосфатного буферного солевого раствора, декстрозы, глицерина, этанола и подобных соединений, а также их комбинации. Во многих случаях будет предпочтительным включить в состав изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые носители могут также включать в минорных количествах вспомогательные вещества, такие как увлажняющие или эмульгирующие реагенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок годности или эффективность фактора влияния.

Композиции настоящего изобретения могут быть в различных формах. Они включают, например, жидкости, полутвердые и твердые дозированные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и вливаемые растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, кремы, лосьоны, мази или пасты, капли, подходящие для введения в глаза, уши или нос, липосомы и суппозитории. Предпочитаемая форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения.

Факторы влияния настоящего изобретения могут вводиться различными способами, известными специалистам в данной области. Для многих терапевтических применений, предпочитаемым путем/способом введения является подкожная инъекция, внутривенная инъекция или вливание. Как поймут специалисты в данной области, путь и/или способ введения будет варьировать в зависимости от желаемых результатов. В некоторых вариантах воплощения, активное соединение может быть приготовлено с носителем, который защитит соединение от быстрого высвобождения, таким как рецептура контролируемого высвобождения, включающая импланты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут использоваться биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы для приготовления таких рецептур запатентованы или в основном известны специалистам в данной области. См., например, Системы доставки лекарств с непрерывным и контролируемым высвобождением, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. В одном варианте воплощения способ введения является парентеральным (например, внутривенным, подкожным, внутривнутренним, внутримышечным). В одном варианте воплощения фактор влияния вводится путем внутривенного вливания или инъекции. В другом варианте воплощения фактор влияния вводится путем внутримышечной или подкожной инъекции. В предпочтительном варианте воплощения фактор влияния вводится местно.

Терапевтические композиции типично должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть по рецептуре раствором, микроэмульсией, дисперсией, липосомой или другой упорядоченной структурой, подходящей для высокой концентрации лекарства. Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем включения активного компонента (например, фактора влияния) в требуемое количество подходящего раствора с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, как требуется, с последующим фильтрованием и стерилизацией. Как правило, дисперсии приготавливаются путем включения активного компонента в стерильный носитель, который содержит базовую дисперсную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных лиофилизированных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочитаемыми способами приготовления являются вакуумная сушка и распылительная сушка, которые дают порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного желаемого ингредиента из их раствора, предварительно стерилизованного и профильтрованного. Необходимая текучесть раствора может быть достигнута, например, использованием покрытия, такого как лецитин, поддержанием нужного размера частиц в случае дисперсии и использованием поверхностно-активных веществ. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть

достигнута включением в композицию реагента, который задерживает абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина.

Техники и рецептуры в основном можно найти в публикации Фармацевтические науки, Remington, Meade Publishing Co., Easton, Пенсильвания. Для системного введения предпочтительна инъекция, включая внутримышечную, внутривенную, внутривенную и подкожную. Композиции для инъекции могут быть сделаны по рецептуре в жидких растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Ханка или раствор Рингера. Кроме того, соединения могут быть изготовлены в твердой форме и растворены или превращены в суспензию непосредственно перед использованием. Также включаются лиофилизированные формы.

Фармацевтические композиции для орального введения могут иметь форму, например, таблеток или капсул, приготовленных стандартными способами с фармацевтически приемлемыми наполнителями, такими как связывающие реагенты (например, желатинированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или гидрофосфат кальция); смазочные вещества (например, стеарат магния, тальк или окись кремния); разрыхлители (например, картофельный крахмал или натрия гликолят крахмала); или увлажняющие реагенты (например, лауретсульфат натрия). Таблетки могут быть покрыты по способам, хорошо известным специалистам в данной области. Жидкие препараты для орального введения могут иметь форму, например, растворов, сиропов или суспензий, или они могут быть представлены в виде сухого продукта для соединения с водой или другим подходящим носителем перед использованием. Такие жидкие препараты могут быть приготовлены обычными способами с фармацевтически приемлемыми добавками, такими как суспендирующие реагенты (например, сорбитный сироп, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры); эмульгирующие агенты (например, лецитин или гуммиарабик); безводные носители (например, атионд масло, жирные эфиры, этиловый спирт или ректифицированные растительные масла); и консерванты (например, метил или пропил-п-гидроксibenзоаты или сорбиновая кислота). Препараты могут также при необходимости содержать буферные соли, ароматизаторы, подкрасивающие и подслащивающие вещества.

Препараты для орального введения могут быть разработаны так, чтобы обеспечить контролируемое высвобождение активного компонента. Для введения через рот композиции могут иметь форму таблеток или лепешек, изготовленных стандартным образом. Для введения путем ингаляции соединения для использования в соответствии с настоящим изобретением легко доставляются в форме аэрозольного спрея, подающегося из баллона под давлением или небулайзера, с использованием подходящей сжатой жидкости, например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого подходящего газа. В случае аэрозольного баллона под давлением дозированная единица может быть точно определена, если обеспечить доставку клапаном постоянного количества. Капсулы и картриджи, например, из желатина для использования в ингаляторе или инъекторе могут быть разработаны с содержанием порошка смеси компонентов и подходящей порошковой базы, такой как лактоза или крахмал.

Соединения могут быть изготовлены для парентерального введения путем инъекции, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Рецептуры для инъекции могут быть представлены в лекарственной форме со стандартной дозировкой, например, в ампулах или мультидозных емкостях, с добавленным консервантом. Композиции могут иметь такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в жировых или водных носителях, и могут содержать рецептурные реагенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или дисперсирующие реагенты. Альтернативно, активный ингредиент может быть в форме порошка для соединения с подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой, перед использованием.

Соединения могут быть также изготовлены в ректальной композиции, такой как суппозитории или удерживающие клизмы, например, содержащие традиционную суппозиторную основу, такую как кокосовое масло или другие глицериды.

В дополнение к композициям, описанным выше, соединения могут также быть изготовлены как депо препарата. Такие долгодействующие композиции могут вводиться имплантацией (например, подкожно или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции. Так, например, в композиции могут входить подходящие полимерные или гидрофобные вещества (например, как эмульсия в соответствующем масле) или ионообменные смолы, или в виде слабо растворимых производных, например, как слабо растворимая соль.

Системное введение может также быть трансмукозальным или трансдермальным. Для трансмукозального или трансдермального введения в рецептуре используются пенетранты, пригодные для преодоления барьера. Такие пенетранты в большинстве своем известны специалистам и включают, например, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты, для облегчения проникновения могут быть использованы детергенты. Трансмуккозальное введение может быть произведено с использованием назальных спреев или суппозитория. Для местного введения, соединение(я) изобретения смешиваются в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, известных в большинстве своем специалистам. Местно может быть использован водный раствор для лечения повреждений или воспаления для ускорения

исцеления.

Композиции могут, при желании, быть представлены в виде упаковки или диспенсера, который может содержать одну или более дозовых единиц в форме, содержащей активный ингредиент. Упаковка, может, например, содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистер. К упаковке или диспенсеру могут прилагаться инструкции по применению.

Для терапии, включающей введение нуклеиновых кислот, соединение(я) изобретения могут быть изготовлены во множестве форм введения, включая системное и местное введение. Техники и рецептуры в большинстве своем можно найти в публикации Фармацевтические науки, Remington, Meade Publishing Co., Easton, Пенсильвания. Для системного введения предпочтительна инъекция, включая внутримышечную, внутривенную, внутривенную, внутрибрюшинную, внутриузловую и подкожную. Для инъекции соединения(й) изобретения могут быть изготовлены в жидких растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Ханка и раствор Рингера. Кроме того, соединение(я) могут быть изготовлены в твердой форме и растворены или превращены в суспензию непосредственно перед использованием. Также включаются лиофилизированные формы.

В одном варианте воплощения, композиции, содержащие фактор влияния, вводятся местно. Предпочтительно представлять активный ингредиент, т.е. фактор-B, как фармацевтическую композицию. Активного ингредиента может содержаться, для местного введения, от около 0,001% до около 20% от массы, по весу композиции в конечном продукте, хотя он может составлять до 30% от массы, предпочтительно от около 1% до около 20% от массы композиции. Местные композиции настоящего изобретения содержат активный ингредиент вместе с одним или более приемлемым носителем(ями), а также опционально любой другой терапевтический ингредиент(ы). Носитель(и) должен быть "приемлемым" в отношении того, что должен сочетаться с другими ингредиентами композиции и не причинять вред реципиенту.

При лечении пациента, у которого выявлена соответствующая болезнь, вводится терапевтически эффективное количество агента или агентов. Терапевтически эффективная доза означает такое количество соединения, которое приводит к облегчению симптомов или удлинению срока жизни пациента.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений должна определяться стандартными фармацевтическими процедурами в клеточных культурах или экспериментальных животных, например, определением ЛД<sub>50</sub> (дозы, летальной для 50% популяции) и ЭД<sub>50</sub> (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение между токсичным и терапевтическим эффектами называется терапевтическим индексом и может быть выражено как соотношение ЛД<sub>50</sub>/ЭД<sub>50</sub>. Предпочтительны соединения, которые показывают высокие терапевтические индексы. Данные, полученные из таких клеточных исследований и исследований на животных, могут быть использованы в разработке диапазона дозировки для использования у людей. Дозировка таких соединений находится предпочтительно внутри диапазона циркулирующих концентраций, которые включают ЭД<sub>50</sub> с маленькой или отсутствующей токсичностью. Дозировка может варьировать внутри этого диапазона в зависимости от применяемой формы дозы и используемого способа введения.

Для любого соединения, используемого в способе изобретения, терапевтически эффективная доза может быть установлена непосредственно из исследований клеточной культуры. Например, доза может быть разработана в моделях на животных для достижения циркулирующей концентрации в плазме в диапазоне, который включает IC<sub>50</sub>, как определено в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения полезной дозы для людей. Уровни в плазме могут быть подсчитаны, например, при помощи ВЭЖХ.

Точная композиция, путь введения и дозировка могут быть выбраны отдельным врачом с учетом состояния пациента, (см. например Fingl et al., Фармакологическая основа терапии, 1975, гл. 1 с. 1). Следует заметить, что внимательный медик будет знать, как и когда следует остановить, прервать или отрегулировать введение, приводящее к токсичности или к дисфункции органа. И наоборот, внимательный врач также будет знать, как отрегулировать лечение к более высоким уровням, если клинический ответ не адекватен (не допуская токсичность). Размер вводимой дозы при лечении соответствующего патологического расстройства будет варьировать в соответствии с серьезностью состояния, подвергающегося лечению, и способа введения. Серьезность состояния может, например, быть оценена, частично, путем стандартных прогностических способов оценки. Более того, доза и, возможно, частота дозы, также будет варьировать в зависимости от возраста, веса тела и реакции отдельного пациента. Программа, сопоставимая с обсуждаемой выше, может быть использована в ветеринарной медицине.

В зависимости от определенных состояний, подвергаемых лечению, соответствующие агенты могут быть созданы и введены системно или местно. Техники для разработки формулы и введения можно найти в публикации Фармацевтические науки, Remington, 18<sup>e</sup> изд., Mack Publishing Co., Easton, Пенсильвания. (1990). Подходящие способы введения могут включать оральное, ректальное, трансдермальное, вагинальное, трансмукозальное или кишечное введение; парентеральную доставку, включая внутримышечные, подкожные, костномозговые инъекции, а также интратекальные, прямые внутрижелудочковые, внутривенные, внутривенные, интраназальные или интраглазные инъекции, перечислено лишь несколько способов.

Композиции, описанные выше, могут вводиться субъекту в любой подходящей рецептуре. В дополнение к лечению метаболического нарушения местными композициями фактора влияния, например CoQ10, в других аспектах изобретения фактор влияния, например CoQ10, может быть доставлен другими способами. Например, фактор влияния, например CoQ10 может быть разработан для парентеральной доставки, например, для подкожной, внутривенной, внутримышечной или внутриопухолевой инъекции. Могут использоваться другие способы доставки, например, липосомная доставка или диффузия из прибора, наполненного композицией. Композиции могут вводиться одним болюсом, множественными инъекциями или непрерывной инфузией (например, внутривенно или путем перитонеального диализа). Для парентерального введения, композиции предпочтительно разрабатываются в стерильной апиrogenной форме. Композиции настоящего изобретения также могут вводиться *in vitro* в клетку (например, для вызова апоптозов в раковой клетке в культуре *in vitro*) непосредственным добавлением композиции к жидкости, в которой содержится клетка.

В зависимости от определенных состояний, подвергаемых лечению, соответствующие агенты могут быть созданы и введены системно или местно. Техники для разработки формулы и введения можно найти в публикации Фармацевтические науки, Remington, 18<sup>е</sup> изд., Mack Publishing Co., Easton, Пенсильвания. (1990). Подходящие способы введения могут включать оральное, ректальное, трансдермальное, вагинальное, трансмукозальное или кишечное введение; парентеральную доставку, включая внутримышечные, подкожные, костномозговые инъекции, а также интратекальные, прямые внутрижелудочковые, внутривенные, внутрибрюшинные, интраназальные или внутриглазные инъекции, перечислено лишь несколько способов.

Для инъекции агенты изобретения могут быть разработаны в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Ханка, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Для такого трансмукозального введения в рецептуре используются пенетранты, пригодные для преодоления барьера. Такие пенетранты в большинстве своем известны специалистам в данной области.

Использование фармацевтически пригодных носителей в рецептуре соединений, раскрытых здесь для практики изобретения, в дозах, пригодных для системного введения, входит в объем изобретения. С правильным выбором носителя и подходящей технологией производства, композиции настоящего изобретения, в частности, разработанные как растворы, могут вводиться парентерально, например, путем внутривенной инъекции. Могут быть легко разработаны композиции с использованием фармацевтически приемлемых носителей, хорошо известных специалистам, в дозах, подходящих для орального введения. Такие носители дают возможность композициям изобретения быть изготовленными в виде таблеток, пилюль, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, суспензий и тому подобного, для орального введения пациенту, подвергаемому лечению.

Агенты, предназначенные для внутриклеточного введения, могут вводиться с использованием техник, хорошо известных специалистам, имеющим стандартные знания в данной области. Например, такие агенты могут быть инкапсулированы в липосомы, затем введены, как описано выше. Липосомы являются сферическими липидными двухслойными структурами с водным содержимым. Все молекулы, представленные в водном растворе во время образования липосомы, включены в водную среду. Содержимое липосом защищено от внешней микросреды и, поскольку липосомы проникают сквозь клеточные мембраны, эффективно доставляется в цитоплазму клеток. Кроме того, вследствие своей гидрофобности маленькие органические молекулы могут вводиться прямо внутриклеточно.

Фармацевтические композиции, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают композиции, в которых активные ингредиенты содержатся в эффективном количестве для достижения соответствующей цели. Определение эффективного количества вполне возможно для специалистов в данной области, особенно в свете детального раскрытия, предоставленного здесь. В дополнение к активным ингредиентам эти фармацевтические композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые носители, содержащие вспомогательные вещества, которые способствуют созданию содержащих активные компоненты препаратов, которые можно использовать в фармацевтике. Препараты, формула которых подходит для орального введения, могут быть в форме таблеток, драже, капсул или растворов. Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут быть произведены по способу, который сам по себе известен, например, посредством стардатного смешивания, растворения, грануляции, приготовления драже, процессов возгонки, эмульгирования, инкапсулирования, улавливания или лиофилизации.

Композиции, подходящие для местного введения, включают жидкости или полужидкие препараты, подходящие для проникновения сквозь кожу в месте, где требуется лечение, такие как жидкие мази, лосьоны, кремы, мази или пасты и капли, подходящие для введения в глаза, уши или нос. Капли в соответствии с настоящим изобретением могут быть в виде стерильных водных или жировых растворов и могут быть приготовлены путем разведения активного ингредиента в подходящем водном растворе бактерицидного и/или фунгицидного реагента и/или любого другого подходящего консерванта, и предпочтительно включать поверхностно-активный реагент. Получившийся в результате раствор затем может быть очищен и стерилизован путем фильтрации и помещен в контейнер по асептической технологии.

Примерами бактерицидных и фунгицидных реагентов, подходящих для включения в капли, являются нитрат или ацетат фенолртути (0,002%), хлорид бензалкония (0,01%) и ацетат хлоргексидина (0,01%). Подходящие растворы для приготовления жирового раствора включают глицерин, разведенный спирт и пропиленгликоль.

Лосьоны в соответствии с настоящим изобретением включают те, которые подходят для применения для кожи или глаз. Глазной лосьон может содержать стерильный водный раствор, необязательно содержащий бактерицид, который может быть приготовлен по способам, похожим на способы, описанные для приготовления капель. Лосьоны или жидкие мази для применения для кожи могут также включать подсушивающий и охлаждающий кожу реагент, такой как спирт или ацетон, и/или увлажнитель, такой как глицерин или масло, такое как касторовое масло или арахисовое масло.

Кремы, мази или пасты в соответствии с настоящим изобретением являются полутвердыми формами с активным ингредиентом для наружного применения. Они могут быть сделаны путем смеси активного ингредиента в мелкодисперсной или порошковой форме, отдельно или в растворе или суспензии в водной или неводной жидкости, с воздухом в подходящем механизме, с масляной или немасляной основой. Основа может содержать углеводороды, такие как твердый, мягкий или жидкий парафин, глицерин, пчелиный воск, металлсодержащее мыло; растительный клей; масло природного происхождения, такое как миндальное, кукурузное, арахисовое, касторовое или оливковое масло; шерстяной жир или его производные, или жирные кислоты, такие как стеариновая или олеиновая кислоты вместе со спиртом, таким как пропиленгликоль или макроголи. Композиция может включать любой подходящий поверхностно-активный агент, такие как анионный, катионный или неионизированный поверхностно-активный агент, такие как эфиры сорбита или их полиоксиэтиленовые производные. Также могут быть включены суспендирующие агенты, такие как природные смолы, производные целлюлозы или неорганические вещества, такие как кремний, и другие ингредиенты, такие как ланолин.

Фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные растворы активных компонентов в растворимой в воде форме. Кроме того, суспензии активных компонентов могут быть приготовлены в виде подходящих для масляных инъекций суспензий. Подходящие липофильные растворы или несущие среды включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Суспензии для водных инъекций могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, такие как натрия карбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Необязательно суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы или агенты, которые повышают растворимость компонентов, что позволяет проникать раствору в более высокой концентрации.

Фармацевтические препараты для орального использования могут представлять из себя комбинацию активных компонентов с твердыми вспомогательными веществами, необязательно размолотыми, в результате чего получается смесь, и произведенными в виде смеси гранул, после добавления подходящих вспомогательных веществ, при желании, для получения таблеток или драже. Подходящими вспомогательными веществами являются, в частности, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, гидроксипропилметил-целлюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон (ПВП). При желании можно добавить дезинтегрирующие агенты, такие как поперечно сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соли, такие как альгинат натрия.

Драже производятся в соответствующей оболочке. Для этой цели могут быть использованы концентрированные растворы сахара, которые необязательно могут содержать гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон, карбопол гель, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы лака и подходящие органические растворители или смеси растворителей. К оболочке таблеток или драже могут быть добавлены красители или пигменты для идентификации или характеристики различных комбинаций или доз активных компонентов.

Фармацевтические препараты, которые можно использовать орально, включают плотно наполненные капсулы, сделанные из желатина, а также мягкие, запечатанные капсулы, сделанные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Плотно наполненные капсулы могут содержать активные ингредиенты в смеси с наполнителями, такими как лактоза, связующими веществами, такими как крахмал, и/или лубрикантами, такими как тальк или стеарат магния, и, необязательно, стабилизаторы. В мягких капсулах активные компоненты могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как жирные кислоты, жидкий парафин или жидкий полиэтиленгликоль. Кроме того, могут быть добавлены стабилизаторы.

Композиция при желании может включать буферную систему. Буферные системы выбираются так, чтобы поддерживать или буферизировать pH композиций внутри желаемого диапазона. Термин "буферная система" или "буфер", используемые здесь, означают растворенный реагент или реагенты, которые, находясь в водном растворе, стабилизируют такой раствор, не давая произойти сильным изменениям pH (концентрации ионов водорода или активности) при добавлении к нему кислот или оснований. Растворенный реагент или реагенты, которые таким образом отвечают за устойчивость или из-

менения pH от стартового значения pH в буфере в диапазоне, указанном выше, хорошо известны. Хотя подходящих буферов существует очень много, предпочтительным буфером является моногидрат фосфата калия.

Конечное значение pH фармацевтической композиции может варьировать внутри физиологически совместимого диапазона. Обязательно, чтобы конечное значение pH не раздражало кожу человека и предпочтительно, чтобы оно способствовало трансдермальному транспорту активного компонента, т.е. CoQ10. Без нарушения этого условия pH может быть выбрано так, чтобы усилить стабильность соединения CoQ10 и чтобы при необходимости подогнать к нужному состоянию консистенцию. В одном варианте воплощения предпочтительное значение pH от около 3,0 до около 7,4, более предпочтительное от около 3,0 до около 6,5, наиболее предпочтительное от около 3,5 до около 6,0.

В композиции предпочтительных местных носителей основным компонентом является вода, обязательно очищенная, например, деионизированная вода. Такие носители содержат воду в диапазоне от более чем около 50 до около 95 процентов, на основе общего веса композиции. Конкретное количество присутствующей воды не является критичным, однако оно подгоняется для получения желаемой вязкости (обычно от около 50 сПз до около 10000 сПз) и/или концентрации других компонентов. Местные носители предпочтительно имеют вязкость не менее около 30 сПз.

Другие известные трансдермальные проникающие в кожу факторы также могут быть использованы для содействия доставки CoQ10. Иллюстрацией являются сульфоксиды, такие как диметилсульфоксид (ДМСО) и подобные ему вещества; циклические амиды, такие как 1-додецилазациклопептан-2-он (Azone.TM., зарегистрированная торговая марка Nelson Research, Inc.) и подобные ему вещества; амиды, такие как N,N-диметилацетамид (ДМА) N,N-диэтилтолуамид, N,N-диметилформамид, N,N-диметилоктамид, N,N-диметилдекамид, и подобные вещества; производные пирролидона, такие как N-метил-2-пирролидон, 2-пирролидон, 2-пирролидон-5-карбоксильная кислота, N-(2-гидроксиэтил)-2-пирролидон или его эфиры жирных кислот, 1-лаурил-4-метоксикарбонил-2-пирролидон, N-талловалкилпирролидоны, и подобные вещества; полиолы, такие как пропиленгликоль, этиленгликоль, полиэтиленгликоль, дипропиленгликоль, глицерин, гексантиол и подобные вещества; линейные и разветвленные жирные кислоты, такие как олеиновая, линолевая, лауриновая, валериановая, гептановая, капроновая, миристиновая, изовалериановая, неопентановая, триметилгексановая, изостеариновая и подобные вещества; спирты, такие как этанол, пропанол, бутанол, октанол, олеиловый, стеариловый, ланолиновый спирты, и подобные вещества; анионные поверхностно-активные вещества, такие как лаурат натрия, натрий лаурилсульфат, и подобные вещества, катионные поверхностно-активные вещества, такие как хлорид бензалколия, хлорид додецилтриметиламмония, бромид цетилтриметиламмония, и подобные вещества; неионные поверхностно-активные вещества, такие как эфиры пропоксигированного полиоксиэтилена, напр, Полосамер 231, Полосамер 182, Полосамер184, и подобные вещества, этоксилированные жирные кислоты, например, Tween 20, Мулг 45, и подобные вещества, производные сорбитана, например, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Span 60, и подобные вещества, этоксилированные спирты, например, полиоксиэтилена (4) лауиловый эфир (Brj 30), полиоксиэтилена (2) олеиловый эфир (Brj 93), и подобные вещества, лецитин и производные лецитина, и подобные вещества; терпены, такие как D-лимонен,  $\alpha$ -пинен,  $\beta$ -карен,  $\alpha$ -терпинеол, карвол, карвон, ментон, оксид лимонена, оксид  $\alpha$ -пинена, эвкалиптовое масло и подобные вещества. Также подходят в качестве проникающих сквозь кожу факторов органические кислоты и эфиры, такие как салициловая кислота, метилсалицилат, лимонная кислота, янтарная кислота и подобные вещества.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения представлены композиции, содержащие CoQ10, и способы их приготовления. Предпочтительно, композиции содержат, по меньшей мере, от около 1% до около 25% CoQ10 (весовые проценты). CoQ10 можно приобрести у Asahi Kasei N&P (Hokkaido, Japan) как УБИДЕКАРЕНОН (USP). CoQ10 также можно приобрести у Kaneka Q10 как Kaneka Q10 (USP УБИДЕКАРЕНОН) в порошковой форме (Pasadena, Texas, USA). CoQ10, использованный в способах, приведенных здесь, имеет следующие характеристики: остаточные растворители соответствуют требованию USP 467; содержание воды менее чем 0,0%, менее чем 0,05% или менее чем 0,2%; остаток после прокаливании 0,0%, менее чем 0,05%, или менее чем 0,2%; содержание тяжелых металлов менее чем 0,002%, или менее чем 0,001%; чистота между 98-100% или 99,9%, или 99,5%. Способы приготовления композиций предоставлены в разделе примеров ниже.

В некоторых вариантах воплощения изобретения предоставляются способы для лечения или профилактики метаболического нарушения у людей местным введением коэнзима Q10 людям, таким образом чтобы оказать лечебное или профилактическое действие, где человеку вводится местная доза коэнзима Q10 с местным наполнителем, где коэнзим Q10 применяется к целевой ткани в диапазоне от около 0,01 до около 0,5 миллиграммов коэнзима Q10 на квадратный сантиметр кожи. В одном варианте воплощения, коэнзим Q10 применяется к целевой ткани в диапазоне от около 0,09 до около 0,15 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. В различных вариантах воплощения, коэнзим Q10 применяется к целевой ткани в диапазоне от около 0,001 до около 5,0, от около 0,005 до около 1,0, от около 0,005 до около 0,5, от около 0,01 до около 0,5, от около 0,025 до около 0,5, от около 0,05 до около 0,4, от около

0,05 до около 0,30, от около 0,10 до около 0,25, или от около 0,10 до 0,20 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. В других вариантах воплощения, коэнзим Q10 применяется к целевой ткани в дозе около 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28, 0,29, 0,30, 0,31, 0,32, 0,33, 0,34, 0,35, 0,36, 0,37, 0,38, 0,39, 0,40, 0,41, 0,42, 0,43, 0,44, 0,45, 0,46, 0,47, 0,48, 0,49 или 0,5 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. В одном варианте воплощения, коэнзим Q10 применяется к целевой ткани в дозе около 0,12 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. Следует понимать, что диапазоны значений, в которых границами является любая из этих величин, также следует рассматривать как часть этого изобретения, например, от около 0,03 до около 0,12, от около 0,05 до около 0,15, от около 0,1 до около 0,20, или от около 0,32 до около 0,49 мг CoQ10 на квадратный сантиметр кожи.

В другом варианте воплощения изобретения, коэнзим Q10 вводится в форме крема CoQ10 в дозе между 0,5 и 10 миллиграммами крема CoQ10 на квадратный сантиметр кожи, где крем CoQ10 содержит между 1 и 5% коэнзима Q10. В одном варианте воплощения, крем CoQ10 содержит около 3% коэнзима Q10. В других вариантах воплощения, крем CoQ10 содержит около 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5% коэнзима Q10. В различных вариантах воплощения, крем CoQ10 вводится в дозе около 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10 миллиграмм крема CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. Следует понимать, что диапазоны значений, в которых границами является любая из этих величин, также следует рассматривать как часть этого изобретения, например, между около 0,5 и около 5,0, около 1,5 и 2,5, или около 2,5 и 5,5 мг крема CoQ10 на квадратный сантиметр кожи.

В другом варианте воплощения коэнзим Q10 вводится в форме крема CoQ10 в дозе между 3 и 5 миллиграммами крема CoQ10 на квадратный сантиметр кожи, где крем CoQ10 содержит между 1 и 5% коэнзима Q10. В одном варианте воплощения крем CoQ10 содержит около 3% коэнзима Q10. В других вариантах воплощения крем CoQ10 содержит около 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5% коэнзима Q10. В различных вариантах воплощения, крем CoQ10 вводится в дозе около 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0 миллиграмм крема CoQ10 на квадратный сантиметр кожи. Следует понимать, что диапазоны значений, в которых границами является любая из этих величин, также следует рассматривать как часть этого изобретения, например, между около 3,0 и около 4,0, около 3,3 и 5,3, или около 4,5 и 4,9 мг крема CoQ10 на квадратный сантиметр кожи.

Некоторые аспекты изобретения предоставляют способы для лечения или профилактики метаболического нарушения у людей путем местного введения коэнзима Q10, так чтобы имели место лечение или профилактика, где коэнзим Q10 местно применяется один или несколько раз за 24 ч в течение шести недель или более.

Некоторые аспекты изобретения предоставляют способ для приготовления 3% крема коэнзима Q10, который включает этапы приготовления Фаз А, В, С, D и Е и комбинацию всех фаз, такую как формирование масло-в-воде эмульсии 3% CoQ10 крема.

В некоторых вариантах воплощения, ингредиенты фазы А включают алкил C<sub>12-15</sub> бензоат NF 4,00 вес.%, цетиловый спирт 2,00 вес.%, глицерина стеарат/ПЭГ-100 4,5 вес.% и стеариловый спирт NF 1,50 вес.%, тогда как ингредиенты фазы В включают диэтиленгликоль моноэфир NF 5,00 вес.%, глицерин USP 2,00 вес.%, пропиленгликоль USP 1,50 вес.%, феноксиэтанол NF 0,475 вес.%, очищенную воду USP 16,725 вес.% и дисперсию карбомера 2% 40,00 вес.%, и ингредиенты фазы С включают молочную кислоту USP 0,50 вес.%, раствор лактата натрия USP 2,00 вес.%, троламин NF 1,30 вес.%, и очищенную воду USP 2,50 вес.%. Кроме того, в этих воплощениях ингредиенты фазы D включают диоксид титана USP 1,00 вес.%, а ингредиенты фазы Е включают CoQ10 21% концентрат 15 вес.%.

Термин "Троламин," используемый здесь, относится к Троламину NF, Триэтаноламину, TEAlan®, TEAlan 99%, Триэтаноламину, 99%, Триэтаноламину, NF или Триэтаноламину, 99%, NF. Эти термины могут быть использованы здесь взаимозаменяемо.

В некоторых других вариантах воплощения, ингредиенты фазы А включают каприновый/каприлиновый триглицерид 4,00 вес.%, цетиловый спирт 2,00 вес.%, глицерина стеарат/ПЭГ-100 4,5 вес.% и стеариловый спирт NF 1,50 вес.%, тогда как ингредиенты фазы В включают диэтиленгликоля моноэфир NF 5,0 вес.%, глицерин USP 2,00 вес.%, пропиленгликоль USP 1,50 вес.%, феноксиэтанол NF 0,475 вес.%, очищенную воду USP 16,725 вес.% и дисперсию карбомера 2% 40,00 вес.%, и ингредиенты фазы С включают молочную кислоту USP 0,50 вес.%, раствор лактата натрия USP 2,00 вес.%, троламин NF 1,30 вес.%, и очищенную воду USP 2,50 вес.%. Кроме того, в этих воплощениях ингредиенты фазы D включают диоксид титана USP 1,00 вес.%, а ингредиенты фазы Е включают CoQ10 21% концентрат 15 вес.%.

В некоторых вариантах воплощения изобретения предоставляются способы приготовления 3% крема коэнзима Q10, которые включают этапы (1) добавления ингредиентов фазы А в соответствующую емкость и нагрев до 70-80°C на водяной бане; (2) добавление ингредиентов фазы В, за исключением дисперсии карбомера, в соответствующую емкость и смешение для образования смешанной фазы В; (3) помещение ингредиентов фазы Е в соответствующую емкость и расплавление их при 50-60°C на



водяной бане для образования расплавленной фазы; (4) добавление дисперсии карбомера к емкости со смесью и нагрев до 70-80°C с одновременным перемешиванием; (5) добавление смешанной фазы В к емкости со смесью, с поддержанием температуры на уровне 70-80°C; (6) добавление ингредиентов фазы С к емкости со смесью, с поддержанием температуры на уровне 70-80°C; (7) добавление ингредиентов фазы D к емкости со смесью и последующее перемешивание и гомогенизирование содержимого емкости; затем (8) остановка гомогенизации и охлаждение содержимого емкости до 50-60°C; затем (9) прекращение перемешивания и добавление расплавленной фазы Е к емкости со смесью для образования дисперсии; (10) постоянное перемешивание до тех пор, пока дисперсия не станет ровной и однородной; затем (11) охлаждение содержимого емкости со смесью до 45-50°C.

В некоторых других вариантах воплощения изобретения предоставляется фармацевтическая композиция, содержащая 3% крем СоQ10. Крем включает фазу А, имеющую С<sub>12-15</sub> алкилбензоат 4,00 вес.% в композиции, цетиловый спирт 2,00 вес.% в композиции, стеариловый спирт 1,5 вес.%, глицерилстеарат и ПЭГ-100 4,5 вес.%; фазу В, имеющую глицерин 2,00 вес.%, пропиленгликоль 1,5 вес.%, этоксидиглицерин 5,0 вес.%, феноксиэтанол 0,475 вес.%, дисперсию карбомера 40,00 вес.%, очищенную воду 16,725 вес.%; фазу С, имеющую триэтаноламид 1,300 вес.%, молочную кислоту 0,500 вес.%, раствор лактата натрия 2,000 вес.%, воду 2,5 вес.%; фазу D, имеющую диоксид титана 1,000 вес.%; и фазу Е, имеющую СоQ10 21% концентрации 15,000 вес.%. В некоторых вариантах воплощения дисперсия карбомера включает воду, феноксиэтанол, пропиленгликоль и карбомер 940.

В некоторых других вариантах воплощения изобретения, предоставляется фармацевтическая композиция, содержащая 3% крем СоQ10. Крем включает фазу

А, имеющую каприновый/каприлиновый триглицерид 4,00 вес.% в композиции, цетиловый спирт 2,00 вес.% в композиции, стеариловый спирт 1,5 вес.%, глицерилстеарат и ПЭГ-100 4,5 вес.%; фазу В, имеющую глицерин 2,00 вес.%, пропиленгликоль 1,5 вес.%, этоксидиглицерин 5,0 вес.%, феноксиэтанол 0,475 вес.%, дисперсию карбомера 40,00 вес.%, очищенную воду 16,725 вес.%; фазу С, имеющую триэтаноламид 1,300 вес.%, молочную кислоту 0,500 вес.%, раствор лактата натрия 2,000 вес.%, воду 2,5 вес.%; фазу D, имеющую диоксид титана 1,000 вес.%; и фазу Е, имеющую СоQ10 21% концентрации 15,000 вес.%. В некоторых вариантах воплощения дисперсия карбомера включает воду, феноксиэтанол, пропиленгликоль и карбомер 940.

В некоторых других вариантах воплощения изобретения предоставляется фармацевтическая композиция, содержащая 1,5% крем СоQ10. Крем включает фазу А, имеющую С<sub>12-15</sub> алкилбензоат 5,000 вес.% в композиции, цетиловый спирт 2,00 вес.% в композиции, стеариловый спирт 1,5 вес.%, глицерилстеарат и ПЭГ-100 4,500 вес.%; фазу В, имеющую глицерин 2,000 вес.%, пропилен 1,750 вес.%, этоксидиглицерин 5,000 вес.%, феноксиэтанол 0,463 вес.%, дисперсию карбомера 50,00 вес.%, очищенную воду 11,377 вес.%; фазу С, имеющую триэтаноламид 1,300 вес.%, молочную кислоту 0,400 вес.%, раствор лактата натрия 2,000 вес.%, и воду 4,210 вес.%; фазу D, имеющую диоксид титана 1,00 вес.%; и фазу Е, имеющую СоQ10 21% концентрации 1,500 вес.%. В некоторых других вариантах воплощения изобретения предоставляется фармацевтическая композиция, содержащая 1,5% крем СоQ10. Крем включает фазу А, имеющую каприновый/каприлиновый триглицерид 5,000 вес.% в композиции, цетиловый спирт 2,000 вес.% в композиции, стеариловый спирт 1,50 вес.%, глицерилстеарат и ПЭГ-100 4,500 вес.%; фазу В, имеющую глицерин 2,000 вес.%, пропилен 1,750 вес.%, этоксидиглицерин 5,000 вес.%, феноксиэтанол 0,463 вес.%, дисперсию карбомера 50,00 вес.%, очищенную воду 11,377 вес.%; фазу С, имеющую триэтаноламид 1,3 вес.%, молочную кислоту 0,400 вес.%, раствор лактата натрия 2,000 вес.%, и воду 4,210 вес.%; фазу D, имеющую диоксид титана 1,000 вес.%; и фазу Е, имеющую СоQ10 21% концентрации 1,500 вес.%. В некоторых вариантах воплощения дисперсия карбомера включает воду, феноксиэтанол и пропиленгликоль.

#### 1. Комбинированная терапия.

В некоторых вариантах воплощения, фактор влияния изобретения и/или содержащие его фармацевтические композиции могут использоваться в комбинированной терапии с по крайней мере одним другим терапевтическим агентом, который может быть другим фактором влияния и/или содержащей его фармацевтической композицией. Фактор влияния и/или содержащая его фармацевтическая композиция и другой терапевтический агент могут действовать аддитивно или, более предпочтительно, синергически. В одном варианте воплощения фактор влияния и/или содержащая его фармацевтическая композиция вводится одновременно с введением другого терапевтического агента. В другом варианте воплощения, смесь и/или содержащая ее фармацевтическая композиция вводится до или после введения другого терапевтического агента

Примеры других терапевтических агентов, которые могут использоваться с фактором влияния изобретения, включают, не ограничиваясь, лечащие сахарный диабет агенты, лечащие осложнения диабета агенты, антигиперлипемические агенты, гипотензивные или антигипертензивные агенты, агенты против ожирения, химиотерапевтические агенты, иммунотерапевтические агенты, иммуноподавляющие агенты и тому подобные.

Примеры агентов для лечения сахарного диабета включают инсулиновые формулы (например,

формулы с животным инсулином, выделенным из поджелудочной железы коров или свиней; формулы с человеческим инсулином, синтезированные при помощи технологий генной инженерии с использованием соответствующих микроорганизмов или техник), повышающие чувствительность к инсулину агенты, фармацевтически приемлемые соли, гидраты или их сольваты (например, пиоглитазон, троглитазон, розиглитазон, нетоглитазон, балаглитазон, ривоглитазон, тезаглитазар, фарглитазар, CLX-0921, R-483, NIP-221, NIP-223, DRF-2189, GW-7282TAK-559, T-131, RG-12525, LY-510929, LY-519818, BMS-298585, DRF-2725, GW-1536, GI-262570, KRP-297, TZD18 (Merck), DRF-2655, и тому подобные), ингибиторы альфа-глюкозидазы (например, воглибоза, акарбоза, миглитол, эмиглитат и тому подобные), бигуаниды (например, фенформин, метформин, буформин и тому подобные) или сульфонилмочевина (например, толбутамид, глибенкламид, гликлазид, хлорпропамид, толазамид, ацетогексамид, гликлопирамид, глимепирид и тому подобные), а также другие усиливающие секрецию инсулина агенты (например, репаглинид, сенаглинид, натеглинид, митиглинид, GLP-1 и тому подобные), агонисты амирина (например, прамлинтид и тому подобные), ингибитор фосфотирозинфосфатазы (например, ванадиевая кислота и тому подобные) и тому подобные.

Примеры агентов для лечения осложнений диабета включают, не ограничиваясь, ингибиторы альдореуктазы (например, толрестат, эналрестат, зенарестат, зополрестат, миналрестат, фидареатат, SK-860, CT-112 и тому подобные), нейротрофные факторы (например, NGF, NT-3, BDNF и тому подобные), ингибиторы РКС (например, LY-333531 и тому подобные), ингибиторы конечного продукта усиленного гликозилирования (AGE) (например, ALT946, пимагедин, пирадоксамин, фенацилтиазиолиума бромид (ALT766) и тому подобные), агенты, гасящие активный кислород (например, липоевая кислота или ее производные, биофлаваноиды включая флавины, изофлавины, флавононы, процианидины, антоцианидины, пикногенол, лютеин, ликопен, витамин E, коэнзим Q, и тому подобные), цереброваскулярные расширяющие агенты (например, тиаприд, мексилетен и тому подобные).

Антигиперлипемические агенты включают, например, основанные на статинах компоненты, которые являются ингибиторами синтеза холестерина (например, правастатин, симвастатин, ловастатин, аторвастатин, флувастатин, розувастатин и тому подобные), ингибиторы синтазы сквалена или соединения фибрата, имеющие понижающий триглицерид эффект (например, фенофибрат, гемфиброзил, безафибрат, хлофибрат, синфибрат, клинофибрат и тому подобные).

Гипотензивные агенты включают, например, ингибиторы ангиотенсин-конвертирующего фермента (например, каптоприл, эналаприл, делаприл, беназеприл, цилазаприл, эналаприл, эналаприлат, фосиноприл, лизиноприл, мозексиприл, перинодоприл, квинаприл, рамиприл, трандолаприл и тому подобные) или антагонисты ангиотензина II (например, лозартан, кандесартан цилексетил, олмесартан медоксомил, эпросартан, валсартан, телмисартан, ирбесартан, тазосартан, помисартан, риписартан фора-сартан, и тому подобные).

Агенты против ожирения включают, например, агенты против центрального ожирения (например, дексфенфлурамин, фенфлурамин, фентермин, сибутрамин, амфепрамон, дексамфетамин, мазиндол, фенилпропаноламин, клобензорекс и тому подобные), гастроинтерстициальной липазы ингибиторы (например, орлистат и тому подобные), бета-3 агонисты (например, CL-316243, SR-58611-A, UL-TG-307, SB-226552, AJ-9677, BMS-196085 и тому подобные), аппетит-подавляющие агенты на основе пептидов (например, лептин, CNTF и тому подобные), агонисты холецистокинина (например, линтитрипт, FPL-15849 и тому подобные) и тому подобные.

Диуретики включают, например, производные ксантина (например, салицилат теобромина натрия, салицилат теобромина кальция и тому подобные), составы с тиазидом (например, этиазид, циклопентиазид, трихлорметиазид, гидрохлортиазид, гидрофлуметиазид, бентилгидрохлортиазид, пентфлутизид, политиазид, метиклотиазид и тому подобные), составы с антиалдостероном (например, спиронолактон, триамтерин и тому подобные), ингибиторы декарбоксилазы (например, ацетазоламид и тому подобные), составы с хлорбензенсульфонамидом (например, хлорталидон, мефрузид, индапамид и тому подобные), азоземид, изосорбид, этакриновая кислота, пиретанид, буметанид, фуросемид и тому подобные.

Химиотерапевтические агенты включают, например, алкилирующие агенты (например, циклофосфамид, ифосфамид и тому подобные), антагонисты метаболизма (например, метотрексат, 5-флуороурацил и тому подобные), антираковые антибиотики (например, митомицин, адриамицин и тому подобные), антираковые агенты растительного происхождения (например, винкристин, увиндезин, таксол и тому подобные), цисплатин, карбоплатин, этопозид и тому подобные. Из этих веществ предпочитаемыми являются производные 5-флуороурацил, такие как фуртулон и неофуртулон.

Иммунотерапевтические агенты включают, например, компоненты микроорганизмов или бактерий (например, производные мурамилдипептида, пицибанил и тому подобные), полисахариды, имеющие иммуноусиливающую активность (например, лентинан, сизофилин, крестин и тому подобные), цитокины, полученные при помощи технологии генной инженерии (например, интерферон, интерлейкин (IL) и тому подобные), колониестимулирующие факторы (например, колониестимулирующий фактор гранулоцитов, эритропоэтин и тому подобные) и тому подобные, среди этих веществ предпочтительными являются IL-1, IL-2, IL-12 и тому подобные.

Иммуноподавляющие агенты включают, например, ингибитор кальциневрина /модуляторы иммунофилина, такие как циклоспорин (Сандимун, Генграф, Неорал), такролимус (Програф, FK506), ASM 981, сиролимус (RAPA, рапамицин, Рапамун), или его производное SDZ-RAD, глюкокортикоиды (преднизон, преднизолон, метилпреднизолон, дексаметазон), ингибиторы синтеза пуринов (микофенолат мофетил, MMF, Селлсепт(R), азатиоприн, циклофосфамид), антагонисты интерлейкина (базиликсимаб, даклизумаб, деоксиспергуалин), лимфоцит-зависимые агенты, такие как антитимоцита глобулин (Тимоглобулин, Лимфоглобулин), анти-CD3 антитело (ОКТ3), и тому подобные.

Кроме того, агенты, чье помогающее при кахексии действие установлено на животной модели или при клинических исследованиях, такие как ингибиторы циклооксигеназы (например, индометацин и тому подобные) [Cancer Research, Vol.49, page 5935-5939, 1989], производные прогестерона (например, ацетат мегестрола) [Journal of Clinical Oncology, Vol.12, page 213-225, 1994], глюкостероиды (например, дексаметазон и тому подобные), агенты на основе метоклопрамида, агенты на основе тетрагидроканнабинола, агенты, улучшающие метаболизм липидов (например, эйкосапентаеновая кислота и тому подобные) [British Journal of Cancer, Vol.68, page 314-318, 1993], гормоны роста, IGF-1, антитела к TNF-альфа, LIF, IL-6 и онкостатин M также могут применяться вместе с соединениями настоящего изобретения.

Настоящее изобретение в дальнейшем иллюстрируется следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Содержание всех ссылок и опубликованных патентов и заявок на патенты, цитируемых в заявке, включены в настоящую заявку путем ссылки.

### Примеры изобретения

Настоящее изобретение, описанное на данный момент в целом, будет лучше понято благодаря ссылкам на следующие примеры, которые включены только с целями иллюстрации определенных аспектов и модификаций настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как ограничивающие изобретение, поскольку специалист распознает из данных здесь описаний и следующих примеров, другие способы, агенты, соединения, или способы анализа данных, все без ограничения, которые могут быть применены, не выходя за заявленный объем формулы изобретения.

Содержание всех патентов, заявок на патенты, публикаций патентов или научных статей, цитируемых в любом месте этой заявки, включены в настоящую заявку путем ссылки в полном объеме.

Практика настоящего изобретения использует в случае соответствия и если не указано иное, стандартные техники клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, вирусологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, известные специалистам. Такие техники описаны в литературе. См., например, Молекулярное клонирование: лабораторное пособие, 3е изд., под ред. Sambrook и Russell (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2001); учебник Способы в энзимологии (Academic Press, Inc., N.Y.); Применение антител, вторая редакция под ред. Harlow и Lane, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Действующие протоколы в клеточной биологии, под ред. Bonifacino, Dasso, Lippincott-Schwartz, Harford, и Yamada, John Wiley и Sons, Inc., New York, 1999; и Протоколы ПЦР, под ред. Bartlett et al., Humana Press, 2003.

#### Пример 1. Идентификация CoQ10 как MBM.

Для того чтобы оценить CoQ10 как потенциальную MBM, CoQ10 в окисленной форме был экзогенно добавлен к группе клеточных линий, включая как линии раковых клеток, так и линии нормальных контрольных клеток, и были оценены изменения, вызванные в профиле клеточного микроокружения для каждой клеточной линии из группы. Были оценены изменения в клеточной морфологии/физиологии и в составе клетки, включая уровни мРНК и белков, и проведено сравнение по этим параметрам больных и здоровых клеток. Результаты этих экспериментов идентифицировали CoQ10 и, в особенности, окисленную форму CoQ10, как MBM.

В первой серии экспериментов изменения в клеточной морфологии/физиологии были оценены при исследовании чувствительности и апоптозного ответа клеток к CoQ10. Группа линий клеток кожи, включающая контрольные клеточные линии (в первую очередь культуру кератиноцитов и меланоцитов) и несколько линий раковых клеток кожи (SK-MEL-28, неместазирующая меланома кожи; SK-MEL-2, метастазирующая меланома кожи; или SCC, плоскоклеточная карцинома; PaCa2, клеточная линия рака поджелудочной железы; или HEP-G2, клеточная линия рака печени) были подвергнуты воздействию различных концентраций коэнзима Q10. Результаты этих экспериментов показывают, что линии раковых клеток демонстрируют дозозависимый ответ, отличный от ответа линий контрольных клеток, при этом индукция апоптоза и смерть клеток происходят только в раковых клетках. Примеры экспериментов описаны детально в примере 3 ниже.

Затем были проведены исследования для оценки изменений в составе клеток после обработки CoQ10. Изменения в экспрессии генов на уровне мРНК анализировались с использованием метода ПЦР в режиме реального времени. Примеры экспериментов описаны детально в примерах 6 и 9-13 ниже. В дополнительных экспериментах, изменения в экспрессии генов по уровню белка анализировались с использованием метода антител на микрочипах, 2-мерного геля электрофореза, за которым следовала идентификация белка с использованием масс-спектрометрии, и иммуноблоттинга. Примеры экспериментов описаны детально ниже в примерах 4, 7 и 8, соответственно. Результаты этих исследований де-

монстрируют, что важные изменения в экспрессии генов как по уровню мРНК, так и по уровню белка, были вызваны в исследуемых клеточных линиях благодаря добавлению окисленной формы CoQ10. Было обнаружено, что гены, модулированные воздействием CoQ10, группировались по различным клеточным путям, включая апоптозы, биологию рака и роста клетки, гликолиз и метаболизм, молекулярный транспорт и клеточный сигналинг.

Были проведены эксперименты для подтверждения вхождения CoQ10 в клетку и определения концентрации и формы CoQ10, присутствующего в клетке. В частности, концентрация коэнзима Q10, а также форма CoQ10 (т.е., окисленная или восстановленная), присутствующего в митохондриях, была определена путем анализа богатых митохондриями препаратов, выделенных из клеток, обработанных CoQ10. Было подтверждено, что концентрация коэнзима Q10, присутствующего в митохондриях, возрастает время- и дозозависимым образом при добавлении экзогенного Q10. Непредсказуемым и неожиданным результатом явилось то, что было установлено присутствие CoQ10 в митохондриях преимущественно в окисленной форме. Кроме того, изменения в концентрациях белков из богатых митохондриями образцов были проанализированы с использованием 2-D гель электрофорезов и идентификации белка путем масс-спектрометрии. Результаты этих экспериментов показали, что концентрации окисленной формы CoQ10 в митохондриях, определяемые на различных временных точках, коррелируют с широким многообразием клеточных изменений, что доказывается путем модуляции мРНК и концентраций белка для специфических белков, связанных с путями метаболизма и апоптоза. Примеры экспериментов детально описаны в примере 5 ниже.

Результаты, описанные здесь заявителями, идентифицировали эндогенную молекулу CoQ10 и, в особенности, окисленную форму CoQ10, как MBM. Например, результаты идентифицировали CoQ10 как MBM, поскольку наблюдалось, что CoQ10 вызывал изменения в экспрессии генов как по уровню мРНК, так и по уровню белка. Результаты показали, что CoQ10 имеет многоаспектный характер, поскольку CoQ10 вызывал различные изменения в клеточной морфологии/физиологии и клеточном составе (например, различные изменения в экспрессии генов как по уровню мРНК, так и по уровню белка), в состоянии болезни (например, раке) по сравнению с нормальным (например, нераковым) состоянием. Больше того, результаты показали, что CoQ10 имеет многоаспектный характер, поскольку CoQ10 был способен входить в клетки и таким образом демонстрировал как терапевтическое действие, так и функции носителя.

Пример 2. Способы идентификации связанных с болезнью процессов и биомаркеры метаболических нарушений.

Из клеточных исследований, в которых клеточные линии обрабатывались изучаемыми молекулами, по количеству мРНК, количеству белковых антител и по 2D гель-электрофорезу были оценены различия между обработанными и необработанными клетками. Белки, идентифицированные по сравнительным анализам образцов как модулированные MBM или эпигенетическим переключателем, оценивались по перспективе системной биологии с использованием анализа метаболизма (программа Ingenuity IPA) и обзору известной литературы. Белки, идентифицированные как потенциальные терапевтические или биомаркерные мишени, подвергались подтверждающим анализам, таким как иммуноблоттинг, нокаут мРНК или создание рекомбинантных белков и характеризующие способы.

#### **Материалы и способы для примеров 3-8**

Коэнзим Q10 исходный раствор.

А 500 мкМ коэнзима Q10 (5% изопропанол в среде для роста клеток) был приготовлен следующим образом. 10 мл 500 мкМ исходного раствора коэнзима Q10 готовился свежим каждый раз.

Молекулярный вес:  $863,34 \text{ (0,0005 моль/л)} \cdot (0,010 \text{ л}) \cdot (863,34 \text{ г/моль}) = 0,004317 \text{ г}$ .

Чтобы приготовить 10 мл 500 мкМ исходного раствора, 4,32 мг коэнзима Q10 взвешивалось в 15 мл пробирке Falcon, и добавлялось 500 мкл изопропанола. Раствор нагревался на 50-60 °C водяной бане при перемешивании до полного растворения. К этому раствору добавлялось 9,5 мл среды (той же среды, в которой росли клетки).

Клеточная культура.

Клетки были получены из коллекции культур американского типа или Gibco. Клетки выращивались в среде DMEM/F-12 с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки, 0,25 мкг/мл амфотерицина, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 U мл<sup>-1</sup> пенициллина. Клетки содержались в атмосфере 95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

Обработка коэнзимом Q10 и выделение общего белка.

Клетки росли до 85% заселенности до того, как их подвергали влиянию Q10. В среду добавили Q10 в таком количестве, чтобы получить 50 и 100 микромолярные концентрации. Колбы были разделены на контроль, 50 мкМ Q10 и 100 мкМ Q10. Белок был выделен из обработанных и контрольных колб через 4, 8, 12 и 24 ч. Для выделения белков клетки были промыты три раза 5 мл ледяного PBS с pH 7,4. Затем клетки были промыты в 3 мл PBS, осаждены центрифугированием и ресуспендированы в лизирующем буфере с pH 7,4 (80 mM TRIS-HCl, 1% SDS, с ингибиторами протеазы и фосфатазы). Концентрации белка были подсчитаны с использованием метода BCA.

Клеточные линии.

Клеточные линии, перечисленные ниже, были размножены и для каждой создан клеточный банк. Было получено большое число клеток для различных исследований и собран материал для анализов. Как правило, когда для поддержания клеточных линий не требовалась определенная клеточная среда, используемой для роста клеток средой была DMEMF-12 с 5% сывороткой. Клетки как правило росли до 75-80% заселенности (свободного пространства) перед сбором и использованием в клеточных исследованиях и последующими стандартными способами. Для экспериментов были взяты следующие клеточные линии:

SK-MEL-28 (неметастазирующая меланома кожи),  
 SK-MEL-2 (метастазирующая меланома кожи),  
 HEKa (кератиноциты, кожный контроль),  
 HEMa (меланоциты, кожный контроль),  
 nFIB (неонатальные фибробласты),  
 HEP-G2 (рак печени) [SBH линия клеток],  
 SkBr-3 (рак молочной железы, Her2 сверхэкспрессия),  
 MCF-7 (рак молочной железы, p53 мутация),  
 PC-3 (рак простаты) [SBH линия клеток],  
 SkBr-3 (аденокарцинома молочной железы человека),  
 NCI-ES-0808,  
 SCC (плоскоклеточная карцинома),  
 PaCa-2 NIH-3T3.

Клеточная культура:

Клетки были получены из коллекции культур американского типа или Gibco. Клетки выращивались в среде DMEM/F-12 с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки, 0,25 мкг/мл амфотерицина, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 U мл-1 пенициллина. Клетки содержались в атмосфере 95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

Клетки злокачественной меланомы кожи SK-MEL28 росли и содержались DMEM/F12 с Глютамаксом (Invitrogen, Carlsbad, Калифорния) с добавкой 5% FBS, амфотерицина и пенициллина/стрептомицина. Клетки росли при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Детали дополнительных клеточных линий и условий роста перечислены в таблице ниже.

Таблица 1. Клеточные линии, анализированные на чувствительность к Q10

| Клеточная линия | Описание                       | Условия роста  |
|-----------------|--------------------------------|--|
| PaCa2           | Карцинома поджелудочной железы | DMEM/F12 с Глютамакс + 10%FBS, 2.5% лошадиная сыворотка, амфотерицин, пенициллин/стрептомицин.                               |
| HerG2           | Гепатоцеллюлярная карцинома    | MEM с солями Eagles с добавлением 10% FBS, амфотерицина, пенициллина/стрептомицина, пирувата натрия и заменимых аминокислот. |
| PC3             | Аденокарцинома простаты        | DMEM/F12 с Глютамакс с добавлением 5%FBS, амфотерицина и пенициллина/стрептомицина.  |
| SKBr3           | Рак молочной железы            | DMEM/F12 с Глютамакс с добавлением 5% FBS и амфотерицина, пенициллина/стрептомицина.   |
| MCF-7           | Рак молочной железы            | DMEM/F12 с Глютамакс с добавлением 5% FBS и амфотерицина, пенициллина/стрептомицина.   |

Обработка Q10 SKMEL28 клеток.

SK-MEL28 клетки были обработаны 100 мкМ Q10 или контрольным раствором. Q10 был приготовлен следующим образом. В 15 мл пробирку с крышкой было перенесено 4,32 мг Q10 (производство Cytotech) и затем растворено добавлением 500 мкл изопропанола. Получившийся раствор был нагрет на 65°C водяной бане и размешан на вортексе на большой скорости. Раствор Q10/изопропанола был доведен до объема 10 мл добавлением отстоявшейся среды для клеточной культуры. Исходный раствор затем был размешан на вортексе для достижения максимальной растворимости Q10. Исходный раствор был разведен (2 мл исходного раствора и 8 мл среды) для получения конечной концентрации 100 мкМ Q10. Для контрольного раствора к 9,5 мл среды было добавлено 500 мкл изопропанола. Контрольный исходный раствор был затем разведен (2 мл исходного раствора) 8 мл среды. Клетки собирались через 6, 16, 24, 48 или 72 ч после начала обработки.

Обработка Q10 клеток SCC.

SCC клетки были обработаны 100 мкМ Q10 (подготовленным как описано выше) или 6 часов, или 24 часа. Контрольными клетками были необработанные клетки. Клетки были собраны и осаждены через различное время после обработки и осадок был заморожен свежим и хранился при -80 °C, пока РНК

не было выделено по XTAL как описано ниже. Выделение РНК:

Клетки после различного времени обработки были лизированы для выделения РНК с использованием RNeasy Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia CA) по инструкциям производителя. РНК было подсчитано путем определения оптической плотности при 260 нм.

Синтез первой нити.

Первая нить кДНК была синтезирована с 1 мкг общей РНК с использованием набора для синтеза первой нити RT2 (SABiosciences., Frederick Мэриленд) по рекомендациям производителя.

ПЦР в режиме реального времени.

Продукты синтеза первой нити были растворены в воде, смешаны с SYBR зеленой мастер-микс (реакционная смесь, SABiosciences., Frederick, Мэриленд) и помещены в прибор для ПЦР анализа. ПЦР в режиме реального времени была осуществлена для нескольких аналитических наборов (апоптозные анализы, диабетические анализы, анализы окислительного стресса и оксидантной защиты, и анализы белков теплового шока) (SABiosciences, Frederick, Мэриленд) на Biorad CFX96.

Определение чувствительности клеточных линий к коэнзиму Q10 путем Nexin анализа для апоптозов.

Процент клеток в раннем и позднем апоптозах был подсчитан через 24 ч после обработки коэнзимом Q10. Ранний и поздний апоптозы использовались как маркеры для понимания различий в чувствительности различных линий раковых клеток к коэнзиму Q10. Различными тестируемыми клеточными линиями были PaCa2, HepG2, PC-3, SKBr3, MCF-7 и SK-MEL28. Клеткам дали адгезировать в течение ночи в 96-луночных планшетах. Эти клетки были обработаны контрольным раствором, 50 мкМ Q10 или 100 мкМ коэнзима Q10. Через 24 часа наличие апоптозных клеток было оценено на проточном цитометре PCA96 (Guava Technologies, Hayward, Калифорния). Кроме того, некоторые клетки были обработаны 4 мкМ Стауропоорином в течение 2 ч в качестве позитивного контроля на апоптозы. Клетки были промыты PBS и диссоциированы 50 мкл Accumax (Innovative Cell Technologies, San Diego, Калифорния) при комнатной температуре. Диссоциация была остановлена добавлением культуральной среды, содержащей 1% Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich, St.Louis, Миссури). Затем 100 мкл Nexin реагента (Guava Technologies, Hayward, Калифорния) было добавлено в каждую лунку. Через 20 минут инкубации в темноте исследование проводилось в чашках со слабой адгезией для минимизации повторного присоединения клеток к субстрату. Nexin реагент содержит два красителя. Annexin-V-PE, который определяет уровень фосфотидил серина на внешней стороне клеток, характеризует ранние апоптозные клетки. Второй краситель, 7-AAD проникает только в поздние апоптозные клетки, что отличает их от живых (здоровых) и ранних апоптозных клеток. Процент четырех популяций клеток: живых, ранних апоптозных, поздних апоптозных и остатков клеток определялся с использованием программы Cytosoft 2.5.7 (Guava Technologies, Hayward, Калифорния).

Иммуноблоттинг.

Примерно 50 мкг белка исследовалось на образец путем иммуноблоттинга. Все эксперименты были поставлены трижды плюс контроль. Белки были разделены в 12% TRIS-HCl геле, перенесены путем электрофореза на нитроцеллюлозные мембраны и блокированы с использованием 5% сыворотки и TBST раствором перед инкубацией с первичными антителами. Первичные антитела инкубировались в течение ночи при 4°C в 5% BSA и TBST растворе. Вторичные антитела инкубировались в течение одного часа при 4°C. Все антитела были получены по технологии клеточной сигнализации. Антитела были использованы в соотношении 1:1000, за исключением  $\beta$ -актина, соотношение которого составляло 1:5000. Блоты были получены и результаты были подсчитаны с использованием NIH Java денситометра и программы Image J. Все блоты были также исследованы и нормализованы по соответствующей экспрессии  $\beta$ -актина.

Двухмерные электрофорезы.

Перед изоэлектрическим фокусированием (IEF), образцы были растворены в 40 mM Tris, 7 M мочеvine, 2 M тиомочевине, и 1% C7 цвиттерионным детергентом, восстановлены трибутилфосфином и алкилированы 10 mM акриламидом в течение 90 мин при комнатной температуре. После этого образцы были проведены через 10-кДа прибор Amicon Ultra, по меньшей мере, с 3 объемами ресуспендирующего буфера, содержащего 7 M мочеvinu, 2 M тиомочевину и 2% CHAPS для восстановления проводимости образца. Одна сотня микрограмм белка была подвергнута IEF при 11-см pH от 3 до 10, pH от 4 до 7 или pH от 6 до 11 на полосках с фиксированным градиентом pH (GE, Amersham, USA) to 100,000 вольт-час. После IEF, полоски с фиксированным градиентом pH были откалиброваны в 6 M мочеvine, 2% SDS, 50 mM Tris-ацетат буфере, pH 7,0, и 0,01% бромфеноле голубом и поставлен SDS-полиактриламид гель электрофорез на 8-16% Tris-HCl Precast Gel, 1 мм (Bio-Rad, USA). Электрофорезы в геле были поставлены дважды. Затем они останавливались в SYPRO Ruby, 80 мл/гель (Invitrogen, USA) и получали их изображение на Fuji FLA-5100 лазерном сканере или переносили на PVDF мембрану.

Дополнительная информация была получена для контрольных образцов для определения полезности белковой идентификации при использовании способов, которые используют dPC (Protein Forest Inc.) избирательное pI фракционирование, за которым следует трипсиновое расщепление dPC комплек-

сом с масс-спектрометрии идентификацией и полу-подсчетом (Nanomate или LC/LTQ/MS). The dPC анализы, проведенные с контрольными образцами, показали свою полезность для идентификации большой субпопуляции белков. Материалы, полученные в ходе исследований, были направлены в архив, так чтобы их можно было использовать в качестве источника для необходимых в будущем исследований.

Анализ изображений 2D-геля.

Анализы всех изображений геля были осуществлены с использованием Progenesis Discovery и Pro (Nonlinear Dynamics Inc., Newcastle upon Tyne, Великобритания). После детекции точек, совмещения, фоновой субтракции, нормализации и фильтрации данные для SYPRO Ruby геля изображений были экспортированы. Парные сравнения между группами были проведены с использованием критерия Стьюдента для идентификации точек, экспрессия которых достоверно изменилась ( $p > 0,05$ ).

Исследование с помощью антител.

Микрочип для антител (Panorama XP725 Antibody Array, Sigma) был использован для скринингового исследования с помощью 700 белковых антител для оценки изменений в уровнях концентрации белков в обработанных Q10 клетках (SK-MEL-28, SCC). Экспрессия белка в клеточном экстракте устанавливалась, когда белок связывался с соответствующим антителом, помещенным на пластинку. Перед связыванием белки прямо метились флюоресцентным красителем, который потом использовался для флюоресцентной визуализации и количественного анализа. Исследование использовалось для сравнения белковых профилей экспрессии в двух образцах (исследуемый и референсный образцы), каждый метился различным Су красителем (Су3 или Су5) и два образца использовались совместно в равных белковых концентрациях в исследовании. Интенсивность флюоресцентного сигнала для каждого образца затем записывалась отдельно на длине волны, соответствующей красящей метке образца, и сравнивалась.

Высокие дозы коэнзима Q10 регулируют экспрессию генов, включенных в апоптозный, диабетический и окислительного стресса пути в культивируемых SKMEL-28 клетках.

Детали эксперимента.

SKMEL-28 клетки (ATCC Каталог # HTB-72) являются неместастазирующими клетками меланомы кожи, которые выращивались в среде DMEM/F-12, содержащей Глутамакс (Invitrogen Cat# 10565-042), с добавлением 5% FBS, пенициллина, стрептомицина и амфотерицина, были обработаны средой или 100 мкМ коэнзима Q10 в течение различного времени. Любые изменения в экспрессии генов, следовавшие за обработкой коэнзимом Q10, были подсчитаны с использованием методов ПЦР в режиме реального времени (Apoptosis Cat #PAHS-12, Diabetes Cat #PAHS-023 и Oxidative Stress Cat #PAHS-065). (SABiosciences, Frederick, Мэриленд).

Исходная концентрация 500 мкМ коэнзима Q10 была приготовлена путем растворения 4,32 мг в 500 мкл изопропанола, который затем разводился до 10 мл добавлением среды. Альтернативно выполнялось перемешивание и нагрев до 65°C растворенного Q10. 2 мл исходного раствора разводилось до 10 мл средой для получения среды, содержащей 100 мкМ Q10, которая использовалась для обработки клеток. Параллельно готовился контрольный раствор по тому же протоколу, за исключением того, что коэнзим Q10 не добавлялся.

SKMEL-28 клетки были помещены с плотностью  $1 \times 10^5$  клеток на лунку в 6-луночный планшет. Через 24 ч, когда клетки прикрепились и заселенность составляла 50%, добавили контрольный раствор или 100 мкМ Q10. Клетки были собраны через 6, 16, 24, 48 или 72 ч после обработки Q10, а обработанные контрольным раствором клетки были собраны через 24 ч. Клетки лизировались для выделения РНК в течение различного времени обработки с использованием мини-набора RNeasy (Qiagen, Inc., Valencia, Калифорния, Cat #74104) по инструкциям производителя с использованием микроцентрифуги и обработки ДНКазой. Количество РНК определялось при определении оптической плотности на 260 нм.

ПЦР в режиме реального времени проводилось путем синтеза с первой нити кДНК с использованием 0,4-1 мкг общей РНК в качестве матрицы с использованием набора синтеза первой нити RT2 (SABiosciences, Frederick, Мэриленд, Cat# C-03) с этапом элиминации геномной ДНК в соответствии с рекомендациями производителя. Продукты синтеза с первой нити были растворены в воде, смешаны с SYBR зеленой мастер-микс (реакционная смесь, SABiosciences, Frederick, Мэриленд, Cat#PA-010-12) и с ними были проведены ПЦР-анализы с праймерами для 84 различных генов, связанных с обычным метаболизмом, 5 конститутивных генов, использованных для нормализации, обратной транскрипции и ПЦР-контроля. ПЦР в режиме реального времени проходила в Biogad Cfx96. Амплификация была начата горячим стартом для активации фермента, продолжалась 40 циклов (95°C -15 секунд этап денатурации и 60°C - 1 минута этап отжига и удлинения), с последующей программой кривой плавления. Значения  $C_t$ , полученные от ПЦР термоциклера по всем обработанным группам, были занесены в таблицу Excel и загружены в программу сравнительного анализа, доступную по адресу [www.sabiosciences.com/prct/arrayanalysis.php](http://www.sabiosciences.com/prct/arrayanalysis.php).

Очистка богатых митохондриями образцов.

Детали эксперимента: SKMEL-28, NCI-ES0808 и NIH-3T3 клетки, обработанные 100 мкМ Q10 24 или 48 ч вместе с клетками, которые были собраны при  $t=0$ , промыты и извлечены из колб T160. Клет-

ки центрифугировали, собрали осадок, заморозили и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до выделения митохондрий. Клеточный осадок был разморожен, ресуспендирован и измельчен в гомогенизаторе Даунса. Гомогенат был центрифугирован и митохондрии выделены с использованием реагентов и протокола, рекомендованных набором выделения митохондрий для культурных клеток (MitoSciences, Eugene, Орегон, Cat # MS852). Фракция митохондрий была разделена на аликвоты и хранилась при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Способ подсчета Коэнзима Q10 и Убихинола-10.

Способ одновременного определения коэнзима Q10 (Q10) и восстановленной формы убихинола-10 (Q10H2) был выполнен на основе недавно опубликованного способа (Ruiz-Jimenez, 2007, J. Chromatogr. A, 1175, 242-248) благодаря использованию LC-MS/MS с ионизацией электрораспылением (ESI) в режиме определения положительных ионов. Возможны высоко избирательная идентификация и чувствительный подсчет Q10 и Q10H2, вкуче с идентификацией других выбранных липидов. Аликвота богатых митохондриями образцов из SK-MEL-28, обработанных 100 мкМ Q10, была подвергнута стандартной пре-обработке, основанной на осаждении белка (100 мкл клеточного осадка, диспергированного ультразвуком в 300 мкл 1-пропанола), экстракции жидкость-жидкость (добавить 100 мкл воды к супернатанту и экстрагировать X3 200 мкл н-гексана), выпаривании комбинированных гексановых экстрактов до высыхания и восстановлению в 50 мкл of 95:5 метанол/гексан (по объему). Анализ был проведен LC-MS/MS на Waters Quattro II тройном квадрупольном масс-спектрометре с Prism RP  $1\times 100$  мм, колонками с частицами размером 5 мкм (Keystone Scientific). Изократическое элюирование с 4 мМ формиата аммония в смеси 20% изопропилового спирта и 80% метанола со скоростью потока 50 мкл/мин. Было введено десять мкл каждого образца. MRM анализ был проведен с использованием m/z 882,7>197,00 (Q10H2) и m/z 880,80>197,00 (Q10) переходов с напряжением на конусе 40 и энергией столкновений 30.

Пример 3. Чувствительность клеточных линий к CoQ10.

Множество клеточных линий тестировались на чувствительность к Q10 после 24 ч обработки с использованием реагента (Nexin реагент), который содержит два типа красителей, 7AAD и Annexin-V-PE. Краситель 7-AAD проникает в клетки с проницаемой мембраной, в первую очередь в те клетки, которые находятся на поздней стадии апоптоза. Annexin-V-PE - это краситель, который связывается с фосфотидил серином, который появляется на внешней поверхности плазматической мембраны у ранних апоптозных клеток. Nexin реагент таким образом может быть использован для различения популяций апоптозных клеток в проточном цитометре.

PaCa2 клетки показали увеличение как ранних, так и поздних апоптозных клеток (5-10% отобранных клеток) с 50 мкМ Q10 и 100 мкМ Q10 после 24 ч обработки Q10. PC-3 клетки также показали увеличение как ранней, так и поздней апоптозной популяции с 50 мкМ и 100 мкМ Q10, хотя возрастание было меньше по сравнению с PaCa2 клетками. MCF-7 и SK-MEL28 клетки показали возрастание только ранней апоптозной популяции с 50 мкМ и 100 мкМ Q10. HepG2 клетки также были чувствительны к обработке 50 мкМ Q10, где наблюдалось возрастание поздних апоптозных и ранних апоптозных стадий на около 20% от отобранных клеток. SKBr3 была единственной исследованной клеточной линией, которая не показала никакого значимого увеличения ранних и поздних апоптозов при обработке как 50 мкМ, так и 100 мкМ Q10. Результаты представлены на фигурах 1-6.

Для того чтобы получить дополнительное подтверждение, что воздействие Q10 приводит к апоптозному ответу у HepG2 раковых клеток печени, второе апоптозное исследование было оценено с использованием основанного на ApoStrand™ ELISA метода, где подсчитывались одонитевые ДНК. The ApoStrand™ ELISA основывается на чувствительности ДНК в апоптозных клетках к денатурации формамидом и на детекции денатурированных ДНК моноклональными антителами к одонитевым ДНК (онДНК). Обработка раковых клеток печени линии HepG2 50 и 100 мкМ Q10 привела к детектируемым апоптозам, с дозозависимым ответом в 17 и 32%, соответственно (фигура 7). Эти результаты совпадают с наблюдением индуцированных Q10 апоптозов в других линиях раковых клеток из других тканей (например, SCC, SKMEL-28, MCF-7, и PC-3).

Пример 4. Протеомический анализ клеток, обработанных Q10.

Клеточный осадок образцов, обработанных Q10, был анализируем с использованием протеомических методов. Клеточные осадки были лизированы и обработаны с использованием 2-D геля и иммуноблоттинга. Три клеточных типа (SKMEL-28, SCC, и nFib) были обработаны Q10 и подвергнуты протеомической характеристике путем 2-D геля электрофореза. Протеометический анализ SKMEL-28 клеток, обработанных Q10.

В первой экспериментальной серии, проведенной и оцененной путем иммуноблоттинга и 2-D геля электрофореза, участвовала линия клеток рака кожи SKMEL-28. Эта экспериментальная серия включала SK-MEL-28 клетки, обработанные 3, 6, 12 и 24 ч 0, 50 или 100 мкМ Q10.

Обработанные Q10 образцы SK-MEL-28 были подвергнуты 2-D геля электрофорезу (фиг. 8) и анализировались на идентификацию изменений в концентрациях белка по сравнению с контрольными образцами. Был проведен сравнительный анализ 943 точек в двадцати четырех гелях, где сравнивались контрольный образец и все обработанные образцы. Анализы включали идентификацию изменений на



точках во времени, из-за возрастания, снижения или пост-трансляционной модификации.

Анализы обнаружили тридцать два статистически достоверно различимых точечных изменений. По ним двадцать статистически неопределимых точки были извлечены и подвергнуты белковой идентификации путем расщепления трипсином и масс-спектрометрии. Охарактеризованные пептиды были найдены в белковой базе данных с помощью аналитической программы Mascot и MSrAT для идентификации белков (табл. 2).

Таблица 2. Белки, идентифицированные как показавшие различную реакцию на обработку Q10 в клетках SKMEL-28

| Время (ч) | Q10 Конц. (мкМ) | 2D точка # | Экспрессия | Разница | Белок  | Название | Тип                  |
|-----------|-----------------|------------|------------|---------|--|----------|----------------------|
| 3         | 50              | 528        | понижилась | 1,234   | Катепсин D   | CTSD     | пептидаза            |
| 3         | 50              | 702        | понижилась | 1,575   | Шаперонин содержащий TCP1, субъединица 3             | CCT3     | другое               |
| 3         | 50              | 74         | понижилась | 1,383   | Фактор инициации трансляции эукариот 3               | EIF3G    | регулятор трансляции |
| 3         | 50              | 829        | понижилась | 1,074   | Рибосомальный белок P2                               | RPLP2    | другое               |
| 3         | 50              | 368        | понижилась | 1,121   | Трансальдолаза 1                                     | TALDO1   | фермент              |
| 6         | 50              | 452        | возросла   | -1,464  | Фактор инициации трансляции эукариот 6               | EIF6     | регулятор трансляции |
| 6         | 50              | 175        | возросла   | -1,32   | Стоматин; HSPC322                                    | STOM     | другое               |
| 6         | 50              | 827        | возросла   | -1,457  | Тирозин 3/Триптофан 5-монооксигеназы активации белок | YWHAZ    | фермент              |
| 6         | 50              | 139        | возросла   | -1,628  | Виментин   | VIM      | другое               |
| 6         | 50              | 218        | возросла   | -1,416  | Виментин   | VIM      | другое               |
| 6         | 50              | 218        | возросла   | -1,212  | Виментин   | VIM      | другое               |
| 6         | 50              | 139        | возросла   | -1,036  | Виментин   | VIM      | другое               |
| 6         | 50              | 507        | понижилась | 1,379   | Ламин B1   | LMNB1    | другое               |
| 6         | 50              | 571        | понижилась | 1,832   | Рецептор импорта в митохондрии Tom22                 | TOMM22   | транспортёр          |
| 12        | 50              | 166        | возросла   | -1,171  | ALG-2 интерактивный белок 1                          | PDCD6IP  | другое               |
| 12        | 50              | 550        | возросла   | -1,747  | Пептидилпролил изомераза A                           | PPIA     | фермент              |
| 12        | 50              | 613        | понижилась | 1,802   | Галектин-1   | LGALS1   | другое               |
| 12        | 50              | 242        | понижилась | 1,373   | Фосфоглицерат мутаза; фосфоманномутаза 2             | PGAM2    | фосфатаза            |
| 24        | 50              | 326        | понижилась | 1,385   | Глицил-tPHK синтаза                                  | GARS     | фермент              |
| 24        | 50              | 419        | понижилась | 1,451   | Гомолог Mago-nashi                                   | MAGOH    | другое               |
| 3         | 100             | 528        | понижилась | -1,036  | Катепсин D   | CTSD     | пептидаза            |
| 3         | 100             | 702        | понижилась | 1,151   | Шаперонин содержащий TCP1, субъединица 3             | CCT3     | другое               |
| 3         | 100             | 74         | понижилась | 1,122   | фактор инициации трансляции эукариот 3               | EIF3G    | регулятор трансляции |
| 3         | 100             | 829        | понижилась | 1,145   | Рибосомальный белок P2                               | RPLP2    | другое               |
| 3         | 100             | 368        | понижилась | 1,209   | Трансальдолаза 1                                     | TALDO1   | фермент              |
| 6         | 100             | 139        | возросла   | -1,829  | Виментин   | VIM      | другое               |
| 6         | 100             | 218        | возросла   | -1,761  | Виментин   | VIM      | другое               |
| 6         | 100             | 452        | понижилась | 1,134   | фактор инициации трансляции эукариот 6               | EIF6     | регулятор трансляции |
| 6         | 100             | 252        | понижилась | 1,4     | Sec 13 белок, Кератин II                             | ?        |                      |
| 6         | 100             | 827        | понижилась | 1,12    | Тирозин 3/Триптофан 5-монооксигеназы активации белок | YWHAZ    | фермент              |
| 12        | 100             | 76         | возросла   | -1,679  | галектин-1; кератин II                               | LGALS1   | другое               |

Ключевой находкой этого эксперимента было уменьшение трансальдолазы 1, что поддерживает предположение, что Q10 действует, изменяя метаболический статус внутри раковой клетки. Трансальдолаза 1 - фермент в пути пентозофосфата (также известного как гексомонофосфатный шунт). Трансальдолаза (EC:2.2.1.2) катализирует обратимый перенос трехуглеродной кетольной единицы с седогептулозы 7-фосфата на глицеральдегид 3-фосфат для формирования эритрозы 4-фосфата и фруктозы 6-фосфата. Этот фермент, вместе с транскетолазой, осуществляет связь между гликолитическим и пентозофосфатным путями. Это важно для синтеза нуклеотидов и синтеза НАДФН, для содействия образованию восстанавливающих эквивалентов для биосинтетических реакций и для поддержания восстановительной среды.

Недавняя публикация (Basta, P., et.al. August 2008, Cancer Detect Prevention, 32, 200-208) предоставила доказательство генетического полиморфизма трансальдолазы и была связана с плоскоклеточной карциномой головы и шеи. Другая недавняя публикация (Qian, Y., et.al. May 2008, Biochem J, 415, 123-134) идентифицировала отсутствие трансальдолазы как модулятор митохондриального гомеостаза, по-

тока  $\text{Ca}^{2+}$  и апоптозов.

По этим первичным результатам другие белки, идентифицированные путем 2-D гель-электрофореза как модулированные Q10 в SK-MEL-28, были анализированы по известным связям (фиг. 9). Функциональная оценка этих белков показала, что существует группа, участвующая в 14-3-3-опосредованном сигналинге (PDGFR, YWHAZ и VIM), наряду с отдельными белками, связанными со множеством процессов [клеточный цикл; пентозофосфатный путь (TALDO1); церамид сигналинге (CTSD); аминокислот-тРНК биосинтезе (GARS) и импорте белков в митохондрии (TOM22)].

Протеомический анализ SCC клеток, обработанных Q10.

Другая линия клеток рака кожи, плоскоклеточная карцинома (SCC), также была подготовлена и проанализирована путем 2-D гель-электрофореза, как в предыдущем эксперименте по анализу SK-MEL-28. SCC клетки были обработаны 100 мкМ Q10 в течение 6 или 24 ч до сбора. Были взяты также контрольные необработанные клетки. Клеточный осадок был лизирован, и образцы были подвергнуты 2-D электрофорезу (дважды на точку). Были проведены анализы шести сотен белковых точек в сравнительном исследовании, где контрольный образец сравнивался с шестичасовым и двадцатичетырехчасовым воздействием.

Верхние двадцать пять статистически достоверно различимых изменений на точках были оценены путем сравнительного анализа в 2-D электрофорез-геле. По ним двадцать точек были извлечены и подвергнуты белковой идентификации путем расщепления трипсином и масс-спектрометрии (результаты представлены в табл. 3 ниже).

Таблица 3. Белки, идентифицированные как показавшие различную реакцию на 100 мкМ обработку Q10 в клетках SCC на 6 и 24 ч

| Точка # | Белок   | Название | Клеточная локализация   | Функция                 | Реакция (кратное изменение)                             |
|---------|---|----------|-------------------------|-------------------------|---|
| 331     | Трансальдолаза 1  | TALDO1   | Цитоплазма              | Фермент                 | Уменьшение (1,5) на 6 и 14 ч                            |
| 23      | Человеческий BSCv (хромосома 20 рамка считывания 3)                         | C20ORF3  | Плазматическая мембрана | Стриктозидин синтаза    | Уменьшение (2,1) на 6 и 24 ч                            |
| 54      | NM23 белок  | NME1     | Ядро, (митохондрии?)    | Киназа                  | Увеличение (-1,2) на 6 ч, уменьшение на 24 ч            |
| 116     | Два человеческих ESTs из MCF7 клеточной линии рака молочной железы (HSP 70) |          |                         | HSP70                   | Уменьшение (2,6) на 6 ч, последующее уменьшение на 24 ч |
| 176     | белок теплового шока 27кДа  | HSPB1    | Цитоплазма              | Ответ на внешний стресс | Увеличение (-1,9) на 6 и 24 ч                           |
| 135     | Кератин I   | KRT1     | Цитоплазма              | Промежуточные филаменты | Уменьшение (2,3) на 6 и 24 ч                            |
| 50      | Кератин 14  | KRT14    | Цитоплазма              | Промежуточные филаменты | Увеличение (-1,6) на 6 и 24 ч                           |
| 68      | Кератин 13  | KRT13    | Цитоплазма              | Промежуточные филаменты | Увеличение (-1,5) на 6 и 24 ч                           |
| 49      | Протеасома Бета 7   | PSMB7    | Цитоплазма              | СУБЪЕДИНИЦА протеасомы  | Уменьшение (1,6) только на 24 ч                         |
| 93      | Субъединица 3 активатора протеасомы   | PSME3    | Цитоплазма              | Пептидаза               | Уменьшение (1,3) только на 24 ч                         |
| 66      | Rho GDP диссоциации ингибитор (GDI) альфа                                   | ARHGDIA  | Цитоплазма              | Ингибитор               | Уменьшение (1,5) только на 6 ч                          |
| 1       | Неизвестен?   |          |                         |                         | Уменьшение (9,5)  |

Трансальдолаза 1. Как наблюдалось ранее у SKMEL-28 клеток, обработанных Q10, фермент трансальдолаза 1 был модулирован с уменьшением в концентрациях. Это дает независимое от предыдущего наблюдения подтверждение связи между Q10 и перестройками в трансальдолазе (и таким образом в метаболическом статусе клетки).

Трансальдолаза - фермент неокислительной фазы пентозофосфатного пути, (фигура 10). Пентозофосфатный путь является ключевым моментом в метаболическом статусе клетки для образования никотинамидадениндинуклеотидфосфата (восстановленного НАДХ), для восстановительного биосинтеза

и для образования рибозы, которая является необходимым компонентом АТФ, ДНК и РНК. Трансальдолаза также связывает пентозофосфатный путь с гликолизом. Гликолиз - метаболический путь, по которому раковые клетки получают энергию, необходимую для поддержания жизни клетки, если митохондриальный процесс окислительного фосфорилирования не задействован. Q10 является необходимым коэнзимным фактором, требующимся для окислительного фосфорилирования и образования АТФ в митохондриях.

BSCv. Точка 23 была новым белком человека из Хромосомы 20, называемым BSCv. BSCv белок также известен как связанный с плазматической мембраной адипоцитов белок (названия генов: APMAP или C20orf3) и предполагается, что он является мембранным белком типа II с последовательностью, подобной белковому семейству синтаз стриктозидина. Обработка Q10 приводит к уменьшению концентраций этого белка. Этот белок не очень хорошо охарактеризован, и его гомология с стриктозидин синтазами не подвержена. Интересно, что этот белок связывается с ролью в дифференциации адипоцитов (Albrektzen et al., 2001). Недавние протеомические исследования человеческой сальниковой жировой ткани идентифицировали BSCv как один из девяти белков с различной экспрессией при поликистозном синдроме яичников (ПКСЯ) у страдающих ожирением женщин (Corton, 2008 Hum. Reprod. 23: 651-661). Поскольку он является белком клеточной оболочки, который реагирует на Q10, антитело к BSCv было бы полезно и как биомаркер. На основании настоящих результатов и доступной литературы, BSCv потенциально может играть роль при раке и диабете.

NM23A. Неметастатических клеток 1, белок (NM23A, также известный как NME1), считающийся метастатическим супрессором. Этот ген (NME1) был идентифицирован, поскольку уровни его мРНК транскриптов падают в высоко метастазирующих клетках. Белок обладает активностью как нуклеозид дифосфат киназа (НДК) и существует как гексамер, состоящий из 'А' (кодируемой этим геном) и 'В' (кодируемой NME2) изоформ. Мутации по этому гену идентифицированы в агрессивных нейроblastомах. Активность NDK поддерживает равновесие между концентрациями различных нуклеозидтрифосфатов, как, например, при превращении GTP, образующегося в цикле лимонной кислоты (Кребса), в АТФ. Комплекс NDK связывается с p53 через взаимодействие с STRAP. Следует заметить, что STRAP связан с HNF4A. Таким образом, NM23A является потенциальным белком, участвующим в путях, важных для клеточного контроля и лечения болезни.

Rho GDP диссоциации ингибитор (GDI) альфа: GDI регулирует GDP/GTP обменную реакцию Rho белков путем ингибирования диссоциации GDP от них, и последующего связывания GTP с ними. Белок показывает повышающую регуляцию в раковых клетках.

Пример 5. Анализы митохондриального обогащения.

Доказательства по нескольким линиям подтвердили, что оценка тесной связи роли митохондриальных белков и биологии рака и реакции на Q10 является достоверной. Во-первых, Q10 в процессах митохондриального окислительного фосфорилирования для образования энергии в нормальных клетках играет необходимую роль. Однако метаболическое переключение, которое происходит в раковых клетках, приводит к тому, что энергия образуется по альтернативному пути гликолиза, не требующему Q10. Во-вторых, апоптотный ответ клеток требует наличия митохондриальных белков. Установлено, что Q10 стимулирует апоптозы в раковых клетках (семейство белков Bcl-2, цитохром c). Наконец, новые митохондриальные белки идентифицированы как модулированные воздействием Q10, что показано изменением уровня белка в митохондриях при импорте рецепторного белка TOM22 (см. эксперименты, описанные здесь).

Получение богатых митохондриями образцов.

Клетки рака кожи SKMEL-28 были обработаны 100 мкМ Q10 или пустым раствором в течение 6, 19 или 48 ч. Клетки были собраны путем промывки и соскабливания клеток с T-160 колб (4 на каждую временную точку). Клетки были собраны путем центрифугирования, и осадок был заморожен и хранился при -80°C. Клеточный осадок был ресуспендирован и разрушен с использованием 2 мл гомогенизатора Dounce. Реагенты и способы были получены из набора для выделения митохондрий для культивируемых клеток (MitoSciences, Cat# MS852). Получившиеся в результате образцы митохондрий были разделены на 75 мкл аликвоты (4-5 аликвот на образец) и хранились при -80°C.

Протеомический анализ богатых митохондриями образцов, выделенных из SK-MEL-28 клеток, обработанных Q10.

2-D гель-электрофорез был осуществлен на белках, растворенных из двух аликвот SK-MEL-28 богатых митохондриями образцов, обработанных 100 мкМ Q10 в течение 6, 19 и 48 часов (одновременно с соответствующими обработанными пустым раствором контролями). Образцы были подвергнуты 2-D электрофорезу (дважды на каждой точке). Были проведены анализы 525 белковых точек в сравнительном исследовании, где контрольный образец сравнивался с образцами других временных точек (фигура 11).

Девять статистически достоверно различимых изменений на точках были выбраны для сравнительного анализа в 2-D электрофорез-геле. По ним 9 точек были извлечены и подвергнуты белковой идентификации путем расщепления трипсином и масс-спектрометрии.

Таблица 4. Белки, идентифицированные как показавшие различную реакцию на обработку Q10 в

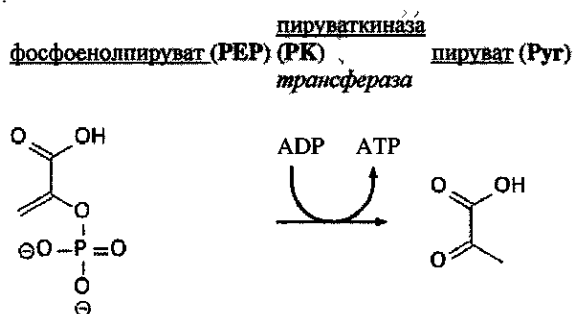
## SKMEL-28 митохондриях

| Spot # | Белок   | Название | Функция   | Реакция (кратное изменение)                                     |
|--------|---|----------|---|---|
| 11     | Неизвестный белок                                       | ?        | ?   | Повышение (1,3) на 6 ч, после этого снижение на низкие уровни   |
| 131    | Неизвестен, такой же как на точке #11, модифицированный | ?        | ?   | Понижение (1,3) на 6 ч, еще более сильное снижение на 19 и 48 ч |
| 279    | ацил-СоА тиазстеразы 7<br>изоформа hBACHb               | ACOT7    | Расщепление жирных ацил-СоА на свободные жирные кислоты и СоА   | Понижение (1,3) на 6 ч, возвращение к норме на 48 ч             |
| 372    | Пируват киназа  | PKM2     | Катализ образования фосфоенолпирувата из пирувата и АТФ   | Повышение (1,5) на 6 ч, возвращение к норме на 48 ч             |
| 110    | Белок eg60  | PDIA3    | Белок дисульфид изомеразы   | Повышение на 19 и 48 ч  |
| 185    | Кератин 10  | KRT10    | Промежуточный филамент  | Повышение только на 19 ч  |
| 202    | Бета-Актин  |          | Структурный белок   | Повышение только на 19 ч  |
| 246    | Малектин  | MLEC     | Углевд-связывающий белок эндоплазматического ретикулума и возможный участник ранних этапов белкового N-гликозилирования | Повышение только на 19 ч  |
| 75     | Биспиральный домен, содержащий 58                       | CCDC58   | Консервативный гипотетический белок – формирование пор ядра   | Повышение на 48 ч   |

Ацил-СоА тиазстераза 7: Ацил-СоА тиазстераза 7 (ACOT7) является членом энзимного семейства, которое катализирует гидролиз жирного ацил-СоА в свободную жирную кислоту и СоА. Этот фермент таким образом играет роль в регуляции липидного метаболизма и клеточного сигналинга. ACOT7 связан с длинноцепочечными ацил-СоА субстратами с цепями жирных кислот, состоящими из 8-16 атомов углерода (C8-C16). Точная функция ACOT7 в клетке понятна не до конца. Транскрипция этого гена активируется связывающим стерол регуляторный элемент белком 2, что подтверждает его функцию в метаболизме холестерина.

Результаты этого примера показывают, что ACOT7 потенциально участвует в метаболизме Q10, прямо или косвенно. Таким образом, целевая ACOT7 может содействовать модуляции внутриклеточных уровней Q10 и тем самым влиять на клеточные эффекты Q10.

Пируваткиназа: пируваткиназа - фермент, участвующий в последнем этапе гликолиза. Он катализирует перенос фосфатной группы с фосфоенолпирувата (PEP) к АДФ, производя одну молекулу пирувата и одну молекулу АТФ.



Белком предположительно является PKM2, изоформа типа 2, которая была идентифицирована в богатом митохондриями образце SK-MEL-28. Хорошо известно, что эта изоформа участвует в образовании и регуляции опухолевых клеток.

Подсчет уровней Q10 в митохондриях.

Способ одновременного определения коэнзима Q10 (Q10) и восстановленной формы убихинола-10 (Q10H2) был выполнен на основе недавно опубликованного способа (Ruiz-Jimenez, 2007, J. Chroma

А, 1175, 242-248) благодаря использованию LC-MS/MS с ионизацией электрораспылением (ESI) в режиме определения положительных ионов. Возможны высоко избирательная идентификация и чувствительный подсчет Q10 и Q10H<sub>2</sub>, вкупе с идентификацией других выбранных липидов. Аликвоты богатых митохондриями образцов из SK-MEL-28, обработанных 100 мкМ Q10, были подвергнуты стандартной пре-обработке, основанной на осаждении белка, экстракции жидкость-жидкость, выпаривании до высыхания и восстановлению в 50 мкл смеси 95:5 метанол/гексан (по объему).

В этом анализе были подсчитаны Q10, Q10H<sub>2</sub> и Q9 (табл. 5). Уровни соответствующей молекулы Q9 были низкими, и близко от уровня детекции. Уровни необработанных образцов были сравнительно постоянными, с 6 часами обработанным Q10 образцом, имеющим тот же уровень. Для контроля за вариабельностью материала образцов были подсчитаны также уровни холестерина для подтверждения того, что различия не происходят вследствие погрешностей в размере образцов. Когда уровни Q10 были верными по сравнению со значениями общего белка, наблюдаемого в белковой экстракции других аликовт из тех же митохондриальных проб, сравнительные соотношения были сопоставимыми. Таким образом, достоверное возрастание уровней Q10 наблюдалось на 19 часах (~в 3 раза), с даже большим возрастанием на временной точке 48 ч (~ в 6 раз) (фиг. 12).

Таблица 5. HPLC-MS Результаты количественного определения уровней Q10, присутствующего в богатых митохондриями образцах из SK-MEL-28 клеток, обработанных 100 мкМ Q10 в среде

| Файл      | Образец             | Инъекция | Площадь пика |        | нг/образец |       |                   | мкг/образец |
|-----------|---------------------|----------|--------------|--------|------------|-------|-------------------|-------------|
|           |                     |          | Q9           | Q10    | Q9         | Q10   | Q10H <sub>2</sub> | Холестерол  |
| 081204-05 | 100 нг Std          |          | 245,342      | 352792 |            |       |                   |             |
| 081204-06 | 6 ч контроль#1      | 10%      | 2560         | 32649  | 1.04       | 9.25  |                   |             |
| 081204-07 | Холостой раствор#1  | 5 ul     | 3781         | 3174   | 1.54       | 0.9   |                   |             |
| 081204-08 | Холостой раствор#2  | 5 ul     | 2396         | 4399   | 0.98       | 1.25  |                   |             |
| 081204-09 | 6 ч контроль#2      | 20%      | 1572         | 36328  | 0.64       | 10.3  |                   |             |
| 081204-10 | Холостой контроль#3 | 10 ul    | 1722         | 2504   | 0.7        | 0.71  |                   |             |
| 081204-11 | 48 ч Q10 обработ.   | 20%      | 4879         | 164496 | 1.99       |       | 0.28              | 13.86       |
| 081204-12 | 48 ч контроль       | 20%      | 2412         | 25552  | 0.98       | 7.24  | 0.09              | 13.04       |
| 081204-13 | 6 ч Q10 обработ.    | 20%      | 692          | 25427  | 0.28       | 7.21  |                   |             |
| 081204-14 | 19 ч Q10 обработ.   | 20%      | 1161         | 59164  | 0.47       | 16.77 |                   |             |
| 081204-15 | 19 ч контроль       | 20%      | 901          | 19999  | 0.37       | 5.67  |                   |             |

Неожиданным результатом этого исследования было обнаружение того, что Q10 попадал в клетки в окисленной форме. Для 48-часовых образцов восстановленная форма Q10H<sub>2</sub> также была подсчитана, и было обнаружено, что она присутствует в достоверно более низких количествах (0,28 нг/образец CoQ10H<sub>2</sub> по сравнению с 46,63 нг/образец CoQ10). Было общее возрастание (в 3 раза) в уровнях Q10H<sub>2</sub> в обработанном Q10 48-часовом образце, хотя уровни были близкими к предполагаемому порогу чувствительности способа. Интересно, что окисленная форма (Q10) может действовать как прооксидант в биологических системах. В соответствии с литературой, когда человеческая плазма была оценена по Q10 и Q10H<sub>2</sub>, было обнаружено, что большинство (90%) молекул присутствуют в восстановленной форме Q10H<sub>2</sub> (Ruiz-Jimenez, 2007, J. Chroma A, 1175,242-248), которая может действовать как антиоксидант.

Таким образом, эти результаты подтверждают и дают количественную оценку того, что уровни Q10 возрастают в митохондриях после экзогенного добавления Q10 в среду. Неожиданным открытием было то, что Q10 оставался в той же окисленной форме (про-оксидант), в которой его добавили, и не превращался в восстановленную (анти-оксидант) форму Q10H<sub>2</sub> в каком-либо значительном количестве.

Пример 6. Анализ ПЦР в режиме реального времени.

Эксперимент 1. Апоптозный анализ.

Как обсуждалось в примере 3, обработка раковых клеток Q10 вызывает гибель части этих клеток вследствие апоптозных процессов. Чтобы идентифицировать белки, задействованные в реакции на Q10, были применены методы полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (RT-ПЦР) для идентификации изменений в уровнях мРНК для генов/белков, включенных в целевые пути, связанные с апоптозом.

При использовании ПЦР методов как скринингового механизма, оценивался спектр целевых молекул, которые потенциально предлагались как способные отвечать на биологическое действие Q10 внутри клеток. Изменения в уровнях мРНК были оценены с использованием количественных оценок ПЦР в режиме реального времени для определения уровней мРНК в отобранных заранее подсериях, содержащих 80 специфических целевых путей.

Для интерпретации мРНК результатов, идентифицировались и оценивались гены, у которых в два раза изменялась транскрипция их мРНК. Уровень генной транскрипции для образования мРНК дает только грубую оценку потенциальных изменений в уровне экспрессируемого белка. Специалисты в данной области поймут, что каждая мРНК может иметь различные степени, в какой она деградирует или в какой ее трансляция неэффективна, поэтому в результате будут получаться различные количества белка.

SkBr-3 клетки, обработанные 50 мкМ Q10 24 ч.

Способ анализа RT-ПЦР был использован для количественного определения изменений уровней мРНК для всех 84 белков, связанных с апоптозным путем. Эксперименты с апоптозным анализом ПЦР в режиме реального времени на SkBr3 с Q10 (24 ч) показали, что влияние было оказано на следующие мРНК: Bcl2, Bcl2L1, Bcl2L11, Birc6, Bax, Xiap, Hprt1, Araf1, Abl1, Braf. Эти результаты также предоставили доказательства того, что обработка Q10 вызывает апоптозный ответ в раковых клетках.

Таблица 6А

| Обозначение | Положительная-Отрицательная регуляция | Unigene   | Refseq    | Описание   | Название гена          |
|-------------|---------------------------------------|-----------|-----------|--|------------------------|
| BCL2L1      | 13.1957                               | Hs.516966 | NM_138578 | BCL2-подобный 1  | BCL-XL/S               |
| BNIP2       | 6.3291                                | Hs.646490 | NM_004330 | BCL2/аденовирус E1B 19кДа взаимодействующий белок 2        | BNIP-2/NIP2            |
| BCL2        | 5.4717                                | Hs.150749 | NM_000633 | В-клетки CLL/лимфома 2                                     | Bcl-2                  |
| BIRC6       | 4.7966                                | Hs.150107 | NM_016252 | Бакуловирусный IAP повтор-содержащий 6 (аполлон)           | APOLLON/B RUC6         |
| BCL2L11     | 4.6012                                | Hs.469658 | NM_006538 | BCL2-подобный 11 (содействие апоптозам)                    | BAM/BIM                |
| XIAP        | 4.3832                                | Hs.356076 | NM_001167 | X-связанный ингибитор апоптозов                            | API3/BIRC4             |
| BRAF        | 4.3832                                | Hs.550061 | NM_004333 | гомолог B1 вирусного онкогена мышиной саркомы V-raf        | B-raf 1/BRAF1          |
| BAX         | 3.896                                 | Hs.631546 | NM_004324 | BCL2-связанный X белок                                     | Bax zeta               |
| APAF1       | 2.6244                                | Hs.708112 | NM_001160 | Фактор активирующий апоптозную пептидазу                   | 1, CED4/DKFZp 781B1145 |
| HPRT1       | -160.6748                             | Hs.412707 | NM_000194 | Гипоксантин Фосфорибозилтрансфераза 1 (синдром Леш-Нихана) | HGPRT/HPRT             |

Согласованные результаты трех независимых экспериментов на SK-MEL-28 клетках представлены ниже в табл. 6В. В SCC клетках многие гены также регулируются обработкой 100 мкМ Q10. Гены в апоптозном анализе, которые по видимости регулируются в SCC клетках, описаны в табл. 7. Мы обнаружили, что многие гены регулируются на 6 ч, как в SK-MEL-28 клетках, так и в SCC клетках. На 24 ч регуляция уменьшается. Гены которые по видимости регулируются как в SK-MEL-28 клетках, так и в SCC клетках, описаны в табл. 8.

Таблица 6В. Гены в клетках SK-MEL-28, которые регулируются воздействием 100 мкМ Q10, при анализе апоптозным анализом

| Обозначение | Описание                                | Регуляция                             | Локализация | Возможные функции                            |
|-------------|---|---------------------------------------|-------------|--|
| ABL1        | C-abl онкоген 1, рецептор тирозинкиназы | Отрицательно регулируется на 72 часах | Ядро        | Тирозинкиназа                                |
| BAG1        | BCL2-ассоциированный атероген           | Положительно регулируется на 48 часах | Цитоплазма  | Анти-апоптоз, путь рецептора глюкокортикоида |
| BCL2        | В-клетки CLL/лимфома 2                  | Отрицательно регулируется на 48 часах | Цитоплазма  | Гибель клеток                                |
| BCL2A1      | BCL2-связанный белок A1                 | Отрицательно регулируется на 48 часах | Цитоплазма  | Регулятор каспаз, фосфорилирование TP73      |
| BCL2L1      | BCL2-подобный 1                         | Отрицательно регулируется на 72 часах | Цитоплазма  | Ингибитор каспаз                             |
| BCL2L10     | BCL2-подобный 10 (содействие апоптозам) | Отрицательно регулируется на 48 часах | Цитоплазма  | Активатор каспаз                             |
| BCL2L11     | BCL2-подобный 11 (содействие апоптозам) | Отрицательно регулируется на 48 часах | Цитоплазма  | Про-апоптоз, активатор каспазы               |

|           |  |  |                           |   |
|-----------|--|--|---------------------------|---|
|           | апоптозам)   | 48 часах   |                           | 3                                       |
| BIRC3     | Бакуловирусный IAP повтор-содержащий 3                           | Отрицательно регулируется на 6 часах                                   | Цитоплазма                | Анти-апоптоз                            |
| BIRC8     | Бакуловирусный IAP повтор-содержащий 8                           | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Цитоплазма                | Активатор каспаз                        |
| CARD8     | Семейство поддерживающее о каспазы домена, член 8                | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Ядро                      | Активатор каспаз                        |
| CASP14    | Каспаза 14, связанная с апоптозом цистеинпептидаза               | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Цитоплазма                | Связанная с апоптозами цистеинпептидаза |
| CASP5     | Каспаза 5, связанная с апоптозом цистеинпептидаза                | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Цитоплазма                | Связанная с апоптозами цистеинпептидаза |
| CD40LG    | CD40 лиганд (TNF суперсемейство, член 5, гипер-IgM синдром)      | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Внеклеточное пространство | Связывание рецептора CD40               |
| CIDEA     | DFFA-подобный эффектор а, вызывающий клеточную гибель            | Положительно регулируется на 48 часах                                  | Цитоплазма                | Про-апоптоз                             |
| FADD      | Fas (TNFRSF6)-связанный через домен гибели                       | Отрицательно регулируется на 6 часах                                   | Цитоплазма                | Про-апоптоз                             |
| FAS       | Суперсемейство рецепторов Fas (TNF, член 6)                      | Положительно регулируется на 48 часах                                  | Плазматическая мембрана   | Про-апоптоз                             |
| FASLG     | Fas лиганд   | Отрицательно   | Внеклеточное пространство | Про-апоптоз                             |
|           | (суперсемейство TNF, член 6)                                     | регулируется на 48 часах   | ное пространство          |   |
| GADD45A   | Задержка роста и индуцирование повреждения ДНК, альфа            | Положительно регулируется на 48 часах                                  | Ядро                      | Задержка роста                          |
| HRK       | Naraki, BCL2 взаимодействующий белок (содержит только BH3 домен) | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Цитоплазма                | Про-апоптоз                             |
| PYCARD    | PYD и CARD домен содержащий                                      | Отрицательно регулируется на 6 часах                                   | Цитоплазма                | Активатор апоптозной протеазы           |
| TNF       | Фактор некроза опухолей (суперсемейство TNF, член 2)             | Положительно регулируется на 48 часах, затем отрицательно регулируется | Внеклеточное пространство | Связывание TNF рецептора                |
| TNFRSF10A | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 10a     | Положительно регулируется на 48 часах, затем отрицательно регулируется | Плазматическая мембрана   | Активатор каспаз                        |
| TNFRSF10B | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 10b     | Отрицательно регулируется на 72 часах                                  | Плазматическая мембрана   | p53 сигналинг, активатор каспаз.        |
| TNFRSF1A  | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 1A      | Отрицательно регулируется на 72 часах                                  | Плазматическая мембрана   | Про-апоптоз                             |

|          |   |                                       |                           |                          |
|----------|---|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| TNFRSF21 | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 21 | Отрицательно регулируется на 48 часах | Плазматическая мембрана   | Активатор каспаз         |
| CD27     | CD27 молекула   | Отрицательно регулируется на 48 часах | Плазматическая мембрана   | Ингибитор каспаз         |
| TNFRSF9  | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 9  | Отрицательно регулируется на 48 часах | Плазматическая мембрана   | Про-апоптоз              |
| TNFSF10  | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 10 | Положительно регулируется на 48 часах | Внеклеточное пространство | Про-апоптоз              |
| TP73     | Опухолевый белок p73  | Отрицательно регулируется на 48 часах | Ядро                      | Фактор транскрипции      |
| TRAF3    | TNF рецептор-связанный фактор 3                             | Отрицательно регулируется на 48 часах | Цитоплазма                | Домен «цинковых пальцев» |
| TRAF4    | TNF рецептор-связанный фактор 4                             | Отрицательно регулируется на 48 часах | Цитоплазма                | Домен «цинковых пальцев» |

Таблица 7. Гены в SCC клетках, которые регулируются воздействием 100 мкМ Q10, при анализе апоптозным анализом

| Обозначение | Описание   | Регуляция   |
|-------------|--|---|
| AKT1        | Гомолог 1 вирусного онкогена мышиной тимомы V-akt    | Отрицательно регулируется на 6 часах и затем положительно регулируется на 24 часах. |
| BAG4        | BCL2-ассоциированный атаноген 4                      | Положительно регулируется на 24 часах.  |
| BAX         | BCL2-ассоциированный X белок                         | Положительно регулируется на 24 часах.  |
| BCL2        | В-клеток CLL/лимфома 2                               | Положительно регулируется на 24 часах.  |
| BCL2L1      | BCL2-подобный 1                                      | Отрицательно регулируется на 6 часах и затем положительно регулируется на 24 часах. |
| BIRC3       | Бакуловирусный IAP повтор-содержащий 3               | Отрицательно регулируется на 6 часах.   |
| BNIP3       | BCL2/аденовирус E1B 19кДа взаимодействующий белок 3  | Отрицательно регулируется на 24 часах.  |
| CARD6       | Семейство поддерживающего каспазы домена, член 6     | Отрицательно регулируется на 6 часах.   |
| CASP6       | Каспаза 6, связанная с апоптозом цистеинпептидаза    | Положительно регулируется на 24 часах.  |
| CASP7       | Каспаза 7, связанная с апоптозом цистеинпептидаза    | Положительно регулируется на 24 часах.  |
| CD40        | CD40 молекула, суперсемейство TNF рецепторов, член 5 | Отрицательно регулируется на 6 часах.   |
| FADD        | Fas (TNFRSF6)-связанный через домен гибели           | Положительно регулируется на 24 часах.  |
| GADD45A     | Задержка роста и индуцирование                       | Положительно  |



|          |  |  |
|----------|--|--|
|          | повреждения ДНК, альфа   | регулируется на 24 часах.  |
| HRK      | Naraki, BCL2<br>взаимодействующий белок<br>(содержит только BH3 домен) | Положительно<br>регулируется на 24 часах.  |
| TNFRSF21 | Суперсемейство рецепторов<br>фактора некроза опухолей, член<br>21      | Отрицательно регулируется<br>на 6 часах.   |
| TNFRSF25 | Суперсемейство рецепторов<br>фактора некроза опухолей, член<br>25      | Отрицательно регулируется<br>на 6 часах и затем<br>положительно регулируется<br>на 24 часах. |
| CD27     | CD27 молекула  | Отрицательно регулируется<br>на 6 часах.   |
| TNFRSF9  | Суперсемейство рецепторов<br>фактора некроза опухолей, член 9          | Отрицательно регулируется<br>на 6 часах.   |
| TNFSF10  | Фактора некроза опухолей<br>(лиганд) суперсемейство, член 10           | Положительно<br>регулируется на 24 часах.  |
| CD70     | CD70 молекула  | Отрицательно регулируется<br>на 6 часах.   |
| TP53     | Опухолевый белок p53   | Положительно<br>регулируется на 24 часах.  |
| TP73     | Опухолевый белок p73   | Отрицательно регулируется<br>на 6 часах и затем<br>положительно регулируется<br>на 24 часах. |
| TRAF2    | TNF рецептор-ассоциированный<br>фактор 2                               | Положительно<br>регулируется на 24 часах.  |

Таблица 8. Гены апоптозного анализа, которые регулируются воздействием 100 мкМ Q10 и в SK-MEL-28, и в SCC клетках

| Обозначение | Описание  |
|-------------|---|
| BCL2        | В-клеток CLL/лимфома 2                                      |
| BCL2L1      | BCL2-подобный 1 (Bcl-xl)                                    |
| BIRC3       | Бакуловирусный IAP повтор-содержащий 3                      |
| FADD        | Fas (TNFRSF6)-связанный через домен гибели                  |
| GADD45A     | Задержка роста и индуцирование повреждения ДНК, альфа       |
| TNFRSF21    | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 21 |
| CD27        | CD27 молекула   |
| TNFRSF9     | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 9  |
| TNFSF10     | Фактора некроза опухолей (лиганд) суперсемейство, член 10   |
| TP73        | Опухолевый белок p73  |
| TRAF2       | TNF рецептор-ассоциированный фактор 2                       |

Интересно, что измененные уровни мРНК показали значимую положительную регуляцию в сериях апоптозных белков, где Bcl-xl был выше всего. Это также наблюдалось в экспериментах анализа белка на SK-MEL-28 клетках.

Bcl-xl является трансмембранной молекулой в митохондриях (Bcl-xl является обозначением "базальноклеточная сверхбольшая лимфома"). Она включена в сигнальный путь трансдукции FAS-L и является одним из нескольких антиапоптозных белков, которые являются членами белкового семейства Bcl-2. Она задействована в выживании раковых клеток. Однако известно, что альтернативный сплайсинг Bcl-x мРНК человека может приводить, по меньшей мере, к двум различным видам Bcl-x мРНК, Bcl-xL и Bcl-xS. Преобладающий белковый продукт (233 аминокислоты) - более крупная Bcl-x мРНК, Bcl-xL, которая подавляет клеточную гибель вследствие удаления фактора роста (Boise et al., 1993. Cell 74, 597-608). Bcl-xS, а с другой стороны, ингибирует возможность Bcl-2 ингибировать клеточную ги-

бель и делает клетки более восприимчивыми к апоптозной гибели клеток. Используемые анализы не различают, какая изоформа является повышающе регулируемой. Bcl-x изоформа, которая повышающе регулируется CoQ10 в этих исследованиях, может быть определена обычными способами, известными специалистам, например, использованием RT-ПЦР способов для оценки соотношения двух изоформ мРНК сплайсинга (Bcl-xL vs Bcl-sL).

Из наблюдения связанных с апоптозом белков было замечено, что множественные про- и анти-апоптозные факторы в BCL-2 семействе или взаимодействие с этими факторами модулировали уровни экспрессии (BCL2L11, BNIP2, BAG1, HRK, BAK1, BCL2, BCL2L1). Эти белки управляют проникновением через мембраны митохондрий.

Ранний маркер апоптозного ответа наблюдался вместе с повышающей регуляцией Каспазы-9 (16 часов), что согласуется с предыдущими наблюдениями апоптозов с каспазой 3/7 белков. Индукция стресс-сигналинг путей приводит к высвобождению цитохрома с из митохондрий и активации араf-1 (апоптосомы), которая в свою очередь расщепляет про-энзимы каспазы-9 в активную форму. После инициации каспаза-9 начинает расщеплять прокаспазу-3 и прокаспазу-7, запуская дополнительные апоптозные пути.

Семейство рецепторов к фактору некроза опухолей также постоянно имеет отношение к модулированным белкам.

Замечена также сильная понижающая регуляция опухолевого белка p73. Анализы множества опухолей, обычно находимых у человека, включая рак молочной железы и яичников, показали высокую экспрессию p73 по сравнению с нормальными тканями в соответствующих областях. Недавние открытия подтверждают, что дерегулируемая сверхэкспрессия транскрипционных факторов в организме, участвующих в регуляции клеточного цикла и синтезе ДНК в клетках млекопитающих (например, E2F-1), вызывает экспрессию p73. Это подтверждает, что p73 может быть онкобелком, но может быть задействован в различных механизмах, которые связаны с p53 белком. На фиг. 13 представлена схема апоптозного пути.

Клетки SKMEL-28.

Из наблюдения связанных с апоптозом белков было замечено, что множественные про- и анти-апоптозные факторы в BCL-2 семействе или взаимодействие с этими факторами модулировали уровни экспрессии (BCL2L11, BNIP2, BAG1, HRK, BAK1, BCL2, BCL2L1). Эти белки управляют проникновением через мембраны митохондрий.

Ранний маркер апоптозного ответа наблюдался вместе с повышающей регуляцией каспазы-9 (16 часов), что согласуется с предыдущими наблюдениями апоптозов с каспазой 3/7 белков. Индукция стресс-сигналинг путей приводит к высвобождению цитохрома с из митохондрий и активации араf-1 (апоптосомы), которая в свою очередь расщепляет про-энзимы каспазы-9 в активную форму. После инициации каспаза-9 начинает расщеплять прокаспазу-3 и прокаспазу-7, запуская дополнительные апоптозные пути.

Таблица 9. Изменения в уровнях мРНК в SKMEL-28 клетках, обработанных 100 мкМ Q10, оцененных по RT-ПЦР анализам, сосредоточенным на апоптозных путях

| справ. Посл. | Описание   | Обозначение | 6 ч Q10 | 16 ч Q10 | 24 ч Q10 | 72 ч Q10 |
|--------------|--|-------------|---------|----------|----------|----------|
| NM_006538    | BCL2-подобный 11 (содействие апоптозам)              | BCL2L1 1    | 2,13    | 2,41     | 1,92     | 2,51     |
| NM_000875    | Инсулин-подобный рецептор фактора роста 1            | IGF1R       | 1,77    | 1,09     | 1,33     | 1,25     |
| NM_004048    | Бета-2-микроглобулин                                 | B2M         | 1,74    | 1,76     | 1,58     | 3,11     |
| NM_003921    | В-клеток CLL/лимфома 10                              | BCL10       | 1,55    | 1,87     | 1,48     | -3,11    |
| NM_004330    | BCL2/аденовиру с E1B 19кДа взаимодействующий белок 2 | BNIP2       | 1,46    | 1,51     | 1,57     | -1,61    |
| NM_005157    | C-abl онкоген 1, рецептор тирозин киназы             | ABL1        | 1,42    | 2,77     | -1,22    | -2,03    |

|           |  |            |        |       |       |         |
|-----------|--|------------|--------|-------|-------|---------|
| NM_004323 | BCL2-ассоциированный антагонист                                  | BAG1       | 1,41   | 1,44  | -1,61 | -2,45   |
| NM_001229 | Каспаза 9, связанная с апоптозом цистеинпептидаза                | CASP9      | 1,32   | 3,96  | 1,83  | 1,14    |
| NM_003806 | Naraki, BCL2 взаимодействующий белок (содержит только BH3 домен) | HRK        | 1,18   | 4,52  | 2,73  | -1,14   |
| NM_001924 | Задержка роста и индуцирование повреждения ДНК, альфа            | GADD45 A   | 1,07   | 3,34  | 1,13  | -2,36   |
| NM_001188 | BCL2-антагонист/киллер 1   | BAK1       | 1,06   | 2,73  | -1,00 | -4,54   |
| NM_004295 | TNF рецептор-связанный фактор 4                                  | TRAF4      | -1,91  | 2,63  | -1,58 | -740,66 |
| NM_003842 | Суперсемейство рецепторов факторов некроза опухолей, член 10b    | TNFRSF 10B | -2,07  | 1,53  | -1,81 | -710,49 |
| NM_000633 | В-клеток CLL/лимфома 2   | BCL2       | -2,98  | -1,63 | -2,82 | -11,36  |
| NM_001242 | CD27 молекула  | CD27       | -3,40  | -2,38 | -1,35 | -12,72  |
| NM_014430 | Клеточную гибель вызывающий                                      | CIDEB      | -3,48  | 1,56  | -3,69 | -2,59   |
|           | DDFA-подобный эффектор b   |            |        |       |       |         |
| NM_001065 | Суперсемейство рецепторов факторов некроза опухолей, член 1A     | TNFRSF 1A  | -4,53  | 2,28  | -3,30 | 1,22    |
| NM_005427 | Опухолевый белок p73   | TP73       | -4,66  | -9,80 | -8,71 | -26,96  |
| NM_003844 | Суперсемейство рецепторов факторов некроза опухолей, член 10a    | TNFRSF 10A | -4,84  | -5,26 | -4,33 | -11,84  |
| NM_138578 | BCL2-подобный 1  | BCL2L1     | -4,94  | -1,80 | -6,17 | -7,04   |
| NM_001165 | Бакуловирусный IAP повтор-содержащий 3                           | BIRC3      | -13,68 | -1,98 | -2,42 | -3,42   |

Семейство рецепторов к фактору некроза опухолей также постоянно имеет отношение к модулированным белкам.

Замечена также сильная понижающая регуляция опухолевого белка p73. Анализы множества опухолей, обычно находимых у человека, включая рак молочной железы и яичников, показали высокую экспрессию p73 по сравнению с нормальными тканями в соответствующих областях. Недавние открытия подтверждают, что дерегулируемая сверхэкспрессия транскрипционных факторов в организме, участвующих в регуляции клеточного цикла и синтезе ДНК в клетках млекопитающих (например, E2F-

1), вызывает экспрессию p73. Это подтверждает, что p73 может быть онкобелком, но может быть задействован в различных механизмах, которые связаны с p53 белком.

Эксперимент 2. ПЦР в режиме реального времени. Анализы, использующие наборы окислительного стресса и антиоксидантной защиты.

Для идентификации белков, которые были включены в Q10 ответ, был использован метод полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (RT-ПЦР) для идентификации изменений в уровнях мРНК для генов/белков, включенных в целевые пути окислительного стресса и антиоксидантной защиты.

В табл. 10 ниже перечисляются гены, которые регулируются в SK-MEL28 клетки, обработанных 100 мкМ Q10. Результаты даются только для тех генов, которые являются регулируемыми в двух независимых экспериментах. Хотя существует достоверное количество генных регуляций, наблюдаемых на 6 часов, большинство достоверных изменений в уровнях РНК наблюдаются на 48 ч.

Таблица 10. Гены в SK-MEL-28 клетках, которые регулируются при обработке 100 мкМ Q10, что видно по анализам окислительного стресса и антиоксидантной защиты Agtays"

| Обозначение | Описание  | Регуляция                           | Локализация               | Возможные функции.  |
|-------------|---|-------------------------------------|---------------------------|---|
| ALB         | Альбумин  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Внеклеточное пространство | Белок-носитель, анти-апоптозная                                       |
| AOX1        | Альдегид оксидаза 1                                     | Положительная регуляция с 16 часов  | Цитоплазма                | Образование свободных радикалов, метаболизм ксенобиотиков             |
| APOE        | Аполипопротеин E  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Внеклеточное пространство | Метаболизм липидов  |
| ATOX1       | ATX1 антиоксидантного белка 1 гомолог (дрожжи)          | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Метаболизм меди   |
| BNIP3       | BCCL2/аденовирус E1B 19кДа взаимодействующий белок 3    | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Анти-апоптоз  |
| CSDE1       | Домен холодового шока, содержащий E1, РНК-связывающийся | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Регуляция транскрипции  |
| CYBA        | Цитохром b-245, альфа полипептид                        | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Апоптозы  |
| CYGB        | Цитоглобин  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Пероксидаза, транспортер  |
| DHCR24      | 24-дегидрохолестерин редуктаза                          | Отрицательная регуляция на 6 часах  | Цитоплазма                | Перенос электронов, связывание с TP53, участие в апоптозах            |
| DUOX1       | Двойная оксидаза 1                                      | Положительная регуляция на 48 часах | Плазматическая мембрана   | Связывание ионов кальция, перенос электронов                          |
| DUOX2       | Двойная оксидаза 2                                      | Отрицательная регуляция на 48 часах | Неизвестна                | Связывание ионов кальция  |
| EPHX2       | Эпоксидгидролаза 2, цитоплазматическая                  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Метаболизм арахидоновой кислоты                                       |
| EPX         | Эозинофил пероксидаза                                   | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Метаболизм фенилаланина, апоптозы                                     |
| GPX2        | Глутатиона пероксидаза 2 (желудочно-кишечная)           | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Перенос электронов, связывание с TP53, участие в апоптозах            |
| GPX3        | Глутатиона пероксидаза 3 (плазма)                       | Положительная регуляция на 48 часах | Внеклеточное пространство | Метаболизм арахидоновой кислоты, отрицательная регуляция в карциномах |

|        |   |                                     |                           |  |
|--------|---|-------------------------------------|---------------------------|--|
| GPX5   | Глутатиона пероксидаза 5 (эпидемальный андроген-связанный белок)                  | Положительная регуляция на 48 часах | Внеклеточное пространство | Метаболизм арахидоновой кислоты.                               |
| GPX6   | Глутатиона пероксидаза 6 (обонятельная)   | Отрицательная регуляция на 48 часах | Внеклеточное пространство | Метаболизм арахидоновой кислоты.                               |
| GSR    | Глутатиона редуктаза  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Метаболизм глутамата и глутатиона, апоптозы                    |
| GTF2I  | Общий фактор транскрипции II, i   | Отрицательная регуляция на 6 часах  | Ядро                      | Активатор транскрипции, транскрипция fos.                      |
| KRT1   | Кератин 1 (эпидермолитический гиперкератоз)                                       | Положительная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Связывание сахара  |
| LPO    | Лактопероксидаза  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Внеклеточное пространство | Метаболизм фенилаланина  |
| MBL2   | Манноза-связывающий лектин (белок C) 2, растворимый (недостаток опсонина)         | Отрицательная регуляция на 48 часах | Внеклеточное пространство | Дополнительный сигнальный, распознавание паттерна в рецепторах |
| MGST3  | Микросомального глутатиона S-трансфераза 3  | Положительная регуляция на 16 часах | Цитоплазма                | Метаболизм ксенобiotиков.                                      |
| MPO    | Миелопероксидаза  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Анти-апоптоз, метаболизм фенилаланина                          |
| MPV17  | MPV17 митохондриальный внутренний мембранный белок                                | Отрицательная регуляция на 6 часах  | Цитоплазма                | Поддержание митохондриальной ДНК.                              |
| MT3    | Металлотренин 3   | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Связывание ионов меди.   |
| NCF1   | Цитозольный фактор нейтрофилов 1, (хронический гранулематоз, аутосом 1)           | Отрицательная регуляция с 6 часах   | Цитоплазма                | Образование свободных радикалов                                |
| NCF2   | Цитозольный фактор нейтрофилов 2 (65кДа, хронический гранулематоз, аутосом 2)     | Положительная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Перенос электронов   |
| NME5   | Белок, экспрессирующийся в метастазирующих клетках 5, (нуклеотид-дифосфат киназа) | Отрицательная регуляция на 48 часах | Неизвестна                | Метаболизм киназ, пуринов и пиримидинов                        |
| NOS2A  | Оксида азота синтаза 2A (индуцируемая, гепатоциты)                                | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Сигнальный рецептор глюкокортикоида, апоптозы                  |
| OXR1   | Устойчивость к окислению 1  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Реакция на окислительный стресс                                |
| PDLIM1 | PDZ и LIM домен 1 (elfin)   | Положительная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Активатор транскрипции   |
| PIP3-E | Фосфоинозитид-связывающий белок PIP3-E  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Пероксидаза  |
| PRDX2  | Пероксидоксин 2   | Отрицательная регуляция на 6 часов  | Цитоплазма                | Роль в метаболизме фенилаланина. Роль в гибели клеток          |
| PRDX4  | Пероксидоксин 4   | Отрицательная регуляция с 24 часов  | Цитоплазма                | Тиоредоксин пероксидаза  |

|        |  |                                     |                           |   |
|--------|--|-------------------------------------|---------------------------|---|
| PREX1  | Фосфатидилинозитол 3,4,5-трисфосфат-зависимый RAC 1                                  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Формирует окисленные свободные радикалы                                 |
| PRG3   | Протеогликан 3   | Отрицательная регуляция на 48 часах | Внеклеточное пространство | Роль в гибели клеток.   |
| PTGS1  | Простагландин-эндопероксид синтаза 1 (простагландин G/H синтаза и циклооксигеназа)   | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Метаболизм арахидоновой кислоты, синтез простагландинов                 |
| PTGS2  | Простагландин-эндопероксид синтаза 2 (простагландин G/H синтаза и циклооксигеназа)   | Положительная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Метаболизм арахидоновой кислоты, синтез простагландинов                 |
| PXDN   | Пероксидаз гомолог (Drosophila)  | Положительная регуляция на 48 часах | Неизвестна                | Связывание с TRAF4, связывание ионов кальция, связывание ионов железа.  |
| PXN1   | Пероксидаз гомолога (Drosophila)-подобный  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Неизвестна                | пероксидаза, связывание ионов кальция, связывание ионов железа.         |
| RNF7   | Ring finger белок 7  | Положительная регуляция на 16 часах | Ядро                      | апоптозы, связывание ионов меди, путь обмена убихинона                  |
| SGK2   | Сыворотка/глюкокортиконд регулируемая киназа 2                                       | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Киназа, регулятор каналов калия   |
| SIRT2  | Сиртуин (молчащего MAT-локуса информационной регуляции 2 гомолог) 2 (S. cerevisiae)  | Положительная регуляция на 16 часах | Ядро                      | Фактор транскрипции   |
| SOD1   | Супероксиддисмутаза 1, растворимая (аминотрофический боковой склероз 1 (у взрослых)) | Положительная регуляция на 16 часах | Цитоплазма                | Апоптозы, активатор каспазы   |
| SOD2   | Супероксиддисмутаза 2, митохондриальная  | Положительная регуляция на 16 часах | Цитоплазма                | Апоптозы, регулируется TNF.   |
| SOD3   | Супероксиддисмутаза 3, внеклеточная  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Внеклеточное пространство | Про-апоптозное  |
| SRXN1  | Сульфидредоксин 1 гомолог (S. cerevisiae)  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Связывание ДНК, оксидоредуктаза   |
| TPO    | Тиреоид-пероксидаза  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Плазматическая мембрана   | Иодирование тироглобулина, метаболизм тирозина, метаболизм фенилаланина |
| TTN    | Титин  | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Актина цитоскелета сигналинг, интегрин сигналинг                        |
| TXNDC2 | Тиоредоксин домен-содержащий 2 (сперматозоиды)                                       | Отрицательная регуляция на 48 часах | Цитоплазма                | Метаболизм пиримидинов  |

Цитозольный фактор нейтрофилов 2 (NCF2, 65кДа, хронический гранулематоз, аутосома 2) был одним из тех, чьи мРНК индуцировались вначале (наблюдалось на 6 часах). Впоследствии на временной точке 16 часов и дальше, после задержки на первичной фазе, индуцировались очень высокие уровни цитозольного фактора нейтрофилов 1 (NCF1) (хронический гранулематоз, аутосома 1).

Цитозольный фактор нейтрофилов 2 является цитозольной субъединицей мультибелкового комплекса, известного как НАДФН оксидаза, обычно находящаяся в нейтрофилах. Эта оксидаза вырабатыва-

ет множество супероксидов, которые попадают в полость нейтрофильной фагосомы.

НАДФН оксидаза (никотинамид аденин динуклеотид фосфатоксидаза) является связанным с мембраной энзимным комплексом. Ее можно обнаружить в плазматической мембране, а также в мембране фагосомы. Она состоит из шести следующих субъединиц:

а Rho гуанозин трифосфатаза (GTPa3a), обычно Rac1 или Rac2 (Rac - обозначение для Rho-связанного C3 субстрата ботулинического токсина);

Пять "phox" единиц. (Phox - обозначение для фагоцитарной оксидазы);

P91-PHOX (содержит гем);

p22phox;

p40phox;

p47phox (NCF1);

p67phox (NCF2)ю

Замечено, что уровни других НАДФН оксидаз не изменились. Ферментом является NOX5, который является новой НАДФН оксидазой, вырабатывающей супероксиды и действующей как H<sup>+</sup> канал (2+)-зависимым образом.

Кроме того, фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат-зависимый RAC обменный агент 1(PREX1) также повышающе регулировался. Этот белок действует как фактор обмена нуклеотида гуанина для RHO семейства маленьких GTP-связывающих белков (RACs). Показано, что он связывает и активирует RAC1 превращая связанный GDP в свободный GTP. Кодированный белок, который находится в основном в цитоплазме, активируется фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатом и бета-гамма субъединицами гетеротримерных G белков.

Вторым основным рано индуцированным белком была синтаза оксида азота 2A (индуцируемая, гепатоциты) (NOS2A). Оксид азота - реактивный свободный радикал, который действует как биологический медиатор в нескольких процессах, включая нейротрансмиссию и антимикробную и антиопухолевую активность. Этот ген кодирует синтазу оксида азота, которая экспрессируется в печени и индуцируется комбинацией липополисахаридов и определенных цитокинов.

Супероксиддисмутаза 2, митохондриальная (SOD2) является членом семейства железо/марганец содержащих супероксиддисмутаз. Она кодирует митохондриальный белок, который формирует гомотетрамер и связывает один ион марганца на субъединицу. Этот белок связывает супероксидные побочные продукты окислительного фосфорилирования и превращает их в перекись водорода и двухатомный кислород. Мутации по этому гену связаны с идиопатической кардиомиопатией (ИКМП), преждевременным старением, спорадической болезнью двигательного нейрона и раком.

Примером понижающей белковой регуляции является Forkhead box M1 (FOXO1), про которого известно, что этот белок играет ключевую роль в последовательности событий клеточного цикла, где пики эндогенной экспрессии FOXO1 наблюдаются на фазах S и G2/M. Недавние исследования показали, что FOXO1 регулирует экспрессию множества G2/M-специфичных генов, таких как Plk1, циклин B2, Nek2 и CENPF и играет важную роль в поддержании сегрегации хромосом и стабильности генома. FOXO1 ген в настоящее время известен как протоонкоген человека. Аномальная повышающая регуляция FOXO1 участвует в онкогенезе базальноклеточной карциномы (БКК). Повышающую регуляцию FOXO1 позднее обнаружили в большинстве солидных раков человека, включая рак печени, молочной железы, легких, простаты, шейки матки, кишечника, поджелудочной железы и мозга. Дальнейшие исследования БКК и Q10 должны определить уровни FOXO1.

SKMEL-28 клетки.

Дальнейшие эксперименты проводились с использованием SKMEL-28 клеток. Уровни мРНК, присутствующей в SKMEL-28 клетках, обработанных 100 мкМ Q10, сравнивались с уровнями необработанных клеток на различных временных точках с использованием методов ПЦР в режиме реального времени (RT-ПЦР). ПЦР-анализ (SABiosciences) представляет из себя серию оптимизированных для ПЦР в режиме реального времени праймерных анализов в 96-луночных планшетах для задействованных в метаболизме или связанных с болезнью генов, а также соответствующие контроли количества РНК. ПЦР-анализ осуществляет анализ генной экспрессии с помощью чувствительной ПЦР в режиме реального времени и возможность определения мультигенного профиля на микрочипе.

Таблица 11. Список и классификация мРНК уровней, оцененных по ПЦР-анализам Окислительного Стресса и Антиоксидантной Защиты. Наиболее сильные изменения уровней мРНК после шести часов обработки 100 мкМ Q10 на SKMEL-28 клетках показаны путем визуального выделения названия белка (возрастание - полужирный шрифт; снижение - подчеркивание; нет изменений - серый).

|  |  |
|--|--|
| <b>Антиоксиданты:</b>  |  |
| Глютатиона пероксидазы (GPx):  | GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, GPX7, GSTZ1.   |
| Peroxiredoxins (TPx):  | PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX4, PRDX5, PRDX6.  |
| Другие пероксидазы:  | CAT, CSDE1, CYGB, DUOX1, DUOX2, EPX, GPR156, LPO, MPO, PIP3-E, PTGS1, PTGS2, PNDL, PNDNL, TPO, TTN.  |
| Другие антиоксиданты:  | ALB, APOE, GSR, MT3, SELS, SOD1, SOD3, SRXN1, TXNDC2, TXNRD1, TXNRD2.  |
| <b>Гены, вовлеченные в метаболизм активных частиц кислорода (ROS):</b> |  |
| Супероксид-дисмутаза (SOD):  | SOD1, SOD2, SOD3.  |
| Другие гены, вовлеченные в супероксидный метаболизм:                   | CCS, CYBA, DUOX1, DUOX2, GTE21, MT3, NCF1, NOX5, PREX1, PRG3.  |
| Другие гены, вовлеченные в метаболизм ROS:                             | ROBOX1, BNIP3, EPHX2, MPV17, SFTPD.  |
| Гены, ответственные за окислительный стресс:                           | AKR1C2, APOE, ATOX1, CAT, CCL5, CSDE1, CYGB, DGKK, DHCR24, DUOX1, DUOX2, DUSP1, EPX, FOXM1, GLRX2, GPR156, GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, GPX7, GSS, KRT1, LPO, MBL2, MPO, MSRA, MTL5, NME5, NUDT1, OXR1, OXSRI, PDLIM1, PIP3-E, PNKP, PRDX2, PRDX5, PRDX6, PRNP, RNF7, SCARA3, SELS, SEPP1, SGK2, SIRT2, SOD1, SOD2, SRXN1, STK25, TPO, TTN, TXNRD2. |

Таблица 12. Данные различной временной обработки 100 мкМ SKMEL-28. Изменения уровней мРНК мониторились RT-ПЦР методами, и были получены данные по анализам окислительного стресса и антиоксидантной защиты

| справ. посл. | Обозначение | Описание  | 6 ч Q10 | 16 ч Q10 | 24 ч Q10 | 48 ч Q10 | 72 ч Q10 |
|--------------|-------------|---|---------|----------|----------|----------|----------|
| NM_000265    | NCF1        | Цитозольный фактор нейтрофилов 1, (хронический гранулематоз, аутосомный)            | 0       | высокое  | 3,3829   | 15,7838  | 31,5369  |
| NM_012423    | RPL13A      | Рибосомальный белок L13a  | -0,9025 | 3,1857   | 2,5492   | 4,9253   | 7,82     |
| NM_020820    | PREX1       | Фосфатидилинозитол 3,4,5-трисфосфат-зависимый RAC 1                                 | -3,2971 | 2,867    | 0,3222   | 6,3719   | 7,476    |
| NM_012237    | SIRT2       | Сиртуин (молчащего MAT-локуса информационной регуляции 2 гомолог) 2 (S. cerevisiae) | -0,9025 | 4,0829   | 4,4766   | 5,7166   | 6,6257   |
| NM_005125    | CCS         | Шаперон меди для супероксиддисмутаза  | -0,6206 | 3,0077   | 3,452    | 2,9801   | 6,1539   |
| NM_181652    | PRDX5       | Пероксиредоксин 5   | -2,995  | 3,0454   | 3,5381   | 4,7955   | 6,0169   |
| NM_016276    | SGK2        | Сыворотка/глюкокортиконд регулируемая киназа 2                                      | 0       | 0        | 0        | 0,5995   | 5,937    |
| NM_003551    | NME5        | Белок, экспрессирующийся в неметастазирующих клетках 5 (нуклеозид-дифосфат киназа)  | -0,6652 | 3,1138   | 3,3694   | 3,1549   | 5,782    |
| NM_004417    | DUSP1       | Двойная специфичная фосфатаза 1   | -0,6998 | 0,5902   | 2,7713   | 3,321    | 5,5375   |
| NM_001752    | CAT         | Каталаза  | -0,8589 | 2,8424   | 0,1046   | 3,8557   | 5,3988   |
| NM_000041    | APOE        | Аполипопротеин E  | -0,8212 | 3,2069   | -0,9543  | 3,7694   | 5,3315   |
| NM_000101    | CYBA        | Цитохром b-245  | -0,3945 | 4,3475   | 3,9208   | 6,2452   | 5,0762   |



|           |       | альфа полипептид   |         |             |             |              |              |
|-----------|-------|--|---------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| NM_000433 | NCF2  | Цитозольный фактор нейтрофилов 2 (65кДа, хронический гранулематоз, аутосома 2)   | 1,2266  | 3,0077      | 0,0954      | 5,476        | 0            |
| NM_000963 | PTGS2 | Простагландин-эндопероксида синтаза 2 (простагландин G/H синтаза и циклооксигеназа)  | -0,6912 | 2,7046      | 2,6552      | 4,0553       | -3,3022      |
| NM_183079 | PRNP  | Прионный белок (p27-30) (болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Герстмана-Штрауслера-Шейнкера, фатальная семейная бессонница) | -0,2144 | 3,5236      | 2,9086      | 5,0837       | -3,9396      |
| NM_004052 | BNIP3 | BCL2/аденовирус E1B 19кДа взаимодействующий белок 3  | -2,9376 | 3,3288      | 4,312       | -18,206<br>9 | -4,8424      |
| NM_000242 | MBL2  | Манноза-связывающий лектин (белок C) 2, растворимый (недостаток опсонина)  | -0,3622 | -1,907<br>2 | -3,014<br>2 | -1,1854      | -6,4544      |
| NM_021953 | FOXO1 | Forkhead box M1  | -0,8135 | 0,068       | -0,921<br>6 | 3,3655       | -10,095<br>3 |

Цитозольный фактор нейтрофилов 2 (NCF2, 65кДа, хронический гранулематоз, аутосома 2) был одним из тех, чьи мРНК индуцировались вначале (наблюдалось на 6 часах). Впоследствии на временной точке 16 часов и дальше, после задержки на первичной фазе, индуцировались очень высокие уровни цитозольного фактора нейтрофилов 1 (NCF1) (хронический гранулематоз, аутосома 1).

Цитозольный фактор нейтрофилов 2 является цитозольной субъединицей мультибелкового комплекса, известного как НАДФН оксидаза, обычно находящаяся в нейтрофилах. Эта оксидаза вырабатывает множество супероксидов, которые попадают в полость нейтрофильной фагосомы. НАДФН оксидаза (никотинамид аденин динуклеотид фосфатоксидаза) является связанным с мембраной энзимным комплексом. Ее можно обнаружить в плазматической мембране, а также в мембране фагосомы. Она состоит из шести следующих субъединиц:

а Rho гуанозин трифосфатаза (GTPаза), обычно Rac1 или Rac2 (Rac -обозначение для Rho-связанного C3 субстрата ботулинического токсина);

Пять "phox" единиц. (Phox - обозначение для фагоцитарной оксидазы);

P91-PHOX (содержит гем);

p22phox;

p40phox;

p47phox (NCF1);

p67phox (NCF2).

Замечено, что уровни других НАДФН оксидаз не изменились. Ферментом является NOX5, который является новой НАДФН оксидазой, вырабатывающей супероксиды и действующей как H<sup>+</sup> канал (2<sup>+</sup>)-зависимым образом.

Кроме того, фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат-зависимый RAC обменный агент I(PREX1) также повышающе регулировался. Этот белок действует как фактор обмена нуклеотида гуанина для RHO семейства маленьких GTP-связывающих белков (RACs). Показано, что он связывает и активирует RAC1 превращая связанный GDP в свободный GTP. Кодированный белок, который находится в основном в цитоплазме, активируется фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатом и бета-гамма субъединицами гетеротримерных G белков.

Вторым основным рано индуцированным белком была синтаза оксида азота 2A (индуцируемая, гепатоциты) (NOS2A). Оксид азота - реактивный свободный радикал, который действует как биологический медиатор в нескольких процессах, включая нейротрансмиссию и антимикробную и антиопухолевую активность. Этот ген кодирует синтазу оксида азота, которая экспрессируется в печени и индуцируется комбинацией липополисахаридов и определенных цитокинов.

Примером понижающей белковой регуляции является Forkhead box M1 (FOXМ1), про которого известно, что этот белок играет ключевую роль в последовательности событий клеточного цикла, где пики эндогенной экспрессии FOXМ1 наблюдаются на фазах S и G2/M. Недавние исследования показали, что FOXМ1 регулирует экспрессию множества G2/M-специфичных генов, таких как Plk1, циклин B2, Nek2 и CENPF и играет важную роль в поддержании сегрегации хромосом и стабильности генома. FOXМ1 ген в настоящее время известен как протоонкоген человека. Аномальная повышающая регуляция FOXМ1 участвует в онкогенезе базальноклеточной карциномы (БКК). Повышающую регуляцию FOXМ1 позднее обнаружили в большинстве солидных раков человека, включая рак печени, молочной железы, легких, простаты, шейки матки, кишечника, поджелудочной железы и мозга. Дальнейшие исследования БКК и Q10 должны определить уровни FOXМ1.

Эксперимент 3. Анализы ПЦР в режиме реального времени, использующие анализ теплового шока.

Анализы теплового шока были проведены для SCC клеток, и данные регулируемых генов представлены ниже в табл. 13.

Таблица 13. Гены белков теплового шока, регулируемые обработкой 100 мкМ Q10 в SCC клетках

| Обозначение | Описание   | Регуляция                             | Локализация | Возможные функции   |
|-------------|--|---------------------------------------|-------------|---|
| ССТ6В       | Шаперонин содержащий ТСР1, субъединица 6В (zeta 2) | Отрицательно регулируется на 24 часах | Цитоплазма  | Укладка белков и сборка белковых комплексов.  |
| ДНКJA1      | DnaJ (Hsp40) гомолог, субсеме́йство А, член 1      | Положительно регулируется на 6 часах. | Ядро        | Реагирует на повреждение ДНК и изменения в укладке белков.                                  |
| ДНКJB13     | DnaJ (Hsp40) связанный, субсеме́йство В, член 13   | Отрицательно регулируется на 6 часах. | Неизвестна  | Укладка белков и апоптозы.  |
| ДНКJB5      | DnaJ (Hsp40) гомолог, субсеме́йство В, член 5      | Отрицательно регулируется на 6 часах. | Неизвестна  | Связывает HSP, участвует в укладке белков и в сборке белковых комплексов                    |
| ДНКJC12     | DnaJ (Hsp40) гомолог, субсеме́йство С, член 12     | Отрицательно регулируется на 6 часах. | Неизвестна  | Связывает HSP, участвует в укладке белков и в сборке белковых комплексов.                   |
| ДНКJC4      | DnaJ (Hsp40) гомолог, субсеме́йство С, член 4      | Отрицательно регулируется на 6 часах. | Цитоплазма  | Связывает HSP, участвует в укладке белков и в сборке белковых комплексов                    |
| ДНКJC5В     | DnaJ (Hsp40) гомолог, субсеме́йство С, член 5 бета | Отрицательно регулируется на 6 часах. | Неизвестна  | Участвует в укладке белков, реагирует на изменения в укладке белков.                        |
| HSPA8       | Теплового шока 70 кДа белок 8                      | Положительно регулируется на 6 часах. | Цитоплазма  | Регулирует TNF, связывает BAG1, STUB1, TP53, участвует в апоптозах.                         |
| HSPH1       | Теплового шока 105 кДа/110 кДа белок 1             | Положительно регулируется на 6 часах. | Цитоплазма  | Связывается с HSPA8, важен для укладки белков, реагирует на разворачивание белков и стресс. |

Эксперимент 4. Анализы ПЦР в режиме реального времени, использующие диабетический анализ.

Эксперименты, описанные в этом примере, были проведены для проверки общей гипотезы, что Q10 оказывает влияние на множество генов и меняет метаболический статус клетки. мРНК из SKMEL-28 клеток, обработанных 100 мкМ Q10, была оценена на RT-ПЦР по набору целевых белков, участвующих в диабетическом и связанными с ним путями. Результаты этого эксперимента демонстрируют, что для нескольких белков, участвующих в путях гликолиза и процессинге инсулина, изменились уровни экспрессии их мРНК (представлено в табл. 14).

Таблица 14. Основные изменения уровней мРНК в SKMEL-28 клетках, обработанных 100 мкМ Q10 в течение 16 ч

| Refseq    | Описание  | Обозначение | Кратное изменение после 16 часов (100 мкМ Q10) |
|-----------|---|-------------|--|
| NM_000162 | Глюкокиназа (гексокиназа 4)   | GCK         | 8,5386   |
| NM_178849 | Гепатоцитов ядерный фактор 4, альфа                                 | HNF4A       | 8,421  |
| NM_005249 | Forkhead box G1   | FOXG1       | 4,6396   |
| NM_000599 | Инсулин-подобный фактор роста связывающий белок 5                   | IGFBP5      | 2,2721   |
| NM_001101 | Актин, бета   | ACTB        | -2,0936  |
| NM_002863 | Фосфорилаза, гликоген; печень (болезнь Герса, гликогеноз VI типа)   | PYGL        | -2,65  |
| NM_001065 | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 1A         | TNFRSF1A    | -2,8011  |
| NM_021158 | Гомолог Tribbles 3 (Drosophila)                                     | TRIB3       | -2,8011  |
| NM_003749 | Инсулин рецептора субстрат 2  | IRS2        | -2,9404  |
| NM_004578 | RAB4A, член RAS семейство онкогенов                                 | RAB4A       | -3,1296  |
| NM_004176 | Регулирующий стеролы элемент, связывающий транскрипционный фактор 1 | SREBF1      | -3,5455  |
| NM_004969 | Инсулин-расщепляющий фермент  | IDE         | -4,4878  |
| NM_005026 | Фосфоинозитид-3-киназа, каталитический, дельта полипептид           | PIK3CD      | -6,8971  |
| NM_000208 | Инсулин рецептор  | INSR        | -8,6099  |
| NM_003376 | Фактор роста эндотелия сосудов A                                    | VEGFA       | -15,5194                                       |
| NM_001315 | Митоген-активируемая протеинкиназа 14                               | MAPK14      | -74,3366                                       |

Результаты этих первичных экспериментов показывают, что уровни мРНК для множества инсулин-связанных белков модулировались в обоих направлениях. Результаты показывают, что Q10 мог бы влиять на лечение и/или оценку диабетической болезни.

Дальнейшие эксперименты проводились для подтверждения результатов, полученных на SK-MEL-28 клетках, обработанных Q10. Многие гены в SK-MEL-28 клетках регулируются уже на 6 часах после обработки после обработки Q10. Однако первичная регуляция становится менее заметной на 16 и 24 часах. Около 48 часов мы обнаружили, что многие гены диабетического набора снова стали сильно

регулируемыми. Совпадающие результаты двух или более независимых экспериментов представлены ниже в таблице 15. В SCC клетках также показана регуляция некоторых генов, на 6 и 24 часах после обработки Q10. Эти результаты, полученные на SCC клетках, представлены в таблице 16, а гены, которые регулируются и в SK-MEL-28 клетках, и в SCC клетках, представлены в табл. 17.

Таблица 15. Связанные с диабетом гены в SK-MEL-28 клетках, регулируемые обработкой 100 мкМ Q10

| Обозначение | Описание  | Регуляция  | Локализация               | Возможные функции  |
|-------------|---|--|---------------------------|--|
| ADRB3       | Адренергический, бета-3-, рецептор  | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Плазматическая мембрана   | cAMP сигналинг, G-белка сигналинг                          |
| CEACAM1     | Молекула клеточной адгезии 1, связанная с карциозембриональным антигеном (билиарный гликопротеин) | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Внеклеточное пространство | Анти-апоптоз, позитивная регуляция ангиогенеза.            |
| CEBPA       | ССААТ/энхансер связывающий белок (C/EBP), альфа   | Положительно регулируется на 48 часах                                  | Ядро                      | Глюкокортикоидного рецептора сигналинг, VDR/RXR активация. |
| CTLA4       | Цитотоксичный Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4  | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Плазматическая мембрана   | Т-клеток рецептора сигналинг, активирует                   |
|             |   |  |                           | CASP8.   |
| DUSP4       | Двойная специфичная фосфатаза 4   | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Ядро                      | Фосфатаза  |
| ENPP1       | Эктонуклеотидная пирофосфатаза/фосфодиэстераза 1  | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Плазматическая мембрана   | Негативная регуляция пути инсулинового рецептора           |
| FOXO2       | Forkhead box C2 (MFX-1, мезенхимный forkhead 1)   | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Ядро                      | Анти-апоптоз, фактор транскрипции                          |
| G6PD        | Глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа   | Положительно регулируется на 48 часах, затем отрицательно регулируется | Цитоплазма                | Пентозофосфатный путь, метаболизм глутатиона.              |
| HMOX1       | Гем оксигеназа (дециклическая) 1  | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Цитоплазма                | Гем оксигеназа дециклическая                               |
| ICAM1       | Молекула внутриклеточной адгезии 1 (CD54), рецептор риновируса человека                           | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Плазматическая мембрана   | Регулируется аторвастатином, влияет на некоторые каспазы.  |
| IL4R        | Интерлейкина 4 рецептор   | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Плазматическая мембрана   | Положительная регуляция TP73, связывает IRS1 и IRS2        |
| IRS1        | Рецептора инсулина субстрат 1   | Положительно регулируется на 48 часах, затем отрицательно регулируется | Плазматическая мембрана   | Связывает инсулин рецептор                                 |
| IRS2        | Рецептора инсулина субстрат 2   | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Плазматическая мембрана   | IGF-1 сигналинг  |

|          |   |  |                           |  |
|----------|---|--|---------------------------|--|
| NSF      | N-этилмаленимид-сенситивный фактор                            | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Цитоплазма                | GABA сигналинг                           |
| PIK3CD   | Фосфоинозитид-3-киназа, каталитический дельта полипептид      | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Цитоплазма                | Киназа                                   |
| PPARG    | Рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом, гамма         | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Ядро                      | Транскрипционный фактор                  |
| PRKCB1   | Протеникиназа C, бета 1                                       | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Цитоплазма                | PKC семейство                            |
| SELL     | Селектин L (молекула адгезии лимфоцитов 1)                    | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Плазматическая мембрана   | Активирует RAS, MAPK                     |
| SREBF1   | Стерол-регуляторный элемент связывающий фактор транскрипции 1 | Положительно регулируется на 48 часах, затем отрицательно регулируется | Ядро                      | Транскрипционный фактор                  |
| STXBP1   | Синтаксин связывающий белок 1                                 | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Цитоплазма                | Присутствует в богатой миелином фракции. |
| TGFB1    | Трансформирующий фактор роста, бета 1                         | Положительно регулируется на 48 часах, затем отрицательно регулируется | Внеклеточное пространство | Про-апоптоз                              |
| NKX2-1   | NK2 гомеобокс 1   | Отрицательно регулируется на 48 часах                                  | Ядро                      | Транскрипционный активатор               |
| TNF      | Фактор некроза опухолей (TNF суперсемейство, член 2)          | Положительно регулируется на 48 часах                                  | Внеклеточное пространство | Про-апоптоз                              |
| TNFRSF1A | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 1A   | Отрицательно регулируется на 72 часах                                  | Плазматическая мембрана   | Про-апоптоз                              |
| VEGFA    | Фактор роста эндотелия сосудовA                               | Положительно регулируется на 58 часах, затем отрицательно регулируется | Цитоплазма                | Киназа                                   |

Таблица 16. Связанные с диабетом гены SCC клеток, регулируемые обработкой 100 мкМ Q10.

| Обозначение | Описание   | Регуляция.                                 |
|-------------|--|--|
| G6PD        | Глюкоза-6-фосфат дегидрогеназа                                       | Отрицательно регулируется на 6 часах.      |
| ICAM1       | Молекула межклеточной адгезии 1 (CD54), рецептор риновируса человека | Отрицательно регулируется на 6 часах.      |
| INPPL1      | Инозитол полифосфат фосфатаза-подобный 1                             | Отрицательно регулируется на 6 часах.      |
| NOS3        | Оксида азота синтаза 3 (эндотелиальные клетки)                       | Отрицательно регулируется на 6 часах.      |
| PIK3CD      | Фосфоинозитид-3-киназа, катализатор, дельта полипептид               | Отрицательно регулируется на 6 часах.      |
| PPARA       | Рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом, альфа                | Отрицательно регулируется на 6 часах.      |
| PYGL        | Фосфорилаза, гликоген; печень (болезнь Герса, гликогеноз VI типа)    | Отрицательно регулируется на 6 часах.      |
| SREBF1      | Стерол-регуляторный элемент связывающий транскрипционный фактор 1    | Отрицательно регулируется на 6 часах.      |
| STXBP2      | Синтаксин связывающий белок 2  | Отрицательно регулируется на 6 часах.      |
| TNF         | Фактор некроза опухолей (TNF суперсемейство, член 2)                 | Отрицательно регулируется на 6 часах.      |
| TNFRSF1A    | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 1A          | Отрицательно регулируется на 6 и 24 часах. |
| VEGFA       | Фактор роста эндотелия сосудов A                                     | Отрицательно регулируется на 6 часах.      |

Таблица 17. Гены, связанные с диабетом, регулируемые обработкой 100 мкМ Q10 как в SK-MEL-28, так и в SCC клетках

| Обозначение | Описание.   |
|-------------|---|
| G6PD        | Глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа   |
| ICAM1       | Молекула внутриклеточной адгезии 1 (CD54), рецептор риновируса человека |
| PIK3CD      | Фосфоинозитид-3-киназа, катализатор, дельта полипептид                  |
| SREBF1      | Стерол-регуляторный элемент связывающий транскрипционный фактор 1       |
| TNF         | Фактор некроза опухолей (TNF суперсемейство, член 2)                    |
| TNFRSF1A    | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 1A             |
| VEGFA       | Фактор роста эндотелия сосудов A  |

Уровни мРНК для множества имеющих отношение к инсулину белков модулировались в обоих направлениях. Q10 оказывает воздействие на регуляцию клеточного метаболизма, и таким образом влияет на болезни, связанные с нарушением метаболизма, такие как диабет. Ниже обсуждаются два белка, которые показали значительную модуляцию.

Митоген-активируемая протеинкиназа 14 (MAPK14): Митоген-активируемая протеинкиназа 14 (MAPK14) является членом семейства MAP-киназ. MAP-киназы действуют как интеграционные точки во множестве биохимических сигналов и участвуют во множестве клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференциация, регуляция транскрипции и развитие. Результаты этого эксперимента показывают, что MAPK14 обнаружила значительную понижающую регуляцию.

Гепатоцитов ядерный фактор 4, альфа (HNF4A): HNF4 (гепатоцитов ядерный фактор 4) является ядерным рецепторным белком, экспрессирующимся по большей части в печени, кишечнике, почках и

бета-клетках поджелудочной железы, который очень важен для развития печени. У человека существуют две изоформы HNF4, альфа и гамма, кодируемые двумя различными генами HNF4A и HNF4G, соответственно. (См., например, Chartier FL, Bossu JP, Laudet V, Fruchart JC, Laine B (1994). "Клонирование и секвенирование с ДНК, с кодированием гепатоцитарного ядерного фактора человека 4 демонстрирует наличие двух изоформ в печени человека". *Gene* 147 (2): 269-72.)

HNF4 первоначально считался "рецептором-сиротой". Однако позже обнаружили, что активность HNF4 поддерживается постоянным связыванием со множеством жирных кислот (см., например, Sladek F (2002). "В отчаянном поиске ...чего-то". *Mol Cell* 10 (2): 219-221 и Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Christian B, Demeure O (2005). "Регуляция транскрипции гепатического гена при помощи жирных кислот". *J Nutr* 135 (11)). Связывающийся с лигандом домен HNF4, как и у других ядерных рецепторов, принимает каноническую форму односпирального сэндвича (см., например Wisely GB, Miller AB, Davis RG, Thornquest AD Jr, Johnson R, Spitzer T, Seftler A, Shearer B, Moore JT, Miller AB, Willson TM, Williams SP (2002). "Гепатоцитарный ядерный фактор 4 является фактором транскрипции, который, в основном, связывает жирные кислоты". *Structure* 10 (9): 1225-34 и Dhe-Paganon S, Duda K, Iwamoto M, Chi YI, Shoelson SE (2002). "Кристаллическая структура связывающего домена альфа-лиганда HNF4 в комплексе с эндогенным лигандом жирной кислоты". *J Biol Chem* 277 (41): 37973-6) и взаимодействует с коактиваторными белками, (см., например Duda K, Chi YI, Shoelson SE (2004). "Структурная основа для HNF-4альфа активации при помощи связывания лигандом и коактиватором". *J Biol Chem* 279 (22): 23311-6).

Мутации по гену HNF4-α связаны с развитием приступов диабета взрослых в молодом возрасте (MODY). (см., например Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS (2001). "Молекулярные механизмы и клиническая патофизиология диабета взрослых в молодом возрасте". *N Engl J Med* 345 (13): 971-80.)

Гепатоцитов ядерный фактор 4 (HNF4) является тканеспецифичным транскрипционным фактором, про которого известно, что он регулирует большое число генов в гепатоцитах и клетках поджелудочной железы. Хотя HNF4 высоко экспрессируется в некоторых отделах почек, о его роли в этом органе и об HNF4-регулируемых генах в почечных клетках известно мало. Распространенность и активность HNF4 часто уменьшаются в клетках почечной карциномы (RCC), что указывает на то, что некоторые опухоли подавляют функцию HNF4 в почечных клетках. Интересно, что показано, что многие гены, регулируемые HNF4, дерегулируются в исследованиях RCC на микрочипах. Эти гены (ACY1, WT1, SELENBP1, COBL, EFHD1, AGXT2L1, ALDH5A1, THEM2, ABCB1, FLJ14146, CSPG2, TRIM9 и HEY1) являются хорошими кандидатами на роль генов, активность которых изменяется при снижении HNF4 в RCC.

В структуре лиганд-связывающего домена HNF4альфа (1M7W.pdb; Dhe-Paganon (2002) *JBC*, 277, 37973); наблюдался маленький липид, который был выделен из *E. coli*. Кристалл содержит две конформации белка, где удлиненная спираль 10 и короткая спираль 12 имеют альтернативные конформации. Интересно, что при изучении липид-связывающего участка нашли, что там существуют два участка. Один выходящий участок захватывает головную группу маленького липида, и было замечено, что несколько карман-образующих регионов колаколизированы с этим выходящим участком. Есть гипотеза, что Q10 специфически связывается с этим транскрипционным фактором. Когда моделируется, как Q10 встраивается в этот связанный с липидами канал, кольцо Q10 входит в карман (фигура 28). Мутация с неизвестными функциями (E276Q) могла бы иметь потенциал для упорядочения остатков, выпрямляющих этот карман, и тем самым оказывать негативное воздействие на предполагаемое связывание Q10.

Кроме того, в согласии с такой моделью связывания Q10, гидрофобный хвост выходил бы за внутреннюю полость и взаимодействовал бы с удлиненным helix 10. Таким образом, это взаимодействие могло бы потенциально менять конформацию helix 10/12 группы. Это могло бы затем менять равновесие активация/инактивация активности транскрипционного фактора.

Пример 7. Анализы антителами на микрочипах.

Оценка концентрации белка, связанной с наличием Q10, была проведена с использованием метода антител на микрочипах. Микрочип содержал антитела примерно к 700 белкам, широкому диапазону типов белков и потенциальным маркерам обменных путей.

Первоначальный эксперимент для определения изменений уровней концентрации белков в клетках, обработанных Q10, был проведен на микрочипах с антителами (Panorama XP725 Antibody Array, Sigma) и SK-MEL-28 клетками, обработанными 6 или 24 ч. Клетки были собраны и экстрагированы для получения растворимого белкового супернатанта. Две порции белков (~1 мг в общем) из каждого образца (1 мг/мл) каждая были помечены флуоресцентной меткой (Cy3 и Cy5, соответственно). Избыточная метка была удалена из белка, и материал использовался для инкубации на микрочипах. Для сравнения образцов с двух временных точек были смешаны равные количества белка, при этом каждый образец относился к различному меченому типу (например, 3-часовой экстракт, меченый Cy3, был смешан с 24-часовым экстрактом, меченым Cy5). После инкубации с микрочипом (в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем), микрочипы были промыты и высушены. Микрочипы сканировались на флуоресцентном лазерном сканере для подсчета сравнительной флуоресцентной ин-

тенсивности Су3 и Су5 меток.



Таблица 18. Белки с повысившимися уровнями в SK-MEL-28 клетках после 24-часовой обработки 50 мкМ Q10

| Название   | Соотношение | Название                                  | Соотношение |
|--|-------------|---|-------------|
| Cdk1   | 0,1         | Белок теплового шока 110                  | 0,4         |
| DcR1   | 0,1         | Серин треонин протеинфосфатаза 1g1        | 0,4         |
| Протеинкиназа Cb2                                | 0,1         | COX II                                    | 0,5         |
| Фактора некроза опухолей растворимый рецептор II | 0,1         | HSP70                                     | 0,5         |
| BAD  | 0,1         | BLK                                       | 0,5         |
| Каспаза 13                                       | 0,2         | Цитокератин 8 12                          | 0,5         |
| FBP1 PAKEMON                                     | 0,2         | BUBR1                                     | 0,5         |
| Zyx1a  | 0,2         | FOX2                                      | 0,5         |
| Cdc25A   | 0,3         | Серин треонин протеинфосфатаза 2 A Bg     | 0,5         |
| PIASx  | 0,3         | MSH6                                      | 0,5         |
| Фактор роста нервов b                            | 0,3         | DR5                                       | 0,5         |
| Протеинтирозин-фосфатаза PEST                    | 0,3         | Rad17                                     | 0,5         |
| hBRM hSNF2a                                      | 0,4         | BAF57                                     | 0,5         |
| GRP94  | 0,4         | Трансформирующий фактор роста b rap       | 0,5         |
| Кальмодулин                                      | 0,4         | BTK                                       | 0,5         |
| Серин треонин протеинфосфатаза 2C a b            | 0,4         | Серин треонин протеинфосфатаза 2 A/B rap2 | 0,5         |
| ARC  | 0,4         | CNPaза                                    | 0,5         |
| НеурабинII                                       | 0,4         | SynCAM                                    | 0,5         |
| Синтаза оксида азота bNOS                        | 0,4         | Ядерный антиген пролиферирующих клеток    | 0,5         |
| Серин треонин протеинфосфатаза 1b                | 0,4         |   |             |

Таблица 19. Белки с возросшими уровнями в SK-MEL-28 клетках после 24-часовой обработки 50 мкМ Q10

| Название                             | Соотношение | Название                            | Соотношение |
|--------------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|
| BclxL                                | 4,2         | Класпин                             | 2,1         |
| BID                                  | 3,7         | GRP75                               | 2,1         |
| Bmf                                  | 3,7         | Каспаза 6                           | 2,1         |
| PUMA bbc3                            | 3,0         | ILP2                                | 2,1         |
| Zip-Киназа                           | 2,8         | aАктинин                            | 2,1         |
| Bmf                                  | 2,8         | Витронектин                         | 2,1         |
| DcR2                                 | 2,7         | DRAK1                               | 2,1         |
| E2F1                                 | 2,7         | PTEN                                | 2,1         |
| FAK pTyr577                          | 2,5         | Grb2                                | 2,1         |
| FKHRL1 FOXO3a                        | 2,5         | HDAC4                               | 2,0         |
| MTBP                                 | 2,5         | HDAC7                               | 2,0         |
| Коннексин 32                         | 2,5         | Синтаза оксида азота bNOS           | 2,0         |
| Аннексин VII                         | 2,4         | HDAC2                               | 2,0         |
| p63                                  | 2,4         | p38 MAPK                            | 2,0         |
| SUMO1                                | 2,4         | Рилин                               | 2,0         |
| IAfadin                              | 2,3         | Протеинкиназа Cd                    | 2,0         |
| MDMX                                 | 2,3         | cerbB3                              | 2,0         |
| Pyk2                                 | 2,3         | hSNF5 INI1                          | 2,0         |
| RIP Рецептор-взаимодействующий белок | 2,3         | Протеинкиназа Ca                    | 2,0         |
| RICK                                 | 2,3         | Глутаматный рецепторNMDAR 2a        | 2,0         |
| IKKa                                 | 2,3         | Лептин                              | 2,0         |
| Bclx                                 | 2,3         | Диметилированный гистон H3 diMeLys4 | 2,0         |
| Afadin                               | 2,2         | BID                                 | 2,0         |

|   |     |                                      |     |
|---|-----|--------------------------------------|-----|
| Проллиферирующий<br>клеточный белок Ki67    | 2,2 | MeCP2                                | 2,0 |
| Гистон H3 pSer28                            | 2,2 | Рецептор фактора<br>роста нервов p75 | 2,0 |
| CASK LIN2                                   | 2,2 | Киназа легких цепей<br>миозина       | 2,0 |
| Центрин                                     | 2,2 | cRaf pSer621                         | 2,0 |
| TOM22                                       | 2,1 | GRP78 BiP                            | 2,0 |
| Синтаза оксида азота<br>эндотелиальная eNOS | 2,1 | cMyc                                 | 2,0 |
| Протеинкиназа Ba                            | 2,1 | Raf1                                 | 2,0 |
| Ламинин                                     | 2,1 | MTA2 MTA1L                           | 2,0 |
| Миозина Ib ядерный                          | 2,1 | Sir2                                 | 2,0 |
| Каспаза 7                                   | 2,1 | ATF2 pThr69 71                       | 2,0 |
| MAP Киназа 2 ERK2                           | 2,1 | Протеинкиназа C                      | 2,0 |
| KIF17                                       | 2,1 | Протеинкиназа Cb2                    | 2,0 |

Для того чтобы подтвердить ранее наблюдавшиеся апоптозные белки, и чтобы расширить оценку по большому числу про-апоптозных и анти-апоптозных белков, были выбраны два метода исследования, по которым можно скринировать большое семейство потенциально задействованных белков.

Во-первых, микрочип с антителами (Panorama XP725 Antibody Array, Sigma) был использован для скрининга с использованием 700 белковых антител для определения изменений в уровнях концентраций белков в SK-MEL-28 клетках, обработанных 24 часа с 50 мкМ Q10.

Из экспериментов с антителами, на SKMEL-28 с Q10 (24 ч), были идентифицированы следующие белки с измененными уровнями: Bcl-xl, Bmf, BTK, BLK, cJun (pSer63), Коннексин 32, PUMA bbc3, BID, Pag4, cCbl. Главное заключение, выведенное из этого первичного исследования, состояло в том, что на ожидаемые пре-апоптозные белки было оказано влияние.

Исследования на микрочипах с антителами на SK-MEL-28

Микрочип с антителами (Panorama XP725 Antibody Array, Sigma) был использован для скрининга с использованием 700 белковых антител для определения изменений в уровнях концентраций белков в SK-MEL-28 клетках, обработанных 24 ч с 50 мкМ Q10.

Таблица 20. Изменения уровней белка в SKMEL-28, обработанных 50 мкМ Q10

| Название    | Номер антител<br>(Sigma) | SKMEL28<br>Q10/<br>SKMEL28<br>контроль | SKMEL28/<br>HEKa<br>контроль | HEKa<br>Q10/<br>HEKa<br>контроль |
|-------------|--------------------------|--|------------------------------|----------------------------------|
| BclxL       | B9429                    | 2,46                                   | 1,04                         | 1,83                             |
| PUMA bbc3   | P4743                    | 2,31                                   | 1,14                         | 2,14                             |
| Bmf         | B1559                    | 2,23                                   | 1,12                         | 2,11                             |
| Bmf         | B1684                    | 2,09                                   | 1,13                         | 1,74                             |
| cJun pSer63 | J2128                    | 1,99                                   | 1,14                         | 1,85                             |
| BLK         | B8928                    | 1,94                                   | 1,05                         | 1,51                             |

Из экспериментов с антителами, на SKMEL-28 с Q10 (24 ч), были идентифицированы следующие белки с измененными уровнями: Bcl-xl, Bmf, BTK, BLK, cJun (pSer63), Коннексин 32, PUMA bbc3, BID, Pag4, cCbl. Эти данные подтверждают, что уровни пре-апоптозных белков изменились после инкубации с повышенными уровнями экзогенно добавленного Q10.

Bcl-xl ("базальноклеточная лимфома сверхбольшая") является трансмембранной молекулой в митохондриях. Она включена в сигнальный путь трансдукции FAS-L и является одним из нескольких антиапоптозных белков, которые являются членами белкового семейства Bcl-2. Она задействована в выживании раковых клеток. Однако известно, что альтернативный сплайсинг Bcl-x мРНК человека может приводить к по крайней мере двум различным видам Bcl-x мРНК, Bcl-xL и Bcl-xS. Преобладающий белковый продукт (233 аминокислоты) - более крупная Bcl-x мРНК, Bcl-xL, которая подавляет клеточную гибель вследствие удаления фактора роста (Boise et al., 1993. Cell 74, 597-608). Bcl-xS, а с другой стороны, ингибирует возможность Bcl-2 ингибировать клеточную гибель и делает клетки более восприимчивыми к апоптозной гибели клеток.

Таблица 21. Протеины с возросшими уровнями в SCC клетках после 24 ч обработки 100 мкМ Q10.

| Название                             | Соотношение | Название                                     | Соотношение |
|--------------------------------------|-------------|--|-------------|
| PUMA bbc3                            | 3,81        | Sir2   | 2,25        |
| HDAC7                                | 3,21        | DcR3   | 2,24        |
| BID                                  | 3,12        | RbAp48 RbAp46                                | 2,21        |
| MTBP                                 | 3,00        | OGlcNAc Трансфераза                          | 2,21        |
| p38 MAP Киназа<br>неактивированная   | 2,93        | GRP78 BiP                                    | 2,20        |
| PKR                                  | 2,87        | Sin3A  | 2,20        |
| TRAIL                                | 2,86        | p63  | 2,20        |
| DR5                                  | 2,86        | Пресенилин1                                  | 2,19        |
| Cdk3                                 | 2,82        | PMI  | 2,18        |
| NКадгерин                            | 2,71        | PAK1pThr212                                  | 2,17        |
| Рилин                                | 2,68        | HDAC8  | 2,16        |
| p35 Cdk5 Регулятор                   | 2,63        | HDAC6  | 2,15        |
| HDAC10                               | 2,60        | Синтаза оксида азота<br>индуцируемая iNOS    | 2,15        |
| RAP1                                 | 2,59        | Нейрофибромин                                | 2,15        |
| PSF                                  | 2,56        | Синтаксин 6                                  | 2,13        |
| cMyc                                 | 2,55        | Parkin                                       | 2,12        |
| Метилированного<br>гистона H3 MeLys9 | 2,54        | Rad17  | 2,11        |
| HDAC1                                | 2,51        | Синтаза оксида азота<br>bNOS                 | 2,10        |
| FIA                                  | 2,48        | TIS7   | 2,09        |
| ROCK1                                | 2,45        | OP18 Статмин<br>(статмин 1/онкобелок<br>18 ) | 2,08        |
| Bim                                  | 2,45        | фосфо-b-Катенин<br>pSer45                    | 2,07        |
| FXR2                                 | 2,44        | НеурабинII                                   | 2,07        |
| DEDAF                                | 2,44        | e Тубулин                                    | 2,07        |
| DcR1                                 | 2,40        | PKB pThr308                                  | 2,07        |
| APRIL                                | 2,40        | Орнитин<br>Декарбоксилаза                    | 2,07        |
| PRMT1                                | 2,36        | P53 BP1                                      | 2,06        |
| Pyk2 pTyr580                         | 2,34        | Pyk2   | 2,05        |
| Витронектин                          | 2,33        | HDAC5  | 2,05        |
| Синаптоподин                         | 2,32        | Коннексин 43                                 | 2,05        |
| Каспаза13                            | 2,30        | a1Синтрофин                                  | 2,04        |
| Синтаксин 8                          | 2,29        | MRP1   | 2,04        |
| DR6                                  | 2,29        | cerbB4                                       | 2,03        |
| BLK                                  | 2,28        | S Нитроцистеин                               | 2,03        |
| ROCK2                                | 2,28        | SGK  | 2,02        |
|                                      |             | Rab5   | 2,01        |
|                                      |             | Убиквитина C<br>терминальная<br>гидролаза L1 | 2,01        |
|                                      |             | Миозина Ib ядерный                           | 2,00        |
|                                      |             | Par4 апоптозного<br>ответа простаты 4        | 2,00        |

Таблица 22. Протеины с понизившимися уровнями в SCC клетках после 24 ч обработки 100 мкМ Q10.

| Название                           | Соотношение |
|------------------------------------|-------------|
| AP1                                | 0,68        |
| Центрин                            | 0,55        |
| CUGBP1                             | 0,67        |
| Цистатин А                         | 0,69        |
| Цитокератин СК5                    | 0,60        |
| Фибронектин                        | 0,63        |
| gParvin                            | 0,70        |
| Независимый фактор роста 1         | 0,63        |
| Фактор роста нервов b              | 0,60        |
| ПроКаспаза 8                       | 0,72        |
| Rab7                               | 0,62        |
| Rab9                               | 0,73        |
| Серин треонин протеинфосфатаза 1g1 | 0,71        |
| Серин треонин протеинфосфатаза 2 A | 0,73        |
| Bg                                 |             |
| SKM1                               | 0,70        |
| SLIPR MAGI3                        | 0,67        |
| Спектрин а и b                     | 0,70        |
| Spred2                             | 0,66        |
| TRF1                               | 0,74        |

Пример 8. Иммуноблоттинг.

Первый эксперимент, проведенный и оцененный с помощью иммуноблоттинга и 2-D геле-электрофорезов был осуществлен на линии клеток рака кожи SKMEL-28. В этой экспериментальной серии участвовали SK-MEL-28 клетки, обработанные в течение 3, 6, 12, и 24 ч 50 или 100 мкМ Q10.

Различные типы клеток были оценены путем иммуноблоттинга с антителами к Bcl-xL (фиг. 14), антителами к Виментину (фиг. 15), серией антител к функции митохондриального окислительного фосфорилирования (фиг. 16-21) и с серией антител, связанных с целостностью митохондриальной мембраны (фиг. 22-27). Результаты этих экспериментов демонстрируют, что некоторые из исследуемых белков в результате обработки клеток Q10 показали повышающую или понижающую регуляцию.

Пример 9. Связанные с диабетом гены, идентифицированные как модулированные по уровням мРНК вследствие обработки клеток рака поджелудочной железы (PaCa2) 100 мкМ Q10.

Диабетные анализы были применены для образцов, обработанных 100мкМ Q10, в различное время после обработки. Эксперименты были проведены практически так же, как описано выше. Различные гены, которые, как было обнаружено, были модулированы обработкой Q10, приведены в табл. 23 ниже. Результаты показывают, что обработка Q10 модулировала следующие гены: ABCC8, ACLY, ADRB3, CCL5, CEACAM1, CEBRA, FOXG1, FOXP3, G6PD, GLP1R, GPD1, HNF4A, ICAM1, IGFBP5, INPPL1, IRS2, MAPK14, ME1, NFKB1, PARP1, PIK3C2B, PIK3CD, PPARGC1B, PRKAG2, PTPN1, PYGL, SLC2A4, SNAP25, HNF1B, TNFRSF1A, TRIB3, VAPA, VEGFA, IL4R и IL6.

Таблица 23. Гены диабетного анализа, экспрессия которых регулируется 100 мкМ Q10 и возможные функции которых в клетке повышающе регулируются (серый) и понижающе регулируются (белый)

| Название гена | Функция гена  |
|---------------|---|
| ADRB          | cAMP сигналинг, G-белка сигналинг   |
| CCL5          | Природные лиганды для CCR5 и регулируется TNF.  |
| CEACAM1       | Анти-апоптозная, позитивная регуляция ангиогенеза                                       |
| GLPR1         | Повышение инсулиновой и уменьшение секреции глюкагоновой секреции поджелудочной железой |
| GPD1          | Метаболизм углеводов, НАДН окисление.   |
| ICAM1         | Регулируется аторвастатином, процессирует некоторые каспазы.                            |
| MAPK14        | Контрольная точка повреждения ДНК, ангиогенез, процесс метаболизма глюкозы.             |
| PARP1         | ДНК восстановление, регулирует TP53, NOS2A, NFkB, восстановление теломеров              |
| PIK3C2B       | Фосфоинозитид опосредованный сигналинг, регулирует AKT и AKT1.                          |
| PIK3CD        | Киназа  |
| PYGL          | Метаболизм углеводов, регулирует гликоген и гликогенсинтазу                             |
| SLC2A4        | Регулирует глюкозу и регулируется INS и инсулином.                                      |
| SNAP25        | Регуляция инсулиновой секреции, захват нейротрансмиттера.                               |
| CEBPA         | Глюкокортикоидных рецепторов сигналинг, VDR/RXR активация.                              |
| FOXP3         | Регулирует IL4, IL2.  |
| G6PD          | Пентозофосфатный путь, метаболизм глутатиона.   |
| IGFBP5        | Регуляция клеточного роста, регулируется IGF1   |
| INPPL1        | Регулирует Akt и гликоген.  |
| IRS2          | IGF-1 сигналинг   |
| ME1           | Регулирует яблочную кислоту и регулируется T3.  |
| NFKB1         | Регулирует IL6 и TNF.   |
| PPARGC1B      | Регулируется MAPK14   |
| PRKAG2        | Биосинтез жирных кислот, холестерина.   |
| PTPN1         | Дефосфорилирует JAK2 и EGFрецептор киназы.  |
| VEGFA         | Киназа, ангиогенез  |
| IL4R          | Положительно регулируется TP73, связывается с IRS1 и IRS2                               |
| HNF1B         | HNF4A   |
| TNFRSF1A      | Про-апоптоз   |
| TRIB3         | Регулирует AKT1 и негативный регулятор NFkB.  |
| VAPA          | Регулирует NFkB, миграцию везикул.  |

Пример 10. Связанные с ангиогенезом гены, идентифицированные как модулированные по уровням мРНК вследствие обработки клеток рака поджелудочной железы (PaCa2) 100 мкМ Q10.

Ангиогенезные анализы были применены для образцов, обработанных 100мкМ Q10, в различное время после обработки. Эксперименты были проведены практически так же, как описано выше. Различные гены, которые, как было обнаружено, были модулированы обработкой Q10, приведены в таблице 24 ниже. Результаты показывают, что обработка Q10 модулировала следующие гены: AKT1, ANGPTL4, ANGPEP, CCL2, CDH4, CXCL1, EDG1, EFNA3, EFN2, EGF, FGF1, ID3, IL1B, IL8, KDR, NRP1, PECAM1, PROK2, SERPINF1, SPHK1, STAB1, TGFB1, VEGFA и VEGFB.

Таблица 24. Список генов, связанных с ангиогенезом, экспрессия которых регулируется 100 мкМ Q10 и возможные функции которых в клетке повышающе регулируются (серый) и понижающе регулируются (белый)

| Ген     | Функция гена.   |
|---------|---|
| ANGPTL4 | антиангиогенез, негативный регулятор апоптозов, метаболизм липидов.   |
| CDH5    | Развитие кровяных сосудов, клеточная адгезия, негативный регулятор клеточной пролиферации.  |
| FGF1    | клеточная адгезия, клеточная пролиферация.  |
| AKT1    | Процесс метаболизма углеводов, процесс биосинтеза гликогена, процесс метаболизма глюкозы, путь сигналинга рецептора инсулина, активация про-апоптозных генных продуктов, апоптозные изменения митохондрий |
| ANPEP   | протеолиз, развитие многоклеточности, клеточная дифференциация  |
| CCL2    | хемотаксис, анти-апоптоз, JAK-STAT каскад, морфогенез органов, репликация вирусного генома  |
| CXCL1   | хемотаксис, воспалительная реакция, иммунный ответ, негативная регуляция клеточной пролиферации, организация и биогенез актинового цитоскелета  |
| EDG1    | позитивная регуляция клеточной пролиферации, трансмиссия нервного импульса, регуляция клеточной адгезии, дифференцировка нейронов, позитивная регуляция миграции клеток, позитивная регуляция Ras         |
| EFNB2   | клетка-клетка сигналинг, регулируется VEGFA.  |
| EGF     | Активация активности MAPKK, позитивная регуляция митозов, ДНК репликация  |
| IL1B    | Ответ на глюкокортикоидную стимуляцию, апоптозы, сигнальная трансдукция, клетка-клетка сигналинг, негативная регуляция клеточной пролиферации   |
| IL8     | Задержка клеточного цикла   |
| KDR     | VEGF путь, регулируется AKT.  |
| NRP1    | клеточная адгезия, сигнальная трансдукция, клетка-клетка сигналинг, клеточная пролиферация, регулируется VEGFA  |
| PECAM1  | Клеточная адгезия, регулируемая TNF.  |
| PROK2   | Активация MAPK, анти-апоптоз, клеточная пролиферация, регулирует AKT,   |
| SPHK1   | анти-апоптоз, клеточная пролиферация, регулирует митозы, миграцию клеток.   |
| STAB1   | Воспалительная реакция, клеточная адгезия, рецептор-опосредованный эндоцитоз, клетка-клетка сигналинг, негативная регуляция ангиогенеза, защитная реакция на бактерии                                     |
| VEGFA   | анти-апоптоз, регулирует TNF, регулируется HIF1.  |

Пример 11. Связанные с апоптозом гены, идентифицированные как модулированные по уровням мРНК вследствие обработки клеток рака поджелудочной железы (PaCa2) 100 мкМ Q10.

Апоптозные анализы были применены для образцов, обработанных 100мкМ Q10, в различное время после обработки. Эксперименты были проведены практически так же, как описано выше. Различные гены, которые, как было обнаружено, были модулированы обработкой Q10, приведены в таблице 25 ниже. Результаты показывают, что обработка Q10 модулировала следующие гены: ABL1, AKT1, Bcl2L1, BclAF1, CASP1, CASP2, CASP6, CIDEA, FADD, LTA, TNF, TNFSF10A и TNFSF10.

Таблица 25. Список генов, связанных с апоптозами, экспрессия которых регулируется 100 мкМ Q10 и возможные функции которых в клетке положительно регулируются (серый) и отрицательно регулируются (белый)

| Ген      | Функция гена   |
|----------|--|
| CASP1    | Про-апоптоз, Регулирует IL1B, регулируется TNF.  |
| CASP6    | Про-апоптоз, регулирует PARP, MCL1, APP  |
| TNF      | Клеточная пролиферация, дифференцировка, апоптозы, метаболизм липидов и коагуляция   |
| TNFSF10  | Про-апоптоз, регулирует каспазы  |
| ABL1     | Регулирует Bcl2L1, TP53, про-апоптоз, организация и биогенез актинового цитоскелета.   |
| AKT1     | Про-апоптоз, апоптозные изменения в митохондриях, транспорт углеводов, реакция на тепловой шок, метаболизм глюкозы, путь IGF сигналинга. |
| BclAF1   | Про-апоптоз.   |
| Bcl2L1   | Анти-апоптоз, высвобождение цитохрома с из митохондрий, регулирует каспазы, связывается с BAD, BAX, Bcl2L1                               |
| CASP2    | Анти-апоптоз.  |
| CIDEA    | Про-апоптоз  |
| FADD     | Про-апоптоз  |
| LTA      | Про-апоптоз  |
| TNFSF10A | Активатор каспаз   |

Пример 12. ПЦР диабетический анализ на клетках рака печени (HepG2).

HepG2 (рака печени) клетки были обработаны или раствором-носителем в течение 24 ч, или 100 мкМ Q10 в течение различного времени. Обработка была проведена на  $1 \times 10^5$  клеток на лунку, после чего следовала процедура, использованная для PaCa2 клеток (выше, примеры 9-11). Однако общее количество РНК, выделенной из этих образцов, было ниже ожидаемого. Обратная транскриптаза нормально работает при использовании 1 мкг общей РНК (определено подсчетом на 260 нм). Максимальный объем, который мог быть использован для обратной транскриптазы, составляет 8 мкл. Поскольку концентрация РНК была низкой, в RT-ПЦР анализах использовались образцы, обработанные раствором-носителем и Q10 в течение 16 и 48 ч с использованием 0,44 мкг РНК. Был проведен первичный анализ тенденций и паттернов в регуляции генов HepG2 обработкой 100 мкМ Q10, как представлено в таблице 26 ниже. Результаты показали, что каждый из генов PPARGC1A, PRKAA1 и SNAP25 показал отрицательную регуляцию на 16 часах после обработки (примерно в 20 раз, 6 раз и 5 раз, соответственно). На 48 часах после обработки PPARGC1A и PRKAA1 показали нормальное состояние или слабую повышающую регуляцию, тогда как SNAP25 показал понижающую регуляцию примерно в 2 раза.

Таблица 26. Список генов, регулируемых в диабетическом анализе, где HepG2 клетки обработаны 100 мкМ Q10

| Ген      | Название гена   | Функция гена.   |
|----------|---|---|
| PPARGC1A | Рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом гамма, коактиватор 1 альфа | Участвует в гибели клеток, пролиферации, клеточном дыхании и трансмембранном потенциале.                      |
| PRKAA1   | протеинкиназа, AMP-активируемый, альфа 1 каталитическая субъединица       | Регулирует TP53 и участвует в апоптозах, регулирует гликолиз, регулирует активность метаболических ферментов. |
| SNAP25   | Синапсомально-ассоциированный белок, 25кДа                                | Играет роль в транспорте, встраивании, экзоцитозе и высвобождении молекул.                                    |

Пример 13. ПЦР ангиогенезный анализ на клетках рака печени (HepG2).

HepG2 (рака печени) клетки были обработаны или раствором-носителем в течение 24 ч, или 100 мкМ Q10 в течение различного времени. Обработка была проведена на  $1 \times 10^5$  клеток на лунку, после чего следовала процедура, использованная для РаСа2 клеток (выше, примеры 9-11). Однако общее количество РНК, выделенной из этих образцов, было ниже ожидаемого. Обратная транскриптаза нормально работает при использовании 1 мкг общей РНК (определено подсчетом на 260 нм). Максимальный объем, который мог быть использован для обратной транскриптазы, составляет 8 мкл. Поскольку концентрация РНК была низкой, в RT-ПЦР анализах использовались образцы, обработанные раствором-носителем и Q10 в течение 16 и 48 ч с использованием 0,44 мкг РНК. Был проведен первичный анализ тенденций и паттернов в регуляции генов HepG2 обработкой 100 мкМ Q10, как представлено в таблице 27 ниже. Результаты показали, что каждый из генов ANGPTL3, ANGPTL4, CXCL1, CXCL3, CXCL5, ENG, MMP2 и TIMP3 показал повышающую регуляцию на 16 часах после обработки (примерно в 5.5, 3, 3, 3.2, 3, 3, 1 и 6.5 раз, 6 раз и 5 раз соответственно). ID3 показал понижающую регуляцию на 16 часах после обработки Q10, примерно в 5 раз по сравнению с контролем. На 48 ч после обработки ANGPTL3, CXCL1, CXCL3, ENG и TIMP3 еще показывали повышающую регуляцию (примерно в 3.5, 1.5, 3.175, 2 и 3 раза, соответственно, по сравнению с контролем), тогда как ANGPTL4, CXCL5, ID3 и MMP2 показывали понижающую регуляцию примерно в 1, 1, 2 и 18 раз, соответственно, по сравнению с контролем.

Таблица 27. Список генов, регулируемых в ангиогенезном анализе, где HepG2 клетки обработаны 100 мкМ Q10

| Ген     | Название гена  | Функция гена  |
|---------|--|---|
| ANGPTL3 | ангиопозтин-подобный 3   | Преимущественно экспрессируется в печени, роль в клеточной миграции и адгезии, регулирует метаболизм жирных кислот и глицерина.   |
| ANGPTL4 | ангиопозтин-подобный 4   | Регулируется PPAR $\gamma$ , ингибитор апоптозов в эндотелиоцитах сосудистой стенки, играет роль в метаболизме липидов и глюкозы и чувствительности к инсулину                    |
| CXCL1   | хемокин (C-X-C motif) лиганд 1 (меланомы роста стимуляция активности, альфа)           | Роль в клеточной пролиферации и миграции  |
| CXCL3   | хемокин (C-X-C motif) лиганд 3   | Активация хемокинов, активация звездчатых клеток печени, миграция, пролиферация.  |
| CXCL5   | хемокин (C-X-C motif) лиганд 5   | Продукция вместе с IL8 при стимуляции IL1 или TNF $\alpha$ . Играет роль в хемотаксисе, миграции, пролиферации.   |
| ENG     | Эндоглин   | Связывание с TGFBR и участие в миграции, пролиферации, прикреплении и инвазивности  |
| ID3     | Ингибитор ДНК связывающегося 3,  | Регулирует MMP2, регулируется TGFBR1, витамином D3, ретиноевой кислотой,  |
|         | доминантного негативного helix-loop-helix белка  | VEGFA, участвует в апоптозах, пролиферации, дифференцировке, миграции.  |
| MMP2    | матрикса металлопептидаза 2 (желатиназа А, 72кДа желатиназа, 72кДа тип IV коллагеназа) | Активация звездчатых клеток печени, HIF $^{\gamma}$ сигналинг, связывание с TIMP3, участие в образовании опухолей, апоптозах, пролиферации, инвазивности, миграции и хемотаксисе. |
| TIMP3   | TIMP металлопептидаз ингибитор 3   | Регулирует MMP2, ICAM1. Регулируется TGFBR, EGF, TNF, FGF и TP53. Участвует в апоптозах, клеточной адгезии и злокачественном перерождении.  |



Белки, известные своим участием в процессе ангиогенеза, были компонентами RT-ПЦР анализа. Ангиогенез является критически важным процессом, благодаря которому раковые клетки становятся злокачественными. Некоторые из этих белков также вовлечены в диабет.

ANGPTL3 и ANGPTL4. В литературе, имеющей отношение к ANGPTL3, этот белок связывается с регуляцией метаболизма липидов. В частности, из литературы (Li, C. Curr Opin Lipidol 2006 Apr;17(2):152-6) известно, что и ангиопоэтины, и ангиопоэтин подобные белки имеют сходные структуры доменов. ANGPTL3 и 4 единственные два члена этого суперсемейства, которые ингибируют активность липопротеинлипаз. Однако ANGPTL3 и 4 по-разному регулируются на многих уровнях, что подтверждается тем, что *in vivo* их функции не избыточны. ANGPTL3 и 4 протеолитически превращаются в две половины и по-разному регулируются ядерными рецепторами. Трансгенная сверхэкспрессия ANGPTL4, так же как нокаут ANGPTL3 или 4 демонстрируют, что эти два белка играют важную роль в метаболизме липопротеинов: образующийся в печени ANGPTL3 ингибирует липопротеинлипазную активность преимущественно во время пищеварения, тогда как ANGPTL4 играет важную роль и во время пищеварения, и в промежутках между пищеварением. Кроме того, ANGPTL4 регулирует тканеспецифичную доставку липопротеин-производных жирных кислот. ANGPTL4 таким образом является эндокринным или аутокринным/паракринным ингибитором липопротеинлипаз, в зависимости от места экспрессии.

Липопротеинлипаза является ферментом, который гидролизует липиды в липопротеинах, таких как хиломикроны и липопротеины с очень низкой плотностью (VLDL), в три жирные кислоты и одну молекулу глицерина. Липопротеинлипазная активность в данных тканях является лимитирующей скоростью стадией для усваивания триглицерид-производной жирной кислоты. Дисбаланс в разделении жирных кислот имеет значительные метаболические последствия. Показано, что высокожировые диеты приводят к тканеспецифичной сверхэкспрессии LPL, которая задействована в тканеспецифичной резистентности к инсулину и последующем развитии сахарного диабета типа 2.

Результаты этого примера показывают, что Q10 модулирует белки, участвующие в метаболизме липидов, что подтверждает важность дальнейших исследований ANGPTL3/ANGPTL4 и связанных с ними обменных путей. Например, ANGPTL3/ANGPTL4 играют определенную роль в следующих путях: Akt, холестерин, жирные кислоты, HDL-холестерин, HNF1A, ITGA5, ITGA5, ITGAV, ITG83, L-трилодотинонин, LIPG, LPL, Mapk, Nrth, NR1H3, PPAR, PTK2, RXRA, триацилглерол и 9-цис-ретиноевая кислота.

Пример 14. ПЦР анализ на клетках рака печени (HEPG2).

Апоптозные анализы были применены для образцов, обработанных 100мкМ Q10 в течение 16 и 48 ч, как описано выше. Однако анализ для 48 ч был проведен с использованием в качестве фулорофора FAM, а не SYBR. И FAM, и SYBR флуоресцируют на одной длине волн.

Различные гены, которые, как было обнаружено, были модулированы обработкой Q10, приведены в таблице 28 ниже. Результаты показывают, что CASP9 показала повышающую регуляцию на 16 ч после обработки Q10, примерно в 61 раз по сравнению с контролем, тогда как BAG1 и TNFRSF1A показали понижающую регуляцию на 16 часах после обработки примерно в 6 и 4 раза, соответственно, по сравнению с контролем. На 48 ч после обработки CASP9, BAG1 и TNFRSF1A показали повышающую регуляцию примерно в 55, 11 раз, соответственно, по сравнению с контролем.

Таблица 28. Список генов, регулируемых в апоптозном анализе, где HepG2 клетки обработаны 100 мкМ Q10

| Ген      | Название гена   | Функция гена.  |
|----------|---|--|
| BAG1     | BCL2-ассоциированный атаноген                               | Участвует в апоптозах  |
| CASP9    | каспаза 9, связанная с апоптозом цистеинпептидаза           | Апоптоз через высвобождение цитохрома c.                               |
| TNFRSF1A | Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, член 1A | Анти-апоптоз, связывает многие факторы гибели клеток, регулирует ICAM1 |

Пример 15. Определение способности эпи-переключателя лечить метаболическое расстройство.

Для того чтобы определить, способен ли выбранный Эпи-переключатель, например, CoQ10, лечить метаболическое нарушение, например, диабет, были проведены анализы на основе клеток, в которых мониторилось возрастание инсулин-стимулированного потребления глюкозы. В частности, дифференцированные мышечные адипоциты использовались для идентификации агентов, которые обладают способностью увеличивать потребление глюкозы после стимуляции инсулином, как определялось путем подсчета цинтиллиции глюкозы с радиоактивной меткой (используя, например, Perkin Elmer 1450

Microbeta JET reader). Эти анализы проводились следующим образом.

Материалы и методы.

Среда "Prees".

Полная среда, также называемая средой "Prees", приготавливалась следующим образом. В модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM) добавлялся L-глутамин, пенициллин-G и стрептомицин (пен/стреп), и инактивированная высокой температурой эмбриональная бычья сыворотка (FBS) (температура инактивации составляла 65°C в течение 30 мин). Поскольку сыворотка может действовать на рост, адгезию и дифференцировку клеток, любая новая партия сыворотки вначале тестировалась перед использованием. Среда приводилась в равновесие в инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>), пока не устанавливалось подходящего значения pH (около 7), что показывалось красным/оранжевым цветом индикаторного красителя. Если среда становилась розовой (что показывает высокий pH), мы отказывались от такой среды, поскольку эти условия могут повлиять на клетки и денатурировать инсулин, используемый в дифференцировочной среде-1 (ДС1) и дифференцировочной среде-2 (ДС2).

Дифференцировочные среды.

Дифференцировочная среда-1 (ДС1) приготавливалась путем добавления к DMEM 10% FBS, L-глутамина, пен/стреп, IBMX (375 мкЕД), инсулина (120 нМ), и дексаметазона (188 нМ). Дифференцировочная среда-2 (ДС2) приготавливалась путем добавления к DMEM 10% FBS, L-глутамина, пен/стреп и инсулина (120 нМ).

Приготовление желатинизированных планшетов.

Планшеты клеточной культуры желатинизировались следующим образом. Желатин (1% (мас./об.) в дистиллированной воде) был автоклавирован и хранился при комнатной температуре. Дно каждой лунки с культурой клеток было покрыто равномерно желатиновым раствором, так, чтобы не образовывались комки. Этот раствор был удален так, чтобы оставалась тонкая пленка желатина. Эти планшеты оставлялись сушиться в вытяжном шкафу. Планшеты затем промывались PBS, после чего 0,5% раствор глutarового альдегида (глutarальдегид в дистиллированной воде) добавлялся с лункам с клеточной культурой. Через десять минут лунки дважды промывались DMEM, содержащим пен-стреп. Каждый этап промывки должен был составлять не менее пять минут.

Клеточная культура.

3T3-L1 преадипоцитные клетки пересаживались каждые 2-3 дня или после достижения конfluence-ности около 60%. Чрезмерная конfluence-ность может повлиять на способность этих клеток дифференцироваться в адипоциты.

Другие реагенты.

D-(+)-глюкоза ("cold" глюкоза, без радиоактивной метки) добавлялась к смеси DPBS до конечной концентрации 10 мМ.

Лизирующий буфер, смесь основания (например, гидроксида натрия в конечной концентрации 0.5N) и детергента (напр, сульфат додецила натрия (SDS), разведенного до конечной концентрации 0,1% (масса/объем)) приготавливался каждый раз свежий (за один или два часа до использования). Пере использованием лизирующий буфер нагревался до температуры, превышающей комнатную температуру на период примерно 30 мин, чтобы избежать осаждения буфера.

Определение потребления глюкозы.

Клетки преадипоциты 3T3-L1 были помещены в планшеты с плотностью примерно 5000 клеток на лунку (в черные NUNC 96 луночные планшеты). Эти клетки дифференцировались в адипоциты в два различных этапа. Вначале клетки культивировались в дифференцированной среде-1 (DM1) (день 1 дифференцировки адипоцитов) в течение периода двух-трех дней. DM1 предотвращает пролиферацию и вызывает экспрессию адипоцит-специфичных генов. Клетки затем культивировались в дифференцированной среде-2 (DM2) от 3 до 4 дней, после чего культуральная среда замещалась свежей DM2. Анализ потребления глюкозы проводился на 9-15 дней дифференцировки. За два дня до эксперимента (на 7-13 день дифференцировки), ДС2 удалялась и замещалась свежей средой "Prees". Исследуемые соединения добавлялись в это время, так чтобы инкубационный период составлял примерно 48 ч. В день эксперимента клетки (теперь на 9-15 день дифференцировки) выдерживались три часа в DPBS, сульфате магния (0,8 мМ) и HEPES (10 мМ) при pH около 7. После этого инкубационного периода к адипоцитам добавлялся свежий DPBS-содержащий инсулин (10 нМ). Свежий DPBS без инсулина добавлялся к клеткам, служившим негативным контролем. После инкубационного периода в течение 25 мин при 37°C, радиоактивная глюкоза (меченая <sup>14</sup>C, в конечной концентрации 0,04 мМ, около 0,26 мКи <sup>14</sup>C-глюкозы на каждую лунку) добавлялась к среде на период 15 мин при комнатной температуре. Среда затем удалялась и клетки тщательно промывались и лизировались. После лизиса клетки формировали маленькую мутную массу, находящуюся на дне лунки, 10% ледяная уксусная кислота добавлялась к каждой лунке для нейтрализации реакции лизиса. Затем к лункам добавлялась сцинтиллирующая жидкость и включение глюкозы определялось путем подсчета радиоактивности в каждой лунке с использованием MicroBeta планшетного ридера.

С использованием вышеописанного экспериментального протокола эпидермальный идентифи-

фицировался как способный лечить метаболическое нарушение, например диабет, где эпипереклюатель увеличивает, повышает или усиливает инсулин-стимулируемое потребление глюкозы в клетках *in vitro*.

Пример 16. Идентификация MBM, связанной с метаболическим расстройством.

Для того чтобы оценить перспективную молекулу (например, фактор влияния) как потенциальную MBM, выбранная перспективная MBM экзогенно добавлялась к нескольким клеточным линиям, включая как больные (раковые) линии клеток, так и линии нормальных контрольных клеток, и оценивались изменения, вызванные в профиле клеточного микроокружения для каждой клеточной линии. Изменения в клеточной морфологии, физиологии и/или составе клеток, включая, например, мРНК и уровни белков, оценивались и сравнивались для больных клеток по сравнению с нормальными клетками.

Изменения в клеточной морфологии/физиологии оценивались по определению чувствительности и апоптозного ответа клеток к перспективной MBM. Эти эксперименты проводились, как детально описано в примере 3. Вкратце, группа клеточных линий, содержащая по крайней мере одну контрольную линию клеток и по крайней мере одну линию раковых клеток подвергалась воздействию различных концентраций перспективной MBM. Чувствительность клеточных линий к потенциальной MBM оценивалась по мониторингу клеточного выживания в разное время и в диапазоне применявшихся концентраций. Апоптозный ответ клеточных линий к потенциальной MBM оценивался с использованием, например, Nexin реагента в комбинации с методом проточной цитометрии. Nexin реагент содержит комбинацию двух красителей, 7AAD и Annexin-V-PE, и позволяет оценить популяцию клеток на раннем и позднем апоптозах. Можно использовать дополнительный апоптозный анализ, который оценивает одонитевые ДНК, с использованием, например, Apostrand™ ELISA метода. Чувствительность и апоптозный ответ больных и контрольных клеточных линий оценивались и сравнивались. Молекула, которая демонстрирует различную цитотоксичность и/или по-разному вызывает апоптозный ответ в больных клетках по сравнению с нормальными клетками, идентифицировалась как MBM.

Оценивались изменения в составе клеток после воздействия перспективной MBM. Изменения в экспрессии генов на уровне мРНК анализировались с использованием метода ПЦР-анализа в режиме реального времени. Эти эксперименты проведены, как описано детально в примерах 6 и 9-13. Вкратце, перспективная MBM экзогенно добавлялась к одной или более клеточным линиям, включая, например, линию больных клеток и линию нормальных контрольных клеток, и мРНК выделялась из клеток через различное время после воздействия. Уровень мРНКs для генов, участвующих в специфичных путях, оценивался с использованием целевых анализов, включая, например, анализы, специфичные для апоптозов, окислительного стресса и антиоксидантной защиты, ангиогенеза, теплового шока или диабета. Гены, у которых транскрипция их мРНК менялась в два раза или больше, идентифицировались и оценивались. Молекула, которая вызывает изменения в уровнях мРНК в клетках и/или вызывает различные изменения в уровне одной или более мРНК в больных клетках по сравнению с нормальными клетками, идентифицировалась как MBM.

В дополнительных экспериментах, изменения в экспрессии генов по уровню белка анализировались с использованием метода антител на микрочипах, 2-мерного геля электрофореза, за которым следовала идентификация белка с использованием масс-спектрометрии, и иммуноблоттинга. Эти эксперименты проведены, как описано в примерах 7, 4 и 8, соответственно. Вкратце, перспективная MBM экзогенно добавлялась к одной или более клеточным линиям, включая, например, линию больных клеток и линию нормальных контрольных клеток, и растворенный белок экстрагировался из клеток в различное время, например, на 6 ч или 24 ч после обработки. Изменения, вызванные в уровнях белков перспективной MBM, оценивались с использованием микрочипов с антителами, содержащих антитела к около 700 белкам, широкому диапазону типов белков и потенциальным маркерам обменных путей. Дальнейший дополнительный протеомический анализ мог быть проведен с использованием мерного (2-D) геля электрофореза в совокупности с методом масс-спектрометрии. Перспективная MBM экзогенно добавлялась к одной или более клеточным линиям, включая, например, линию больных клеток и линию нормальных контрольных клеток, и клеточный осадок лизировался и подвергался 2-D геля электрофорезу. Гели анализировались для идентификации изменений в уровнях белков в обработанных образцах по сравнению с контрольными, необработанными образцами. Гели анализировались для идентификации изменений на временных точках, для того чтобы определить возросшие уровни, снизившиеся уровни или посттрансляционную модификацию. Точки, показавшие статистически достоверные изменения, извлекались и подвергались белковой идентификации расщеплением пепсином и характеристизации масс-спектрометрией. Проводился поиск охарактеризованных пептидов в белковой базе данных, например, с программными анализами Mascot и MSRAТ для идентификации белков. В дополнение к вышеупомянутым 2-D гелям анализам и экспериментам с антителами на микрочипах, потенциальные изменения в уровнях специфических белков, вызванные перспективной MBM, могли быть оценены путем иммуноблоттинга. Во всех протеомических экспериментах белки с возросшими или снизившимися уровнями в различных клеточных линиях идентифицировались и оценивались. Молекула, которая вызывает изменения в уровнях белков в клетках и/или вызывает различные изменения в

уровне одного или более белков в больных клетках по сравнению с нормальными клетками, идентифицируется как МВМ.

Гены, относительно которых было обнаружено, что они модулируются воздействием перспективной МВМ из вышеупомянутых экспериментов, становились объектами клеточных и биохимических путей анализов и в соответствии с ними могли быть разделены на несколько клеточных путей метаболизма, включая апоптозы, биологию рака и рост клеток, гликолиз и метаболизм, молекулярный транспорт и клеточный сигналинг.

Проводились эксперименты для подтверждения вхождения перспективной МВМ в клетки, для определения того, локализовалась ли перспективная МВМ внутри клетки, и для определения уровня и формы перспективной МВМ, присутствующей в клетке. Эксперименты проводились, например, как описано детально в примере 5. Например, для определения уровня и формы перспективной МВМ, присутствующей в митохондриях, получались и анализировались богатые митохондриями препараты из клеток, обработанных перспективной МВМ. Тем самым можно подтвердить, что уровень перспективной МВМ, присутствующей в митохондриях, возрастает время- и дозозависимым образом при добавлении экзогенной перспективной МВМ. Кроме того, изменения уровней белков из богатых митохондриями образцов анализировались с использованием 2-D гель-электрофореза, и белок идентифицировался с помощью масс-спектро스코пии, как описывалось выше для белковых образцов из целых клеток. Перспективные МВМ, для которых обнаружено, что они проникают в клетку и присутствуют в повышенной концентрации, например, в митохондриях, идентифицировались как МВМ. Уровни перспективной МВМ в клетках, или, например, специфически в митохондриях, определявшиеся на разных временных точках, могут коррелировать с другими наблюдаемыми клеточными изменениями, что подтверждается, например, модуляцией мРНК и уровней белка для определенных белков.

Перспективные МВМ, для которых было установлено, что они вызывают изменения в составе клеток, например, вызывают изменения экспрессии генов на уровне мРНК или белков, идентифицируются как МВМ. Перспективные МВМ для которых было установлено, что они вызывают разные изменения в морфологии, физиологии или составе клеток (например, разные изменения экспрессии генов на уровне мРНК или белков), в болезненном состоянии (например, диабет или ожирение) по сравнению с нормальными клетками идентифицируются как МВМ и, в особенности, как имеющие многоаспектный характер. Перспективные МВМ, относительно которых было обнаружено, что они способны проникать в клетки, идентифицировались как МВМ и, в особенности, как имеющие многоаспектный характер, поскольку тем самым перспективные МВМ демонстрировали в добавление к терапевтическому действию также и действие молекулы-переносчика.

Пример 17. Идентификация CoQ10 как эпи-переключателя, связанного с метаболическим расстройством.

Группа линий клеток кожи, включающая контрольные клеточные линии (в первую очередь культуру кератиноцитов и меланоцитов) и несколько линий раковых клеток кожи (SK-MEL-28, неместазирующая меланома кожи; SK-MEL-2, метастазирующая меланома кожи; или rSCC, плоскоклеточная карцинома; РаСа2, клеточная линия рака поджелудочной железы; или HEP-G2, клеточная линия рака печени) были подвергнуты воздействию различных концентраций коэнзима Q10. Линии раковых клеток показали дозозависимый ответ, отличавшийся по сравнению с контрольными линиями клеток, где индукция апоптозов и клеточная гибель имели место только в раковых клетках. Примеры экспериментов описаны детально, например, в примере 3.

Были проведены анализы для оценки изменений в мРНК и уровнях белка после воздействия CoQ10 в ранее идентифицированных клетках. Изменения экспрессии мРНК анализировались с использованием ПЦР в режиме реального времени на микрочипах, специфичных для: апоптозов, окислительного стресса и аксидантов, ангиогенеза и диабета. Изменения экспрессии белка анализировались с использованием анализа антител на микрочипах и иммуноблоттинга. Результаты этих анализов демонстрировали, в клеточных линиях в результате добавления коэнзима Q10 наблюдались значительные изменения экспрессии генов, на уровне как мРНК, так и белков. В результате обработки CoQ10 наблюдалась модуляция многочисленных генов, про которые было известно, что они связаны с процессами клеточного метаболизма или участвуют в них. Например, было обнаружено, что экспрессия белка ядерного рецептора HNF4A модулируется в клетках после обработки Q10. Экспрессия трансацетальдегиддегидрогеназы 1 (TAL) также модулировалась в клетках, обработанных Q10. TAL балансирует уровни НАДФН и промежуточных продуктов реактивного кислорода, тем самым регулируя трансмембранный потенциал митохондрий, который критически важен для синтеза АТФ и выживания клеток. Имеющие особое значение для метаболических нарушений, многие гены, известные как связанные, например, с диабетом, были идентифицированы как регулируемые Q10. Примеры экспериментов описаны здесь детально, например, в примерах 4, 6, 7, 8 и 9.

Q10 является необходимым кофактором для возбуждения процессов фосфорилирования в митохондриях для выработки энергии. Уровень коэнзима Q10, а также формы CoQ10, присутствующей в митохондриях, был определен путем анализа богатых митохондриями препаратов из клеток, обработанных CoQ10. Подтвердилось, что уровень коэнзима Q10, присутствующего в митохондриях, возрас-

тает время- и дозозависимым образом при добавлении экзогенного Q10. Время обработки коррелировало с множеством клеточных изменений, наблюдаемых в модуляции уровней мРНК и белков для определенных белков, связанных с путями метаболизма и апоптоза. Примеры экспериментов описаны здесь детально, например, в примере 5.

Результаты, описанные здесь, идентифицируют эндогенную молекулу CoQ10 как эпипереключатель. В особенности результаты идентифицируют CoQ10 как вызывающую переключение в метаболическом статусе и частичное восстановление функций митохондрий в клетках. Эти заключения основываются на следующей интерпретации данных, описанных здесь, и существующих на настоящее время представлений в соответствующей области.

Известно, что Q10 синтезируется, активно транспортируется, накапливается и используется во внутренней мембране митохондрий. Известно также, что Q10 - необходимый кофактор в процессах окислительного фосфорилирования в митохондриях, вырабатывающих энергию. Однако в большинстве раковых клеток энергия вырабатывается преимущественно в процессе гликолиза, следующего за ферментацией молочной кислоты в цитоплазме, а не после окисления пирувата в митохондриях, как у большинства нормальных клеток. Окислительное фосфорилирование включает транспорт электронов комплексами и цитохромом c. Апоптозы включают разрушение митохондрий, когда про-апоптотические факторы вызывают повышенную проницаемость внутренней мембраны митохондрий. Используя различные метаболические пути энергетического синтеза, раковые клетки способны ослаблять нормальную апоптотическую реакцию на дефекты в клетке. Не имея намерения ограничиваться теорией, Заявители делают предположение, что Q10 функционирует, повышая регулируемые белки пути окислительного фосфорилирования, таким образом возвращая митохондриальную функцию назад к состоянию, при котором распознаются онкогенетические дефекты и запускается апоптоз. Таким образом Q10 действует как эпипереключатель, переключающий метаболический статус клетки.

Пример 18. Идентификация эпипереключателя, связанного с метаболическим заболеванием.

Группа линий клеток кожи, включающая контрольные клеточные линии (в первую очередь культуру кератиноцитов и меланоцитов) и несколько линий раковых клеток кожи (SK-MEL-28, неметастазирующая меланома кожи; SK-MEL-2, метастазирующая меланома кожи; или rSCC, плоскоклеточная карцинома; PaCa2, клеточная линия рака поджелудочной железы; или HEP-G2, клеточная линия рака печени) были подвергнуты воздействию различных концентраций перспективного эпиперекключателя. Изменения в клеточной морфологии/физиологии были оценены при исследовании чувствительности и апоптотического ответа клеток к перспективному эпиперекключателю. Эти эксперименты были проведены, как детально описано в примере 3. Вкратце, чувствительность клеточных линий к перспективному эпиперекключателю оценивалась путем мониторинга выживания клеток на различных временных точках и в диапазоне применяемых концентраций. Апоптотический ответ клеточных линий к перспективному эпиперекключателю оценивался с использованием, например, Nexin реагента в комбинации с методом проточной цитометрии. Nexin реагент содержит комбинацию двух красителей, 7AAD и Annexin-V-PE, и позволяет количественно определить популяцию клеток на ранних и поздних апоптозах. Дополнительное апоптотическое исследование, в котором оцениваются одноклеточные ДНК, может использоваться, например, метод Apostrand™ ELISA. Чувствительность и апоптотический ответ больных и контрольных клеточных линий оценивались и сравнивались. Перспективные эпиперекключатели оценивались на основе их способности предпочтительно или выборочно ингибировать клеточный рост в раковых клетках по сравнению с нормальными или контрольными клетками. Перспективные эпиперекключатели в дальнейшем оценивались на основе их способности предпочтительно или выборочно вызывать апоптозы в раковых клетках по сравнению с нормальными или контрольными клетками.

Были проведены анализы для оценки изменений в уровнях мРНК и белков ранее идентифицированных клеток после обработки перспективным эпиперекключателем. Изменения уровней мРНК анализировались с использованием ПЦР в режиме реального времени на микрочипах. Эти эксперименты были проведены, как описано детально в примерах 6 и 9-13. Вкратце, мРНК выделялась из клеток через различное время после воздействия. Уровни мРНК для генов, участвующих в специфичных путях, оценивались с использованием целевых анализов, включая, например, анализы, специфичные для апоптозов, окислительного стресса и антиоксидантной защиты, ангиогенеза, теплового шока или диабета. Гены, у которых транскрипция их мРНК менялась в два раза или больше, идентифицировались и оценивались.

Изменения в экспрессии белков анализируются с использованием анализов антител на микрочипах, 2-D гель-электрофорез анализов в совокупности с масс-спектроскопией, и анализов иммуноблоттингом. Эти эксперименты проводились, как детально описано в примерах 7, 4 и 8, соответственно. Вкратце, растворимый белок выделялся из клеток на различных временных точках, например, 6 ч или 24 ч, после чего обрабатывался перспективным эпиперекключателем. Изменения, вызываемые в уровнях белков перспективным эпиперекключателем, оценивались с использованием микрочипа на антителах, содержащего антитела к примерно 700 белкам, широкому диапазону типов белков и потенциальным маркерам обменных путей. Дальнейшие дополнительные протеомические анализы можно провести с использованием 2-мерного (2-D) гель-электрофореза в совокупности с методом масс-спектропии.

Перспективный эпи-переключатель экзогенно добавлялся с клеточным линиям и клеточный осадок лизировался и подвергался 2-D гель-электрофорезу. Гели анализировались для идентификации изменений в уровнях белков в обработанных образцах по сравнению с контрольными, необработанными образцами. Гели анализировались для идентификации изменений на разных временных точках обработки, для определения возросших уровней, снизившихся уровней или посттрансляционной модификации. Точки, показавшие статистически достоверные изменения, извлекались и подвергались белковой идентификации путем трипсинового расщепления и масс-спектроскопии. Охарактеризованные пептиды искались в белковой базе данных, например, с программами Mascot и MSRAТ для идентификации белков. В дополнение к предшествовавшим 2-D гель-анализам и экспериментам с антителами на микрочипах, потенциальные изменения уровней специфических белков, вызванные возможной MBM, могли быть оценены иммуноблоттингом. Во всех протеомических экспериментах белки с возросшими или снизившимися уровнями в различных клеточных линиях идентифицировались и оценивались.

Возможные эпи-переключатели оценивались на основе изменений, вызванных в экспрессии генов, в уровнях мРНК и/или белков, в клеточных линиях вследствие добавления возможного эпи-переключателя. В частности, возможные эпи-переключатели оценивались на основе их способности модулировать гены, известные своей связью или включенностью в клеточные метаболические процессы. По особенной связи с метаболическими заболеваниями, возможные эпи-переключатели оценивались по их способности модулировать гены, известные своей связью, например, с диабетом или ожирением.

Уровень возможного эпи-переключателя, также как форма возможного эпи-переключателя, присутствующая в клетке или в определенной клеточной локации определялась с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области. Например, уровень возможного эпи-переключателя в митохондриях в зависимости от времени и дозы определялся путем анализа богатых митохондриями препаратов из клеток, обработанных возможным эпи-переключателем. Уровни возможного эпи-переключателя в митохондриях на разных временных точках можно было сравнить и определить их корреляцию с другими наблюдаемыми клеточными изменениями, такими как модуляция уровней мРНК и белков для специфичных белков, связанных с метаболизмом и путями апоптоза.

Перспективные эпи-переключатели, которые, как наблюдалось, вызывали переключение метаболического статуса в клетке на основании результатов, наблюдаемых в предыдущих экспериментах, идентифицируются как эпи-переключатели. Например, перспективный эпи-переключатель, который увеличивает, повышает или усиливает инсулин-стимулируемое потребление глюкозы в клетках, идентифицировался как эпи-переключатель.

Пример 19. Идентификация витамина D3 как эпи-переключателя.

Витамин D3, или 1 $\alpha$ , 25-дигидроксивитамин D3 (также известный как кальцитриол) является метаболитом витамина D, который синтезируется из витамина в двухэтапном энзимном процессе. Витамин D3 взаимодействует со своим повсеместным ядерным рецептором витамина D (VDR), регулируя транскрипцию широкого спектра генов, участвующих в кальциевом и фосфатном гомеостазе, а также в делении и дифференцировке клеток. Сообщалось, что витамин D3 обладает антираковым действием во многочисленных модельных системах, включая плоскоклеточную карциному, аденокарциному простаты, рак яичников, молочную железу и легких (обзор Deeb et al. 2007 *Nature Reviews Cancer* 7:684-700).

Сообщалось, что антираковые эффекты витамина D3 участвуют во многих механизмах, включая остановку роста на G1 фазе клеточного цикла, апоптозы, дифференцировку опухолевых клеток, разрушение посредников фактора роста -сигналов выживания клеток, и ингибирование ангиогенезов и клеточной адгезии (обзор Deeb et al. 2007 *Nature Reviews Cancer* 7:684-700). Например, сообщалось, уделяя особенное внимание апоптозам, что витамин D3 вызывает апоптозы, регулируя ключевые медиаторы апоптозов, такие как подавление экспрессии антиапоптозов, белки предвыживания BCL2 и BCL-XL, или вызывая экспрессию про-апоптозных белков (например, BAX, BAK и BAD) (Deeb et al. 2007). В другом примере сообщалось, уделяя особенное внимание ангиогенезу, что витамин D3 ингибирует пролиферацию некоторых эндотелиальных клеток, имеющих опухолевое происхождение, и ингибирует экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), который вызывает ангиогенез в опухолях (обзор Masuda и Jones, 2006 *Mol. Cancer Ther.* 5(4): 797-8070). В другом примере сообщалось, уделяя особенное внимание остановке клеточного цикла, что витамин D3 вызывает транскрипцию гена циклин-зависимой киназы ингибитора p21WAF1/CIP1 и вызывает синтез и/или стабилизацию циклин-зависимой киназы ингибитора p27KIP1 белка, которые чрезвычайно важны для индукции остановки G1. (Deeb et al. 2007).

На основе предыдущих наблюдений витамин D3 идентифицировался как эпи-переключатель, т.е., обладающий способностью переключать метаболический статус клетки. Витамин D3 является эпи-переключателем благодаря своей способности вызывать апоптозы в клетках и, в особенности, на основании его способности по-разному подавлять клеточный рост и вызывать апоптозную реакцию в больных (раковых) клетках по сравнению с нормальными клетками (например, по-разному модулировать экспрессию белков, таких как BCL-2, BCL-XL, и BAX, включенных в апоптозы, в раковых клетках по сравнению с нормальными).

Пример 20. Анализ иммуноблоттингом клеток, обработанных коэнзимом Q10.

За последние пять десятилетий был накоплен громадный объем информации касательно эндогенных/экзогенных факторов, влияющих на специфические процессы, лежащие в основе злокачественной трансформации. Клиническая и базовая литература дает доказательства того, что изменения в структуре и функциях ДНК играют важную роль в инициации и развитии рака, определяя рак как генетическую болезнь. (Wooster, 2010; Haiman, 2010). В начале 1920-х Otto Warburg и другие исследователи, занимавшиеся характеристикой фундаментальных изменений в этиологии онкогенеза, описали два главных наблюдения (а) способность клеток транспортировать и утилизировать глюкозу при образовании АТФ в для образования энергии в присутствии кислорода - также известного как эффект Варбурга и (б) изменения в структуре и функции митохондрий - включая изменения в транспорте электронов, приводящие к уменьшению образования митохондриальной АТФ. Последние несколько лет в исследованиях возвращается представление о центральной роли клеточной биоэнергетики в этиологии рака, т.е. на взгляд на рак как на метаболическое нарушение.

Хотя исторически мутации в генах считаются отвечающими за изменения в генной экспрессии, накопились литературные данные в поддержку того, что эпигенетические процессы играют ключевую роль во влиянии на экспрессию генов в поддержании канцерогенеза. Это доказывается наблюдениями, что скорость мутаций большинства генов низкая и не может быть причиной множества мутаций, найденных в раковых клетках. Эпигенетические изменения регулируются метилированием и модификацией гистоновых хвостов, и те и другие по сути связаны с энергетическим (нутриентным) статусом клеток, так как им требуется доступность ко-факторов, например ацетил CoA требуется для гистоновой ацетиляции (ref). Биосинтез ацетил CoA зависит от гликолиза и цикла Кребса, прямо связанных со внутриклеточным энергетическим статусом для регуляции экспрессии и активности генов.

В нормальных клетках митохондриальное окислительное фосфорилирование производит значительное количество АТФ, соответствующее энергетическим нуждам для поддержания физиологической активности и поддержания жизни клетки. Следствием митохондриального вырабатывания энергии является образование химически активных кислородных радикалов (ROS), aberrantные продукты которых приводят к повреждению митохондрий (refs). Хорошо установлено, что постоянное образование ROS митохондриями приводит к кумулятивной аккумуляции генетических мутаций, феномену, который участвует в этиологии канцерогенеза. Подтверждено, что в раковых клетках снижается митохондриальное дыхание для минимизации образования ROS, и происходит переключение на гликолиз для поддержания образования энергии. Таким образом, постепенное переключение образования энергии с окислительного фосфорилирования на гликолиз было бы необходимым для клеток для поддержания образования энергии, поддержания физиологических функций и могло быть связано с движением фенотипа нормальной клетки в сторону раковой клетки. Постепенное переключение клеточного энергетического (биоэнергетического) профиля в совокупности с накопившимися изменениями (мутациями) в митохондриальном геноме приводит к изменениям в клеточном метаболизме. Изменения в метаболическом профиле всей клетки вследствие перехода от митохондриального фосфорилирования к гликолизу соответствуют аномальной биоэнергетике, вызванной метаболическим профилем и более глубокими причинами, поддерживающими канцерогенез. Целевое вмешательство с использованием эндогенных молекул для вызова клеточного метаболического переключения к условиям неканцерогенного нормального митохондриального окислительного фосфорилирования, связанного с клеточным биоэнергетическим статусом, представляет собой терапевтический критерий эффективности в лечении рака.

Коэнзим Q10 как MBM, вызывающая эпи-метаболическое переключение.

Данные, представленные здесь, демонстрируют, что лечение нормальных и раковых клеток коэнзимом Q10 связано с изменениями в экспрессии белков, которые регулируют ключевые биохимические точки в континууме гликолиз - митохондриальный окислительный стресс. Комбинация данных, описывающих оценку экспрессии белков иммуноблоттингом и степенями кислородного потребления демонстрирует, что в нормальных клетках нет значимых изменений в нормальных степенях гликолиза и митохондриального дыхания вследствие воздействия коэнзима Q10. Таким образом, значения экспрессии белков и степени митохондриального дыхания в нормальных клеточных линиях, например HDFa (нормальные фибробласты взрослого человека), HASMC (нормальные гладкие мускульные клетки аорты человека), nFib (нормальные фибробласты) и HeKa (нормальные кератиоциты человека) можно рассматривать как отображающие базовый физиологический статус. Любые отклонения в экспрессии белков и степени митохондриального дыхания в линиях раковых клеток, например HepG2 (рак печени), PaCa-2 (рак поджелудочной железы), MCF7 (рак молочной железы), SK-MEL (меланома) и SCC-25 (плоскоклеточная карцинома), представляет изменение вследствие возникновения/прогрессирования болезни, в данном случае рака. Экспериментальные доказательства поддерживают гипотезу, что воздействие коэнзима Q10 на раковые клетки связано с клеточной патофизиологической реорганизацией, которая вспоминает о нормальных клетках. Именно, приведенные здесь данные демонстрируют, что воздействие коэнзима Q10 на раковые клетки связано с переключением в гликолитических путях и митохондриальном окислительном фосфорилировании, отвечающем за индукцию глобальной реорганизации клеточной архитектуры к наблюдаемой в нормальных клетках.

В нормальных клетках, конец гликолитического производства связан с митохондриальным окислительным фосфорилированием (OXPHOS), т.е. генерацией пирувата из глюкозы через глюкозный путь для вхождения в цикл Кребса (также известный как цикл трикарбоксильной кислоты, ТСА, или цикл лимонной кислоты) для образования восстановленных эквивалентов для поддержания митохондриального OXPHOS для образования АТФ. Таким образом, в нормальных клетках экспрессия и функциональная ориентация генного продукта, участвующего в гликолизе, служит заправкой адекватной генерации пирувата и его вхождению в цикл Кребса. Дисрегулируемая экспрессия и функция Ключевых белков, участвующих в путях гликолиза и цикла Кребса в раковых клетках приводит к повышению гликолиза со значительным снижением митохондриальной функции. Воздействие на раковые клетки коэнзима Q10, эндогенной молекулы, которая селективно влияет на митохондриальную дыхательную цепь, влияет (нормализует) экспрессию белков путей гликолиза и цикла Кребса, содействуя биоэнергетическому переключению, так что образование энергии (т.е. генерация АТФ) восстанавливается в митохондриях.

#### Экспериментальная процедура

##### Иммуноблоттинг. Эксперимент 1.

Клетками, использовавшимися для эксперимента, были HDFa и MCF-7 клетки, которые обрабатывались или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях, 50 мкМ и 100 мкМ, и собирались через 24 часа после обработки. Весь клеточный осадок сразу же ресуспендировался в 1 мл С7 буфера и переносился в меченые 15 мл тубы. Образцы затем подвергались обработке ультразвуком в холодной комнате на льду с использованием 6 ультразвуковых импульсов с шагом #14. Образцы центрифугировались короткое время на 2500 г после обработки ультразвуком и переносились в 2 мл пробирки. У каждого образца проверялось pH (pH должно быть 9,0) с использованием пены, оставшейся в 50 мл пробирке.

Алкилирование и восстановление проб осуществлялась для каждой пробы добавлением 10 мкл 1М акриламида, 25 мкл трибутилфосфена и инкубацией в течение 90 мин со прерывистым смешиванием. После инкубации 10 мкл 1М DTT добавлялось и пробирки центрифугировались при 20000 г и 20°C в течение 10 мин, и супернатант переносился в помеченные Amicon Ultra фильтры для центрифугирования с 10 k сечениями (Millipore catalog # UFC 801024). Образцы 2 раза центрифугировались по 15 минут на 2500 г. Проводимость оценивалась только для чапсов. Если проводимость проб была высокой, тогда 1 мл чапсов добавлялось и снова центрифугировалось на 2500 г, пока объем не снижался до 250 мкл. Если проводимость была 200 или менее, образцы центрифугировались на 5 мин интервалах при 2500 г пока объем супернатанта не становился между 150-100 мкл. Пробы супернатанта переносились в эппендорфы и делался анализ Брадфорда с использованием BSA как стандарта.

Пробы были обработаны по стандартному протоколу, как описано выше, и количество белка на каждую пробу определялось по анализу Брадфорда. Объемы проб, эквивалентные 10 мкг белка, были приготовлены, как показано ниже, с красителем Lamelli Loading (LDS) и MilliQ водой, и разгонялись в 4-12% Bis-Tris Novex NuPAGE геле (Invitrogen, cat # NP0323Box).

Гели разгонялись в течение 50 мин с использованием 1X MOPS буфера, с использованием NOVEX Xcell Surelock системы при 200 В. Гели затем переносились в течение 1 ч с использованием NOVEX Xcell Surelock протокола влажного переноса при 30 В. Блоты красились с Simply Blue Safestain от Invitrogen (LC6065).

IDH1 и АТФ Цитратлиазы уровни в HDFa и MCF-7 образцах.

После переноса каждый блот был помещен между 2 бумажными фильтрами Whatman и высушен в течение 15-20 мин. После сушки на блотах HB карандашом были помечены дата, тип образца и номер блота (1 или 2). Молекулярный вес маркеров был очерчен карандашом с одной линией для голубого и двойной для цветного маркера. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блоты блокировались в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый). Блот 1 был зондирован первичным антителом для IDH1 (Cell Signaling # 3997) в TBST с 5% BSA (разведение 1:1000) и блот 2 с кроличьим поликлональным антителом для АТФ цитрата лиазы в 5% BSA (Cell Signaling #4332) при разведении 1:1000 и инкубировался на ночь при 4 градусах С с перемешиванием. После ночной инкубации с первичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондированы вторичными антителами (антикроличьи; 1:10000 разведение) в течение 1 ч на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубированы с ECF реагентом в течение 5 мин. и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Уровни актина в HDFa и MCF-7 образцах.

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 мин инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота были скани-



рованы на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блоты блокировались в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондированы антителом к Актину в 5% BSA (Sigma Catalog # A5316, клон AC-74) при разведении 1:5000 в течение 1 ч на шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами, блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондированы вторичными антителами (антимышинные; 1:10000 разведение) в течение 1 ч на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

#### Иммуноблоттинг. Эксперимент 2.

Клетками, использованными в этом эксперименте, были SKMEL28, SCC-25, nFib и HeKa, которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях, 50 мкМ или 100 мкМ, и собраны после 3, 6 и/или 24 часов обработки. Пробы были обработаны и разогнаны в 4-12% Bis-Tris Novex NuPAGE геле, как описано выше. Гели были разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

#### Уровни IDH1 для 4 клеточных линий.

После переноса блот был высушен в течение 15-20 мин, активирован метанолом 5 с, промыт водой 5 мин и TBST 15 мин. Блот блокировался в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывался 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый). Затем блот зондировался первичным антителом для IDH1 (Cell Signaling # 3997) в TBST с 5% BSA (разведение 1:1000) на ночь при 4 градусах С на шейкере. После ночной инкубации с первичными антителами блот промывался 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и был зондирован вторичными антителами (антикроличьи; 1:10,000 разведение) в течение 1 ч при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами, блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

#### АТФ цитрат лиазы уровни в 4 различных клеточных линиях.

Изоцитрат дегидрогеназы блот был зачищен путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 мин инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. Блот сканировался на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блот активировался метанолом 5 с, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блот блокировался в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый). Затем блот зондировался кроличьим поликлональным антителом к АТФ цитрат лиазе в 5% BSA (Cell Signaling #4332) при разведении 1:1000 на ночь при 4°C на шейкере. После ночной инкубации с первичными антителами к АТФ цитрат лиазе блот промывался 3 раза TBS-T (X-15'; 2X 5' каждый) и был зондирован вторичными антителами (антикроличьи; 1:10,000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блот был промыт 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировался с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В. Уровни актина в 4 различных клеточных линиях.

АТФ цитрат лиазы блот был зачищен путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. Блот сканировался на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блот активировался метанолом 5 с, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блот блокировался в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (X-15'; 2X 5' каждый) и зондировался антителом к Актину в 5% BSA (Sigma catalog # A5316, клон AC-74) 1:5000 разведение на 1 час при комнатной температуре на шейкере. После 1 часа инкубации с первичными антителами к Актину мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и были зондированы вторичными антителами (антимышинные; 1:10,000 разведение) в течение 1 ч на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блот был промыт 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировался с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

#### Иммуноблоттинг. Эксперимент 3.

Клетками, использованными в этом эксперименте, были HepG2, HASMC, и PACA2 клетки, которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях (50 мкМ и 100 мкМ) и собраны через 48 ч после обработки. В этом эксперименте (иммуноблоттинг эксперимент 3) и во всех экспериментах, описанных ниже в этом примере (т.е. иммуноблоттинг эксперименты с 4 по 9), клетки

были дополнительно обработаны или 5 мМ глюкозой ("5G") или 22 мМ глюкозой ("22G"). Образцы, взятые из клеток, были обработаны и разогнаны в 4-12% Bis-Tris Novex NuPAGE геле, как описано выше. Гели были разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

IDH1, АТФ цитрат лиазы и актина уровни в HASMC vs. PACA2 и HepG2.

Уровни IDH1, АТФ цитрат лиазы и актина были определены путем зондирования блотов первичными антителами к IDH1, АТФ цитрат лиазе и актину, в основном как описано выше.

Иммуноблоттинг. Эксперимент 4.

Клетками, использованными в этом эксперименте, были HepG2 клетки которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях (50 мкМ и 100 мкМ) и собраны через 24 или 48 ч после обработки. Образцы были обработаны и разогнаны в 4-12% Bis-Tris Novex NuPAGE геле, как описано выше. Гели были разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

Уровни лактат дегидрогеназы в HepG2 клетках.

После переноса каждый блот был высушен в течение 15-20 мин, активирован метанолом 5 с, промыт водой 5 мин и TBST 15 мин. Блот блокировался в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывался 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый), и зондирован первичным антителом к лактатдегидрогеназе (abcam ab2101; поликлональные) в 5% BSA (1:1000 разведение) на ночь при 4°C на шейкере. После ночной инкубации с первичными антителами к лактатдегидрогеназе блот промывался 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и был зондирован вторичными антителами (кроличьи антикоза; 1:10,000 разведение) в течение 1 ч при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блот был промыт 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировался с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Пируват киназы мышечной формы (PKM2) уровни в HepG2 клетках.

Лактата дегидрогеназы блоты были зачищены путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 мин инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блоты блокировались в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались кроличьим поликлональным антителом к Пируват киназе M2 в 5% BSA (Novus Biologicals catalog # H00005315-D01P) 1:500 разведение на ночь при 4°C на шейкере. После ночной инкубации с первичными антителами к Пируват киназе M2 мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (антикроличьи; 1:10000 разведение) в течение 1 ч на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блот был промыт 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировался с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Уровни пируват дегидрогеназы бета в HepG2 клетках.

Пируват киназы блоты были зачищены путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 мин инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. После того как убедились, что зачистка антитела и ECF реагент работает, блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блоты блокировались в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к Пируват дегидрогеназе в 5% BSA (ABNOVA catalog # H00005162-M03) 1:500 разведение на ночь при 4°C на шейкере. После ночной инкубации с первичными антителами к Пируват дегидрогеназе мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (антимышьиные; 1:10,000 разведение) в течение 1 ч на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блот был промыт 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировался с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Уровни актина в HepG2 клетках.

Пируват дегидрогеназы блоты были зачищены и затем вновь зондированы антителами к актину, как описано выше.

Иммуноблоттинг. Эксперимент 5.

Клетками, использованными в этом эксперименте, были MIAPACA2 (PACA2) клетки, которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях (50 мкМ и 100 мкМ) и собраны через 24 или 48 ч после обработки. PACA2 образцы были обработаны и гели разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

Лактат дегидрогеназы (LDH) и Пируват дегидрогеназы (PDH) уровни в PaCa2 клетках

Уровни LDH и PDH определялись путем зондирования блотов подряд первичными антителами к LDH и PDH, по существу, как описано выше.

Каспазы 3 уровня в PaCa2 клетках.

Блоты были зачищены путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 мин инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 секунд, промывались водой 5 минут и TBST 15 минут. Блоты блокировались в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к Каспазе 3 в 5% BSA (SantaCruz Biotechnology # sc7272) 1:200 разведение на ночь при 4°C на шейкере. После ночной инкубации с первичными антителами к Каспазе 3 мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (анти-мышиные; 1:10000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Иммуноблоттинг. Эксперимент 6.

Клетками, использованными в этом эксперименте с иммуноблоттингом, были PC-3, HepG2, MCF-7, HDFa и PACA2, которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 IV формулой и собраны через 24 ч после обработки. Образцы были обработаны и гели были разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

Каспаза 3 и уровни Актина в различных клеточных типах.

Уровни Каспазы 3 и актина определялись зондированием блотов первичными антителами к Каспазе 3 и актину, как описано выше.

Иммуноблоттинг. Эксперимент 7.

Клетками, использованными в этом эксперименте, были клетки гладкой мускулатуры аорты человека (HASMC), которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях (50 мкМ и 100 мкМ) и собраны через 24 или 48 ч после обработки. HASMC образцы были обработаны и гели разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

Экспериментальный протокол для Актина.

Уровни актина определялись зондированием блотов первичными антителами к актину, как описано выше.

Экспериментальный протокол для Hif 1 alpha, Каспазы 3 и PDHB.

Актиновые блоты были зачищены путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. Блоты сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 с, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к Hif 1 alpha, Каспазе 3 или PDHB в 5% BSA (1:200 при инкубации на ночь при 4°C на малой скорости шейкера. Первичные антитела к Hif 1 alpha (Abcam ab2185; антикроличье) были разведены 1:500 в 5% BSA. Первичные антитела к Каспазе 3 (SantaCruz sc7272; антикроличье) были разведены 1:200 в 5% BSA. Первичные антитела к пируват дегидрогеназе бета (PDHB) (Novus Biologicals H00005162-M03; антимышиное) были разведены 1:500 в 5% BSA. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (PDHB антимышиное; Hif 1a и Каспаза 3 антикроличье; 1:10000 разведение) в течение 1 ч при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Экспериментальный протокол для PKM2, SDHB и SDHC.

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 минут инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. Блоты сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 с, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блоты блокировались в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к PKM2, SDHB или SDHC в 5% BSA в TBS-T (1:200 при инкубации на ночь при 4°C на малой скорости шейкера. Первичные антитела к SDHC (ABNOVA H00006391-M02; антимышиное) были разведены 1:500. Первичные антитела к SDHB были из Abcam ab4714-200; антимышиное; были разведены 1:1000. Первичные антитела к пируваткиназе M2 (PKM2) были из Novus

Biologicals H00005315-D01P; антикроличье; были разведены 1:500. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (SDHB & С антимышино; и PKM2 антикроличье; 1:10000 разведение) в течение 1 ч на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Экспериментальный протокол для LDH и Bik:

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 мин инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. Блоты сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 с, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блоты блокировались в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к LDH или Bik в 5% BSA в TBS-T при инкубации на ночь при 4°C на малой скорости шейкера. Первичные антитела к LDH были из Abcam ab2101; антикозье; были разведены 1:1000. Первичные антитела к Bik были из Cell Signaling #9942; антикроличье; были разведены 1:1000. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (LDH антикозье; Jackson Laboratories) и Bik антикроличье; 1:10000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 минут и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Иммуноблоттинг. Эксперимент 9.

Использованными клетками были HepG2, которые были обработаны или нет коэнзимом Q10 в двух различных концентрациях, 50 мкМ и 100 мкМ, и собраны через 24 или 48 ч после обработки. HepG2 образцы были обработаны и гели разогнаны, перенесены и окрашены, как описано выше.

Экспериментальный протокол для Актина.

Уровни актина определялись зондированием блотов первичными антителами к актину, как описано выше.

Экспериментальный протокол для Каспазы 3 и MMP-6.

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 мин инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. Блоты сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 с, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блоты блокировались в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к Каспазе 3 или MMP-6 в 5% BSA при инкубации на ночь при 4°C на малой скорости шейкера. Первичные антитела к Каспазе 3 (Abcam ab44976-100; антикроличье) были разведены 1:500 в 5% BSA. Первичные антитела к MMP-6 (SantaCruz scMM0029-ZB5; антимышиное) были разведены 1:100 в 5% BSA. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (MMP-6 антимышиное; каспаза 3 антикроличье; 1:10000 разведение) в течение 1 ч при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Экспериментальный протокол для LDH.

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 мин инкубации с Stripping буфером при 50°C и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. 2 блота сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 с, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блоты блокировались в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к LDH в 5% BSA или 5% сыворотке при инкубации на ночь при 4°C на малой скорости шейкера. Первичные антитела к LDH 080309b1 (Abcam ab2101; антикозье) были разведены 1:1000 в 5% BSA. Первичные антитела к LDH 080309b2 (Abcam ab2101; антикозье) были разведены 1:100 в 5% BSA. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (Jackson Immuno Research антикозье; 1:10000 разведение; 305-055-045) в течение 1 ч при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Экспериментальный протокол для трансальдолазы и Hif1a.

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 мин инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. Блоты сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 с, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блоты блокировались в течение 1 часа 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителом к Трансальдолазе или Hif1a в 5% BSA при инкубации на ночь при 4 градусах С на малой скорости шейкера. Первичные антитела к Трансальдолазе (Abcam ab67467; антимишиное) были разведены 1:500. Первичные антитела к Hif1a (Abcam ab2185; антикроличье) были разведены 1:500. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (антимишиное или антикроличье; 1:10000 разведение) в течение 1 часа при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Экспериментальный протокол для IGFBP3 и TP53.

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 мин инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. Блоты сканировались на лазерном сканере для определения полноты зачистки. Блоты активировались метанолом 5 с, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блоты блокировались в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителами к IGFBP3 или TP53 в 5% BSA при инкубации на ночь при 4°C на малой скорости шейкера. Первичные антитела к IGFBP3 (Abcam ab76001; антикроличье) были разведены 1:100. Первичные антитела к TP53 (Sigma Aldrich AV02055; антикроличье) были разведены 1:100. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (антикроличье; 1:10,000 разведение) в течение 1 часа на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

Экспериментальный протокол для Трансальдолазы и PDHB.

Вышеупомянутые блоты были зачищены путем инкубации 30 мин в метаноле, с последующими двумя 10-минутными промывками с TBS-T, затем 30 мин инкубации с Stripping буфером при 50°C, и с последующими двумя промывками 100 мл или более TBS-T в течение 30' каждая. Блоты активировались метанолом 5 с, промывались водой 5 мин и TBST 15 мин. Блоты блокировались в течение 1 ч 5% блокирующим реагентом в TBS-T при комнатной температуре и затем промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и зондировались антителами к Трансальдолазе или PDHB в 5% BSA при инкубации на ночь при 4°C на малой скорости шейкера. Первичные антитела к Трансальдолазе (Santacruz sc51440; антикозье) были разведены 1:200. Первичные антитела к PDHB (Novus Biologicals H00005162-M03; антимишиное) были разведены 1:500. После инкубации с первичными антителами мембраны промывались 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждая) и были зондированы вторичными антителами (антикозье или антимишиное; 1:10000 разведение) в течение 1 ч на орбитальном наклонном шейкере при комнатной температуре. После 1 ч инкубации с вторичными антителами блоты были промыты 3 раза TBS-T (1X-15'; 2X 5' каждый) и затем инкубировались с ECF реагентом 5 мин и затем каждый блот сканировался с 5100 Fuji Laser сканером на 25 мкМ разрешении, 16 бит, зеленый лазер, при 400 В и при 500 В.

#### Результаты

Изоцитрат дегидрогеназа - 1 (IDH-1).

Изоцитрат дегидрогеназа - один из ферментов, который является частью TCA цикла, который обычно присутствует внутри митохондриального матрикса. Однако IDH1 является цитозольной формой энзима, которая катализирует окислительное декарбоксилирование изоцитрата в  $\alpha$ -кетоглутарат и вырабатывает диоксид углерода в двухэтапном процессе. IDH1 является НАДФ<sup>+</sup> зависимой формой, которая присутствует в цитоплазме и пероксисоме. IDH1 инактивируется Ser113 фосфорилированием и экспрессируется во многих видах, включая те, у которых нет цикла лимонной кислоты. Судя по всему, в норме IDH1 функционирует как супрессор опухолей, который при инактивации способствует онкогенезу, частично за счет активации HIF-1 пути (Bailey 2010; Reitman, 2010). Недавние исследования вовлекли инактивирующие мутации в IDH1 в этиологию глиобластомы (Bleeker, 2009; Bleeker, 2010).

Обработка коэнзимом Q10 повышала экспрессию IDH1 в линиях раковых клеток, включая MCF-7, SKMEL28, HepG2 и PaCa-2 клетки. Было среднее возрастание экспрессии в SCC25 клеточных линиях.

Напротив, культуры первичных фибробластов человека HDFa, pFIB и клеток гладкой мускулатуры аорты человека HASMC не показали значительных изменений в экспрессионном паттерне IDH1 в ответ на коэнзим Q10.  $\alpha$ -кетоглутарат ( $\alpha$ -КГ) является ключевым промежуточным продуктом в цикле ТСА, биохимически синтезируемым из изоцитрата и в конечном итоге превращающемся в сукцинил соА и являющимся лекарственно-ориентированным MBM и эпи-переключателем. Образование  $\alpha$ -КГ служит критическим местом связи в ТСА цикле, поскольку может использоваться клеткой для пополнения промежуточных веществ в цикле, приводя к образованию восстановленных эквивалентов и возрастанию окислительного фосфорилирования.

Таким образом, коэнзим Q10, опосредуя возрастание экспрессии IDH1, приводит к формированию промежуточных продуктов, которые могут быть использованы в митохондриальном ТСА цикле для увеличения окислительного фосфорилирования в раковых клетках. Результаты суммированы в таблицах ниже.

Таблица 29. IDH1 в HDFa и MCF-7

| Композиция            | Средняя нормализованная интенсивность |
|-----------------------|---------------------------------------|
| HDF, среда            | 346                                   |
| HDF24-50-Коэнзим Q10  | 519                                   |
| HDF24-100-Коэнзим Q10 | 600                                   |
| MCF, среда            | 221                                   |
| MCF24-50-Коэнзим Q10  | 336                                   |
| MCF24-100-Коэнзим Q10 | 649                                   |

Таблица 30. IDH1 в HASMC vs. HepG2 после обработки

| Количество - Композиция  | Нормализованная интенсивность |
|--------------------------|-------------------------------|
| HAS5g48-среда            | 20                            |
| HAS5g48-50-Коэнзим Q10   | 948                           |
| HAS5g48-100-Коэнзим Q10  | 1864                          |
| HAS22G48-Среда           | 1917                          |
| HAS22G48-50-Коэнзим Q10  | 1370                          |
| HAS22G48-100-Коэнзим Q10 | 1023                          |
| Hep5g48-Среда            | 14892                         |
| Hep5g48-50-Коэнзим Q10   | 14106                         |
| Hep5g48-100-Коэнзим Q10  | 15774                         |
| Hep22G48-Среда           | 16558                         |
| Hep22G48-50-Коэнзим Q10  | 15537                         |
| Hep22G48-100-Коэнзим Q10 | 27878                         |

Таблица 31. IDH1 в HASMC vs. PACA2 после обработки

| Количество - Композиция   | Нормализованная интенсивность |
|---------------------------|-------------------------------|
| HAS5g48-Среда             | 562                           |
| HAS5g48-50-Коэнзим Q10    | 509                           |
| HAS5g48-100-Коэнзим Q10   | 627                           |
| HAS22G48-Среда            | 822                           |
| HAS22G48-50-Коэнзим Q10   | 1028                          |
| HAS22G48-100-Коэнзим Q10  | 1015                          |
| PACA5g48-Среда            | 1095                          |
| PACA5g48-50-Коэнзим Q10   | 1095                          |
| PACA5g48-100-Коэнзим Q10  | 860                           |
| PACA22G48-Среда           | 1103                          |
| PACA22G48-50-Коэнзим Q10  | 1503                          |
| PACA22G48-100-Коэнзим Q10 | 1630                          |

АТФ цитрат лиаза (ACL) является гомотетрамерным (~126 кД) ферментом, который катализирует образование ацетил-КоА и оксалоацетата в цитозоле. Эта реакция является очень важным первым этапом в биосинтезах жирных кислот, холестерина и ацетилхолина, а также для глюконеогенеза (Towle et al., 1997). Питательные вещества и гормоны регулируют уровень экспрессии и фосфорилиционный статус этого ключевого фермента. Сообщалось о Ser454 фосфорилировании ACL благодаря Akt и PKA (Bergwick, DC MW et al., 2002; Pierce MW et al., 1982).

Данные описывают действие коэнзима Q10 на АТФ цитрат лиазу в нормальных и раковых клетках. Постоянно наблюдается, что в раковых клетках существует дозозависимое снижение экспрессии ACL ферментов. И, напротив, судя по всему существует тенденция возрастания экспрессии ACL в нормальных клетках. Цитозольный ACL демонстрирует необходимость для ацетилирования гистонов в клетке во время стимуляции фактора роста и во время дифференцировки. Тот факт, что ACL утилизирует цитозольной глюкозы дериват цитрат для образования Ацетил СоА, необходимого для ацетилирования гистонов, процесса, важного в процессе новообразований, демонстрирует роль коэнзима Q10, вызывающего экспрессию ACL, влияющего на функцию раковых клеток. Ацетил СоА, вырабатывающийся из цитрата благодаря цитозольному ACL, служит источником для биосинтезов новых липидов и холестерина во время деления клеток. Таким образом, коэнзим Q10, вызывающий изменения в экспрессии ACL, влияет на способность Ацетил СоА синтезировать липиды и холестерин в нормальных клетках по сравнению с раковыми клетками. Результаты суммированы в таблицах ниже.

Таблица 32. ATPCL в HDFa и MCF-7

| Композиция          | Средняя нормализованная интенсивность |
|---------------------|---------------------------------------|
| HDF-Среда           | ~ 15000                               |
| HDF-50-Коэнзим Q10  | ~ 17500                               |
| HDF-100-Коэнзим Q10 | ~ 25000                               |
| MCF-Среда           | ~ 7500                                |
| MCF-50-Коэнзим Q10  | ~7500                                 |
| MCF-100-Коэнзим Q10 | ~ 12500                               |

Таблица 33. АТФ цитрат лиаза ~кД полоса в HASMC vs. HepG2

| Количество – композиция  | Нормализованная интенсивность |
|--------------------------|-------------------------------|
| HAS5g48-среда            | 24557                         |
| HAS5g48-50-Коэнзим Q10   | 23341                         |
| HAS5g48-100-Коэнзим Q10  | 25544                         |
| HAS22G48-среда           | 27014                         |
| HAS22G48-50-Коэнзим Q10  | 21439                         |
| HAS22G48-100-Коэнзим Q10 | 19491                         |
| Hep5g48-среда            | 28377                         |
| Hep5g48-50-Коэнзим Q10   | 24106                         |
| Hep5g48-100-Коэнзим Q10  | 22463                         |
| Hep22G48-Среда           | 24262                         |
| Hep22G48-50-Коэнзим Q10  | 31235                         |
| Hep22G48-100-Коэнзим Q10 | 50588                         |

Таблица 34. АТФ цитрат лиаза ~кД полоса в HASMC vs. PACA2

| Количество – композиция   | Нормализованная интенсивность |
|---------------------------|-------------------------------|
| HAS5g48-среда             | 11036                         |
| HAS5g48-50-Коэнзим Q10    | 12056                         |
| HAS5g48-100-Коэнзим Q10   | 15265                         |
| HAS22G48-среда            | 18270                         |
| HAS22G48-50-Коэнзим Q10   | 15857                         |
| HAS22G48-100-Коэнзим Q10  | 13892                         |
| PACA5g48-среда            | 11727                         |
| PACA5g48-50-Коэнзим Q10   | 8027                          |
| PACA5g48-100-Коэнзим Q10  | 4942                          |
| PACA22G48-среда           | 8541                          |
| PACA22G48-50-Коэнзим Q10  | 9537                          |
| PACA22G48-100-Коэнзим Q10 | 14901                         |

Таблица 35. АТФ цитрат лиаза в HepG2 и PACA2 как % от CTRL

| Количество - Композиция   | Нормализованная интенсивность |
|---------------------------|-------------------------------|
| PACA5g48-среда            | 1,00                          |
| PACA5g48-50-Коэнзим Q10   | 0,68                          |
| PACA5g48-100-Коэнзим Q10  | 0,42                          |
| PACA22G48-среда           | 1,00                          |
| PACA22G48-50-Коэнзим Q10  | 1,12                          |
| PACA22G48-100-Коэнзим Q10 | 1,74                          |
| Нер5g48-среда             | 1,00                          |
| Нер5g48-50-Коэнзим Q10    | 0,85                          |
| Нер5g48-100-Коэнзим Q10   | 0,79                          |
| Нер22G48-среда            | 1,00                          |
| Нер22G48-50-Коэнзим Q10   | 1,29                          |
| Нер22G48-100-Коэнзим Q10  | 2,09                          |

Пируват Киназа M2 (PKM2).

Пируват киназа является ферментом, участвующем в гликолитическом пути. Она отвечает за перенос фосфата с фосфоенолпирувата (ПЕР) на аденозиндифосфат (АДФ) с образованием АТФ и пирувата. PKM2 является изоэнзимом гликолитической пируваткиназы, экспрессия которого характеризуется по метаболической функции ткани, т.е. M2 изоэнзим экспрессируется в нормальных быстро пролиферирующих клетках с высокими энергетическими потребностями, такими как эмбриональные клетки, и также экспрессируется в нескольких нормальных дифференцированных тканях, таких как легкие и инсулоциты поджелудочной железы, где требуется высокая степень синтеза нуклеиновых кислот. PKM2 в высокой степени экспрессируется в опухолевых клетках вследствие своей зависимости от гликолитического пути, отвечающего энергетическим потребностям клетки. PKM2 изоформа, в норме считающаяся ограниченной эмбриональным периодом, ре-экспрессируется в раковых клетках. Клетки, экспрессирующие PKM2, поддерживают сильный аэробный гликолитический фенотип (показывающий переключение в метаболическом фенотипе) с возрастом образования лактата и снижением окислительного фосфорилирования. Таким образом, снижение экспрессии PKM2 в раковых клетках переключает или понижающе регулирует образование энергии благодаря гликолитическому пути, стратегии, которая полезна в лечении рака. Данные демонстрируют различный паттерн экспрессии PKM2 в нормальных и раковых клетках, где раковые клетки демонстрируют более высокий уровень экспрессии по сравнению с нормальными. Обработка клеток коэнзимом Q10 изменяет экспрессионный паттерн PKM2 выше и ниже исходных уровней в нормальных и раковых клетках (фиг. 81-85). В исследуемых раковых клетках существует дозозависимое снижение экспрессии PKM2, и в основном не наблюдается изменений в нормальных клетках. Результаты суммированы в таблицах ниже.

Таблица 36. Пируваткиназа мышечная форма 2 верхняя полоса в НерG2

| Количество - Композиция | Нормализованный объем (24 ч) | Нормализованная интенсивность (48 ч) |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| 5г-Среда                | 28386                        | 413                                  |
| 5г-50-Коэнзим Q10       | 29269                        | 303                                  |
| 5г-100-Коэнзим Q10      | 18307                        | 354                                  |
| 22Г-Media               | 25903                        | 659                                  |
| 22-50-Коэнзим Q10       | 22294                        | 562                                  |
| 22G-100-Коэнзим Q10     | 19560                        | 601                                  |



Таблица 37. Пируваткиназа мышечная форма 2 нижняя полоса (58 КД) в HepG2

| Количество -<br>Композиция | Нормализованный<br>объем (24 ч) | Нормализованный<br>объем (24 ч) |
|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 5г-Среда                   | 10483                           | 310                             |
| 5г-50-Коэнзим<br>Q10       | 11197                           | 185                             |
| 5г-100-Коэнзим<br>Q10      | 7642                            | 122                             |
| 22G-Среда                  | 9150                            | 306                             |
| 22G-50-Коэнзим<br>Q10      | 6302                            | 344                             |
| 22G-100-<br>Коэнзим Q10    | 6904                            | 465                             |

Таблица 38. Пируваткиназа мышечная форма 2 верхняя полоса в HASMC клетках после обработки

| Количество - Композиция | Нормализованная<br>интенсивность |
|-------------------------|----------------------------------|
| 5г48-Среда              | 608                              |
| 5г48-50-Коэнзим Q10     | 811                              |
| 5г48-100-Коэнзим Q10    | 611                              |
| 22G48-Среда             | 516                              |
| 22G48-50-Коэнзим Q10    | 595                              |
| 22G48-100-Коэнзим Q10   | 496                              |
| 22G24-Среда             | 301                              |
| 22G24-50-Коэнзим Q10    | 477                              |
| 22G24-100-Коэнзим Q10   | 701                              |

Лактат дегидрогеназа (LDH).

LDH является ферментом, который катализирует взаимное превращение пирувата и лактата с одновременным взаимным превращением НАДН и НАД<sup>+</sup>. Он обладает способностью превращать пируват в лактат (молочную кислоту) при низком давлении кислорода в клетке для образования восстановленных эквивалентов и образования АТФ за счет митохондриального окислительного фосфорилирования. Раковые клетки обычно демонстрируют повышенную экспрессию LDH для поддержания гликолитического потока для образования АТФ и восстановленных эквивалентов и уменьшения митохондриального OXPHOS. Таким образом, уменьшение экспрессии LDH в раковых клетках переключает метаболизм с образования лактата на содействие входу пирувата в ТСА цикл. Обработка коэнзимом Q10 уменьшала экспрессию лактатдегидрогеназы (LDH) при раке с минимальным действием на нормальные клетки, поддерживая роль коэнзима Q10 в вызове переключения в биоэнергетике раковых клеток для образования АТФ с гликолитического на митохондриальные OXPHOS источники путем минимизации превращения цитоплазматического пирувата в молочную кислоту. Результаты суммированы в таблицах ниже.

Таблица 39. Лактат дегидрогеназа в HepG2

| Количество -<br>Композиция | Нормализованный<br>объем (24 ч) | Нормализованный<br>объем (48 ч) |
|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 5г-Среда                   | 7981                            | 5997                            |
| 5г-50-Коэнзим Q10          | 7900                            | 5188                            |
| 5г-100-Коэнзим Q10         | 6616                            | 7319                            |
| 22G-Среда                  | 9171                            | 7527                            |
| 22G-50-Коэнзим<br>Q10      | 7550                            | 6173                            |
| 22G-100-Коэнзим<br>Q10     | 7124                            | 9141                            |

Таблица 40 Лактат дегидрогеназа в НерG2 как % контроля от 2 экспериментов

| Количество - Композиция | Средний объем как % от контроля |
|-------------------------|---------------------------------|
| 5g24-Среда              | 1,00                            |
| 5g24-50-Коэнзим Q10     | 0,64                            |
| 5g24-100-Коэнзим Q10    | 1,06                            |
| 5g48-Среда              | 1,00                            |
| 5g48-50-Коэнзим Q10     | 1,12                            |
| 5g48-100-Коэнзим Q10    | 1,21                            |
| 22G24-Среда             | 1,00                            |
| 22G24-50-Коэнзим Q10    | 1,21                            |
| 22G24-100-Коэнзим Q10   | 1,44                            |
| 22G48-Среда             | 1,00                            |
| 22G48-50-Коэнзим Q10    | 0,95                            |
| 22G48-100-Коэнзим Q10   | 0,67                            |

Таблица 41. Лактатдегидрогеназа в РАСА2

| Количество - Композиция | Нормализованный объем (24 ч) | Нормализованный объем (48 ч) |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 5г-Среда                | 2122                         | 2360                         |
| 5г-50-Коэнзим Q10       | 5068                         | 2978                         |
| 5г-100-Коэнзим Q10      | 3675                         | 2396                         |
| 22G-Среда               | 4499                         | 2332                         |
| 22G-50-Коэнзим Q10      | 10218                        | 2575                         |
| 22G-100-Коэнзим Q10     | 7158                         | 3557                         |

Пируват Дегидрогеназа - В (PDH-E1).

Пируват дегидрогеназа бета (PDH-E1) является первым ферментным компонентом, который является частью пируватдегидрогеназного комплекса (PDC), который превращает пируват в ацетилCoA. PDH-E1 требует тиамина как кофактора для своей активности, осуществляет первые две биохимические реакции в PDC комплексе, необходимые для превращения пирувата в ацетилCoA для вхождения в TCA цикл в митохондриях. Таким образом, сопутствующее снижение экспрессии PKM2 и LDH в ходе возрастания экспрессии PDH-E1 в раковых клетках увеличивает степень вхождения пирувата для усиления митохондриального OXPHOS для образования АТФ. Данные показывают, что экспрессия PDH-E1 в нормальных и раковых клеточных линиях, исходная линия экспрессии этого фермента уменьшается при раке по сравнению с нормальными клетками. Воздействие коэнзимом Q10 связано с прогрессивным повышением экспрессии PDH-E1 белков в раковых клетках при минимальных изменениях в нормальных клетках. Результаты суммаризованы в таблицах ниже.

Таблица 42. Пируват дегидрогеназа бета в НерG2

| Количество - Композиция | Нормализованный объем (24 ч) | Нормализованный объем (48 ч) |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 5г-Среда                | 517                          | 100                          |
| 5г-50-Коэнзим Q10       | 921                          | 123                          |
| 5г-100-Коэнзим Q10      | 433                          | 205                          |
| 22G-Среда               | 484                          | 181                          |
| 22G-50-Коэнзим Q10      | 426                          | 232                          |
| 22G-100-Коэнзим Q10     | 340                          | 456                          |

Таблица 43. Пируват дегидрогеназа бета в PACA2

| Количество<br>Композиция | -<br>Нормализованный<br>объем (48 ч) | Нормализованный<br>объем (48 ч) |
|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 5г-Среда                 | 323                                  | 375                             |
| 5г-50-Коэнзим Q10        | 492                                  | 339                             |
| 5г-100-Коэнзим Q10       | 467                                  | 252                             |
| 22G-Среда                | 572                                  | 276                             |
| 22G-50-Коэнзим Q10       | 924                                  | 279                             |
| 22G-100-Коэнзим<br>Q10   | 1201                                 | 385                             |

Таблица 44. Пируват дегидрогеназа бета в HASMC после обработки

| Количество - Композиция | Нормализованный<br>объем |
|-------------------------|--------------------------|
| 5г48-Среда              | 140                      |
| 5г48-50-Коэнзим Q10     | 147                      |
| 5г48-100-Коэнзим Q10    | 147                      |
| 22G48-Среда             | 174                      |
| 22G48-50-Коэнзим Q10    | 149                      |
| 22G48-100-Коэнзим Q10   | 123                      |
| 22G24-Среда             | 140                      |
| 22G24-50-Коэнзим Q10    | 145                      |
| 22G24-100-Коэнзим Q10   | 150                      |

## Каспаза-3.

Контроль начала апоптозов часто влияет на уровень инициатора каспаз, каспазы-2, -9 и -8/10. Во внешнем пути апоптозов, каспаза-8 активируется, прямо расщепляется и активирует каспазы-убийцы (такие как каспаза-3). Активная каспаза-3 расщепляет и активирует другие каспазы (6, 7, и 9), а также и соответствующие цели в клетках (например, PARP и DFF). В этих исследованиях уровни эффекторов белка каспазы-3 оценивались в раковых клеточных линиях и в нормальных клеточных линиях в ответ на коэнзим Q10. Следует заметить, что хотя считается, что контроль за апоптозами идет через инициатора каспаз, множество сигнальных путей прерывается взамен передачи апоптозного сигнала через прямую ингибицию эффекторов каспаз. Для, например, P38 MAPK фосфорилирует каспазу-3 и поддерживает ее активность (Alvarado-Kristensson et al., 2004). Интересно, что активация белка фосфотазы (PP2A) в том же исследовании или протеинкиназы С дельта (PKC дельта) (Voss et al., 2005) может препятствовать действию p38 MAPK усиливать активацию каспазы-3 и содействовать передаче апоптозного сигнала. Следовательно, события на уровне активации каспазы-3 или после активации каспазы-3 могут определять конечную судьбу клетки в некоторых случаях.

Каспаза-3 является цистеин-аспаргиновой кислоты протеиназой, которая играет центральную роль в фазе осуществления клеточного апоптоза. Уровни каспазы 3 в раковых клетках возрастали при обработке коэнзимом Q10. Напротив, экспрессия каспазы-3 в нормальных клетках умеренно понизилась. Результаты суммированы в таблицах ниже.

Таблица 45. Каспаза 3 в PACA2

| Количество<br>Композиция | -<br>Нормализованный<br>объем (24 ч) | Нормализованный<br>объем (24 ч) |
|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 5г-Среда                 | 324                                  | 300                             |
| 5г-50-Коэнзим Q10        | 325                                  | 701                             |
| 5г-100-Коэнзим Q10       | 374                                  | 291                             |
| 22G-Среда                | 344                                  | 135                             |
| 22G-50-Коэнзим Q10       | 675                                  | 497                             |
| 22G-100-Коэнзим Q10      | 842                                  | 559                             |

Таблица 46. Каспаза-3 в НерG2 клетках как % контроля от 2 экспериментов

| Количество - Композиция | Нормализованный<br>объем как % от<br>контроля |
|-------------------------|---|
| 5г24-Среда              | 1,00  |
| 5г24-50-Коэнзим Q10     | 1,08  |
| 5г24-100-Коэнзим Q10    | 1,76  |
| 5г48-Среда              | 1,00  |
| 5г48-50-Коэнзим Q10     | 1,44  |
| 5г48-100-Коэнзим Q10    | 0,95  |
| 22G24-Среда             | 1,00  |
| 22G24-50-Коэнзим Q10    | 1,39  |
| 22G24-100-Коэнзим Q10   | 1,78  |
| 22G48-Среда             | 1,00  |
| 22G48-50-Коэнзим Q10    | 1,50  |
| 22G48-100-Коэнзим Q10   | 1,45  |

Таблица 47. Каспаза 3 в HASMC после обработки

| Количество - Композиция | Нормализованный<br>объем |
|-------------------------|--------------------------|
| 5г48-Среда              | 658                      |
| 5г48-50-Коэнзим Q10     | 766                      |
| 5г48-100-Коэнзим Q10    | 669                      |
| 22G48-Среда             | 846                      |
| 22G48-50-Коэнзим Q10    | 639                      |
| 22G48-100-Коэнзим Q10   | 624                      |
| 22G24-Среда             | 982                      |
| 22G24-50-Коэнзим Q10    | 835                      |
| 22G24-100-Коэнзим Q10   | 865                      |

Сукцинат дегидрогеназа (SDH).

Сукцинат дегидрогеназа, также известная как сукцинат-коэнзим Q редуктаза, является комплексом внутренней митохондриальной мембраны, которая задействована и в ТСА, и в электронной транспортной цепи. В ТСА этот комплекс катализирует окисление сукцината до фумарата с сопутствующим восстановлением убихинона до убихинола. (Baysal et al., Science 2000; и Tomlinson et al., Nature Genetics 2002). Обнаружено, что генеративные мутации в SDH B, C и D субъединицах инициируют события семейной параганглиомы или лейомиомы (Baysal et al., Science 2000).

Иммуноблоттинг использовался для характеристики экспрессии SDH субъединицы B в митохондриальных препаратах раковых клеток, обработанных коэнзимом Q10. Результаты подтверждают, что обработка коэнзимом Q10 связана с возрастанием уровней SDH белка в митохондриях клеток. Эти результаты подтверждают, что одним из механизмов действия коэнзима Q10 является переключение метаболизма клеток на ТСА цикл и на митохондрии благодаря возрастанию уровней митохондриальных ферментов, таких как SDHB. Результаты суммированы в таблице ниже.

Таблица 48. Сукцинат дегидрогеназа B в NCIE0808 митопрепаратах

| Композиция - Время      | Средний<br>нормализованный объем |
|-------------------------|----------------------------------|
| Среда                   | 531                              |
| 50 мкМ Коэнзим Q10, 3ч  | 634                              |
| 100 мкМ Коэнзим Q10, 3ч | 964                              |
| 50 мкМ Коэнзим Q10, 6ч  | 1077                             |
| 100 мкМ Коэнзим Q10, 6ч | 934                              |

Индущирующий гипоксию фактор-1.

Индущирующий гипоксию фактор (Hif) является транскрипционным фактором, состоящим из альфа и бета субъединиц. При нормоксии уровни белка Hif1 альфа очень низкие вследствие его постоянной деградации в последовательности посттрансляционных событий. Обычно считается, что переключение между гликолизом и окислительным фосфорилированием контролируется совместной активностью двух ферментов PDH и LDH, которые определяют катаболическую судьбу пирувата. Hif контролирует эту критическую точку бифуркации, индуцируя уровни LDH и ингибируя активность PDH путем стимуляции PDK. Благодаря своей способности отводить метаболизм пирувата от митохондрий в цитозоль, Hif считается ключевым медиатором биоэнергетического переключения в раковой клетке.

Воздействие коэнзима Q10 снижает уровни белка Hif1 альфа в митохондриальных препаратах раковых клеток. В лизатах нормальных клеток также наблюдается более слабая полоса Hif1, показывающая снижение. Результаты суммированы в таблицах ниже.

Таблица 49. Hif1 альфа слабая полоса в HASMC клетках после обработки

| Количество - Композиция | Нормализованный объем |
|-------------------------|-----------------------|
| 5г48-Среда              | 22244                 |
| 5г48-50-Коэнзим Q10     | 21664                 |
| 5г48-100-Коэнзим Q10    | 19540                 |
| 22G48-Среда             | 14752                 |
| 22G48-50-Коэнзим Q10    | 17496                 |
| 22G48-100-Коэнзим Q10   | 23111                 |
| 22G24-Среда             | 21073                 |
| 22G24-50-Коэнзим Q10    | 18486                 |
| 22G24-100-Коэнзим Q10   | 17919                 |

Таблица 50. Hif1 альфа более сильная полоса в HepG2 после обработки

| Количество - Композиция | Нормализованный объем |
|-------------------------|-----------------------|
| 5г24-Среда              | 12186                 |
| 5г24-50-Коэнзим Q10     | 8998                  |
| 5г24-100-Коэнзим Q10    | 9315                  |
| 5г48-Среда              | 8868                  |
| 5г48-50-Коэнзим Q10     | 8601                  |
| 5г48-100-Коэнзим Q10    | 10192                 |
| 22G24-Среда             | 11748                 |
| 22G24-50-Коэнзим Q10    | 14089                 |
| 22G24-100-Коэнзим Q10   | 8530                  |
| 22G48-Среда             | 8695                  |
| 22G48-50-Коэнзим Q10    | 9416                  |
| 22G48-100-Коэнзим Q10   | 5608                  |

Пример 21. Анализ степени потребления кислорода (OCR) и внеклеточной кислотности (ECAR) в нормальных и раковых клетках, обработанных CoQ10.

Этот пример демонстрирует, что воздействие на клетки репрезентативной MBM /эпи-переключателем изобретения - CoQ10 - в отсутствие и/или присутствие стрессора (например, гипергликемии, гипоксии, молочной кислоты), связано с переключением между гликолизом /биосинтезом лактата и митохондриальным окислительным фосфорилированием (как оценено по значениям ECAR и OCR), в сторону значений, наблюдаемых в нормальных клетках при нормальных физиологических условиях.

Заявители демонстрировали в предыдущих разделах, что воздействие CoQ10 на раковые клетки связано с изменениями экспрессии определенных белков, которые усиливают митохондриальное окис-

лительное фосфорилирование, с сопутствующим снижением гликолиза и биосинтеза лактата. Этот пример показывает, что непосредственную оценку митохондриального окислительного фосфорилирования можно наблюдать путем подсчета степени потребления кислорода (OCR) в клеточных линиях с использованием SeaHorse XF анализатора, инструмента, который оценивает растворенный кислород и внеклеточные уровни в *in vitro* экспериментальной модели (SeaHorse Biosciences Inc, North Billerica, MA).

pH внеклеточного микроокружения сравнительно кислый в опухолях по сравнению с внутриклеточным (цитоплазматическим) pH и окружающими нормальными тканями. Этот характерный признак опухолей служит множеству целей, включая способность нарушать внеклеточный матрикс (ECM), отличительную черту опухолевых метастаз, которая впоследствии инициирует сигнальный каскад, который затем модулирует:

- ангиогенез в опухоли;
- повышенную активацию механизма остановки, контролирующего включение-выключение клеточного цикла;
- иммуномодулирующие механизмы, которые содействуют системе клеточной системы уклонения от иммунного надзора;
- элементы метаболического контроля, которые повышают зависимость от гликолитического потока и потребления лактата;
- дисрегуляцию ключевых семейств апоптозных генов, таких как Bcl-2, IAP, EndoG, AIF, которые служат возрастанию онкогенности.

Не имея стремления ограничиваться какой-либо определенной теорией, кислая pH внешнего микроокружения в опухоли является последствием возрастания концентрации ионов водорода, вышедших из опухолевых клеток из-за возросшего образования лактата из-за изменившегося гликолитического фенотипа.

В этом эксперименте OCR и степень внеклеточной кислотности (ECAR) в нормальных клеточных линиях наблюдались в присутствии и отсутствии CoQ10 для определения базовых величин. Наблюдалось, что в своем естественном окружении базовые степени OCR в нормальных клеточных линиях различны, и обычно зависят от физиологической роли клеток в теле.

Например, одна серия экспериментов была проведена с использованием неканцерогенной клеточной линии HDFa, которая является клеточной линией дермальных фибробластов у взрослых людей. Фибробласты - клетки, которые в основном синтезируют и секретируют компоненты внеклеточного матрикса (ECM) и коллаген, который формирует структурный каркас (stroma) тканей. Кроме того, известно, что фибробласты служат в ткани посредниками множества функций, таких как заживление мелких ран и местная иммуномодуляция. При нормальных физиологических условиях энергетические потребности нормальных фибробластов удовлетворяются использованием комбинации гликолиза и окислительного фосфорилирования - гликолиз предоставляет необходимые вещества для синтеза ECM.

В отличие от HDF, HASMC (клетки гладкой мускулатуры аорты человека) находятся в артериях, венах, лимфатических сосудах, пищеварительном тракте, дыхательных путях, мочевом пузыре и в других тканях со способностью подвергаться регулируемому возбуждению и сокращению. Способность гладких мускулов, таких как клетки HASMC, сокращаться, требует энергии, запасенной в АТФ. Эти ткани переходят от низкоэнергетической модели, когда АТФ может поставляться из митохондрий, к высокоэнергетической модели (во время физической активности/стресса), когда энергия предоставляется путем переключения на гликолиз для быстрого образования АТФ. Таким образом, нормальные клетки гладкой мускулатуры могут использовать комбинацию митохондриального OXPHOS и гликолиза для удовлетворения своих энергетических потребностей в нормальном физиологическом состоянии.

Разница в их сравнительных физиологических ролях (т.е., HDFa и HASMC) наблюдалась в остаточных OCR значениях, подсчитанных в этих клеточных линиях с использованием SeaHorse XF анализатора. Фиг. 29 и 30 описывают OCR в HDFa и HASMC клетках, растущих в условиях физиологически нормального количества глюкозы (около 4,6 mM) и при повышенной глюкозе (гипергликемия).

Базовое значение OCR для HDFa в отсутствие каких-либо воздействий при нормальной доступности кислорода примерно 40 рмоль/мин (фигура 29) в присутствии 5,5 mM глюкозы. Это значение слегка повысилось, когда клетки содержали в 22 mM глюкозе. Напротив, в клетках HASMC значения OCR при 5,5 mM глюкозы примерно 90 пмоль/мин., и значение OCR уменьшилось до примерно 40 пмоль/мин. в присутствии 22 mM глюкозы. Таким образом, в условиях гипергликемии существует различная реакция у HDFa и HASMC, что демонстрирует врожденные различия в их соответствующем физиологическом складе и функциях.

Обработка CoQ10 в клетках связана с изменениями в OCR, которая проявляется в условиях, наблюдаемых при нормальных глюкозных условиях (5 mM). Сложность физиологического ответа соответствует присутствию малой плотности кислорода. Таким образом, влияние CoQ10 связано с изменениями в степенях OCR в нормальных клетках в сторону физиологического статуса, который присущ определенным типам клеток.

Табл. 51 ниже описывает значения ECAR (мрН/мин) в HDFa клетках в присутствии или отсутствии CoQ10 в условиях нормоксии и гипоксии при 5,5 мМ и 22 мМ глюкозы. Можно видеть, что у нормальных клеток обработка CoQ10 имела минимальное влияние на значения ECAR, даже когда было оказано влияние на OCR в этих клетках. В условиях гипоксии при больших значениях глюкозы обработка CoQ10 была связана с понижением повышенного ECAR до значения, которое наблюдалось в условиях нормоксии и отсутствии обработки.

Таблица 51. ECAR значения в HDFa клетках в отсутствие и присутствие CoQ10 в условиях нормоксии и гипоксии при 5,5 мМ и 22 мМ глюкозы

| Обработка      | Нормоксия (5,5 мМ) |      | Гипоксия (5,5 мМ) |      | Нормоксия (22 мМ) |      | Гипоксия (22 мМ) |      |
|----------------|--------------------|------|-------------------|------|-------------------|------|------------------|------|
|                | ECAR               | SEM  | ECAR              | SEM  | ECAR              | SEM  | ECAR             | SEM  |
| Необработанные | 5                  | 1,32 | 5                 | 0,62 | 5                 | 0,62 | 9                | 0,81 |
| 50мкМ 31510    | 6                  | 1,11 | 5                 | 0,78 | 5                 | 0,78 | 6                | 0,70 |
| 100мкМ 31510   | 6                  | 0,76 | 5                 | 1,19 | 5                 | 1,19 | 8                | 1,07 |

В таблице 52 оцененные базовые значения ECAR (мрН/мин) в HASMC были выше по сравнению с HDFa. То, что условия гипоксии стали причиной повышения ECAR, скорее всего связано с тем, что внутриклеточная гипоксия вызывает ацидозы во вторую очередь после возрастания гликолиза

Таблица 52. ECAR значения в клетках HASMC в отсутствие и присутствие CoQ10 в условиях нормоксии и гипоксии в условиях 5,5 мМ и 22 мМ глюкозы

| Обработка      | Нормоксия (5,5 мМ) |      | Гипоксия (5,5 мМ) |      | Нормоксия (22 мМ) |      | Гипоксия (22 мМ) |      |
|----------------|--------------------|------|-------------------|------|-------------------|------|------------------|------|
|                | ECAR               | SEM  | ECAR              | SEM  | ECAR              | SEM  | ECAR             | SEM  |
| Необработанные | 9                  | 2,22 | 11                | 2,18 | 22                | 2,08 | 19               | 1,45 |
| 50мкМ 31510    | 9                  | 2,13 | 11                | 2,54 | 21                | 1,72 | 17               | 1,60 |
| 100мкМ 31510   | 9                  | 1,72 | 13                | 2,30 | 22                | 1,64 | 17               | 1,47 |

Наблюдалось, что обработка CoQ10 связана со спускающимся трендом степеней ECAR в гипергликемичных клетках HASMC в условиях гипоксии по сравнению со значением, которое наблюдается в условиях нормоксии при нормальной глюкозе. Эти данные показывают наличие физиологической изменчивости, которое свойственно физиологической роли определенного типа клеток, изменения наблюдаются при аномальных условиях (напр, гипергликемии), и происходит переключение в направлении нормы при воздействии CoQ10.

Напротив, раковые клетки (например, MCF-7, PaCa-2) по сути своей склонны к культуре с более высокими уровнями глюкозы по сравнению с нормальными клетками из-за своего гликолитического фенотипа, поддерживающегося в культуре. Воздействие CoQ10 приводит к последовательному уменьшению значений OCR (фиг. 31 и 32).

Действие CoQ10 на значения OCR в MCF-7 и PaCa-2 клетках было подобно действию на нормальные HDFa и HASMC клетки, тогда как варибельный ответ подтверждал терапевтическую реакцию, основанную на индивидуальном метаболическом профиле линии раковых клеток.

Таблица 53. ECAR значения в PaCa-2 клетках в отсутствие и присутствие CoQ10 в условиях нормоксии и гипоксии при 5,5 мМ и 22 мМ глюкозе

| Обработка      | Нормоксия (17 мМ) |      | Гипоксия (17 мМ) |      | Нормоксия (22 мМ) |      | Гипоксия (22 мМ) |      |
|----------------|-------------------|------|------------------|------|-------------------|------|------------------|------|
|                | ECAR              | SEM  | ECAR             | SEM  | ECAR              | SEM  | ECAR             | SEM  |
| Необработанные | 21                | 5,97 | 16               | 3,41 | 24                | 4,35 | 36               | 5,65 |
| 50мкМ 31510    | 13                | 3,08 | 12               | 1,66 | 20                | 5,15 | 25               | 4,58 |
| 100мкМ 31510   | 14                | 2,14 | 17               | 2,59 | 19                | 3,38 | 30               | 5,62 |

Табл. 53 описывает значения ECAR в PaCa-2 клетках. В отличие от нормальных клеток, раковые клетки фенотипически склонны использовать высокие уровни глюкозы для образования АТФ (усиленный гликолиз), что приводит к повышенному ECAR (табл. 53, ECAR для необработанной нормоксии 17 мМ) при 21 мрН/мин. Обработка CoQ10 дает значительное уменьшение степени ECAR при этих условиях, скорее всего связанное с уменьшением вырабатываемой при гликолизе молочной кислоты. Соответствующее уменьшение OCR в этих клетках скорее всего связано с повышенной эффективностью митохондриального OXPHOS.

Подобное сравнение OCR и ECAR значений (данные не показаны), определенных для множество других нормальных и раковых клеток, включает: HАЕС (нормальные эндотелиальные клетки аорты человека), MCF-7 (рак молочной железы), HepG2 (рак печени) и сильно метастазирующие PC-3 (рак простаты) клеточные линии. Во всех этих исследуемых линиях воздействие CoQ10 в отсутствие и/или присутствие стрессоров (например, гипергликемии, гипоксии, молочной кислоты) было связано с переключением в значениях OCR и ECAR к значениям, наблюдаемым в нормальных клетках при нормальных физиологических условиях. Таким образом, общее действие CoQ10 на лечение рака, включая клеточную гибель, является эффектом потока из-за его совместного влияния на протеомические, геномные, метаболические результаты одновременно с переключением клеточной биоэнергетики с гликолиза на митохондриальное OXPHOS.

Пример 22. Структурные молекулярные элементы для биосинтеза CoQ10.

Этот пример демонстрирует, что определенные предшественники биосинтеза CoQ10, такие как те, которые участвуют в биосинтезе бензохинонового кольца и те, которые участвуют в биосинтезе изопреновых повторов и их присоединении к бензохиноновому кольцу, ("компоненты структурных элементов"), могут вводиться отдельно или вводиться в комбинации с целевыми клетками, и оказывать эффект отрицательной регуляции на ингибитор апоптозов Bcl-2, и/или положительной регуляции на промотор апоптозов Каспазы-3. Определенные предшественники или их комбинации могут также ингибировать клеточную пролиферацию. Данные подтверждают, что такие предшественники CoQ10 могут быть использованы вместо CoQ10 для достижения по большей части таких же результатов, как и при введении CoQ10.

Определенные приведенные в качестве примера экспериментальные условия, использованные в экспериментах, перечислены ниже.

Skmel-28 клетки меланомы культивировались в DMEM/F12 с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и 1X конечной концентрации антибиотиков. Клетки росли до 85% заселенности и были обработаны компонентами структурных элементов в течение 3, 6, 12 и 24 ч. Клетки затем были собраны и проведен иммуноблоттинг.

Исследуемые компоненты строительных элементов включали L-фенилаланин, DL-фенилаланин, D-фенилаланин, L-тирозин, DL-тирозин, D-тирозин, 4-гидрокси-фенилпируват, фенилацетат, 3-метокси-4-гидроксиманделат (манделат ванилина или VMA), ванилиновую кислоту, 4-гидроксибензоат, пикросин, пантенол, мевалоновую кислоту, Ацетилглицин, Ацетил-CoA, Фарнезил и 2,3-диметокси-5-метил-п-бензохинон.

Для иммуноблоттинга клетки были собраны в холодный PBS, лизированы и уровни белка были количественно определены с использованием ВСА белкового анализа. Общий лизат клеток был помещен в 12% Tris-HCl гель. Белки затем были перенесены на нитроцеллюлозную бумагу, а затем блокированы 5% сывороткой Tris-буферного раствора в течение 1 часа. Белки затем подвергались действию первичных антител (Bcl-2 и каспазы-3) в течение ночи. Нитроцеллюлозная бумага затем экспонировалась в Pico Chemilluminiscent на 5 мин и регистрировалась экспрессия белка. После экспозиции актин подсчитывался по такому же способу. С использованием ImageJ были подсчитаны уровни белковой экспрессии. t-Тест использовался для анализа статистической достоверности

Иллюстративные результаты экспериментов представлены ниже.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов L-фенилаланина. Перед тем, как вступить в путь синтеза структуры кольца хинона, L-фенилаланин превращается в тирозин. Иммуноблоттинг был проведен для определения любых изменений экспрессии апоптозных белков в клетках меланомы. Тестировались следующие концентрации: 5 мкМ, 25 мкМ и 100 мкМ. В первоначальных исследованиях L-фенилаланин добавлялся к DMEM/F12 среде, которая содержала его в концентрации 0,4 М. Для 5 мкМ, 25 мкМ и 100 мкМ, конечная концентрация L-фенилаланина в среде была 0,405 М, 0,425 М и 0,500 М, соответственно. Эти конечные концентрации исследовались на Skmel-28 клетках в течение периодов инкубации 3, 6, 12 и 24 ч. Клетки росли до 80% заселенности до добавления воздействующей среды и собирались с использованием процедуры иммуноблоттинга, как описано выше. Статистически достоверное снижение Bcl-2 наблюдалось при 100 мкМ L-фенилаланина после 3 и 12 ч инкубации. При 5 мкМ L-фенилаланина статистически достоверное снижение Bcl-2 наблюдалось после 6 ч инкубации. При 25 мкМ L-фенилаланина статистически достоверное снижение Bcl-2 и статистически достоверное возрастание каспазы-3 наблюдались после 12 ч инкубации. Статистически достоверное снижение Bcl-2 показывает изменение апоптозного потенциала, статистически достоверное возрастание каспазы-3 подтверждает, что клетки подверглись апоптозу. Имелась постоянная тенденция снижения Bcl-2 по срав-



нению с контролем, хотя из-за размера образцов и стандартного отклонения в этом эксперименте эти временные точки не были статистически достоверными.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов D-фенилаланина: D-фенилаланин, химически синтезированная форма биоактивного L-фенилаланина, исследовался в сравнении с L-фенилаланином. Для всех трех концентраций (5 мкМ, 25 мкМ и 100 мкМ) D-фенилаланина наблюдалось достоверное уменьшение экспрессии Bcl-2 после 6 ч инкубации. Кроме того для 5 мкМ и 25 мкМ наблюдалось достоверное уменьшение после 3 ч инкубации. Для 5 мкМ и 100 мкМ концентраций наблюдалось достоверное возрастание экспрессии каспазы-3 после 6 ч инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов DL-фенилаланина: DL-фенилаланин также исследовался в сравнении с L-фенилаланином. Опять концентрации 5 мкМ, 25 мкМ, и 100 мкМ исследовались на Skmel-28 клетках. Периоды инкубации составляли 3, 6, 12 и 24 ч. Статистически достоверное возрастание каспазы-3 наблюдалось после 3 ч инкубации. Статистически достоверное снижение Bcl-2 наблюдалось после 24 ч инкубации. Хотя тенденция снижения Bcl-2 и возрастания каспазы-3 наблюдалась при всех концентрациях и на всех временных точках, это не было статистически достоверным в этом эксперименте.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов L-тирозина: L-тирозин является компонентом структурных элементов в синтезе структуры кольца хинона CoQ10. Первичное исследование L-тирозина не дало концентраций белка, достаточно высоких для иммуноблоттинга. В этом исследовании концентрации 25 мкМ исследовались иммуноблоттингом. В DMEM/F12 среде использовалась содержащая L-тирозин динатриевая соль в концентрации 0.398467 М. Первоначальная концентрация была увеличена до 500 нМ, 5 мкМ, и 15 мкМ. Статистически достоверное возрастание каспазы-3 наблюдалось для 500 нМ концентраций после 12 ч инкубации. Статистически достоверное снижение Bcl-2 наблюдалось для 5 мкМ концентраций после 24 ч инкубации. Статистически достоверное снижение Bcl-2 наблюдалось для 500 мкМ и 5 мкМ концентраций после 24 ч инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов D-тирозина: D-тирозин, синтетическая форма L-тирозина, исследовался в сравнении с апоптозным действием L-тирозина на клетки меланомы. Основываясь на первоначальных исследованиях L-тирозина, для иммуноблоттинга были выбраны концентрации ниже 25 мкМ. Тестируемыми концентрациями были 1 мкМ, 5 мкМ, и 15 мкМ. D-тирозин показал уменьшение экспрессии Bcl-2 при 5 мкМ и 15 мкМ концентрациях на 12 и 24-часовых временных периодах. Каспаза-3 значительно возростала при концентрациях 5 мкМ на 3, 12 и 24 временных периодах. Также наблюдалось возрастание экспрессии каспазы-3 при 1 мкМ на 12 и 24 временных периодах. Кроме того, существует возрастание экспрессии каспазы-3 при 5 мкМ на 12-часовом временном периоде.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов DL-тирозина: DL-тирозин, синтетическая форма L-тирозина, также исследовался в сравнении с апоптозным действием L-тирозина на клетки. Существует статистически достоверное уменьшение экспрессии Bcl-2, наблюдаемое при 1 мкМ и 15 мкМ концентрациях после 12 ч инкубации и при 5 мкМ после 24 ч инкубации. Возрастание экспрессии каспазы-3 также наблюдалось при 5 мкМ и 15 мкМ после 12 ч инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов 4-гидрокси-фенилпирувата: 4-гидрокси-фенилпируват получается из аминокислот тирозина и фенилаланина и может играть роль в синтезе структуры кольца. Концентрации 1 мкМ, 5 мкМ и 15 мкМ исследовались на экспрессию Bcl-2 и каспазы-3. Для 5 мкМ и 15 мкМ концентраций наблюдается значительное уменьшение экспрессии Bcl-2 после 24 часов инкубации и значительное возрастание экспрессии каспазы-3 после 12 ч инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов фенилацетата: фенилацетат потенциально может превратиться в 4-гидроксибензоат, который играет роль в присоединении боковой цепи к структуре кольца. Тестировались следующие концентрации: 1 мкМ, 5 мкМ, и 15 мкМ. Для фенилацетата наблюдается уменьшение экспрессии Bcl-2 для концентраций 5 мкМ и 15 мкМ после 12 и 24 ч инкубации. Возрастание экспрессии каспазы-3 наблюдалось для концентраций 5 мкМ и 15 мкМ после 12 ч и 24 ч инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов 3-метокси-4-гидроксиманделат (манделат ванилина или VMA): VMA является дополнительным компонентом для синтеза структуры кольца хинона CoQ10. Тестировались следующие концентрации: 100 нМ, 250 нМ, 500 нМ, 1 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ. Хотя статистически достоверное апоптозное действие в этом эксперименте не наблюдалось, данные показывают тенденцию снижения экспрессии Bcl-2.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов ванилиновой кислоты: Ванилиновая кислота является предшественником синтеза кольца хинона и исследовалась в концентрациях 500 нМ, 5 мкМ, и 15 мкМ. Экспрессию Bcl-2 и каспазы-3 оценили путем иммуноблоттинга. Ванилиновая кислота показала достоверное уменьшение экспрессии Bcl-2 при концентрациях 500 нМ и 5 мкМ на временной точке 24 ч инкубации. Для концентрации 15 мкМ наблюдается уменьшение экспрессии Bcl-2 после 3 ч инкубации. Для клеток, инкубированных с 15 мкМ в течение 24 ч наблюдается значительное повышение экспрессии каспазы-3.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов 4-гидроксибензоата: 4-гидроксибензойная

кислота играет роль в присоединении изопреноидной боковой цепи к структуре кольца. Тестировались следующие концентрации: 500 нМ, 1 мкМ, и 50 мкМ. Наблюдалось достоверное уменьшение экспрессии Bcl-2 для концентраций 15 мкМ после 24 ч инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов 4-пиродоксина: Пиродоксин - другой предшественный структурный элемент для синтеза структуры кольца хинона CoQ10. Для этого компонента тестировались следующие концентрации: 5 мкМ, 25 мкМ и 100 мкМ. Клетки оценивались по уровням Bcl-2 и каспазы-3. Пиродоксин показал значительное снижение экспрессии Bcl-2 в клетках меланомы после 24 ч инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов пантенола: Пантенол играет роль в синтезе структуры кольца хинона CoQ10. Концентрации, тестируемые на клетках меланомы, были следующими: 5 мкМ, 25 мкМ и 100 мкМ.

Этот компонент показал значительное снижение экспрессии Bcl-2 при 25 мкМ концентрации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов мевалона: мевалоновая кислота является одним из основных компонентов в синтезе CoQ10. Для этого компонента тестировались следующие концентрации: 500 нМ, 1 мкМ, 25 мкМ, и 50 мкМ. В этом эксперименте не было показано достоверного уменьшения экспрессии Bcl-2 или возрастания экспрессии каспазы-3.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов ацетилглицина: другим путем для синтеза CoQ10 является изопреноидный синтез (боковой цепи). Добавление ацетилглицина превращает Коэнзим А в Ацетил-КоА, который входит в путь мевалона для изопреноидного синтеза. Тестировались следующие концентрации 5 мкМ, 25 мкМ, и 100 мкМ. Исследование ацетилглицина показало значительное уменьшение экспрессии Bcl-2 после 12 часов инкубации при концентрациях 5 мкМ и 25 мкМ. Значительное уменьшение Bcl-2 было отмечено при 100 мкМ концентрации при 24 часовой временной точке инкубации.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов Ацетил-КоА: Ацетил-КоА является предшественником в мевалоновом пути в синтезе CoQ10. Тестировались следующие концентрации 500 нМ, 1 мкМ, 25 мкМ, и 50 мкМ. Не наблюдалось значительного снижения экспрессии Bcl-2 или возрастания каспазы-3 при тестируемых концентрациях и временных точках.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов L-Тирозина в комбинации с фарнезилем: L-тирозин является одним из предшественников в синтезе структуры кольца хинона CoQ10. Предыдущие эксперименты исследовали воздействие L-тирозина в среде с L-фенилаланином и L-тирозином. В этом исследовании L-тирозин изучался в среде без добавления L-фенилаланина и L-тирозина. В этом исследовании конечными тестируемыми концентрациями L-тирозина были 500 нМ, 5 мкМ, и 15 мкМ. Фарнезил тестировался в концентрации 50 мкМ. Не наблюдалось достоверного влияния на 3 и 6-часовых временных точках.

Иммуноблоттинг компонента структурных элементов L-фенилаланина в комбинации с фарнезилем: L-фенилаланин, предшественник синтеза структуры кольца хинона, исследовался в комбинации с фарнезилем в среде, свободной от L-тирозина и L-фенилаланина. Иммуноблоттинг был проведен для оценки экспрессии Bcl-2 и каспазы-3. Конечными концентрациями L-фенилаланина были: 5 мкМ, 25 мкМ, и 100 мкМ. Фарнезил был добавлен в концентрации 50 мкМ. Это исследование показало уменьшение экспрессии Bcl-2 для большинства тестируемых концентраций и комбинаций, как показано в таблице ниже.

Таблица 54. L-фенилаланин и/или фарнезил

| L-фенилаланин       | 3 ч   |       | 6 ч   |       | 12 ч  |       | 24 ч  |       |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                     | Bcl-2 | Cas-3 | Bcl-2 | Cas-3 | Bcl-2 | Cas-3 | Bcl-2 | Cas-3 |
| 5 мкМ               | X     |       |       |       |       |       |       |       |
| 5 мкМ w/ Фарнезил   |       |       |       |       |       |       | X     | X     |
| 25 мкМ              | X     |       | X     |       |       |       |       |       |
| 25 мкМ w/ Фарнезил  | X     |       |       |       |       |       |       | X     |
| 100 мкМ             | X     |       | X     |       |       |       | X     |       |
| 100 мкМ w/ Фарнезил |       |       |       | X     |       |       |       |       |

Анализ клеточной пролиферации при комбинации 4-гидроксibenзоата с бензохиноном: Эта серия экспериментов использовала анализ клеточной пролиферации для определения действия комбинированных различных строительных блоков молекул на клеточную пролиферацию.

Первое исследование определяло действие комбинации 4-гидроксibenзоата с бензохиноном. Клетки инкубировались 48 ч, после чего определялось число клеток для живых клеток. Каждая тестовая группа сравнивалась с контролем, и каждая комбинационная группа сравнивалась с контролем по бензохинону. Композиции статистически анализировались при добавлении бензохинона. Следующая таблица суммирует результаты подсчета клеток, где X означает статистическое уменьшение числа клеток.

Таблица 55. 4-Гидроксibenзоат и/или бензохинон

| 4-гидроксibenзоат        | По сравнению с Ctrl | По сравнению с 4-гидроксibenзоатом композицией w/o бензохинона | По сравнению с контролем по бензохинону |
|--------------------------|---------------------|--|---|
| 500 нМ                   | X                   |  |   |
| 500 нМ w/ Benzo (35 мкМ) | X                   | X  |   |
| 500 нМ w/ Benzo (70 мкМ) | X                   | X  |   |
| 1 мкМ                    | X                   |  |   |
| 1 мкМ w/ Benzo (35 мкМ)  | X                   | X  |   |
| 1 мкМ w/ Benzo (70 мкМ)  | X                   | X  |   |
| 50 мкМ                   | X                   |  |   |
| 50 мкМ w/ Benzo (35 мкМ) | X                   |  |   |
| 50 мкМ w/ Benzo (70 мкМ) | X                   | X  | X                                       |

Существует значительное уменьшение числа клеток, инкубированных с 4-гидроксibenзоатом и бензохиноном и в комбинации. Для комбинации 50 мкМ 4-гидроксibenзоата в комбинации с 70 мкМ бензохинона существует значительное уменьшение числа клеток, по сравнению с контролем по бензохинону. Это подтверждает синергетическое действие этого молярного соотношения.

Дополнительные исследования были проведены для исследования дополнительных молярных соотношений. Для первого теста 4-гидроксibenзоат был тестирован в концентрации 500 нМ, 1 мкМ, и 50 мкМ. Эти концентрации тестировались в комбинации с 2,3-диметокси-5-метил-п-бензохиноном (Benzo). Тестируемая концентрация Benzo составляла 25 мкМ, 50 мкМ, и 100 мкМ. Клетки меланомы росли до заселенности 80% и сажались в 6-луночные планшеты в концентрации 40К клеток на лунку. Клетки были обработаны CoQ10, 4-гидроксibenзоатом, Benzo, и комбинацией 4-гидроксibenзоат/бензо.

T-тест был проведен с  $p < 0,05$  как статистически достоверной. X означает статистически достоверное уменьшение числа клеток.

Таблица 56. 4-Гидроксibenзоат и/или 2,3-диметокси-5-метил-п-бензохинон (Benzo)

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| Контроль vs Benzo 25 мкМ           | X |
| Контроль vs Benzo (B) 50 мкМ       |   |
| Контроль vs Benzo (B) 100 мкМ      | X |
| Контроль vs 4-Гидроксibenзоат (HB) | X |
| Контроль нМ                        |   |
| Контроль vs HB 1 мкМ               | X |
| Контроль vs HB 50 мкМ              | X |
| 500 нМ HB vs 500 нМ HB w/ 25 B     | X |
| 500 нМ HB vs 500 нМ HB w/ 50 B     | X |
| 500 нМ HB vs 500 нМ HB w/ 100 B    | X |
| 1 мкМ HB vs 1 мкМ HB w/ 25 B       | X |
| 1 мкМ HB vs 1 мкМ HB w/ 50 B       | X |
| 1 мкМ HB vs 1 мкМ HB w/ 100 B      |   |
| 50 мкМ HB vs 50 мкМ HB w/ 25 B     | X |
| 50 мкМ HB vs 50 мкМ HB w/ 50 B     | X |
| 50 мкМ HB vs 50 мкМ HB w/ 100 B    |   |
| 500 нМ HB w/ 25 B vs 25 B          | X |
| 500 нМ HB w/ 50 B vs 50 B          | X |
| 500 нМ HB w/ 100 B vs 100 B        | X |
| 1 мкМ HB w/ 25 B vs 25 B           | X |
| 1 мкМ HB w/ 50 B vs 50 B           | X |
| 1 мкМ HB w/ 100 B vs 100 B         |   |
| 50 мкМ HB w/ 25 B vs 25 B          | X |
| 50 мкМ HB w/ 50 B vs 50 B          | X |
| 50 мкМ HB w/ 100 B vs 100 B        |   |

Существует значительное уменьшение пролиферации клеток в среде, содержащей НВ. Больше того, комбинация НВ с бензохиноном показала значительное уменьшение числа клеток, сравнимое с клетками, инкубированными с соответствующими концентрациями бензохинона.

Анализ клеточной пролиферации также был сделан на клетках неонатальных фибробластов. Концентрации тестируемого НВ были 500 нМ, 5 мкМ, и 25 мкМ. НВ также тестировался в комбинации с бензохиноном в концентрациях 25 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ. Клетки меланомы были посажены по 40к клеток на лунку и были обработаны в течение 24 ч. Клетки были обработаны трипсином и подсчитаны с использованием счетчика.

Статистический анализ не показал значительного уменьшения клеток фибробластов. Это показывает минимальную токсичность или ее отсутствие в нормальных клетках.

Анализ клеточной пролиферации при комбинации фенилацетата и бензохинона: фенилацетат является предшественником синтеза 4-гидроксibenзойной кислоты (облегчает присоединение структуры кольца). Анализ клеточной пролиферации был осуществлен для определения эффекта инкубации с фенилацетатом в комбинации с CoQ10 и бензохиноном.

Таблица 57. Фенилацетат и/или бензохинон

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| Контроль и 25/25 мкМ Ben           | X |
| Контроль и 25/50 мкМ Ben           | X |
| Контроль и 25/100 мкМ Ben          | X |
| Контроль и 25/25 мкМ Q-10          | X |
| Контроль и 25/25 мкМ Q-10          | X |
| Контроль и 25/50 мкМ Q-10          | X |
| Контроль и 25/100 мкМ Q-10         | X |
| Контроль и Ben 25                  | X |
| Контроль и Ben 50                  | X |
| Контроль и Ben 100                 | X |
| Контроль и Q-10 25                 |   |
| Контроль и Q-10 50                 |   |
| Контроль и Q-10 100                | X |
| Ben 25 мкМ и 500 нМ/25 мкМ Ben     | X |
| Ben 25 мкМ и 5 нМ/25 мкМ Ben       | X |
| Ben 25 мкМ и 25 нМ/25 мкМ Ben      | X |
| Ben 50 мкМ и 500 нМ/50 мкМ Ben     | X |
| Ben 50 мкМ и 5 нМ/50 мкМ Ben       | X |
| Ben 50 мкМ и 25 нМ/50 мкМ Ben      | X |
| Ben 100 мкМ и 500 нМ/100 мкМ Ben   |   |
| Ben 100 мкМ и 5 нМ/100 мкМ Ben     |   |
| Ben 100 мкМ и 25 нМ/100 мкМ Ben    |   |
| Q-10 25 мкМ и 500 нМ/25 мкМ Q-10   | X |
| Q-10 25 мкМ и 5 нМ/25 мкМ Q-10     | X |
| Q-10 25 мкМ и 25 нМ/25 мкМ Q-10    | X |
| Q-10 50 мкМ и 500 нМ/50 мкМ Q-10   | X |
| Q-10 50 мкМ и 5 нМ/50 мкМ Q-10     | X |
| Q-10 50 мкМ и 25 нМ/50 мкМ Q-10    | X |
| Q-10 100 мкМ и 500 нМ/100 мкМ Q-10 | X |
| Q-10 100 мкМ и 5 нМ/100 мкМ Q-10   | X |
| Q-10 100 мкМ и 25 нМ/100 мкМ Q-10  | X |

Данные показывают, что добавление фенилацетата в комбинации с бензохиноном значительно уменьшает клеточную пролиферацию. Комбинация с CoQ10 и фенилацетатом значительно уменьшает число клеток по сравнению с инкубацией с CoQ10 одним бензохиноном.

Анализ клеточной пролиферации при комбинации 4-гидроксibenзоата с фарнезилем: 4-гидроксibenзоат был инкубирован в комбинации с Фарнезилем. Суммарные результаты перечислены ниже. Группы 4-гидроксibenзоата сравнивались с контрольными и фарнезил-контрольными группами. X означает статистически достоверное уменьшение числа клеток.

Таблица 58. 4-Гидроксibenзоат и/или фарнезил

| 4-гидроксibenзоат           | По сравнению с контролем | По сравнению с 4-гидрокси совокупности w/o фарнезилом | По сравнению с фарнезил контролем |
|-----------------------------|--------------------------|---|-----------------------------------|
| 500 нМ                      | X                        |   |                                   |
| 500 нМ w/ фарнезил (35 мкМ) | X                        |   |                                   |
| 500 нМ w/ фарнезил (70 мкМ) | X                        |   |                                   |
| 1 мкМ                       | Ошибка                   |   |                                   |
| 1 мкМ w/ фарнезил (35 мкМ)  | Ошибка                   |   |                                   |
| 1 мкМ w/ фарнезил (70 мкМ)  | Ошибка                   |   |                                   |
| 50 мкМ                      | X                        |   |                                   |
| 50 мкМ w/ фарнезил (35 мкМ) | X                        |   |                                   |
| 50 мкМ w/ фарнезил (70 мкМ) | X                        |   |                                   |

Анализ клеточной пролиферации при комбинации L-фенилаланина с бензохиноном: анализ клеточной пролиферации был проведен для тестирования комбинации L-фенилаланина в комбинации с бензохиноном. Ниже суммированы результаты по L-фенилаланину в сравнении с контролем и бензохиноновым контролем. X показывает статистически достоверное уменьшение.

Таблица 59. L-Фенилаланин и/или бензохинон

| L-фенилаланин             | По сравнению с контролем | По сравнению с L-фенилаланином в совокупности с w/o бензохиноном | По сравнению с бензохиноновым контролем |
|---------------------------|--------------------------|--|---|
| 5 мкМ                     |                          |  |   |
| 5 мкМ w/ Benzo (50 мкМ)   |                          | X  |   |
| 5 мкМ w/ Benzo (100 мкМ)  |                          | X  |   |
| 25 мкМ                    |                          |  |   |
| 25 мкМ w/ Benzo (50 мкМ)  |                          | X  |   |
| 25 мкМ w/ Benzo (100 мкМ) |                          | X  |   |
| 100 мкМ                   |                          |  |   |
| 100 мкМw/ Benzo (50 мкМ)  | X                        | X  | X                                       |
| 100 мкМw/ Benzo (100 мкМ) | X                        | X  | X                                       |

Подобная синергетическая роль наблюдается для L-фенилаланина в комбинации с бензохиноном.

Анализ клеточной пролиферации при комбинации L-фенилаланина с фарнезилом: Предварительные результаты комбинации исследований клеточной пролиферации L-фенилаланина, инкубированных в комбинации с фарнезилом. L-фенилаланин сравнивался с контрольными и фарнезил-контрольными группами. X обозначает статистически достоверное уменьшение числа клеток.

Таблица 60. L-Фенилаланин и/или фарнезил

| L-фенилаланин                 | По сравнению с контролем | По сравнению с L-фенилаланином в совокупности с w/o Фарнезил | По сравнению с фарнезил контролем |
|-------------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|
| 5 мкМ                         |                          |  |                                   |
| 5 мкМ w/ Фарнезил (50 мкМ)    |                          |  |                                   |
| 5 мкМ w/ Фарнезил (100 мкМ)   |                          |  |                                   |
| 25 мкМ                        | X                        |  |                                   |
| 25 мкМ w/ Фарнезил (50 мкМ)   | X                        | X  | X                                 |
| 25 мкМ w/ Фарнезил (100 мкМ)  | X                        | X  | X                                 |
| 100 мкМ                       | X                        |  |                                   |
| 100 мкМ w/ Фарнезил (50 мкМ)  | X                        |  | X                                 |
| 100 мкМ w/ Фарнезил (100 мкМ) | X                        |  |                                   |

Анализ клеточной пролиферации при комбинации L-тирозина с бензохиноном.

L-тирозин использовался для инкубации в комбинации с бензохиноном после чего было подсчитано число клеток. Группы сравнивались с контрольными группами и бензохиноновыми контрольными группами.

Таблица 61. L-тирозин и/или бензохинон

| L-тирозин                 | По сравнению с контролем | По сравнению с L-тирозином в совокупности w/o бензохиноном | По сравнению с бензохиноновым контролем |
|---------------------------|--------------------------|--|---|
| 500 нМ                    |                          |  |   |
| 500 нМ w/ Benzo (50 мкМ)  |                          |  |   |
| 500 нМ w/ Benzo (100 мкМ) |                          |  |   |
| 5 мкМ                     | X                        |  |   |
| 5 мкМ w/ Benzo (50 мкМ)   | X                        |  |   |
| 5 мкМ w/ Benzo (100 мкМ)  | X                        |  |   |
| 15 мкМ                    | X                        |  |   |
| 15 мкМ w/ Benzo (50 мкМ)  | X                        |  |   |
| 15 мкМ w/ Benzo (100 мкМ) | X                        |  |   |

Добавление бензохинона не амплифицирует эффект L-тирозина на число клеток.

Анализ клеточной пролиферации при комбинации L-тирозина с бензохиноном. Это исследование исследует комбинацию L-тирозина с Фарнезилем. Группы сравнивались с контролем и Фарнезил контрольными группами.

Таблица 62. L-тирозин и/или фарнезил

| L-тирозин                    | По сравнению с контролем | По сравнению с L-тирозином в совокупности w/o Фарнезил | По сравнению с Фарнезил контролем |
|------------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------|
| 500 нМ                       |                          |  |                                   |
| 500 нМ w/ Фарнезил (50 мкМ)  |                          |  |                                   |
| 500 нМ w/ Фарнезил (50 мкМ)  |                          |  |                                   |
| 5 мкМ                        | X                        |  |                                   |
| 5 мкМ w/ Фарнезил (50 мкМ)   | X                        |  |                                   |
| 5 мкМ w/ Фарнезил (100 мкМ)  | X                        |  |                                   |
| 15 мкМ                       | X                        |  |                                   |
| 15 мкМ w/ Фарнезил (50 мкМ)  | X                        |  |                                   |
| 15 мкМ w/ Фарнезил (100 мкМ) | X                        |  |                                   |

Комбинация L-тирозина и фарнезила не приводит к синергическому эффекту на уменьшение числа клеток в этом эксперименте.

Синтез CoQ10 разделяется на две основные части, которые состоят из синтеза структуры кольца и синтеза структуры боковой цепи. Здесь к онкогенным клеткам были добавлены вещества, которые являются предшественниками для компонентов синтеза боковой цепи и структуры кольца. Эти результаты сосредоточены на исследовании 3 основных компонентов, включенных в синтез структуры кольца, и двух компонентов, которые играют роль в присоединении структуры кольца к структуре боковой цепи. Тремя компонентами, показавшими значительное уменьшение Bcl-2 и возрастание каспазы-3 экспрессии, были: 1) L-фенилаланин, 2) L-тирозин и 3) 4-гидроксифенилпируват. Двумя компонентами,

включенными в присоединение боковой цепи к структуре кольца, были: 1) 4-гидроксibenзоат и 2) фенилацетат.

Эти результаты также показали, что экзогенная доставка этих компонентов в комбинации с 2,3-диметокси-5-метил-п-бензохиноном (бензохинон) значительно ингибирует пролиферацию клеток. Это показывает, что добавка структуры кольца с компонентами для присоединения боковой цепи к бензохиноновому кольцу может дополнительно усилить механизм синтеза CoQ10. Это может также содействовать стабилизации молекулы в поддержании функциональных свойств, необходимых для клеточных процессов. Фенилацетат, являющийся предшественником синтеза 4-гидроксibenзоата, который экзогенно доставляется в комбинации с бензохиноном имеет подобное влияние на онкогенные клетки.

Пример 23. Модуляция генной экспрессии коэнзимом Q10 в клеточной модели диабета.

Коэнзим Q10 является эндогенной молекулой с устоявшейся ролью в поддержании нормальной митохондриальной функции, прямо влияя на окислительное фосфорилирование. Существует экспериментальное доказательство, которое демонстрирует способность коэнзима Q10 модулировать внутриклеточные цели, которые служат ключевыми показателями метаболических расстройств, таких как диабеты, таким образом достигая терапевтического эффекта.

Для того чтобы понять, как коэнзим Q10 регулирует экспрессию генов, связанных с причиной или лечением диабета, в качестве экспериментальной модели были использованы иммортализируемая первичная линия клеток проксимальных канальцев почек, произошедшая из почки человека (HK-2) и первичные культуры гладких мускульных клеток аорты человека (HASMC). The HK-2 и HASMC клетки нормально поддерживаются в культуре с 5,5 мМ глюкозы, которая является концентрацией, связанной с диапазоном, считающимся нормальным для крови человека. Однако для того чтобы симулировать диабетическое окружение, обе клеточные линии впоследствии содержались при 22 мМ глюкозы, что соответствует значениям, наблюдаемым в крови человека, связанным с хронической гипергликемией. Клетки впоследствии дали размножиться через 3 перехода, так что во внутриклеточных регуляторных процессах MBM функционально адаптировались к диабетическому состоянию. Выбор клеточной линии основывался на физиологическом влиянии диабета на почечную дисфункцию и прогрессию абсолютной почечной недостаточности (ESRD) в добавление к прогрессивной патофизиологии подорванной кардиоваскулярной функции.

Действие коэнзима Q10 на экспрессию генов в HK-2 клетках с использованием диабетического ПЦР анализа.

Диабетический ПЦР анализ (SABiosciences) применяется для скринирования 84 генов одновременно. В этом исследовании тестировались следующее 4 обработки:

HK-2;

HK-2 Н содержащаяся при 22 мМ глюкозы; HK2(H) +50 мкМ коэнзима Q10; и HK2(H) + 100 мкМ коэнзима Q10.

Точный анализ данных ПЦР в режиме реального времени HK-2 образцов по диабетическому анализу (Cat # PAHS-023E, SABiosciences Frederick, Мэриленд) был сделан для того чтобы исключить все результаты, где регуляция генов менее чем в два раза по сравнению с нормальными необработанными HK-2 клетками с значением p менее чем 0,05. Гены, для которых наблюдалось, что они регулируются или хронической гипергликемией, или коэнзимом Q10, перечислены в табл. 63 и их функции и внутриклеточная локация (взяты из Ingenuity Pathway Analysis) перечислены в табл. 64.

Таблица 63

| Гены    | HK-2(H)<br>Кратность<br>регуляции | значени<br>е р | HK-2(H)-50<br>мкМ Коэнзим<br>Q10 кратность<br>регуляции | значени<br>е р | HK-2(H)-100<br>мкМ Коэнзим<br>Q10<br>Кратность<br>регуляции | значени<br>е р |
|---------|-----------------------------------|----------------|---|----------------|---|----------------|
| CEACAM1 | 1,26                              | 0,409          | 3,47  | 0,067          | 5,36  | 0,032          |
| PIK3C2B | 1,48                              | 0,131          | 2,32  | 0,115          | 3,31  | 0,003          |
| INSR    | -1,09                             | 0,568          | 2,51  | 0,103          | 2,88  | 0,024          |
| TNF     | 2,00                              | 0,005          | 2,57  | 0,042          | 2,81  | 0,020          |
| ENPP1   | -1,50                             | 0,002          | 1,42  | 0,238          | 2,67  | 0,038          |
| PRKCB   | -1,75                             | 0,005          | 1,82  | 0,280          | 2,49  | 0,042          |
| DUSP4   | 1,27                              | 0,318          | 1,24  | 0,455          | 2,26  | 0,060          |
| SELL    | -1,58                             | 0,219          | 1,77  | 0,042          | 2,06  | 0,021          |
| SNAP25  | -1,00                             | 0,934          | 1,46  | 0,377          | 1,97  | 0,059          |

Таблица 64

| Обозначение | Entrez название гена  | Локализация               | Тип(ы)                   |
|-------------|---|---------------------------|--------------------------|
| CEACAM1     | Молекула клеточной адгезии 1, связанная с карциозембриональным антигеном (билиарный гликопротеин) | Плазматическая мембрана   | Трансмембранный рецептор |
| PIK3C2B     | Фосфоинозитид-3-киназа, класс 2, бета полипептид  | Цитоплазма                | Киназа                   |
| INSR        | Инсулиновый рецептор  | Плазматическая мембрана   | Киназа                   |
| TNF         | Фактор некроза опухолей (TNF) суперсемейство, член 2)   | Внеклеточное пространство | Цитокин                  |
| ENPP1       | Эктонуклеотидная пирофосфатаза/фосфодиэстераза 1  | Плазматическая мембрана   | Фермент                  |
|             |   | мембрана                  |                          |
| PRKCB       | Протенинкиназа C, бета  | Цитоплазма                | Киназа                   |
| DUSP4       | Двойная специфичная фосфатаза 4   | Ядро                      | Фосфатаза                |
| SELL        | Селектин L  | Плазматическая мембрана   | Другое                   |
| SNAP25      | Синаптосома-ассоциированный белок, 25кДа  | Плазматическая мембрана   | Транспортер              |

Среди детектируемых РНК транскриптов с модулированными уровнями, ракового эмбрионального антигена молекула клеточной адгезии 1 (CEACAM1) была идентифицирована как высоко повышающе регулируемая в НК2(Н) клетках, особенно обработкой 100 мкМ коэнзима Q10. CEACAM-1, также известный как CD66a и BGP-I, является 115-200 KD типом I трансмембранного гликопротеина, который принадлежит к субсемейству мембран-связанных CEA из суперсемейства CEA. На поверхности клеток он формирует нековалентные гомо- и гетеродимеры. Внеклеточный регион содержит три C2-типа Ig-подобных доменов и один N-терминальный V-тип Ig-подобного домена. Существуют множественные сплайс-вариации, включающие регионы C-терминальные для второго C2-типа домена (aa 320 и далее). Предполагается, что отсутствие интактной экспрессии CEACAM1 у мышей усиливает метаболический синдром, связанный с диабетом, тогда как возрастание экспрессии CEACAM1 связывается с возрастающей инсулиновой интернализацией, которая подтверждает возрастание инсулиновой чувствительности и утилизации глюкозы (например, движения глюкозы из крови в клетки), таким образом смягчая резистентность к инсулину, отличительный признак сахарного диабета 2 типа.

Как показано в табл. 63, экспрессия инсулинового рецептора (INSR) также меняется в диабетических НК-2 клетках, обработанных коэнзимом Q10. Не имея стремления ограничиваться теорией, возрастание экспрессии INSR при обработке коэнзимом Q10 должно усилить чувствительность к инсулину (или одного, или в совокупности с экспрессией CEACAM1) с возможностью развернуть основные физиологические/метаболические трудности, связанные с диабетом.

Действие коэнзима Q10 на экспрессию генов в НК-2 клетках с использованием митохондриального анализа

Дифференциальная экспрессия митохондриальных генов при диабете оценивалась с использованием митохондриальных анализов (Cat# PAHS 087E, SABiosciences Frederick, Мэриленд). Гены, которые регулируются хронической гипергликемией и /или воздействием коэнзима Q10, перечислены в таблице 65, а их функции и локализация перечислены в таблице 66.

Таблица 65

| Гены    | НК2 (Н) необработанный | р значение | НК-2(Н) 50 мкМ Коэнзима Q10 | р значение | НК-2(Н) 100 мкМ Коэнзима Q10 | р значение |
|---------|------------------------|------------|-----------------------------|------------|------------------------------|------------|
| GRPEL1  | -1,5837                | 0,151255   | -2,6512                     | 0,04704    | -1,933                       | 0,139161   |
| SLC25A3 | -8,6338                | 0,071951   | -8,2059                     | 0,0425     | -1,6984                      | 0,995194   |
| TOMM40  | -2,3134                | 0,140033   | -1,1567                     | 0,115407   | -1,9509                      | 0,038762   |
| TSPO    | -3,6385                | 0,111056   | -6,7583                     | 0,073769   | -2,1104                      | 0,167084   |



Таблица 66

| Обозначение | Entrez Название гена  | Локализация                   | Тип(ы)                   |
|-------------|---|-------------------------------|--------------------------|
| GRPEL1      | GrpE-подобный митохондриальный (E. coli) 1,   | Митохондрия                   | Другое                   |
| SLC25A3     | Растворимых переносчиков семейства 25 (митохондриальный переносчик; фосфата переносчик), член 3 | Митохондриальная мембрана.    | Транспортер              |
| TOMM40      | Транслоказа внешнего митохондриального мембранного гомолога(дрожжи) 40                          | Внешняя мембрана митохондрии. | Ионный канал             |
| TSPO        | Транслокационный белок (18кДа)  | Внешняя мембрана митохондрии. | Трансмембранный рецептор |

На сегодняшний день, роль четырех митохондриальных генов, идентифицированных (табл. 65) в диабетических НК-2 клетках, обработанных коэнзимом Q10, не охарактеризована в диабете.

Исследование 2. Действие коэнзима Q10 на экспрессию генов в HASMC клетках с использованием диабетического ПЦР анализа.

Диабетический ПЦР анализ (SABiosciences) позволяет скринировать одновременно 84 гена. 4 обработки, тестированными в этом исследовании, были:

HASMC;

HASMC H, содержащиеся в 22 мМ глюкозы;

HASMC (H) + 50 мкМ коэнзима Q10; и

HASMC (H) + 100 мкМ коэнзима Q10.

Точный анализ данных ПЦР в режиме реального времени HASMC образцов по диабетическому анализу (Cat # PAHS-023E, SABiosciences Frederick, Мэриленд) был сделан для того, чтобы исключить все результаты, где регуляция генов менее чем в два раза по сравнению с нормальными необработанными HASMC клетками с значением p менее чем 0,05. Гены, для которых наблюдалось, что они регулируются или хронической гипергликемией, и/или коэнзимом Q10, перечислены в табл. 67.

Таблица 67

| Гены    | HASMC-(H) | значение p | HASMC-(H)-50 мкМ коэнзима Q10 | значение p | HASMC-(H)-100 мкМ коэнзима Q10 | значение p |
|---------|-----------|------------|-------------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| AGT     | 1,3051    | 0,547507   | -1,0169                       | 0,781622   | 2,3027                         | 0,030195   |
| CCL5    | -17,4179  | 0,013798   | -5,3796                       | 0,022489   | -4,6913                        | 0,022696   |
| CEACAM1 | -5,5629   | 0,012985   | -5,3424                       | 0,014436   | -5,8025                        | 0,012948   |
| IL6     | 2,7085    | 0,049263   | 3,8172                        | 0,012685   | 6,0349                         | 0,000775   |
| INSR    | 1,4649    | 0,207788   | 1,9622                        | 0,081204   | 2,0801                         | 0,016316   |
| NFKB1   | 1,482     | 0,072924   | 1,3779                        | 0,191191   | 2,0898                         | 0,027694   |
| PIK3C2B | 2,0479    | 0,218276   | 1,4331                        | 0,254894   | 2,6329                         | 0,069422   |
| SELL    | -1,9308   | 0,087513   | 1,2476                        | 0,393904   | 4,0371                         | 0,000177   |
| TNF     | -1,814    | 0,108322   | -3,2434                       | 0,043526   | -1,8489                        | 0,133757   |

В клетках HASMC, обработка гипергликемических клеток коэнзимом Q10 привела к изменению экспрессии в генах, включенных в регуляцию васкулярной функции (AGT), чувствительности к инсулину (CEACAM1, INSR, SELL) и воспалительной/иммунной функции (IL-6, TNF, CCL5). Не имея стремления ограничиваться теорией, возрастание экспрессии INSR может быть связано с возрастанием инсулиновой чувствительности в HASMC клетках, которая является физиологическим свойством, которое благоприятно для лечения диабета, тогда как IL-6, в дополнение к своим иммунорегулирующим свойствам, как предполагается, действует на гомеостаз и метаболизм глюкозы, как прямо, так и опосредованно, путем действия на скелетные мышечные клетки, адипоциты, гепатоциты, панкреатические β-клетки и нейроэндокринные клетки. Перед активацией нормальная Т-клетка экспрессирует и секретирует RANTES и хемокиновый (C-Cmotif) лиганд (CCL5). CCL5 экспрессируется адипоцитами, и уровни RANTES в сыворотке возрастают при ожирении и диабете 2 типа. Однако, как показано в табл. 67, обработка HASMC клеток коэнзимом Q10 приводит к значительному уменьшению экспрессии CCL5. Основываясь на вышеизложенных данных, мы надеемся, что введение коэнзима Q10 будет давать терапевтическую пользу в лечении диабета.

Действие коэнзима Q10 на экспрессию генов в HASMC клетках с использованием митохондриального анализа

Различная экспрессия митохондриальных генов была исследована с использованием митохондри-

ального анализа (Cat# PAHS 087E, SABiosciences Frederick, Мэриленд). Гены, которые регулируются или хронической гипергликемией, и/или коэнзимом Q10, показаны в табл. 68.

Таблица 68

| Гены     | HASMC-<br>(H) | значение<br>р | HASMC-<br>(H) 50<br>мкМ<br>коэнзима<br>Q10 | значение<br>р | HASMC-<br>(H)-100<br>мкМ<br>коэнзима<br>Q10 | значение р |
|----------|---------------|---------------|--|---------------|---|------------|
| BCL2L1   | -1,6558       | 0,244494      | -2,7863                                    | 0,008744      | -2,3001                                     | 0,014537   |
| MFN1     | -1,4992       | 0,317009      | -1,2585                                    | 0,021185      | -2,2632                                     | 0,005961   |
| PMIAIP1  | -4,7816       | 0,206848      | -6,8132                                    | 0,000158      | -4,352                                      | 0,000286   |
| SLC25A1  | -2,2051       | 0,020868      | -1,834                                     | 0,00581       | -3,0001                                     | 0,03285    |
| SLC25A13 | -2,0527       | 0,035987      | -1,5                                       | 0,029019      | -1,5245                                     | 0,043712   |
| SLC25A19 | -1,0699       | 0,417217      | -1,4257                                    | 0,104814      | -2,1214                                     | 0,007737   |
| SLC25A22 | -2,1747       | 0,007344      | -1,9839                                    | 0,0013        | -10,3747                                    | 0,003437   |
| TIMM44   | -1,3605       | 0,414909      | -2,3214                                    | 0,004118      | -1,9931                                     | 0,010206   |
| TOMM40   | -1,1982       | 0,428061      | -2,0922                                    | 0,002195      | -2,2684                                     | 0,003272   |
| TSPO     | -1,402        | 0,304875      | -2,0586                                    | 0,061365      | -2,3647                                     | 0,044656   |

Обработка гипергликемических HASMC клеток коэнзимом Q10 привела к изменению экспрессии в генах, которые регулируют программируемую клеточную гибель или апоптоз (BCL2L1, PMIAIP1 также известный как NOXA), белки транспортеры (SLC25A1 [транспортер цитрата], SLC25A13 [антипортер аспартата-глутамата], SLC25A19 [транспортер тиамин пирофосфата] и SLC25A22 [глутамат-водород котранспортер]) и белки транспорта в митохондриальном матриксе (MFN1, TIMM44 и TOMM40). Активность этих транспортеров играет важную роль в регуляции предшественников, необходимых для цикла Кребса и поддержания митохондриального окислительного фосфорилирования. Эти результаты показывают, что воздействие на диабетические клетки HASMC коэнзимом Q10 связано с изменениями в экспрессии цитоплазматических и митохондриальных генов, что в свою очередь согласуется с тем, что коэнзим Q10 предоставляет терапевтическую пользу в лечении диабета.

Сравнение с данными, наблюдаемыми при воздействии на HASMC клетки и НК-2 клетки коэнзимом Q10 или в гипергликемическом окружении, показывает, что 4 гена обычно регулируются коэнзимом Q10 в обеих клеточных линиях (например, PIK3C2B и SELL в анализе генной экспрессии и TOMM40 и TSPO в митохондриальном анализе). Эти результаты демонстрируют, что воздействие на клетки в диабетическом состоянии коэнзимом Q10 связано с изменением экспрессии генов, про которых известно, что они связаны с причиной или лечением диабета.

Эквиваленты.

Специалисты в данной области распознают, или будут способны распознать, используя лишь обычные эксперименты, многие эквиваленты определенным воплощениям и способам, описанным в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты полностью включены в объем следующей формулы изобретения.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Дзе Реджентс ов дзе Университи ов Калифорния

Хорвитц, Рейчел Э.

Даудна, Дженнифер А.

Виденхедт, Блейк

Инек, Мартин

<120> КОМПОЗИЦИИ ЭНДОРИБОНУКЛЕАЗ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> BERK-118WO

<150> US 61/413,287

<151> 2010-11-12

<150> US 61/365,627

<151> 2010-07-19

<150> US 61/333,163

<151> 2010-05-10

<160> 103

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 1

guucacugcc guauaggcag cuaagaaa 28

<210> 2

<211> 204

<212> PRT

<213> Moritella sp. PE36

<400> 2

Met Leu Asn Arg Phe Tyr Phe Tyr Ile Lys Phe Ile Pro Gln His Thr

1 5 10 15

Asp Asn Ala Phe Leu Ile Gly Arg Cys Ile Lys Val Ser His Ala Phe

20 25 30

Phe Ala Lys His Ser Ile Thr Gly Val Gly Val Ser Phe Pro Cys Trp

35 40 45

Ser Glu Gln Asp Ile Gly Asn Ala Leu Ala Phe Val Ser Thr Asp Met

50 55 60

Glu Ala Leu Glu Gln Leu Lys Ala Gln Pro Leu Phe Ser Val Met Ala

65 70 75 80

Asp Glu Leu Ile Phe Glu Ile Ser Asp Val Leu Ser Ile Pro Asp Lys

85 90 95

Leu Glu Glu Glu Arg Phe Thr Leu Asn Tyr Ala Ile Arg Lys Ser Phe  
 100 105 110  
 Ala Gly Asp Lys Lys Arg Arg Leu Lys Arg Ala Lys Lys Arg Ala Glu  
 115 120 125  
 Ala Arg Gly Glu Thr Tyr Lys Pro Val Leu His Ile Asn Thr Glu Lys  
 130 135 140  
 Arg Val Phe Asn His Tyr His Thr Ile Pro Met Asn Ser Lys Glu Lys  
 145 150 155 160  
 Pro Asp Gly Phe Thr Leu His Val Gln Lys Asn Pro Cys Val Glu Gln  
 165 170 175  
 Tyr Ala Ala Asp Phe Leu Asp Tyr Gly Phe Ala Thr Asn Glu Gln His  
 180 185 190  
 Arg Gly Thr Val Pro Lys Leu Ser Ser Leu Met Lys  
 195 200  
 <210> 3  
 <211> 192  
 <212> PRT  
 <213> Moritella sp. PE36  
 <400> 3  
 Met Asp Val Phe Leu Leu Ser Gly Arg Cys Ala Lys Ala Leu His Asn  
 1 5 10 15  
 Phe Glu Phe Lys Lys Arg Lys His Asn Ile Gly Ile Ala Leu Pro Cys  
 20 25 30  
 Trp Ser Glu Asn Ser Val Gly Asp Met Ile Ala Phe Val Ser Glu Asp  
 35 40 45  
 Lys Asn Gln Leu Leu Lys Phe His Gln Asp Ser Tyr Phe Gln Met Met  
 50 55 60  
 Ala Ser Asp Glu Ile Phe Ile Ile Ser Asp Ile Thr Ala Val Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Leu Pro Glu Val Gln Phe Cys Arg Asn Asn Thr Ile Ser Lys Met  
 85 90 95  
 Phe Ile Lys Asp Thr Gln Lys Arg Leu Arg Arg Thr Gln Lys Arg Ala  
 100 105 110  
 Glu Ala Arg Gly Asp Ala Phe Lys Pro Ala Leu His Glu Asn Ser Lys  
 115 120 125  
 Lys Arg Val Phe Glu Asn Phe His Ser Leu Pro Ile Asp Ser Tyr Gly  
 130 135 140  
 Thr Glu Glu Asp Phe Met Leu His Ile Gln Lys His Asn Asp Val Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Ser Asp Cys Tyr Thr Ser Tyr Gly Phe Ala Thr Asn Asn Asp Asn  
 165 170 175

Arg Gly Thr Val Pro Asp Met Ser Ile Leu Phe Asn Gln Met Thr Lys  
 180 185 190

<210> 4  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> *Shewanella* sp. W3-18-1

<400> 4

Met Lys Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Leu Leu Pro Asp Ala Glu Ala Asn  
 1 5 10 15

Leu Gly Phe Leu Trp His Lys Val Tyr Gln Gln Ile His Leu Met Leu  
 20 25 30

Val Glu His Lys Val Ser Val Glu Asn Ser Ala Ile Gly Leu Ser Phe  
 35 40 45

Pro Lys Tyr Asp Ala Lys Ser Phe Ser Asp Asn Thr Lys Phe Pro Leu  
 50 55 60

Gly Asp Lys Leu Arg Leu Phe Ala Gly Thr Glu Gln Gln Leu Ala Asp  
 65 70 75 80

Leu Lys Val Ala Gln Trp Leu Ala Arg Leu Ala Asp Tyr Val His Ile  
 85 90 95

Lys Ala Ile Lys Ala Val Pro Asp Asn Val Ser Glu Tyr Ala Tyr Phe  
 100 105 110

Lys Arg Arg His Phe Lys Ser Pro Asp Lys Leu Arg Arg Asn Ile Asp  
 115 120 125

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

Val Lys Thr Arg Leu Leu Ala Ser Ile Asp Asn Leu Asp Thr Lys Ser  
 145 150 155 160

Lys Leu Pro Phe Ile Asn Leu Arg Ser Leu Ser Thr Glu Lys Asp Val  
 165 170 175

Ser Pro Ala Asp Arg Arg Lys Phe Leu Leu Phe Ile Glu Cys Glu Lys  
 180 185 190

Val Thr Lys Pro Ser Gln Asn Asn Gly Leu Phe Asn Cys Tyr Gly Leu  
 195 200 205

Ser Arg Arg Ala Gln Thr Glu Gln Ala Ala Val Pro Trp Phe Glu Gly  
 210 215 220

<210> 5  
 <211> 167  
 <212> PRT  
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 5

Met Ser Val Leu Phe Gly Lys Leu His Gln Ala Leu Val Ala Gln Gly  
1 5 10 15

Gly Asp Arg Ile Gly Val Ser Phe Pro Asp Leu Asp Glu Ser Arg Ser  
20 25 30

Arg Leu Gly Glu Arg Leu Arg Ile His Ala Ser Ala Asp Asp Leu Arg  
35 40 45

Ala Leu Leu Ala Arg Pro Trp Leu Glu Gly Leu Arg Asp His Leu Gln  
50 55 60

Phe Gly Glu Pro Ala Val Val Pro His Pro Thr Pro Tyr Arg Gln Val  
65 70 75 80

Ser Arg Val Gln Ala Lys Ser Asn Pro Glu Arg Leu Arg Arg Arg Leu  
85 90 95

Met Arg Arg His Asp Leu Ser Glu Glu Glu Ala Arg Lys Arg Ile Pro  
100 105 110

Asp Thr Val Ala Arg Ala Leu Asp Leu Pro Phe Val Thr Leu Arg Ser  
115 120 125

Gln Ser Thr Gly Gln His Phe Arg Leu Phe Ile Arg His Gly Pro Leu  
130 135 140

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

Gly Gly Phe Val Pro Trp Phe  
165

<210> 6

<211> 187

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 6

Met Asp His Tyr Leu Asp Ile Arg Leu Arg Pro Asp Pro Glu Phe Pro  
1 5 10 15

Pro Ala Gln Leu Met Ser Val Leu Phe Gly Lys Leu His Gln Ala Leu  
20 25 30

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

Glu Ser Arg Ser Arg Leu Gly Glu Arg Leu Arg Ile His Ala Ser Ala  
50 55 60

Asp Asp Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Pro Trp Leu Glu Gly Leu Arg  
65 70 75 80

Asp His Leu Gln Phe Gly Glu Pro Ala Val Val Pro His Pro Thr Pro  
85 90 95

Tyr Arg Gln Val Ser Arg Val Gln Val Lys Ser Asn Pro Glu Arg Leu  
100 105 110

Arg Arg Arg Leu Met Arg Arg His Asp Leu Ser Glu Glu Glu Ala Arg  
115 120 125

Lys Arg Ile Pro Asp Thr Val Ala Arg Ala Leu Asp Leu Pro Phe Val  
130 135 140

Thr Leu Arg Ser Gln Ser Thr Gly Gln His Phe Arg Leu Phe Ile Arg  
145 150 155 160

His Gly Pro Leu Gln Val Thr Ala Glu Glu Gly Gly Phe Thr Cys Tyr  
165 170 175

Gly Leu Ser Lys Gly Gly Phe Val Pro Trp Phe  
180 185

<210> 7

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 7

guucacugcc guuaggcag cuaagaaa 28

<210> 8

<211> 187

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 8

Met Asp His Tyr Leu Asp Ile Arg Leu Arg Pro Asp Pro Glu Phe Pro  
1 5 10 15

Pro Ala Gln Leu Met Ser Val Leu Phe Gly Lys Leu His Gln Ala Leu  
20 25 30

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

Glu Ser Arg Ser Arg Leu Gly Glu Arg Leu Arg Ile His Ala Ser Ala  
50 55 60

Asp Asp Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Pro Trp Leu Glu Gly Leu Arg  
65 70 75 80

Asp His Leu Gln Phe Gly Glu Pro Ala Val Val Pro His Pro Thr Pro  
85 90 95

Tyr Arg Gln Val Ser Arg Val Gln Ala Lys Ser Asn Pro Glu Arg Leu  
100 105 110

Arg Arg Arg Leu Met Arg Arg His Asp Leu Ser Glu Glu Glu Ala Arg  
115 120 125

Lys Arg Ile Pro Asp Thr Val Ala Arg Thr Leu Asp Leu Pro Phe Val  
130 135 140

Thr Leu Arg Ser Gln Ser Thr Gly Gln His Phe Arg Leu Phe Ile Arg  
145 150 155 160

His Gly Pro Leu Gln Ala Thr Ala Glu Glu Gly Gly Phe Thr Cys Tyr  
165 170 175

Gly Leu Ser Lys Gly Gly Phe Val Pro Trp Phe  
180 185

<210> 9

<211> 187

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 9

Met Asp His Tyr Leu Asp Ile Arg Leu Arg Pro Asp Pro Glu Phe Pro  
1 5 10 15

Pro Ala Gln Leu Met Ser Val Leu Phe Gly Lys Leu His Gln Ala Leu  
20 25 30

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

Glu Ser Arg Ser Arg Leu Gly Glu Arg Leu Arg Ile His Ala Ser Ala  
50 55 60

Asp Asp Leu His Ala Leu Leu Ala Arg Pro Trp Leu Glu Gly Leu Arg  
65 70 75 80

Asp His Leu Gln Phe Gly Glu Ala Ala Val Val Pro His Pro Thr Pro  
85 90 95

Tyr Arg Gln Val Ser Arg Val Gln Ala Lys Ser Asn Pro Glu Arg Leu  
100 105 110

Arg Arg Arg Leu Met Arg Arg His Asp Leu Ser Glu Glu Glu Ala Arg  
115 120 125

Lys Arg Ile Pro Asp Thr Val Ala Arg Thr Leu Asp Leu Pro Phe Val  
130 135 140

Thr Leu Arg Ser Gln Ser Thr Gly Gln His Phe Arg Leu Phe Ile Arg  
145 150 155 160

His Gly Pro Leu Gln Ala Thr Ala Glu Glu Gly Gly Phe Thr Cys Tyr  
165 170 175

Gly Leu Ser Lys Gly Gly Phe Val Pro Trp Phe  
180 185

<210> 10

<211> 184

<212> PRT

<213> *Dickeya dadantii*

<400> 10

Met Asp His Tyr Ile Glu Ile Arg Val Leu Pro Asp Leu Glu Phe Ser



1            5            10            15  
 Ala Val Gln Leu Leu Ser Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Arg Ala Leu  
           20            25            30  
 Gly Gln Arg Ala Thr Gly Ala Ile Gly Val Ser Phe Pro Asp Val Asp  
           35            40            45  
 Lys Thr Leu Gly Glu Arg Leu Arg Leu His Gly Ser Val Gln Glu Leu  
           50            55            60  
 Ala Ala Leu Glu Gln Thr Gly Trp Leu Lys Gly Leu Arg Asp Tyr Thr  
           65            70            75            80  
 Ala Ile Thr Glu Pro Leu Pro Val Pro Ala Gly Ala Lys His Arg Thr  
           85            90            95  
 Val Arg Arg Val Gln Val Lys Ser Ser Ala Glu Arg Leu Arg Arg Arg  
           100            105            110  
 Ala Val Ser Lys Gly Arg Met Thr Glu Asp Glu Ala Ala Thr Arg Ile  
           115            120            125  
 Pro Tyr Ala Val Glu Lys Arg Ser Ser Leu Pro Tyr Leu Pro Leu Arg  
           130            135            140  
 Ser Leu Ser Ser Gly Gln Thr Phe Leu Leu Phe Val Glu His Gly Pro  
           145            150            155            160  
 Leu Gln Asp Lys Pro Val Ala Gly Ala Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser  
           165            170            175  
 Ala Thr Thr Thr Ile Pro Trp Phe  
           180

<210> 11  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 11  
 guucacugcc gcguaggcag cuuagaaa            28

<210> 12  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 12  
 guucacugcc gaguaggcag cuuagaaa            28

<210> 13  
 <211> 184  
 <212> PRT

<213> *Pectobacterium wasabiae*

&lt;400&gt; 13

Met Asp His Tyr Ile Asp Ile Arg Val Gln Pro Asp Pro Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Ala Pro Gln Leu Leu Asn Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Arg Ala Leu  
 20 25 30

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

Lys Thr Leu Gly Glu Cys Leu Arg Leu His Gly Thr Ala Asp Ala Leu  
 50 55 60

Ser Thr Leu Glu Lys Thr Ser Trp Leu Lys Gly Leu Arg Asp Tyr Thr  
 65 70 75 80

Gln Val Ser Glu Cys Lys Ala Val Pro Asn Asn Val Lys Phe Arg Thr  
 85 90 95

Val Arg Arg Val Gln Leu Lys Thr Ser Ala Glu Arg Leu Arg Arg Arg  
 100 105 110

Ser Val Asn Lys Gly Trp Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Arg Ile  
 115 120 125

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

Ser Leu Ser Asn Gly Gln Met Phe Phe Val Phe Val Glu His Gly Pro  
 145 150 155 160

Leu Gln Asn Ala Pro Ala Thr Gly Arg Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser  
 165 170 175

Ala Glu Ala Thr Val Pro Trp Phe  
 180

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетический олигонуклеотид

&lt;400&gt; 14

guucacugcc guauaggcag cuuagaaa

28

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

<213> *Photorhabdus asymbiotica*

&lt;400&gt; 15

Met Asp Tyr Tyr Phe Glu Ile Leu Val Leu Pro Asp Pro Glu Phe Ser  
 1 5 10 15

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

<210> 16  
 <211> 29  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 16  
 guucacuguc guacaggcag cuuagaaaa 29

<210> 17  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 17  
 gugcacugcc guacaggcag cuuagaaa 28

<210> 18  
 <211> 24  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетический олигонуклеотид

&lt;400&gt; 18

асугссгуас аггсagusua гааа 24

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетический олигонуклеотид

&lt;400&gt; 19

гуисасугсс гсасaggсag суагааа 28

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетический олигонуклеотид

&lt;400&gt; 20

гугуасугсс гуасaggсag суагааа 28

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетический олигонуклеотид

&lt;400&gt; 21

гуисасугсс гуасaggсag суагааа 28

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Dickeya dadantii

&lt;400&gt; 22

Met Asp His Tyr Ile Glu Ile Arg Val Leu Pro Asp Pro Glu Phe Ser

1 5 10 15

Gly Val Gln Leu Leu Ser Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Arg Ala Leu

20 25 30

Gly Gln Arg Ala Thr Gly Ala Ile Gly Val Ser Phe Pro Asp Ala Gly

35 40 45

Lys Thr Leu Gly Glu Arg Leu Arg Leu His Gly Ser Val Gln Glu Leu

50 55 60

Ala Ala Leu Glu Gln Thr Gly Trp Leu Arg Gly Leu Arg Asp Tyr Thr

65 70 75 80

Ala Ile Thr Glu Pro Leu Pro Val Pro Ala Gly Val Lys His Arg Thr  
85 90 95

Val Arg Arg Val Gln Val Lys Ser Ser Ala Glu Arg Leu Arg Arg Arg  
100 105 110

Ala Val Asn Lys Gly Arg Met Thr Val Asp Glu Ala Asp Ala Arg Ile  
115 120 125

Pro Tyr Thr Val Glu Lys Arg Thr Ser Leu Pro Tyr Leu Pro Leu Arg  
130 135 140

Ser Leu Ser Asn Gly Gln Thr Phe Leu Leu Phe Val Glu His Gly Pro  
145 150 155 160

Leu Gln Asp Lys Pro Val Ala Gly Ala Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser  
165 170 175

Ala Val Ala Thr Ile Pro Trp Phe  
180

<210> 23  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 23  
guucacugcc guguaggcag cuuagaaa 28

<210> 24  
 <211> 188  
 <212> PRT  
 <213> Xanthomonas albilineans

<400> 24

Met Gln His Tyr Leu Asp Leu His Leu Arg Pro Asp Pro Glu Leu Ala  
1 5 10 15

Pro Tyr Gln Leu Leu Gly Ala Leu Tyr Ala Arg Leu His Arg Ser Leu  
20 25 30

Val Thr Leu Asn Thr Thr Arg Ile Gly Val Ser Phe Pro Gly His Asp  
35 40 45

Asn Arg Val Pro Thr Leu Gly Thr His Leu Arg Leu His Gly Asp Asp  
50 55 60

Ser Thr Leu His His Leu Met Ala Thr Thr Trp Leu His Gly Val Arg  
65                70                75                80

Asp His Val Thr Ile Thr Ser Ile Gly Ala Val Pro Ser Glu Ala Val  
85 90 95

His Arg Gln Val Thr Arg Val Gln Ala Lys Ser Ser Pro Glu Arg Leu  
100 105 110

Arg Arg Arg Ala Met Arg Arg His Gly Ile Ser Glu Asp Leu Ala Val  
115 120 125

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

Val Leu Gly Ser Arg Ser Thr Gly Gln Thr Ala Phe Pro Val Phe Val  
145 150 155 160

Arg His Gly Pro Val Gln Gln Glu Pro Val Pro Gly Asp Phe Ser Ser  
165 170 175

Tyr Gly Leu Ser Arg Gly Ala Thr Val Pro Trp Phe  
180 185

<210> 25

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 25

guucacugcc guuaggcag cucagaaa 28

<210> 26

<211> 27

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 26

uucacugccg uguaggcagc ucagaaa 27

<210> 27

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 27

guucacugcc guuaggcag cucagaaa 28

<210> 28

<211> 184

<212> PRT

<213> Pectobacterium atrosepticum

<400> 28

Met Asp His Tyr Ile Asp Ile Arg Val Gln Pro Asp Pro Glu Phe Thr  
1 5 10 15

Ala Ser Gln Leu Leu Asn Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Arg Val Leu

20            25            30  
 Gly Gln Leu Ala Asn Gly Lys Ile Gly Ile Ser Phe Pro Glu Val Gly  
      35            40            45  
 Lys Thr Leu Gly Glu Cys Leu Arg Leu His Gly Thr Glu Asp Ala Leu  
      50            55            60  
 Ser Thr Leu Glu Lys Thr Ser Trp Leu Lys Gly Leu Arg Asp Tyr Thr  
      65            70            75            80  
 Gln Val Ser Glu Cys Lys Val Val Pro Asn Gly Val Lys Phe Arg Thr  
      85            90            95  
 Val Arg Arg Val Gln Leu Lys Ser Ser Ala Glu Arg Leu Arg Arg Arg  
      100            105            110  
 Ser Val Ser Lys Gly Trp Leu Thr Ala Ala Glu Ala Ala Ala Arg Ile  
      115            120            125  
 Pro Asp Ala Val Glu Lys Arg Ser Ala Leu Pro Phe Val Gln Ile Lys  
      130            135            140  
 Ser Leu Ser Asn Gly Gln Met Phe Phe Val Phe Val Glu His Gly Pro  
      145            150            155            160  
 Leu Gln Asn Ala Pro Thr Ala Gly Arg Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser  
      165            170            175  
 Thr Glu Ala Thr Val Pro Trp Phe  
      180  
 <210> 29  
 <211> 184  
 <212> PRT  
 <213> Photorhabdus luminescens  
 <400> 29  
 Met Asp Tyr Tyr Leu Glu Ile Arg Val Leu Pro Asp Leu Glu Phe Ser  
      1            5            10            15  
 Gln Gln Ser Leu Phe Glu Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Arg Ala Leu  
      20            25            30  
 Gly Gln Leu Ser Asn Gly Gln Val Gly Val Ser Phe Pro Cys Ala Arg  
      35            40            45  
 Lys Thr Leu Gly Asp Thr Leu Arg Ile His Gly Ser Ser Glu Ala Leu  
      50            55            60  
 Asn Asp Leu Gln Ala Leu Pro Trp Leu Lys Gly Leu Arg Asp Tyr Thr  
      65            70            75            80  
 Glu Val Ile Asp Ile Gln Pro Ile Pro Gln Glu Thr Lys Tyr Arg Cys  
      85            90            95  
 Val Ser Arg Val Gln Val Lys Ser Ser Ala Glu Arg Leu Arg Arg Arg  
      100            105            110  
 Ala Ile Lys Lys Gly Trp Leu Thr Gly Glu Gln Ala Arg Gln Arg Ile

115            120            125  
 Pro Ile Ser Lys Glu Gln Arg Thr His Leu Pro Phe Leu Phe Leu Lys  
 130            135            140  
 Ser Leu Ser Ser Gly Gln Ser Phe Leu Leu Phe Val Lys Gln Gly Pro  
 145            150            155            160  
 Ile Gln Asp Lys Pro Thr Ser Gly Ile Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser  
 165            170            175  
 Ser Ser Ala Thr Ile Pro Trp Phe  
 180  
 <210> 30  
 <211> 188  
 <212> PRT  
 <213> *Desulfurivibrio alkaliphilus*  
 <400> 30  
 Met Val Met Ala Met Asp Cys Tyr Val Glu Ile Ser Leu Leu Pro Asp  
 1            5            10            15  
 Pro Glu Phe Pro Asp Ser Ile Leu Met Asn Ala Leu Phe Ala Lys Leu  
 20            25            30  
 His Arg Ala Leu Ala Glu Asn Gly Lys Gln Glu Ile Gly Val Ser Phe  
 35            40            45  
 Pro Glu Phe Gly Lys Lys Leu Asn Ser Lys Leu Arg Ile His Gly Ser  
 50            55            60  
 Glu Glu Ser Leu Lys Arg Leu Met Asp Leu Asn Trp Ile Gln Gly Met  
 65            70            75            80  
 Lys Asp Tyr Thr Arg Val Ser Gly Ile Ala Lys Val Pro Asp Ser Cys  
 85            90            95  
 Gln Tyr Arg Thr Val Lys Arg Val Gln Ala Lys Ser Ser Val Asp Arg  
 100            105            110  
 Leu Tyr Arg Arg Ser Val Lys Lys Gly Trp Leu Ser Glu Glu Asn Ala  
 115            120            125  
 Glu Gln Gln Lys Glu Arg Ala Arg Glu Gly Arg Leu Lys Leu Pro Phe  
 130            135            140  
 Val Gln Leu Lys Ser Gln Thr Thr Gly Gln Gln Phe Arg Leu Phe Ile  
 145            150            155            160  
 Gln His Gly Ser Leu Gln Glu Lys Pro Val Thr Gly Arg Phe Ser Ser  
 165            170            175  
 Tyr Gly Leu Ser Asn Glu Ala Thr Val Pro Trp Phe  
 180            185  
 <210> 31  
 <211> 28  
 <212> RNA



<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 31

guucacugcc gcacaggcag cucagaaa

28

<210> 32

<211> 184

<212> PRT

<213> Dickeya zeae

<400> 32

Met Asp His Tyr Ile Glu Ile Arg Val Leu Pro Asp Leu Glu Phe Ser

1 5 10 15

Ala Val Gln Leu Leu Ser Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Arg Ala Leu

20 25 30

Gly Gln Gln Ala Thr Gly Ala Ile Gly Val Ser Phe Pro Asp Val Gly

35 40 45

Lys Thr Leu Gly Glu Arg Leu Arg Leu His Gly Ser Glu Gln Ala Leu

50 55 60

Thr Ala Leu Glu Gln Thr Gly Trp Arg Thr Gly Leu Arg Asp Tyr Ser

65 70 75 80

Thr Ile Thr Asp Val Leu Thr Val Pro Thr Gly Ala Gln Tyr Arg Thr

85 90 95

Val Arg Arg Val Gln Val Lys Ser Ser Ala Glu Arg Leu Arg Arg Arg

100 105 110

Ala Val Ser Lys Gly Trp Leu Thr Ala Asp Glu Ala Ala Ala Arg Ile

115 120 125

Pro Tyr Ala Val Glu Lys Arg Thr Ser Leu Pro Tyr Leu Pro Leu Arg

130 135 140

Ser Leu Ser Ser Gly Gln Pro Phe Leu Leu Phe Val Glu His Gly Pro

145 150 155 160

Leu Gln Asp Lys Pro Val Ala Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser

165 170 175

Ala Thr Ala Thr Ile Pro Trp Phe

180

<210> 33

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 33

gugcacugcc guauaggcag cuuagaaa 28

<210> 34  
 <211> 184  
 <212> PRT  
 <213> Yersinia pestis

<400> 34

Met Asp His Tyr Leu Asp Ile Arg Val Leu Pro Asp Pro Glu Phe Ser  
 1 5 10 15

Ala Gln Thr Leu Leu Glu Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Arg Ala Leu  
 20 25 30

Val Ala Thr Ile Pro Gly Arg Val Gly Val Ser Phe Pro Thr Ala Gly  
 35 40 45

Lys Thr Leu Gly Ser Gln Leu Arg Leu His Gly Ser Arg Gly Asp Leu  
 50 55 60

Leu Glu Leu Gln Ser Ala Gly Trp Leu Lys Gly Leu Gln Asp Tyr Cys  
 65 70 75 80

Glu Cys Ser Glu Ile Leu Pro Val Pro Ala Asp Val Lys His Arg Thr  
 85 90 95

Ile Arg Arg Val Gln Val Lys Ser Ser Ala Gln Arg Leu Arg Arg Arg  
 100 105 110

Ser Val Ser Lys Gly Trp Leu Thr Glu Glu Gln Ala Arg Leu Arg Ile  
 115 120 125

Pro Asp Ser His Asp Lys Arg Cys Asp Leu Pro Phe Leu Arg Leu Lys  
 130 135 140

Ser Arg Ser Ser Glu Gln Tyr Phe Leu Leu Phe Ile Glu Gln Gly Thr  
 145 150 155 160

Leu Gln Ala Ser Ala Thr Thr Gly Glu Phe Ser Ala Tyr Gly Leu Ser  
 165 170 175

Val Asn Ala Thr Ile Pro Trp Phe  
 180

<210> 35  
 <211> 30  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 35  
 uguuacugc cgcacaggca gcuuagaaaa 30

<210> 36  
 <211> 184  
 <212> PRT  
 <213> Dickeya dadantii

&lt;400&gt; 36

Met Asp His Tyr Ile Glu Ile Arg Val Leu Pro Asp Pro Glu Phe Ser  
1 5 10 15

Ala Val Gln Leu Leu Ser Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Arg Ala Leu  
20 25 30

Gly Gln Arg Ala Thr Gly Asp Ile Gly Val Ser Phe Pro Asp Ala Gly  
35 40 45

Lys Thr Leu Gly Glu Arg Leu Arg Leu His Gly Ser Val Gln Ala Leu  
50 55 60

Ala Ala Leu Glu Gln Thr Gly Trp Leu Lys Gly Leu Arg Asp Tyr Ser  
65 70 75 80

Thr Ile Thr Asp Val Leu Thr Val Pro Thr Gly Ala Gln Tyr Arg Thr  
85 90 95

Val Arg Arg Val Gln Val Lys Ser Ser Ala Glu Arg Leu Arg Arg Arg  
100 105 110

Ala Val Ser Lys Gly Arg Met Thr Ala Asp Glu Ala Ala Ala Arg Ile  
115 120 125

Pro Tyr Ala Ala Glu Lys Arg Thr Ser Leu Pro Tyr Leu Pro Leu Arg  
130 135 140

Ser Leu Ser Ser Gly Gln Thr Phe Leu Leu Phe Val Glu His Gly Pro  
145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Pro Val Ala Gly Val Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser  
165 170 175

Ala Ile Ala Thr Ile Pro Trp Phe  
180

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетический олигонуклеотид

&lt;400&gt; 37

gugaacugcc gcauaggcag cuuagaaa

28

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 198

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 38

Met Ala Val Ser Leu Val Arg Asn Arg Asn Lys Glu Leu Pro Met Asp  
1 5 10 15

His Tyr Leu Glu Ile Arg Val Leu Pro Asp Pro Glu Phe Ser Ser Glu  
20 25 30

Met Leu Met Ala Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Arg Val Leu Gly Ala  
35 40 45

Arg Gly Gln Gly Asp Ile Gly Val Ser Phe Pro Asp Val Asn Val Met  
50 55 60

Pro Gly Ala Arg Leu Arg Leu His Gly Ser Ala Gln Ala Leu Gln Ala  
65 70 75 80

Leu Glu Ala Ser Thr Trp Arg Lys Gly Leu Thr Asp Tyr Cys Gln Cys  
85 90 95

Ser Pro Val Thr Pro Val Pro Glu Ile Lys Gly Trp Arg Val Val Ser  
100 105 110

Arg Val Gln Val Lys Ser Asn Pro Gln Arg Leu Leu Arg Arg Ser Val  
115 120 125

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

Gln Ala Glu Gln Arg Thr Asp Leu Pro Phe Leu Asn Met Lys Ser Leu  
145 150 155 160

Ser Ser Gln Gln Leu Phe Lys Leu Phe Ile Arg His Gly Asp Leu Leu  
165 170 175

Lys Glu Pro Val Lys Gly Glu Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser Ala Thr  
180 185 190

Ala Thr Ile Pro Trp Phe  
195

<210> 39

<211> 184

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 39

Met Asp His Tyr Leu Glu Ile Arg Val Leu Pro Asp Pro Glu Phe Ser  
1 5 10 15

Ser Glu Met Leu Met Ala Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Arg Val Leu  
20 25 30

Gly Ala Arg Gly Gln Gly Asp Ile Gly Val Ser Phe Pro Asp Val Asn  
35 40 45

Val Met Pro Gly Ala Arg Leu Arg Leu His Gly Ser Ala Gln Ala Leu  
50 55 60

Gln Ala Leu Glu Ala Ser Thr Trp Arg Lys Gly Leu Thr Asp Tyr Cys  
65 70 75 80

Gln Cys Ser Pro Val Thr Pro Val Pro Glu Ile Lys Gly Trp Arg Val  
85 90 95

Val Ser Arg Val Gln Val Lys Ser Asn Pro Gln Arg Leu Leu Arg Arg  
100 105 110

Ser Val Lys Lys Gly Trp Leu Thr Glu Glu Gln Ala Ile Glu Arg Leu  
115 120 125

Ala Thr Gln Ala Glu Gln Arg Thr Asp Leu Pro Phe Leu Asn Met Lys  
130 135 140

Ser Leu Ser Ser Gln Gln Leu Phe Lys Leu Phe Ile Arg His Gly Asp  
145 150 155 160

Leu Leu Lys Glu Pro Val Lys Gly Glu Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser  
165 170 175

Ala Thr Ala Thr Ile Pro Trp Phe  
180

<210> 40

<211> 184

<212> PRT

<213> *Tolomonas auensis*

<400> 40

Met Asp His Tyr Leu Asp Ile Arg Leu Leu Pro Glu Glu Pro Glu Val  
1 5 10 15

Ser Glu Ser Phe Leu Leu Asn Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Val Arg  
20 25 30

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

His Lys Arg Leu Gly Asp Leu Leu Arg Leu His Gly Gln Arg Thr Asp  
50 55 60

Leu Gln Ala Leu Met Ala Asp Asp Trp Leu Gln Gly Leu Lys Gly Tyr  
65 70 75 80

Thr Gln Cys Ser Glu Val Leu Pro Ile Pro Ala Thr Val Ser Tyr Arg  
85 90 95

Ala Val Lys Arg Val Gln Ala Lys Ser Ala His Asn Lys Arg Gln Arg  
100 105 110

Ser Ile Ala Lys Gly Trp Leu Thr Glu Ser Glu Ala Gln Ile Arg Ile  
115 120 125

Pro Asp Thr Gln Gln Lys Glu Leu His Leu Pro Phe Val Gln Leu Lys  
130 135 140

Ser Arg Ser Asn Gly Gln Met Met Arg Val Tyr Val Glu His Gly Pro  
145 150 155 160

Val Leu Ala Val Pro Val Ser Gly Tyr Phe Asn Ala Tyr Gly Leu Ser  
165 170 175

Ser Ile Ala Thr Ile Pro Trp Phe  
180

<210> 41  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 41  
 cuucacugcc gcacaggcag cuuagaaa 28

<210> 42  
 <211> 184  
 <212> PRT  
 <213> *Erwinia pyrifoliae*

<400> 42

Met Asp His Tyr Gln Asp Ile Arg Val Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Leu Leu Ala Gln Val Phe Met His Leu His Gln Val Leu  
 20 25 30

Met Arg Ala Ala Asn Gly Arg Ile Gly Ile Ser Phe Pro Asn Val Lys  
 35 40 45

Arg Thr Leu Gly Asp Arg Ile Arg Leu His Gly Thr Leu Asp Asp Leu  
 50 55 60

Ser Ala Leu Gln Gln Ser Gly Trp Asn Lys Cys Leu Arg Asp Tyr Ile  
 65 70 75 80

Ala Cys Ser Asp Ile Ala Pro Val Pro Lys Gly Ala Ala Trp Arg Thr  
 85 90 95

Val Arg Arg Val Gln Val Lys Ser Ser Ala Glu Arg Leu Arg Arg Arg  
 100 105 110

Ser Val Asn Lys Gly Trp Leu Ser Glu Gln Glu Ala Ala Glu Arg Ile  
 115 120 125

Ser Val Leu Asn Glu Gln Arg Ser Asn Leu Pro Phe Leu Gln Ile Lys  
 130 135 140

Ser Gly Ser Asn Gly Gln Ala Trp Arg Leu Phe Ile Glu His Gly Ser  
 145 150 155 160

Leu Val Ser Ala Pro Ser Asp Gly Ser Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser  
 165 170 175

Ala Ala Ala Thr Ile Pro Trp Phe  
 180

<210> 43  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 43

uucacugccg uacagcagc uuagaaa

28

<210> 44

<211> 198

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 44

Met Ala Val Ser Leu Val Arg Asn Arg Asn Lys Glu Leu Pro Met Asp  
1 5 10 15

His Tyr Leu Glu Ile Arg Val Leu Pro Asp Pro Glu Phe Ser Ser Glu  
20 25 30

Met Leu Met Ala Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Arg Val Leu Gly Ala  
35 40 45

Arg Gly Gln Gly Asp Ile Gly Val Ser Phe Pro Asp Val Asn Val Met  
50 55 60

Pro Gly Thr His Leu Arg Leu His Gly Ser Ala Gln Ala Leu Gln Glu  
65 70 75 80

Leu Glu Ala Ser Thr Trp Arg Lys Gly Leu Thr Asp Tyr Cys Gln Cys  
85 90 95

Ser Pro Val Thr Pro Val Pro Glu Ile Lys Gly Trp Arg Val Val Ser  
100 105 110

Arg Val Gln Val Lys Ser Asn Pro Gln Arg Leu Leu Arg Arg Ser Val  
115 120 125

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

Gln Ala Glu Gln Arg Thr Asp Leu Pro Phe Leu Asn Met Lys Ser Leu  
145 150 155 160

Ser Ser Gln Gln Gln Phe Lys Leu Phe Ile Arg His Gly Asp Leu Leu  
165 170 175

Lys Glu Pro Val Lys Gly Glu Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser Ala Thr  
180 185 190

Ala Thr Ile Pro Trp Phe  
195

<210> 45

<211> 190

<212> PRT

<213> Verminephrobacter eiseniae

<400> 45

Met Ser Thr His Tyr Ile Asp Ile Thr Leu Arg Pro Asp Pro Glu Phe  
1 5 10 15

Ser Pro Ala His Leu Leu Asn Ala Leu His Ala Gln Leu His Leu Ala  
20 25 30

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

Ile Leu Arg Gly Glu His Ser His Leu Gly Thr Thr Leu Arg Leu His  
50 55 60

Gly Ala Thr Ser Ala Leu Gln Arg Leu Gln Ala Leu Ser Trp Leu Arg  
65 70 75 80

Gly Met Arg Asp His Val Lys Thr Ser Glu Val Ala Pro Val Pro Thr  
85 90 95

His Thr Gln His Arg Val Val Arg Arg Val Gln Ala Lys Ser Ser Pro  
100 105 110

Glu Arg Ser Arg Arg Arg Leu Met Arg Arg Leu Glu Ile Asp Glu Ala  
115 120 125

Gln Ala Leu Gln Arg Ile Pro Asp Gln Glu Gly Arg Arg Leu Ala Leu  
130 135 140

Pro Tyr Leu Arg Leu Gln Ser Ala Ser Lys Gly Gln Val Phe Arg Leu  
145 150 155 160

Phe Ile Glu His Gly Pro Leu Leu Asp Thr Pro Ser Pro Gly Ser Phe  
165 170 175

Gly Thr Tyr Gly Leu Ser Thr Gln Ala Thr Ile Pro Trp Phe  
180 185 190

<210> 46

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 46

guucacugcc ggauaggcag cucagaaa 28

<210> 47

<211> 195

<212> PRT

<213> Chromobacterium violaceum

<400> 47

Met Asp His Tyr Leu Asp Ile Arg Leu Leu Pro Asp Ala Asp Phe Gly  
1 5 10 15

Pro Pro Val Leu Met Asn Ala Leu Tyr Ala Lys Leu His Arg Ala Leu  
20 25 30

Ala Ala Gln Gln Arg Gln Asp Ile Gly Val Ser Phe Pro Gly Tyr Asp  
35 40 45



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

<210> 48  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 48  
 guucacugcc ggauaggcag cuuagaaa 28

<210> 49  
 <211> 184  
 <212> PRT  
 <213> Erwinia tasmaniensis

<400> 49

Met Asp Arg Tyr Gln Asp Ile Arg Val Arg Val Asp Ala Glu Met Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Pro Val Leu Leu Ala Gln Val Phe Met Arg Leu His Gln Val Leu  
 20 25 30  
 Met Arg Ala Ala Asn Gly Arg Ile Gly Ile Ser Phe Pro Asp Val Lys  
 35 40 45  
 Leu Thr Leu Gly Asp Arg Ile Arg Leu His Gly Thr Leu Asp Asp Leu  
 50 55 60

Ser Ser Leu Gln Gln Ser Gly Trp Asp Lys Gly Leu Thr Asp Tyr Ile  
65 70 75 80

Ala Cys Ser Ala Ile Asp Pro Val Pro Pro Gly Ala Ala Trp Arg Thr  
85 90 95

Val Arg Arg Val Gln Val Lys Ser Ser Ala Glu Arg Leu Arg Arg Arg  
100 105 110

Ser Val Asn Lys Gly Trp Leu Asn Glu Ala Glu Ala Ala Glu Arg Ile  
115 120 125

Asn Val Leu Ser Glu Gln Arg Ser Asp Leu Pro Tyr Leu Gln Ile Lys  
130 135 140

Ser Gly Ser Asn Gly His Ala Trp Arg Leu Phe Ile Glu His Gly Pro  
145 150 155 160

Leu Val Ser Val Pro Val Asn Gly Gly Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser  
165 170 175

Ala Thr Ala Thr Val Pro Trp Phe  
180

<210> 50

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 50

guucacugcc guacaggcag cuuagaag 28

<210> 51

<211> 190

<212> PRT

<213> Delftia acidovorans

<400> 51

Met Ala Met Thr Ser His Tyr Ile Asp Thr Thr Leu Leu Pro Asp Pro  
1 5 10 15

Glu Phe Ser His Ala His Leu Leu Gly Ala Leu Val Ala Lys Leu His  
20 25 30

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

Gly Tyr Ser Leu Arg Pro Arg Thr Leu Gly Thr Ile Leu Arg Leu His  
50 55 60

Gly Ser Glu Ala Ala Leu Arg Gly Leu Met Glu Gln Pro Trp Leu Gln  
65 70 75 80

Gly Met Arg Asp His Val His Cys Thr Pro Pro Ala Leu Val Pro Glu  
85 90 95

Gly Ala Val Pro Cys Leu Val Gln Arg Arg Gln Phe Lys Thr Ser Pro  
100 105 110

Asp Arg Leu Arg Arg Arg Arg Met Arg Arg Lys Gly Glu Thr Ala Glu  
115 120 125

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

Pro Tyr Val Gln Leu Arg Ser Ala Ser Thr Gly Gln Pro Phe Cys Leu  
145 150 155 160

Phe Val Glu Gln Lys Ala Val Gln Gly Thr Ala Gly Gln Glu Gly Phe  
165 170 175

Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Leu Gly Thr Ala Val Pro Trp Phe  
180 185 190

<210> 52

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 52

guucgcugcc gcuaggcag cucagaaa 28

<210> 53

<211> 184

<212> PRT

<213> Enterobacter sp. 638

<400> 53

Met Asp His Tyr Leu Glu Ile Arg Val Leu Ser Asp Pro Glu Phe Ser  
1 5 10 15  
Glu Glu Thr Leu Met Ala Ala Leu Phe Ala Lys Leu His Arg Ala Leu  
20 25 30

Gly Ala Arg Gly Gln Gly Asp Ile Gly Val Ser Phe Pro Arg Tyr Ser  
35 40 45

Leu Lys Pro Gly Asp Thr Leu Arg Leu His Gly Ser Ala Gln Ser Leu  
50 55 60

Asp Glu Leu Glu Lys Met Ala Trp Arg Lys Gly Leu Ser Asp Tyr Cys  
65 70 75 80

Leu Cys Lys Gly Val Leu Pro Ala Pro Asp Val Asn Ala Trp Arg Cys  
85 90 95

Val Ser Arg Val Gln Val Lys Ser Ser Pro Gln Arg Leu Met Arg Arg  
100 105 110

Ser Val Lys Lys Gly Trp Leu Thr Glu Glu Ala Gln Gln Arg Leu  
115 120 125

Leu Asn Leu Gln Glu Ala Arg Thr Asp Leu Pro Trp Leu Asn Leu Gln

130            135            140  
 Ser Leu Ser Thr Gly Gln Ser Phe Arg Leu Phe Ile Arg His Gly Asp  
 145            150            155            160  
 Ile Val Asp Met Pro Met Cys Gly Glu Phe Ser Ser Tyr Gly Leu Ser  
           165            170            175  
 Ala Thr Ala Thr Ile Pro Trp Phe  
           180  
 <210> 54  
 <211> 186  
 <212> PRT  
 <213> Thioalkalivibrio sp. K90mix  
 <400> 54  
 Met Asp His Tyr Leu Asp Leu Arg Val Met Pro Asp Pro Glu Phe Lys  
 1            5            10            15  
 Glu Thr Thr Leu Leu Gly Ala Leu Val Ser Lys Leu His Arg Arg Leu  
           20            25            30  
 Val Ser Met Ser Ala Asp Asp Ile Gly Ile Ser Leu Pro Asp His Glu  
           35            40            45  
 Gln Glu Pro Pro Leu Gly Arg Arg Leu Arg Val His Gly Thr Gln Gly  
           50            55            60  
 Arg Leu Asn Leu Leu Met Gln Asp Glu Trp Leu Gly Gly Met Gln Ser  
 65            70            75            80  
 Leu Val Asp Ala Thr Pro Val Gln Pro Val Pro Asp Gln Val Thr Tyr  
           85            90            95  
 Arg Pro Val Arg Arg Arg Gln Tyr Lys Thr Asn Ala Glu Arg Leu Arg  
           100            105            110  
 Arg Arg Arg Met Arg Arg His Gly Glu Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Gln  
           115            120            125  
 His Ile Pro Asp Thr Val Glu Arg Arg Val Asn Thr Pro Phe Leu Ser  
           130            135            140  
 Val Gln Ser Ala Ser Thr Gly Gln Arg Phe Ser Leu Phe Ile Glu His  
 145            150            155            160  
 Gly Pro Pro Gln Gln His Ala Ser Pro Gly Arg Phe Asn Thr Tyr Gly  
           165            170            175  
 Leu Ser Gln Asp Ala Thr Val Pro Trp Phe  
           180            185  
 <210> 55  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 55  
 guuagcugcc gcacaggcag cucagaaa 28

<210> 56  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Zymomonas mobilis

<400> 56

Met Leu Ala Asn Pro Val Asp Ser Tyr Gln Asp Ile Tyr Ile Leu Pro  
 1 5 10 15

Asn Gln Glu Ile Ala Pro His Ile Ile Met Glu Lys Leu Phe Ser Leu  
 20 25 30

Leu His Leu Glu Leu Val Arg Leu Gly Ser Gln His Ile Gly Ile Ser  
 35 40 45

Phe Pro Glu His Asp Asn Asn Lys Pro Cys Leu Gly Ser Arg Leu Arg  
 50 55 60

Leu His Gly Thr Gly Ala Asp Leu His Glu Leu Ala Leu Ser Gly Trp  
 65 70 75 80

Ile Thr Arg Leu Asp Asp Tyr Leu Tyr Cys Glu Asp Ile Lys Ser Val  
 85 90 95

Pro Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Val Val Ser Arg Val Gln Ala Lys Ser  
 100 105 110

Ser Pro Ala Arg Leu Arg Arg Arg Ala Ile Arg Arg His Gly Phe His  
 115 120 125

Asp Glu Glu Ala Lys Lys Val Ile Pro Asp Thr Ala Phe Glu Arg Leu  
 130 135 140

Glu Leu Pro Phe Ile Met Thr Gly Ser Cys Ser Thr Lys Gln Pro Arg  
 145 150 155 160

Phe Pro Val Phe Ile Ser His Lys Ile Ile Gln Asn Lys Leu Met Asn  
 165 170 175

Gly Asn Phe Asn Ser Tyr Gly Leu Ser Leu Gly Ala Ser Val Pro Trp  
 180 185 190

Phe

<210> 57  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Zymomonas mobilis

<400> 57

Met Leu Ala Asn Pro Val Asp Ser Tyr Gln Asp Ile Tyr Ile Leu Pro  
 1 5 10 15

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

<210> 58  
 <211> 191  
 <212> PRT  
 <213> Acidovorax sp. JS42

<400> 58

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

Ala Asn Ala Gln His Arg Thr Val Arg Arg Arg Gln Phe Lys Thr Asn  
100 105 110

Ala Asp Arg Leu Arg Arg Arg Arg Met Gln Arg Lys Gly Glu Thr Ala  
115 120 125

Glu Gln Ala Ala Ala Ala Ile Pro Asp Thr Val Glu Arg Arg Pro Asp  
130 135 140

Leu Pro Phe Val Gln Leu Arg Ser Ser Ser Thr Gly Gln Ser Phe Cys  
145 150 155 160

Leu Cys Val Glu His Gly Pro Leu Gln Pro Leu Pro Val Ala Gly Ala  
165 170 175

Phe Asn Ala Tyr Gly Leu Gly His Asp Ala Thr Val Pro Trp Phe  
180 185 190

<210> 59

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 59

guucacugcc gcauagcgag cucagaaa 28

<210> 60

<211> 182

<212> PRT

<213> Desulfurispirillum indicum

<400> 60

Met Asp Ser Tyr Ile Glu Ile Arg Ile Leu Pro Asp Gln Glu Phe Glu  
1 5 10 15

Ala Thr Thr Leu Met Ser Thr Val Phe Ala Lys Leu His Arg Ala Leu  
20 25 30

Val Glu Ser Gly Arg Ser Asp Ile Gly Val Ser Phe Pro Glu Ala Gly  
35 40 45

Lys Thr Pro Gly Ala Leu Leu Arg Leu His Gly Ser Leu Ala Ala Leu  
50 55 60

Glu Ser Ile Met Thr Leu Ser Trp Leu Thr Gly Leu Gln Asp Tyr Thr  
65 70 75 80

Gln Thr Ser Gly Ile Leu Gln Val Pro Ala Gln Ala Ala Tyr Val Gln  
85 90 95

Val Ala Arg Val Gln Ser Lys Met Thr Ala Ser Arg Ile Arg Arg Ala  
100 105 110

Leu Lys Arg Gly Ser Leu Ser Glu Glu Arg Ala Leu Glu Leu Leu Gln  
115 120 125

Ser Arg Asp Gln Leu Asn Gln Pro Phe Phe Arg Leu Leu Ser Ala Ser  
130 135 140

Thr Ala Gln Lys Phe Pro Leu Phe Ile Glu Gln Arg Asn Ala Glu Lys  
145 150 155 160

Ala Gly Lys Gln Ser Val Tyr Ser Ala Tyr Gly Leu Ser Val Gly Gly  
165 170 175

Ser Thr Val Pro Trp Phe  
180

<210> 61  
<211> 184  
<212> PRT  
<213> Photobacterium profundum

<400> 61

Met Met Asp Ser Tyr Val Asp Ile Gln Leu Lys Pro Asp Ala Glu Met  
1 5 10 15

Arg Glu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Val Phe Thr Lys Phe His Lys Ala  
20 25 30

Leu Ala Thr Leu Asn Thr Asn Lys Ile Gly Ile Ser Phe Pro Gln Met  
35 40 45

Asn Leu Lys Leu Gly Arg Leu Phe Arg Ile His Gly Asn Ala Ser Leu  
50 55 60

Leu Lys Asp Leu Gln Gly Ile Lys Trp Leu Gly Ala Leu Ala Gly Tyr  
65 70 75 80

Cys Gln Val Gly Glu Ile Thr Val Val Pro Asp Gln Val Gln Tyr Arg  
85 90 95

Val Ile Ser Val Lys Arg Ser Asn Leu Ser Lys Ala Lys Leu Lys Arg  
100 105 110

Leu Ile Ala Arg Gly Ser Ile Asp Lys Asp Gly Glu Lys Arg Tyr Lys  
115 120 125

Val Lys Met Leu Ser Gln Gly Phe Asp Asn Pro Tyr Leu Asp Leu Phe  
130 135 140

Ser Ser Ser Thr Gly Gln Val Tyr Arg Lys Phe Phe Glu Phe Gly Asp  
145 150 155 160

Ile Gln Ala Thr Ser Val Ser Asp Glu Phe Asp Ser Tyr Gly Leu Ser  
165 170 175

Asn Thr Ala Thr Ile Pro Trp Phe  
180

<210> 62  
<211> 184  
<212> PRT  
<213> Legionella pneumophila



&lt;400&gt; 62

Met Asp His Tyr Leu Asp Ile Ser Ile Leu Pro Asp Ser Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Thr Pro Val Leu Met Asn Ala Ile Tyr Thr Asn Leu His Lys Ala Leu  
 20 25 30

His Thr Leu Ala Ser Thr Asn Ile Gly Val Ser Phe Pro Lys Tyr Ser  
 35 40 45

Ser Thr Leu Gly Asn Leu Leu Arg Ile His Gly Lys Lys Glu Ala Leu  
 50 55 60

Gln Glu Leu Gln Asn Leu Asn Trp Ile Gly Gly Met Ile Gly Tyr Cys  
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Leu Ile Lys Thr Val Pro Ala Asp Thr Lys Phe Arg Thr  
 85 90 95

Val Ser Arg Lys Gln Pro Thr Met Ser Gln Ser Lys Leu Arg Arg Leu  
 100 105 110

Ile Lys Arg Asn Ser Leu Thr Glu Asp Glu Ile Arg Gln Tyr Lys Ala  
 115 120 125

Lys Met Phe Ser Lys Gly Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Glu Leu Val Ser  
 130 135 140

Val Ser Asn Gly Gln Arg His Arg Arg Tyr Ile Glu Phe Gly Glu Leu  
 145 150 155 160

Phe Asn Glu Pro Ile Pro Gly Leu Phe Asp Gln Phe Gly Leu Ser Asn  
 165 170 175

Ser Ala Thr Val Pro Trp Phe Asp  
 180

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

<213> *Legionella pneumophila*

&lt;400&gt; 63

Met Asp His Tyr Leu Glu Ile Ser Ile Leu Pro Asp Ser Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Thr Pro Val Leu Met Asn Ala Ile Tyr Thr Asn Leu His Lys Ala Leu  
 20 25 30

His Thr Leu Ala Ser Thr Ser Ile Gly Val Ser Phe Pro Lys Tyr Ser  
 35 40 45

Ser Thr Leu Gly Asn Ile Leu Arg Ile His Gly Lys Lys Glu Val Leu  
 50 55 60

Gln Asp Leu Gln Asn Leu Asn Trp Ile Gly Gly Met Ile Gly Tyr Cys  
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Leu Ile Lys Thr Val Pro Ala Asp Thr Lys Phe Arg Thr

85 90 95  
 Val Ser Arg Lys Gln Pro Thr Met Ser Gln Ser Lys Leu Arg Arg Leu  
 100 105 110

Ile Lys Arg Asn Thr Leu Thr Glu Asp Glu Ile Arg Gln Tyr Lys Ala  
 115 120 125

Lys Met Phe Ser Lys Gly Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Glu Leu Val Ser  
 130 135 140

Val Ser Asn Gly Gln Arg His Arg Arg Tyr Ile Glu Phe Gly Glu Leu  
 145 150 155 160

Phe Asn Glu Pro Ser Pro Gly Leu Phe Asp Gln Phe Gly Leu Ser Asn  
 165 170 175

Ser Ala Thr Val Pro Trp Phe Asp  
 180

<210> 64

<211> 183

<212> PRT

<213> *Shewanella putrefaciens*

<400> 64

Met Asn Ser Tyr Ile Asp Ile Arg Leu Lys Pro Asp Ala Glu Met Arg  
 1 5 10 15

Glu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Val Phe Thr Lys Phe His Lys Ala Leu  
 20 25 30

Val Thr Leu Asn Ser His Lys Ile Gly Ile Ser Phe Pro Gln Met Lys  
 35 40 45

Leu Ser Leu Gly Gln Leu Phe Arg Ile His Gly Asp Ala Ser Leu Leu  
 50 55 60

His Asp Leu Gln Gly Leu Asp Trp Leu Gly Pro Leu Ala Gly Tyr Cys  
 65 70 75 80

Gln Val Thr Ala Val Ser Ala Val Pro Asp His Val Gln Tyr Arg Ile  
 85 90 95

Val Ser Val Lys Arg Ser Asn Leu Ser Lys Ala Lys Leu Lys Arg Leu  
 100 105 110

Ile Ala Arg Gly Ser Ile Asp Lys Asp Gly Glu Lys Arg Tyr Lys Val  
 115 120 125

Lys Met Leu Gly Gln Gly Phe Asp Asn Pro Tyr Leu Asp Leu Phe Ser  
 130 135 140

Ser Ser Thr Gly Gln Val Tyr Arg Lys Phe Phe Glu Phe Ser Asp Ile  
 145 150 155 160

Gln Ala His Pro Leu Asp Gly Glu Phe Asp Ser Tyr Gly Leu Ser Lys  
 165 170 175

Thr Ala Thr Val Pro Trp Phe  
180

<210> 65  
<211> 28  
<212> RNA  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 65  
guucaccgcc gcacaggcgg cuuagaaa 28

<210> 66  
<211> 184  
<212> PRT  
<213> Legionella pneumophila

<400> 66

Met Asp Tyr Tyr Val Asp Ile Leu Ile Lys Pro Asp Ser Glu Lys Ser  
1 5 10 15

Leu Asn Phe Leu Leu Ser Thr Leu Tyr Thr Lys Leu His Lys Val Leu  
20 25 30

His Asp Met Ala Ser Thr Asn Ile Gly Val Ser Phe Pro Lys Tyr Asn  
35 40 45

Ile Thr Leu Gly Asn Ile Leu Arg Ile His Ser Lys Lys Val Val Leu  
50 55 60

Asp Glu Leu Leu Gly Met Asn Phe Leu Ser Gly Ile Asn Asn Tyr Tyr  
65 70 75 80

Glu Val Ser Pro Ile Lys Ser Val Pro Ala Asp Ser Lys Phe Arg Ile  
85 90 95

Ile Ser Arg Lys Gln Thr Thr Met Ser Gln Ser Lys Met Arg Arg Leu  
100 105 110

Phe Lys Arg Gly Ser Met Thr Val Gly Asp Ile Arg Gln Tyr Lys Ala  
115 120 125

Lys Met Phe Ala Lys Ser Ile Asp Asn Pro Tyr Leu Glu Leu Val Ser  
130 135 140

Gly Ser Asn Gly Tyr Arg Tyr Arg Arg Tyr Ile Glu Phe Gly Glu Leu  
145 150 155 160

Leu Asp Gln Pro Val Tyr Gly Glu Phe Asp Arg Phe Gly Leu Ser Lys  
165 170 175

Thr Ala Thr Val Pro Trp Phe Asp  
180

<210> 67  
<211> 28  
<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 67

guuaacugcc gcacaggcag cuuagaag 28

<210> 68

<211> 183

<212> PRT

<213> *Vibrio metschnikovii*

<400> 68

Met Asp Ser Tyr Ile Glu Ile Arg Leu Gln Pro Asp Ala Glu Met Pro

1 5 10 15

Glu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Val Phe Thr Lys Phe His Lys Ala Leu

20 25 30

Val Ile Leu His Ser Asn Gln Ile Gly Ile Ser Phe Pro Glu Val Asn

35 40 45

Val Lys Leu Gly Arg Leu Phe Arg Leu His Gly Glu Ala Ser Phe Leu

50 55 60

His Asp Leu Gln Gly Leu Asn Trp Leu Gly Pro Leu Ser Gly Tyr Cys

65 70 75 80

Gln Val Ser Glu Ile Leu Ala Ile Pro Glu Gln Val Gln Tyr Arg Val

85 90 95

Ile Ser Val Lys Arg Ser Asn Leu Ser Gln Ala Lys Leu Arg Arg Leu

100 105 110

Ile Ala Arg Gly Ser Ile Asp Lys Glu Gly Glu Lys Arg Tyr Lys Val

115 120 125

Lys Met Leu Ser Gln Gly Phe Asp Asn Pro Tyr Leu Asp Leu Phe Ser

130 135 140

Ser Ser Thr Lys Gln Val His Arg Lys Phe Phe Glu Phe Gly Glu Ile

145 150 155 160

Gln Pro Leu Pro Val Ser Gly Lys Phe Asp Ser Tyr Gly Leu Ser His

165 170 175

Thr Thr Thr Val Pro Trp Phe

180

<210> 69

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 69

guucacugcc gcuaaggcag cuuagaaa

28

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 102

&lt;212&gt; PRT

<213> *Citrobacter koseri*

&lt;400&gt; 70

Met Ala Ile Thr Pro Val Pro Ala Val Lys Gly Trp Arg Thr Val Ser

1 5 10 15

Arg Val Gln Val Lys Ser Ser Pro Gln Arg Leu Leu Arg Arg Ser Val

20 25 30

Arg Lys Gly Trp Leu Thr Glu Glu Gln Ala Gln Leu Arg Leu Val Glu

35 40 45

Ser Thr Glu Gln His Ser Asp Leu Pro Tyr Leu Asn Val Lys Ser Leu

50 55 60

Ser Asn Gln Gln Gln Phe Arg Val Phe Ile Arg His Ser Glu Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Pro Val Ser Gly Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Leu Ser Ser Thr

85 90 95

Ala Thr Ile Pro Trp Phe

100

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 183

&lt;212&gt; PRT

<213> *Vibrio sp. RC586*

&lt;400&gt; 71

Met Asp Ala Tyr Ile Asp Ile Arg Leu Met Pro Asp Ala Glu Met Arg

1 5 10 15

Glu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Val Phe Ile Lys Phe His Lys Ala Leu

20 25 30

Val Lys Leu Arg Ser Asn Lys Ile Gly Ile Ser Phe Pro Glu Ala Asn

35 40 45

Ile Lys Leu Gly Arg Leu Phe Arg Leu His Gly Glu Met Ser Ala Leu

50 55 60

His Asp Leu Gln Gly Leu Asn Trp Leu Gly Pro Leu Ala Gly Tyr Cys

65 70 75 80

Lys Ile Thr Thr Val Thr His Val Pro Asp Gln Val Gln Tyr Arg Ile

85 90 95

Ile Ser Val Lys Arg Ser Asn Leu Ser Lys Ala Lys Leu Thr Arg Leu

100 105 110

Ile Ala Arg Gly Ser Ile Asp Lys Asp Gly Glu Lys Arg Tyr Lys Val

115 120 125

Lys Met Leu Ser Gln Gly Phe Asp Asn Pro Tyr Leu Asp Leu Ser Ser  
130 135 140

Ser Ser Thr Gly Gln Val Tyr Arg Lys Phe Phe Glu Phe Ser Asp Ile  
145 150 155 160

Gln Ala Asp Pro Val Asp Gly Glu Phe Asp Ser Tyr Gly Leu Ser Lys  
165 170 175

Thr Ala Thr Val Pro Trp Phe  
180

<210> 72

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 72

aguguucugc cgaauaggca gcuagaag 28

<210> 73

<211> 184

<212> PRT

<213> Vibrio cholerae

<400> 73

Met Met Asp Ala Tyr Ile Asp Ile Arg Leu Met Pro Asp Ala Glu Met  
1 5 10 15

Arg Glu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Val Phe Ile Lys Phe His Lys Ala  
20 25 30

Leu Val Lys Leu Gln Ser Asn Lys Ile Gly Ile Ser Phe Pro Glu Ala  
35 40 45

Asn Ile Lys Leu Gly Arg Leu Phe Arg Leu His Gly Glu Val Ser Ala  
50 55 60

Leu His Asp Leu Gln Gly Leu Asn Trp Leu Gly Pro Leu Ala Gly Tyr  
65 70 75 80

Cys Lys Ile Thr Thr Val Thr His Val Pro Asp Gln Val Glu Tyr Arg  
85 90 95

Ile Ile Ser Val Lys Arg Ser Asn Leu Ser Lys Ala Lys Leu Ala Arg  
100 105 110

Leu Ile Ala Arg Gly Ser Ile Asp Lys Asp Gly Glu Lys Arg Tyr Lys  
115 120 125

Val Lys Met Leu Arg Gln Gly Phe Asp Asn Pro Tyr Leu Asp Leu Ser  
130 135 140

Ser Ser Ser Thr Gly Gln Val Tyr Arg Lys Phe Phe Glu Phe Ser Asp  
145 150 155 160

Ile Gln Ala Glu Pro Val Asp Gly Glu Phe Asp Ser Tyr Gly Leu Ser  
 165 170 175

Lys Thr Ala Thr Val Pro Trp Phe  
 180

<210> 74

<211> 29

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 74

guucacugcc gcacaggcag cuuagaaau 29

<210> 75

<211> 197

<212> PRT

<213> Oxalobacter formigenes

<400> 75

Met Lys His Tyr Ile Glu Ile Thr Leu Thr Gly Ser Pro Asp Phe Pro  
 1 5 10 15

Leu Tyr His Leu Trp Ser Lys Leu Tyr Thr Gln Leu His Leu Ala Leu  
 20 25 30

Val Glu Asn Arg Asp Ala Ser Asp Gln Val Asn Ile Gly Val Ser Phe  
 35 40 45

Pro Glu Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Lys Gly Met Gly Phe Leu Gly Thr  
 50 55 60

Lys Leu Arg Leu Phe Ala Glu Asp Glu Thr Ser Leu Gln Lys Ile Asp  
 65 70 75 80

Ile Gln Lys Trp Phe Val Arg Leu Asn Asp Cys Ile His Ile Thr Pro  
 85 90 95

Val Cys Arg Val Pro Leu Asn Glu Ile Thr Gly Tyr Ala Thr Phe Ser  
 100 105 110

Arg Lys His Ile Lys Ser Asn Ala Glu Arg Leu Ala Arg Arg Gln Met  
 115 120 125

Lys Arg His Lys Asp Leu Ser Phe His Glu Thr Val Gln Arg Tyr Gln  
 130 135 140

Lys Asn Leu Ala Lys Ser Pro Leu Pro Phe Ile Gln Leu Glu Ser Leu  
 145 150 155 160

Thr Asn Ser His Pro Phe Lys Leu Phe Ile Glu Lys Lys Pro Ala Ile  
 165 170 175

Asn Ala Ser Leu Lys Val Phe Thr Thr Tyr Gly Leu Ser Ala Glu Ser  
 180 185 190

Thr Ile Pro Glu Phe  
195

<210> 76  
<211> 28  
<212> RNA  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 76  
guucacugcc guauaggcag cuuagaag 28

<210> 77  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> *Psychromonas ingrahamii*

<400> 77

Met Lys Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Leu Leu Pro Asp Ile Glu Ile Pro  
1 5 10 15

Leu Gly Phe Ile Trp Gln Lys Val Phe Gln Gln Val His Ile Ala Leu  
20 25 30

Ala Asp Asn Lys Val Gly Glu Asn Glu Ser Asp Ile Ala Leu Ser Leu  
35 40 45

Pro Asn Tyr Gly Asp Lys Ala Phe Pro Leu Gly Asn Lys Leu Arg Leu  
50 55 60

Phe Ser Val Ser Glu Gln Ala Leu Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Trp  
65 70 75 80

Leu Lys Arg Phe Thr Asp His Thr His Ile Thr Ser Val Lys Ala Val  
85 90 95

Pro Glu Ser Ala Asn Glu Tyr Ala Cys Phe Thr Arg Lys Gln Phe Asn  
100 105 110

Thr Asn Ile Ser Arg Leu Ala Arg Arg Arg Ala Lys Arg His Met Glu  
115 120 125

Thr Phe Glu Lys Ala Leu Gln Tyr Tyr Asp Asn Phe Ala Glu Glu Gln  
130 135 140

Thr Lys Leu Pro Phe Met Asn Ile Lys Ser Leu Thr Asn Asn Ala Gln  
145 150 155 160

Phe Arg Ile Phe Ile Glu Arg Ser Ile Thr Lys Ile Pro Lys Gln Gly  
165 170 175

Thr Phe Asn Cys Tyr Gly Leu Ser Gln Ala Ile Ala Thr Val Pro Trp  
180 185 190

Phe



<210> 78  
 <211> 29  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 78  
 guguucccg ugccacggg gaugaaccg 29

<210> 79  
 <211> 202  
 <212> PRT  
 <213> *Dichelobacter nodosus*

<400> 79

Met Asn Phe Tyr Gln Glu Ile Thr Leu Leu Pro Asp Ala Glu Val Ser  
 1 5 10 15

Leu Tyr Phe Leu Trp Ser Lys Val Tyr Gly Gln Leu His Ile Ala Leu  
 20 25 30

Ala Asp Val Arg Asn Arg Tyr Gly Ile Asp Thr Ile Gly Val Asn Phe  
 35 40 45

Pro His Tyr Val Tyr Glu Glu Gln Asn His Lys Val Val Ala Ala Arg  
 50 55 60

Leu Gly Asp Gln Leu Arg Ile Phe Ala Leu Ala Glu Asn Asp Leu Glu  
 65 70 75 80

Lys Leu Gln Ile Asn Gln Trp Leu Glu Arg Leu Ser Asp Tyr Val His  
 85 90 95

Ile Lys Arg Ile Ser Lys Ile Glu Pro Asn Lys Val Thr Gly Tyr Val  
 100 105 110

Val Val Lys Arg Tyr Arg Tyr Pro Ser Leu Asp Lys Val Ala Leu Arg  
 115 120 125

Phe Ala Gln Phe Arg Lys Ile Asn Phe Glu Glu Ala Arg Lys His Cys  
 130 135 140

Thr Lys Tyr Lys His Gln Ala Lys Asn Tyr Pro Phe Ile Met Leu Lys  
 145 150 155 160

Ser Gln Ser Asn Gln Glu Tyr Tyr Lys Leu Ser Ile Arg Gln Glu Asn  
 165 170 175

Ala Gln Glu Ser Val Ser Gly Arg Phe Asn Val Tyr Gly Ile Asn Ser  
 180 185 190

Ala Thr Gly Ile Val Thr Val Pro Asn Trp  
 195 200

<210> 80  
 <211> 194  
 <212> PRT

<213> *Shewanella baltica*

&lt;400&gt; 80

Met Asn His Tyr Leu Asp Ile Thr Leu Leu Pro Asn Glu Glu Val Gly  
 1 5 10 15

His Tyr Phe Leu Trp Glu Lys Leu Tyr His Gln Val His Leu Ala Leu  
 20 25 30

Val Glu His Lys Asn Arg Val Gly Gln Phe Glu Ile Ala Ala Ala Phe  
 35 40 45

Pro Gln Phe Asn Glu Met Asp Asn Ser Leu Gly Ser Lys Leu Arg Leu  
 50 55 60

Leu Ala Thr Gln Pro Gln His Leu Glu Asp Leu Lys Val Ser Asn Trp  
 65 70 75 80

Leu Arg His Phe Thr Asp Tyr Leu His Ile Ser Ser Ile Arg Pro Val  
 85 90 95

Pro Glu Lys Ile Glu Val Tyr Val Ala Tyr Ser Arg Pro Ala Ile Arg  
 100 105 110

Ala Asn Lys Ala Arg Glu Ile Ala Arg Arg Met Lys Arg His Asn Glu  
 115 120 125

Thr Leu Glu Gln Ala Thr Ala His Phe Glu Gly Phe Lys Pro Lys Lys  
 130 135 140

Thr Lys Ala Pro Phe Val Tyr Met Gln Ser Tyr Thr Lys Asp Ser Arg  
 145 150 155 160

Phe Pro Leu Phe Ile Gln Gln Thr His Ser Ala Val Val Lys Glu Gly  
 165 170 175

Ser Val Ser Phe Asp Ser Tyr Gly Leu Ser Ser Arg Gly Tyr Leu Pro  
 180 185 190

Lys Phe

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 194

&lt;212&gt; PRT

<213> *Shewanella baltica*

&lt;400&gt; 81

Met Asn His Tyr Leu Asp Ile Thr Leu Leu Pro Asn Glu Glu Val Gly  
 1 5 10 15

His Tyr Phe Leu Trp Glu Lys Leu Tyr His Gln Met His Leu Ala Leu  
 20 25 30

Val Glu His Lys Asn Arg Val Gly Gln Phe Glu Ile Ala Ala Ala Phe  
 35 40 45

Pro Gln Phe Asn Glu Met Asp Asn Asn Leu Gly Ser Lys Leu Arg Leu  
 50 55 60

Leu Ala Thr Gln Pro Gln His Leu Glu Asp Leu Lys Val Ser Asn Trp  
65 70 75 80

Leu Arg His Phe Thr Asp Tyr Leu His Ile Ser Ser Ile Arg Pro Val  
85 90 95

Pro Asp Lys Ile Glu Val Tyr Val Ala Tyr Ser Arg Pro Ala Ile Arg  
100 105 110

Ala Asn Lys Ala Arg Glu Ile Ala Arg Arg Met Lys Arg His Asn Glu  
115 120 125

Thr Leu Val Gln Ala Thr Ala His Phe Glu Gly Phe Lys Pro Lys Lys  
130 135 140

Thr Lys Ala Pro Phe Val Tyr Met Gln Ser Tyr Thr Lys Asp Ser Arg  
145 150 155 160

Phe Pro Leu Phe Ile Gln Gln Thr His Ser Ala Val Val Lys Glu Gly  
165 170 175

Asn Val Ser Phe Asp Ser Tyr Gly Leu Ser Ser Arg Gly Tyr Leu Pro  
180 185 190

Lys Phe

<210> 82

<211> 204

<212> PRT

<213> *Acinetobacter baumannii*

<400> 82

Met Met Asn Trp Tyr Gln Glu Ile Thr Leu Ile Asp Gln Asp Glu Ile  
1 5 10 15

Ser Leu Tyr Phe Ile Trp Ser Lys Val Tyr Thr Gln Leu His Ile Ala  
20 25 30

Phe Ala Glu His Ser Asn Glu Gln Gly Arg Ile Ser Phe Gly Val Ser  
35 40 45

Phe Pro Gln Tyr Arg Ile Asn Glu Gln Lys Lys Ile Gly Phe Leu Gly  
50 55 60

Thr Lys Ile Arg Val Phe Ala Ser Ser Glu Asn Asp Leu Gln Gln Leu  
65 70 75 80

Asn Leu Gly Lys Trp Leu Glu Arg Phe Ile Asp Tyr Val His Ile Thr  
85 90 95

Gln Pro Arg Glu Val Pro Arg Ala Lys Ile Thr Gly Tyr Ala His Tyr  
100 105 110

Tyr Arg Val Asn His Arg Met Ser Val Glu Glu Arg Ile Val His Gln  
115 120 125

Ala Gln Arg Arg Asn Ile Ser Leu Asp Gln Ala Arg Gln His Phe Lys  
130 135 140

Gln Tyr Val Glu Gln Pro Val Val Glu Pro Tyr Val Ser Leu Lys Ser  
145 150 155 160

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

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

Tyr Gly Leu Ser Arg Met Thr Thr Val Pro Glu Phe  
195 200

<210> 83

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 83

guucauggcg gcauacgcca uuuaagaaa 28

<210> 84

<211> 203

<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 84

Met Asn Trp Tyr Gln Glu Ile Thr Leu Ile Asp Gln Asp Glu Ile Ser  
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Ile Trp Ser Lys Val Tyr Thr Gln Leu His Ile Ala Phe  
20 25 30

Ala Glu His Ser Asn Glu Gln Gly Arg Ile Ser Phe Gly Val Ser Phe  
35 40 45

Pro Gln Tyr Arg Ile Asn Glu Gln Lys Lys Ile Gly Phe Leu Gly Thr  
50 55 60

Lys Ile Arg Val Phe Ala Ser Ser Glu Asn Asp Leu Gln Gln Leu Asn  
65 70 75 80

Leu Gly Lys Trp Leu Glu Arg Phe Ile Asp Tyr Val His Ile Thr Gln  
85 90 95

Pro Arg Glu Val Pro Arg Ala Lys Ile Thr Gly Tyr Ala His Tyr Tyr  
100 105 110

Arg Val Asn His Arg Met Ser Val Glu Glu Arg Ile Val His Gln Ala  
115 120 125

Gln Arg Arg Asn Ile Ser Leu Asp Gln Ala Arg Gln His Phe Lys Gln  
130 135 140

Tyr Val Glu Gln Pro Val Val Glu Pro Tyr Val Ser Leu Lys Ser Leu  
145 150 155 160

Ser Ala Lys Arg Glu Glu Asn Val Asp Arg Pro Tyr Arg Leu Tyr Ile

165 170 175  
 Gly Lys Ser Leu Val Asp Glu Ala Arg Asp Gly Met Phe Gly Thr Tyr  
 180 185 190

Gly Leu Ser Arg Met Thr Thr Val Pro Glu Phe  
 195 200

<210> 85  
 <211> 186  
 <212> PRT  
 <213> *Pasteurella multocida*

<400> 85

Met Thr Thr His Tyr Ile Glu Leu Lys Ala Ile Pro Gln Met Asp Met  
 1 5 10 15

Leu Gln Ser Glu Val Ile Gly His Cys Met Gln Ile Leu His Gln Phe  
 20 25 30

Leu Pro His Phe Glu Gly Arg Val Gly Val Ala Phe Pro Ala Tyr Gly  
 35 40 45

Leu Gly Arg Thr Leu Gly Gly Ile Val Arg Leu Phe Ala Asn Gln Glu  
 50 55 60

Asp Cys Asn Gln Leu His Gln Gln Leu Leu Arg Ser Gly Leu Ser Asp  
 65 70 75 80

Tyr Ala Leu Ile Ser Glu Val Ser Lys Thr Pro Leu Pro Thr Glu His  
 85 90 95

Arg Ser Tyr Ser Arg Val His Arg Lys Gly Gln Ser Ala Ile Arg Arg  
 100 105 110

Thr Glu Lys Arg Leu Lys Ser Gln Gly Arg Trp Asp Glu Ser Ile Arg  
 115 120 125

Ala Asp Met Gln Gln Arg Gln Gln Asn Val Ala Phe Phe Pro His Cys  
 130 135 140

His Leu Lys Ser Ala Ser Thr Gly Gln Arg Phe Ile Leu Ala Val Lys  
 145 150 155 160

Glu Asn Arg Met Pro Gln Ser Cys Val Gly Val Phe Asn Ala Tyr Gly  
 165 170 175

Leu Ser Asn Ser Ala Thr Val Pro His Phe  
 180 185

<210> 86  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 86

guuaccacuu guguagaugg cuuagaaa

28

<210> 87  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 87  
 guuaacugcc guauagcgag cuuagaaa 28

<210> 88  
 <211> 187  
 <212> PRT  
 <213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

<400> 88

Met Thr Val Gln Thr His Tyr Ile Glu Ile Lys Ala Ile Pro Gln Val  
 1 5 10 15

Asp Met Leu Gln Thr Glu Val Ile Gly Phe Cys Leu Gln Lys Leu His  
 20 25 30

Gln Ile Leu Pro His Phe Glu Gly Arg Ile Gly Leu Ala Phe Pro Ala  
 35 40 45

Tyr Gly Asn Asp Lys Thr Leu Gly Gly Ile Ile Arg Leu Phe Gly Thr  
 50 55 60

Glu Asn Asp Cys Gly Phe Ile His Phe Lys Leu Gln Ser Leu Arg Asp  
 65 70 75 80

Tyr Ala Leu Ile Ser Glu Val Met Pro Ile Pro Glu Lys Val Arg Ser  
 85 90 95

Tyr Arg Ile Tyr Gln Arg Ile Gln Pro Lys Gly Gln Ser Ser Ile Arg  
 100 105 110

Arg Ala Glu Lys Arg Leu Thr Ala Gln Gly Lys Trp Asn Glu Glu Val  
 115 120 125

Leu Gln Asn Met Leu Gln Lys Gln Ala Thr Gln Arg Ile Tyr Pro His  
 130 135 140

Ala His Leu Lys Ser Ser Ser Thr Lys Gln Gln Phe Ile Leu Ala Ile  
 145 150 155 160

Lys Ser Val His Gln Thr Lys Ala Val Glu Gly Val Phe Ser Ala Tyr  
 165 170 175

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

<210> 89  
 <211> 28  
 <212> RNA  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетический олигонуклеотид

&lt;400&gt; 89

cuucacugcc gaauaggcag cuuagaaa

28

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 199

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Marinomonas sp. MWYL1

&lt;400&gt; 90

Met Lys His Tyr Ile Asp Ile Thr Leu Leu Pro Ser Asp Asp Ile Gly

1 5 10 15

Val His Phe Leu Trp Ser Lys Leu Met Met Gln Val His Leu Ala Leu

20 25 30

Val Glu Ile Gln Asn Glu Gln Lys Gln Val Pro Val Ala Val Ser Phe

35 40 45

Pro Lys Tyr Gln Pro Arg Glu Asn Glu Lys Leu Gly Phe Val Gly Asn

50 55 60

Lys Leu Arg Leu Phe Ala Asn Asp Lys Thr Asp Leu Glu Arg Leu Asn

65 70 75 80

Phe Gly Lys Trp Leu His Arg Leu Glu Asp Tyr Val His Ile Lys Ser

85 90 95

Ile Ala Asp Val Pro Asn Asp Val Ile Ser Tyr Glu Ser Phe Asn Arg

100 105 110

Arg Ser Lys Ser Gly Ser Pro Asp Lys His Ile Lys Arg Arg Met Gln

115 120 125

Arg His Asn Glu Thr Trp Glu Gln Ala Ala Ala Phe Phe Lys Gly Tyr

130 135 140

Ser Met Glu Lys Ala Asp Lys Asp Leu Pro Phe Ile Arg Met Lys Ser

145 150 155 160

Leu His Ser Asp Asn Glu Phe Cys Met Ser Ile Ile Arg Lys Glu Ala

165 170 175

Ala Pro Ser Asn Lys His Ile Met Phe Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Ala

180 185 190

Glu Gly Val Leu Pro Lys Phe

195

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетический олигонуклеотид

&lt;400&gt; 91

guucgccgcc gagcacgccg cuuagaaa

28

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 190

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Dialister invisus

&lt;400&gt; 92

Met Glu Tyr Tyr Gln Glu Ile Thr Leu Leu Pro Cys Ala Glu Val Ser

1 5 10 15

Leu Ala Phe Leu Trp Thr Lys Val Phe Thr Gln Leu His Ile Ala Phe

20 25 30

Ala Asp Glu Lys Asn Lys Ser Gly His Asn Leu Tyr Ala Val Ser Phe

35 40 45

Pro Glu Tyr Arg Glu Thr Gly Leu Gly Glu Lys Ile Arg Val Phe Ala

50 55 60

Glu Ala Gln Glu Leu Glu Arg Leu Asn Leu Ser Lys Val Leu Gly Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Tyr Val His Cys Thr Ser Ile Arg Lys Val Pro Glu Arg

85 90 95

Lys Leu Arg Gly Tyr Ala Val Tyr Ser Arg Tyr Gln Pro Glu Gly Ser

100 105 110

Ile Trp Val Lys Ala Arg Arg Tyr Ala Lys Arg His Pro Gly Val Thr

115 120 125

Ile Glu Glu Ala Ala Arg Leu Leu Gln Gly Lys Arg Lys Ser Val Arg

130 135 140

Leu Pro Tyr Ile Gln Met Lys Ser Leu Ser Arg Gly Gly Thr Phe Ser

145 150 155 160

Leu Phe Ile Lys Lys Arg Val Glu Lys Glu Ser Ala Leu Thr Glu Cys

165 170 175

Gly Thr Tyr Gly Leu Ser Asn Asn Arg Thr Val Pro Glu Phe

180 185 190

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетический олигонуклеотид

&lt;400&gt; 93

guuaacugcc gcauagguag uuuaagaaa

28

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; RNA



<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 94

guuauucugcc guuuaggcag cuuagaaa

28

<210> 95

<211> 189

<212> PRT

<213> Actinobacillus pleuropneumoniae

<400> 95

Met Ser Glu Leu Thr His Tyr Ile Glu Leu Lys Ala Ile Pro Gln Val  
1 5 10 15

Asp Ile Leu Gln Thr Asp Val Ile Ala His Gly Leu Gln Ile Leu His  
20 25 30

Lys Phe Leu Pro Leu Tyr Gln Gly Glu Ile Gly Leu Ser Phe Pro Ala  
35 40 45

Tyr Gly Leu Gly Arg Thr Leu Gly Gly Ile Ile Arg Val Phe Gly Asn  
50 55 60

Glu Gln His Cys Thr Gln Ile Lys Thr Gln Leu Ile Gly Glu Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Asp Tyr Val Leu Ile Thr Ser Val Thr Pro Val Pro Glu Glu Ile  
85 90 95

Val Glu Tyr His Arg Tyr Gln Arg Val His Arg Lys Gly Gln Ser Ala  
100 105 110

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

Glu Ile Arg Gln Glu Met Leu Ile His Gln Gln Asn Gln Lys Val Phe  
130 135 140

Pro Tyr Val Lys Leu Lys Ser Gly Ser Thr Lys Gln His Phe Val Leu  
145 150 155 160

Ala Ile Arg Gln Leu Arg Leu Ala Glu Pro Ala Ser Gly Leu Phe Asn  
165 170 175

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

<210> 96

<211> 28

<212> RNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 96

cuucacugcc guauaggcag cuuagaaa

28

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 189

&lt;212&gt; PRT

<213> *Actinobacillus pleuropneumoniae*

&lt;400&gt; 97

Met Ser Glu Leu Thr His Tyr Ile Glu Leu Lys Ala Ile Pro Gln Val  
 1 5 10 15

Asp Ile Leu Gln Thr Asp Val Ile Ala His Gly Leu Gln Ile Leu His  
 20 25 30

Lys Phe Leu Pro Leu Tyr Gln Gly Glu Ile Gly Leu Ser Phe Pro Ala  
 35 40 45

Tyr Gly Leu Gly Arg Thr Leu Gly Gly Ile Ile Arg Val Phe Gly Asn  
 50 55 60

Glu Gln His Cys Thr Gln Ile Lys Thr Gln Leu Ile Gly Glu Gly Leu  
 65 70 75 80

Gln Asp Tyr Val Leu Ile Thr Ser Val Thr Pro Val Pro Glu Glu Ile  
 85 90 95

Val Glu Tyr His Arg Tyr Gln Arg Val His Arg Lys Gly Gln Ser Ala  
 100 105 110

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

Glu Ile Arg Gln Glu Met Leu Ile His Gln Gln Asn Gln Lys Val Phe  
 130 135 140

Pro Tyr Val Lys Leu Lys Ser Gly Ser Thr Lys Gln His Phe Val Leu  
 145 150 155 160

Ala Ile Arg Gln Leu Arg Leu Ala Glu Pro Val Ser Gly Leu Phe Asn  
 165 170 175

Ala Tyr Gly Leu Ser Lys Ile Ala Thr Val Pro His Phe  
 180 185

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 189

&lt;212&gt; PRT

<213> *Actinobacillus pleuropneumoniae*

&lt;400&gt; 98

Met Ser Glu Leu Thr His Tyr Ile Glu Leu Lys Ala Ile Pro Gln Val  
 1 5 10 15

Asp Ile Leu Gln Thr Asp Val Ile Ala His Gly Leu Gln Ile Leu His  
 20 25 30

Lys Phe Leu Pro Leu Tyr Gln Gly Glu Ile Gly Leu Ser Phe Pro Ala  
 35 40 45

Tyr Gly Leu Gly Arg Thr Leu Gly Gly Ile Ile Arg Val Phe Gly Asn  
50 55 60

Glu Gln His Cys Thr Gln Ile Lys Thr Gln Leu Ile Gly Glu Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Asp Tyr Val Leu Ile Thr Ser Val Thr Pro Val Pro Glu Glu Ile  
85 90 95

Val Glu Tyr His Arg Tyr Gln Arg Val His Arg Lys Gly Gln Ser Ala  
100 105 110

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

Glu Ile Arg Gln Glu Met Leu Ile His Gln Gln Asn Gln Lys Val Phe  
130 135 140

Pro His Val Lys Leu Lys Ser Gly Ser Thr Lys Gln His Phe Val Leu  
145 150 155 160

Ala Ile Arg Gln Leu Arg Leu Ala Glu Pro Ser Phe Gly Leu Phe Asn  
165 170 175

Thr Tyr Gly Leu Ser Lys Ile Ala Thr Val Pro His Phe  
180 185

<210> 99

<211> 189

<212> PRT

<213> Actinobacillus pleuropneumoniae

<400> 99

Met Ser Glu Leu Thr His Tyr Ile Glu Leu Lys Ala Ile Pro Gln Val  
1 5 10 15

Asp Ile Leu Gln Thr Asp Val Ile Ala His Gly Leu Gln Ile Leu His  
20 25 30

Lys Phe Leu Pro Leu Tyr Gln Gly Glu Ile Gly Leu Ser Phe Pro Ala  
35 40 45

Tyr Gly Leu Gly Arg Thr Leu Gly Gly Ile Ile Arg Val Leu Gly Asn  
50 55 60

Glu Gln His Cys Thr Gln Ile Lys Thr Gln Leu Ile Gly Glu Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Asp Tyr Val Leu Ile Thr Ser Val Thr Pro Val Pro Glu Glu Ile  
85 90 95

Val Glu Tyr His Arg Tyr Gln Arg Val His Arg Lys Gly Gln Ser Ala  
100 105 110

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

Glu Ile Arg Gln Glu Met Leu Ile His Gln Gln Asn Gln Lys Val Phe  
130 135 140

Pro His Val Lys Leu Lys Ser Gly Ser Thr Lys Gln His Phe Val Leu  
145 150 155 160

Ala Ile Arg Gln Leu Arg Leu Ala Glu Pro Ser Phe Gly Leu Phe Asn  
165 170 175

Thr Tyr Gly Leu Ser Lys Ile Ala Thr Val Pro His Phe  
180 185

<210> 100

<211> 201

<212> PRT

<213> Streptococcus thermophilus

<400> 100

Met Ser Lys Thr Met Ile Ile Gly Leu Thr Gly Gly Ile Ala Ser Gly  
1 5 10 15

Lys Ser Thr Val Val Glu Ile Ile Lys Asp Ala Gly Tyr Lys Val Ile  
20 25 30

Asp Ala Asp Gln Leu Val His Asp Met Gln Val Lys Gly Gly Arg Leu  
35 40 45

Tyr Gln Ala Leu Leu Asp Trp Leu Gly Asp Gly Ile Leu Leu Pro Asn  
50 55 60

Gly Glu Leu Asn Arg Pro Lys Leu Gly Gln Leu Ile Phe Ser Ser Glu  
65 70 75 80

Glu Met Arg Tyr Gln Ser Ala Glu Ile Gln Gly Lys Ile Ile Arg Glu  
85 90 95

Glu Leu Ala Ala Lys Arg Asp Cys Leu Ala Lys Glu Glu Asp Val Phe  
100 105 110

Phe Met Asp Ile Pro Leu Leu Phe Glu Asn Asp Tyr Gln Asp Trp Phe  
115 120 125

Asp Gln Ile Trp Leu Val Ala Val Ser Pro Gln Val Gln Gly Gln Arg  
130 135 140

Leu Met Lys Arg Asn His Leu Ser Ala Glu Glu Ala Gly Met Arg Ile  
145 150 155 160

Ala Ser Gln Met Pro Leu Ala Glu Lys Leu Pro Tyr Ala Ser Leu Val  
165 170 175

Ile Asp Asn Asn Gly Asn Ile Asp Asp Leu Lys Lys Lys Val Lys Gly  
180 185 190

Ala Ile Lys Asp Leu Ala Asn Leu Val  
195 200

<210> 101

<211> 187 .

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 101

023913

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

<210> 102  
<211> 187  
<212> PRT  
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 102

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

<210> 103  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 103  
guucacugcc guauaggcag 20

# ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения, облегчения симптомов, предотвращения прогрессирования или профилактики ожирения у млекопитающих, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей коэнзим Q10 или по меньшей мере один структурный элемент коэнзима Q10.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что коэнзим Q10 или по меньшей мере один структурный элемент коэнзима Q10 селективно вызывает в больных клетках млекопитающего переключение клеточного энергетического метаболизма в направлении нормализованного митохондриального окислительного фосфорилирования.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что коэнзим Q10 или по меньшей мере один структурный элемент коэнзима Q10, по существу, не вызывает в нормальных клетках млекопитающих переключения клеточного энергетического метаболизма в направлении митохондриального окислительного фосфорилирования.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что млекопитающим является человек (или не являющееся человеком млекопитающее).

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что ожирение поддается или чувствительно к воздействию коэнзима Q10, или его метаболитов, или аналогов.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что ожирение характеризуется дисрегуляцией функции митохондриального окислительного фосфорилирования, что приводит к изменению регуляции генов и/или взаимодействию белок-белок, что способствует или непосредственно приводит к ожирению.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один структурный элемент коэнзима Q10 включает:

(a) бензохинон или по меньшей мере одну молекулу, которая способствует биосинтезу бензохинонового кольца, и

(b) по меньшей мере одну молекулу, которая способствует синтезу и/или присоединению изопреноидных единиц к бензохиноновому кольцу.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что вышеупомянутая по меньшей мере одна молекула, которая способствует биосинтезу бензохинонового кольца, включает в себя L-фенилаланин, DL-фенилаланин, D-фенилаланин, L-тирозин, DL-тирозин, D-тирозин, 4-гидроксифенилпироват, 3-метокси-4-гидроксиманделат (ванилилманделата или VMA), ванилиновую кислоту, пиридоксин или пантенол.

9. Способ по п.7, отличающийся тем, что вышеупомянутая по меньшей мере одна молекула, которая способствует синтезу и/или присоединению изопреноидных единиц к бензохиноновому кольцу, включает в себя фенилацетат, 4-гидроксibenzoат, мевалоновую кислоту, ацетилглицин, ацетил-CoA или фарнезил.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один структурный элемент коэнзима Q10 включает:

(a) один или несколько из L-фенилаланина, L-тирозина и 4-гидроксифенилпировата;

(b) один или несколько из 4-гидроксibenzoата, фенилацетата и бензохинона.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что коэнзим Q10 или по меньшей мере один структурный элемент коэнзима Q10:

(a) ингибирует экспрессию Bcl-2 и/или стимулирует экспрессию каспазы-3 и/или

(b) ингибирует клеточную пролиферацию.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что концентрация коэнзима Q10 или по меньшей мере одного структурного элемента коэнзима Q10 в тканях человека, подвергающегося лечению, отличается от концентрации в контрольном стандарте ткани человека, находящегося в здоровом или нормальном состоянии.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что форма коэнзима Q10 или по меньшей мере одного структурного элемента коэнзима Q10, вводимого человеку, отличается от преобладающей формы, находимой в системе кровотока у человека.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что количество фармацевтической композиции, достаточное для лечения ожирения у человека:

a) повышающе регулирует или понижающе регулирует митохондриальное окислительное фосфорилирование или

b) модулирует анаэробное использование глюкозы и/или биосинтез лактата.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что лечение происходит благодаря взаимодействию коэнзима Q10 или по меньшей мере одного структурного элемента коэнзима Q10 с HNF4-альфа или трансальдозой.

16. Способ по п.1, где метаболическим нарушением является коэнзим Q10 или по меньшей мере один структурный элемент коэнзима Q10, действующий на окисление в митохондриях бета-клеток, уменьшающий размер адипоцитов и/или контролирующий уровни кортизола.

17. Способ избирательного усиления митохондриального окислительного фосфорилирования в больных клетках млекопитающих, нуждающихся в лечении ожирения, включающий введение вышеупомянутому млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей коэнзим Q10 или по меньшей мере один структурный элемент коэнзима Q10, тем самым избирательно усиливая митохондриальное окислительное фосфорилирование в вышеупомянутых больных клетках млекопитающего.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что дополнительно включает:

а) повышающее регулирование экспрессии одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из молекул, перечисленных в табл. 2-4, 6-28 и 63-68, имеющих позитивное кратное изменение; и/или понижающее регулирование экспрессии одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из молекул, перечисленных в табл. 2-4, 6-28 и 63-68, имеющих негативное кратное изменение; или

б) модулирование экспрессии одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из HNF4-альфа, Bcl-xl, Bcl-xS, BNIP-2, Bcl-2, Birc6, Bcl-2-L11, XIAP, 20 BRAF, Bax, c-Jun, Bmf, PUMA, cMyc, трансальдолазы 1, COQ1, COQ3, COQ6, пренилтрансферазы, 4-гидробензоата, цитозольного фактора нейтрофилов 2, синтазы оксида азота 2A, супероксиддисмутазы 2, VDAC, Bax канала, ANT, Цитохрома c, комплекса I, комплекса II, комплекса III, комплекса IV, Foxo 3a, DJ-1, IDH-1, Cpt1C и Cam киназы II.

19. Способ по п.1, отличающийся тем, что вышеупомянутое лечение, облегчение симптомов, предотвращение прогрессирования или профилактика ожирения приводят к снижению объема талии, снижению содержания внутреннего жира, снижению уровня триглицеридов в плазме натощак или повышению уровня липопротеина высокой плотности натощак.

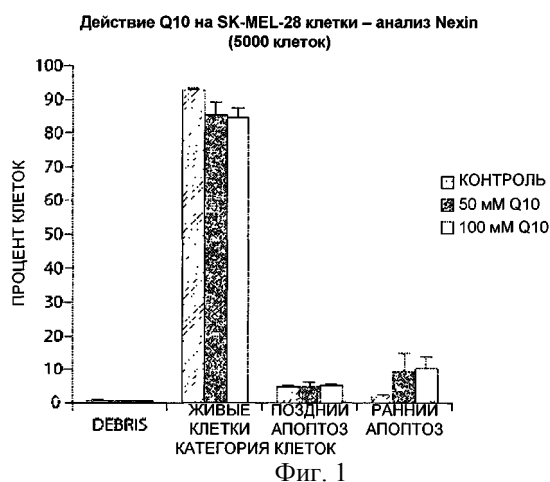
20. Способ по любому из пп.1, 17-19, отличающийся тем, что дополнительно включает введение дополнительного терапевтического агента.

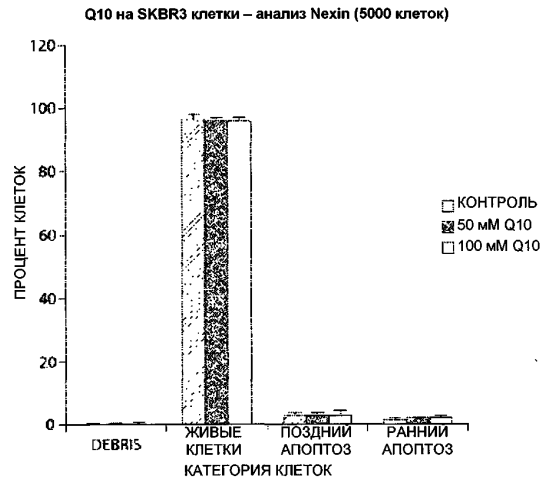
21. Способ по п.20, отличающийся тем, что дополнительный терапевтически агент выбирается из группы, состоящей из агентов для лечения сахарного диабета, агентов для лечения осложнений диабета, антигиперлипемических агентов, гипотензивных или антигипертензивных агентов, агентов от ожирения, диуретиков, химиотерапевтических агентов, иммунотерапевтических агентов и иммуносупрессоров.

22. Способ уменьшения уровней липидов у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей коэнзим Q10 или по меньшей мере один структурный элемент коэнзима Q10.

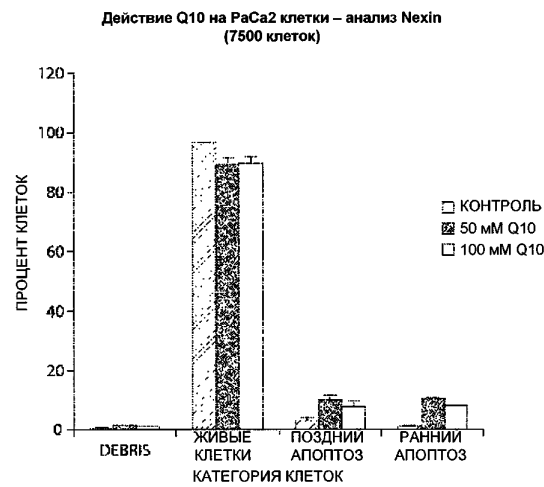
23. Способ лечения, облегчения симптомов, профилактики прогрессирования или предупреждения поддающегося воздействию коэнзима Q10 нарушения у млекопитающих, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей коэнзим Q10 или по меньшей мере один структурный элемент коэнзима Q10, где коэнзим Q10 или по меньшей мере один структурный элемент коэнзима Q10 избирательно вызывает в больных клетках млекопитающего переключение клеточного энергетического метаболизма в направлении уровней гликолиза и митохондриального окислительного фосфорилирования, наблюдаемых в нормальных клетках млекопитающих при нормальных физиологических условиях, где нарушением, поддающимся воздействию коэнзима Q10, является ожирение.

24. Способ по п.1, 17, 22 или 23, в котором фармацевтическая композиция содержит от 1 до 25 мас.% коэнзима Q10 или по меньшей мере одного структурного элемента коэнзима Q10.

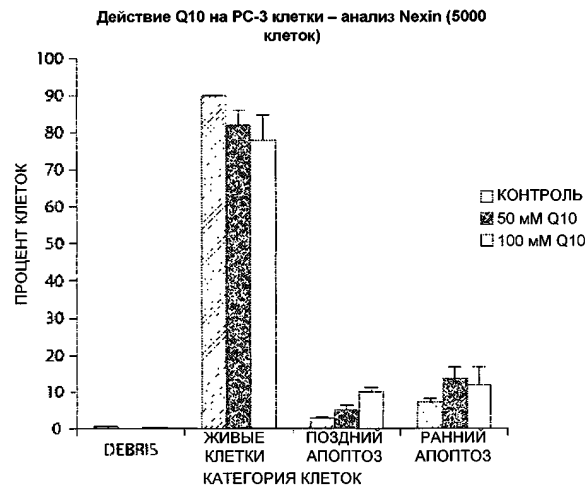




Фиг. 2



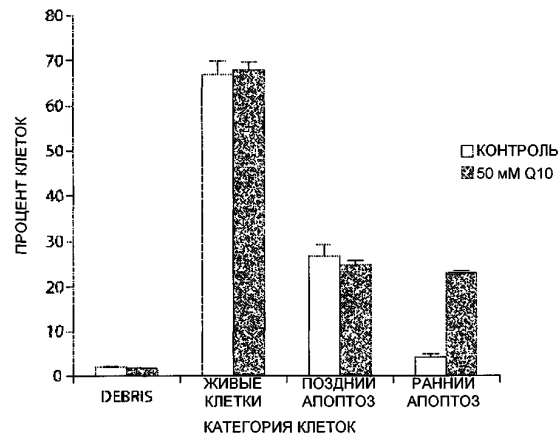
Фиг. 3



Фиг. 4

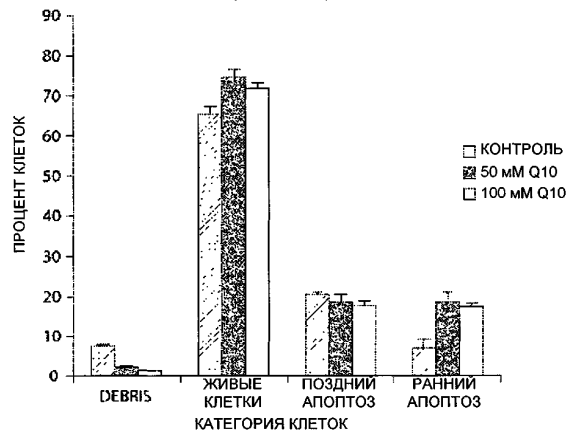


Действие Q10 на HepG2 клетки – анализ Nexin  
(7500 клеток)



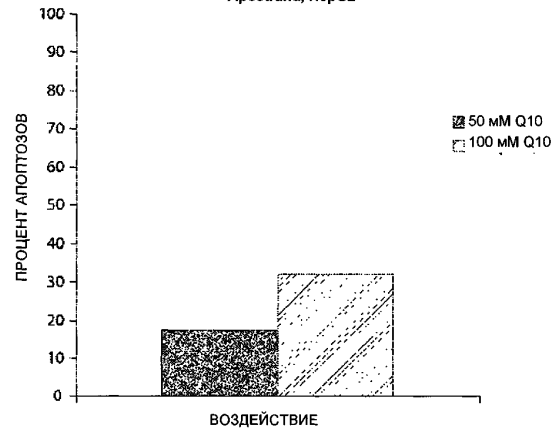
Фиг. 5

Действие Q10 на MCF-7 клетки – анализ Nexin  
(7500 клеток)



Фиг. 6

Апоптозы после воздействия Q10 - метод  
Apostrand, HepG2



Фиг. 7

The diagram illustrates the metabolic pathway of glycolysis (Гликолиз). It begins with D-глюкоза-6-Р (D-glucose-6-phosphate) at the top. A dashed arrow leads to Гликолиз (Glycolysis), which then leads to Рибитол (Ribitol). Another dashed arrow from D-глюкоза-6-Р leads to 2 НАД<sup>+</sup> and 2 НАДН, which are shown in a cycle with CO<sub>2</sub>. The main pathway proceeds through D-рибоза-5-Р (D-ribose-5-phosphate). From here, it branches into two main routes: the Transketolase (Транскетолaza) route and the Transaldolase (Трансальдaza) route. The Transketolase route involves D-ксилозу-5-Р (D-xylulose-5-phosphate) and D-рибоза-5-фосфат (D-ribose-5-phosphate), leading to D-ксилоза (D-xylulose) and D-рибоза (D-ribose). The Transaldolase route involves D-глицеральдегид-3-Р (D-glyceraldehyde-3-phosphate) and D-фруктоза-6-Р (D-fructose-6-phosphate), leading to D-эритроза-4-Р (D-erythrulose-4-phosphate) and D-эритроза (D-erythrulose). The D-эритроза-4-Р is further converted to Эритритол (Erythritol). The D-рибоза-5-фосфат is also converted to Рибитол. The D-рибоза is converted to Рибозитол (Ribositol). The D-ксилоза is converted to D-ксилозу-5-фосфат (D-xylulose-5-phosphate), which is then converted to D-арбитол (D-arabitol). The D-арбитол is further converted to Седогексипентол (Sedogexipentol), D-седогексипентоза (D-sedogexipentulose), D-мангексипентоза (D-mangexipentulose), and finally Персепитол (Persipitol).

```

graph TD
    D6P[D-глюкоза-6-Р] -.-> Glycolysis[Гликолиз]
    Glycolysis -.-> Ribitol[Рибитол]
    D6P -.-> NAD[2 НАД+ / 2 НАДН]
    NAD --> CO2[CO2]
    CO2 --> NAD
    D6P -.-> Rib5P[D-рибоза-5-Р]
    Rib5P --> Rib5P_F[D-рибоза-5-фосфат]
    Rib5P_F --> Ribitol
    Rib5P --> X5P[D-ксилозу-5-Р]
    X5P --> X5P_F[D-ксилозу-5-фосфат]
    X5P_F --> X5P_F_F[D-арбитол]
    X5P_F_F --> Sedogexipentol[Седогексипентол]
    Sedogexipentol --> Sedogexipentulose[D-седогексипентоза]
    Sedogexipentulose --> Mangexipentulose[D-мангексипентоза]
    Mangexipentulose --> Persipitol[Персепитол]
    Rib5P --> Gly3P[D-глицеральдегид-3-Р]
    Gly3P --> Fru6P[D-фруктоза-6-Р]
    Fru6P --> E4P[D-эритроза-4-Р]
    E4P --> E[Эритритол]
  
```

131 11

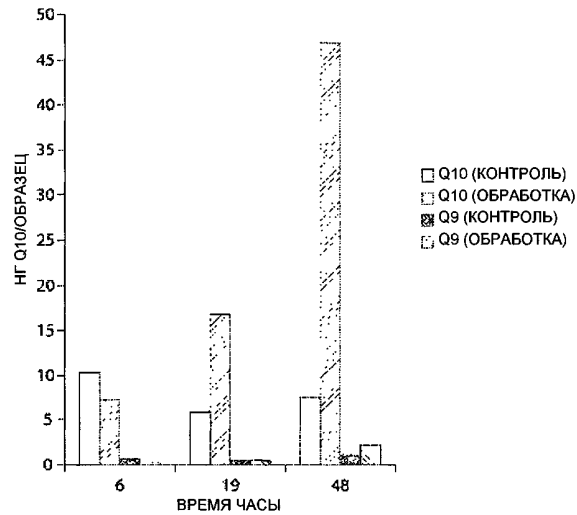
372

202 279

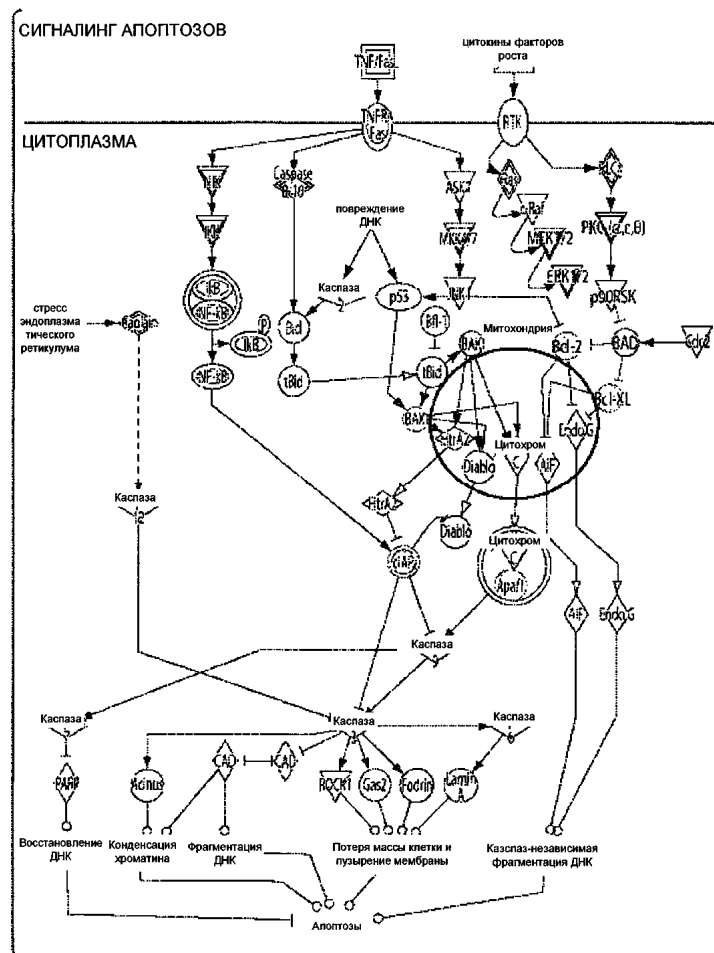
246 185

75

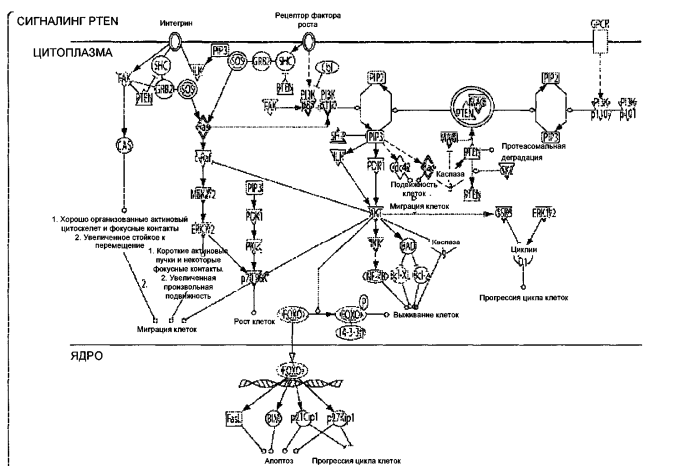
- 161 -



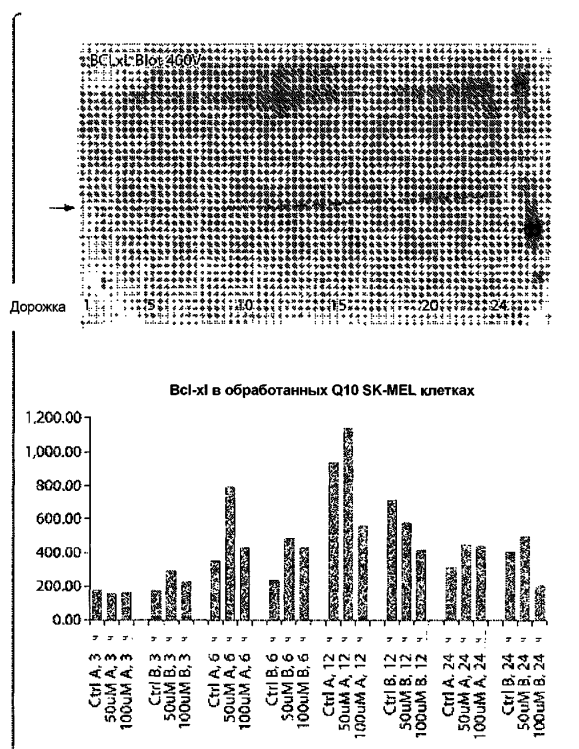
ФИГ. 12



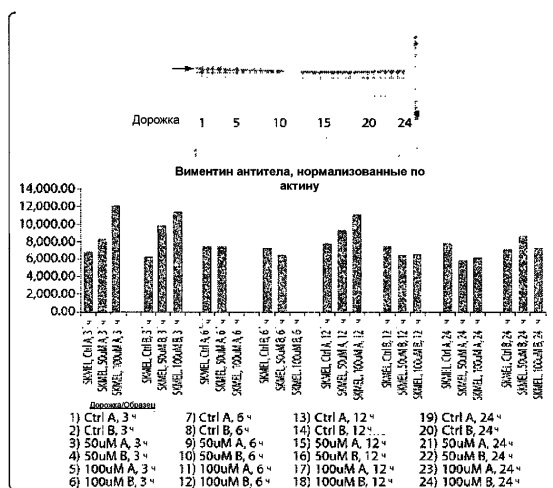
ФИГ. 13А



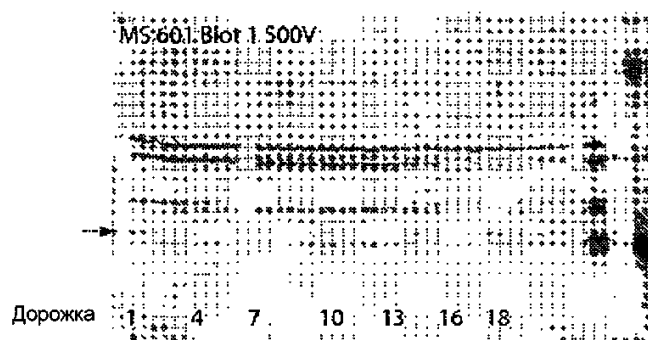
Фиг. 13В



Фиг. 14



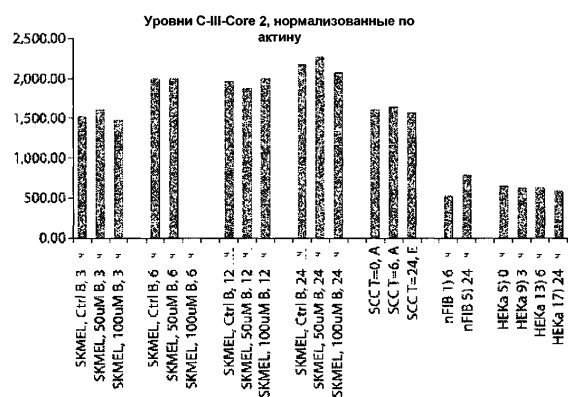
Фиг. 15



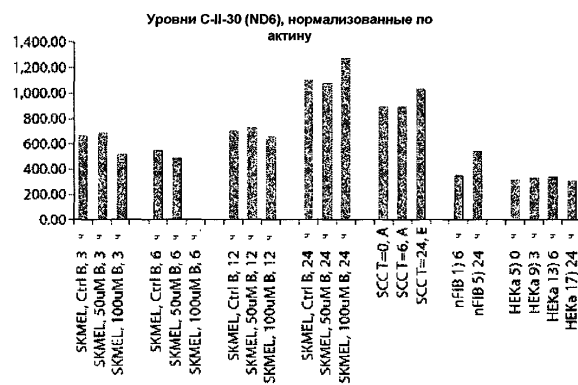
Фиг. 16



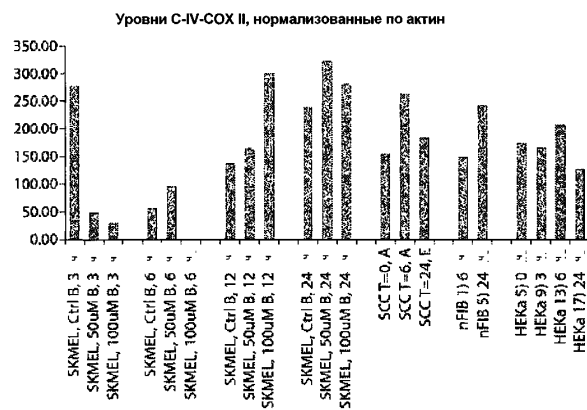
Фиг. 17



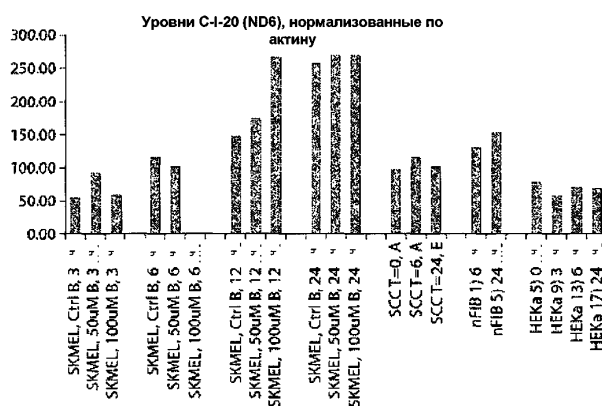
Фиг. 18



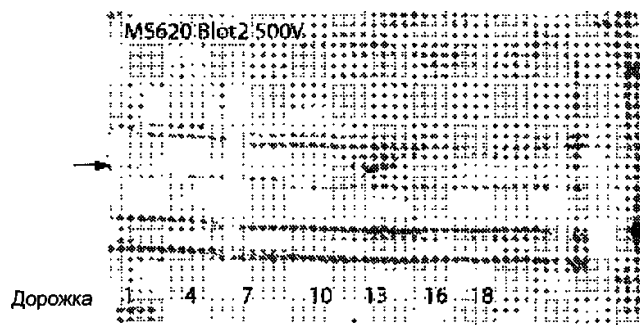
Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23



ФИГ. 24



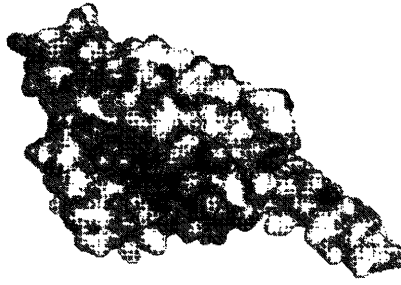
ФИГ. 25



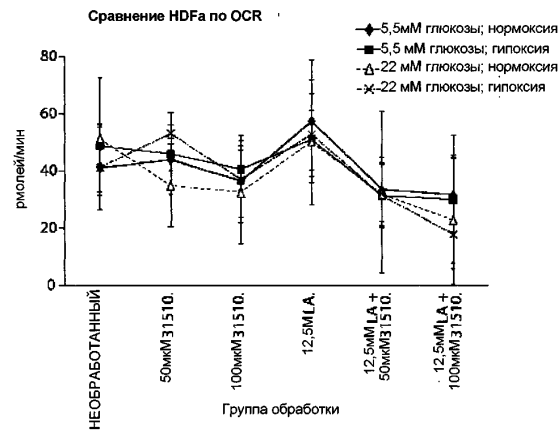
ФИГ. 26



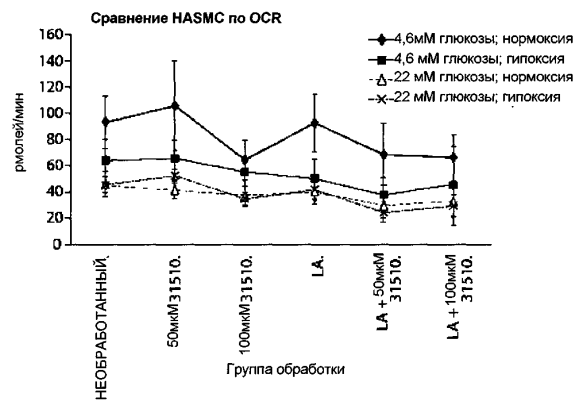
ФИГ. 27



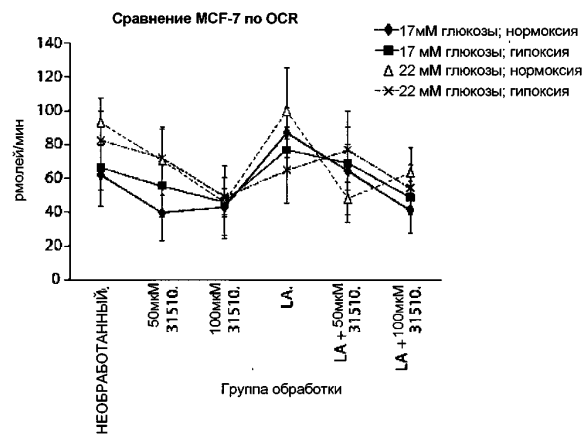
Фиг. 28



Фиг. 29

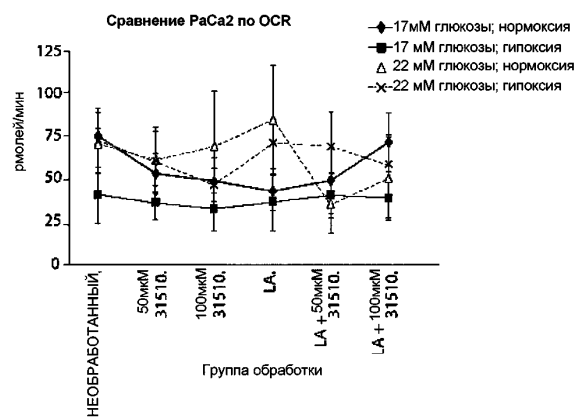


Фиг. 30



Фиг. 31





Фиг. 32



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2