

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 016584

(13) В1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2012.06.29

(21) Номер заявки

200900404

(22) Дата подачи заявки

2007.09.21

(51) Int. Cl. C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

A61K 31/4164 (2006.01)

C07D 233/54 (2006.01)

C07D 235/06 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

C07D 417/12 (2006.01)

(54) НОВЫЕ ГЕНЫ, РОДСТВЕННЫЕ ГЕНУ ГЛУТАМИНИЛЦИКЛАЗЫ

(31) 60/846,244; 60/947,780

(32) 2006.09.21; 2007.07.03

(33) US

(43) 2009.10.30

(86) PCT/EP2007/060013

(87) WO 2008/034891 2008.03.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПРОБИОДРУГ АГ (DE)

(72) Изобретатель:

Шиллинг Штефан, Цинис Хольгер,
Рафельд Йенс-Ульрих, Демут Ханс-
Ульрих (DE)

(74) Представитель:

Веселицкая И.А., Пивницкая Н.Н.,
Кузенкова Н.В., Веселицкий М.Б.,
Каксис Р.А., Комарова О.М., Белоусов
Ю.В. (RU)

(56) DATABASE EMBL 26 May 2006
(2006-05-26), SUZUKI Y. ET AL.: "Homo sapiens
mRNA for glutaminyl-peptide cyclotransferase-like
variant" XP002462494 Database accession no.
AK222636 nucleic acid sequence

DATABASE UniProt 5 September 2006
(2006-09-05), SUZUKI Y. ET AL.: "Glutaminyl-
peptide cyclotransferase-like variant" XP002462495
Database accession no. Q53HE4 amino acid sequence

DATABASE GENESEQ 29 July 2004
(2004-07-29), PENN S.G. ET AL.: "Human genome

derived single exon probe" XP002462496 Database
accession no. ACH86904 abstract

WO-A-2004098625

WO-A-2004098591

WO-A-2005039548

WO-A-2005075436

SCHILLING S. ET AL.: "Identification
of human glutaminyl cyclase as
a metalloenzyme. POTENT INHIBITION
BY IMIDAZOLE DERIVATIVES AND
HETEROCYCLIC CHELATORS" JOURNAL
OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN
SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS,
BIRMINGHAM, US, vol. 278, no. 50, 12
December 2003 (2003-12-12), pages 49773-49779,
XP002324506 ISSN: 0021-9258 abstract

BUCHHOLZ MIRKO ET AL.: "The
first potent inhibitors for human glutaminyl
cyclase: Synthesis and structure-activity relationship"
JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol.
49, no. 2, January 2006 (2006-01), pages 664-677,
XP002462493 ISSN: 0022-2623 the whole document
WO-A-2005049025

DATABASE CA [Online] CHEMICAL
ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US;
2005, OHSUGI, TADANORI ET AL: "Anti-platelet
aggregation and anti-blood coagulation activities of
dipicolinic acid, a sporal component of Bacillus
subtilis natto" XP002462497 retrieved from STN
Database accession no. 145:369541 abstract & FOOD
SCIENCE AND TECHNOLOGY RESEARCH
(2005), 11(3), 308-310 CODEN: FSTRFS;
ISSN: 1344-6606, 2005,

B1

016584

(57) В патente описаны новые белки, напоминающие глутаминилпептидциклотрансферазу (QPCTL),
которые являются изоизимами глутаминилциклизазы (QC, К.Ф. 2.3.2.5), и выделенные нуклеиновые
кислоты, кодирующие эти изоизимы, которые все можно применять для выявления новых
терапевтических агентов, измерения циклазной активности и для определения ингибирующей
активности соединений в отношении этих изоизимов глутаминилциклизазы.

016584
B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к новым белкам, напоминающим глутамилпептидциклотрансферазу (QPCTL), которые представляют собой изозимы глутамилциклизазы (QC, К.Ф. 2.3.2.5), и к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующими эти изозимы, которые все можно применять для разработки новых терапевтических агентов, для оценки циклазной активности и для определения ингибирующей активности соединений в отношении этих изозимов глутамилциклизазы.

Предпосылки создания изобретения

Глутамилциклизаза (QC, К.Ф. 2.3.2.5) катализирует внутримолекулярную циклизацию N-концевых остатков глутамина с образованием пироглутаминовой кислоты (pGlu*) с выделением в свободном состоянии аммиака. QC впервые была выделена Messer из латекса тропического растения Carica papaya в 1963 г. (Messer M., Nature 4874, 1963, с. 1299). Спустя 24 года соответствующая ферментативная активность была обнаружена в гипофизе животных (Busby W. H. J. и др., J Biol Chem 262, 1987, сс. 8532-8536; Fischer W. H. и Spiess J., Proc Natl Acad Sci USA 84, 1987, сс. 3628-3632). Касательно QC млекопитающих, превращение Gln в pGlu с помощью QC было обнаружено для предшественников TRH (тиреолиберин) и GnRH (гонадолиберин) (Busby W. H. J. и др., J Biol Chem 262, 1987, сс. 8532-8536; Fischer W. H. и Spiess J., Proc Natl Acad Sci USA 84, 1987, сс. 3628-3632). Кроме того, первые эксперименты по выявлению локализации QC позволили обнаружить ее совместную локализацию с предполагаемыми продуктами катализа в бычьем гипофизе, что является дополнительным доказательством ее участия в синтезе пептидных гормонов (Bockers T. M. и др. J. Neuroendocrinol 7, 1995, сс. 445-453). В противоположность этому, физиологическая функция растительной QC является менее изученной. Предполагается, что фермент из C. papaya играет роль в защите растений от патогенных микроорганизмов (El Moussaoui A. и др., Cell Mol Life Sci 58, 2001, сс. 556-570). В настоящее время на основе сравнительного анализа последовательностей были выявлены предполагаемые QC из других растений (Dahl S. W. и др., Protein Expr Purif 20, 2000, сс. 27-36). Однако физиологическая функция этих ферментов все еще остается неясной.

Известные выделенные из растений и животных QC обладают строгой специфичностью в отношении L-глутамина в N-концевом положении субстратов, и установлено, что их кинетические характеристики описываются уравнением Михаэлиса-Ментен (Pohl T. и др., Proc Natl Acad Sci USA 88, 1991, сс. 10059-10063; Consalvo A. P. и др., Anal Biochem 175, 1988, сс. 131-138; Gololobov M. Y. и др., Biol Chem Hoppe Seyler 377, 1996, сс. 395-398). Однако сравнение первичных структур QC из C. papaya и высококонсервативных QC млекопитающих не выявило никакой гомологии последовательностей (Dahl S. W. и др., Protein Expr Purif 20, 2000, сс. 27-36). В то время как растительные QC, вероятно, принадлежат к новому семейству ферментов (Dahl S. W. и др., Protein Expr Purif 20, 2000, сс. 27-36), установлено, что QC млекопитающих обладают выраженной гомологией последовательностей с бактериальными аминопептидазами (Bateman R. C. и др., Biochemistry 40, 2001, сс. 11246-11250), это позволило сделать заключение о различном эволюционном происхождении QC из растений и животных.

В настоящее установлено, что не рекомбинантная человеческая QC, а обладающие QC-активностью экстракти, выделенные из головного мозга, катализируют циклизацию как N-концевого глутаминила, так и глутамата. Более конкретно, установлено, что для катализируемого циклазой Glu₁-превращения оптимальным является значение pH, близкое к 6,0, а для Gln₁-превращения в pGlu производные оптимальным является значение pH, близкое к 8,0. Поскольку образование пептидов, родственных pGlu- $\text{A}\beta$, можно подавлять путем ингибирования рекомбинантной человеческой QC и QC-активности экстрактов, выделенных из гипофиза свиньи, то фермент QC является мишенью для разработки лекарственных средств, предназначенных для лечения болезни Альцгеймера.

В ЕР 02011349.4 описаны полинуклеотиды, кодирующие глутамилциклизазу насекомых, а также кодируемые ими полипептиды. В этой заявке описаны также клетки-хозяева, которые содержат экспрессионные векторы, несущие полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении. Выделенные полипептиды и клетки-хозяева, содержащие QC насекомых, применяют в методах скрининга агентов, которые снижают глутамилциклизазную активность. Такие агенты можно применять в качестве пестицидов.

Ингибиторы QC, которые можно применять также в качестве ингибиторов изозимов QC, описаны в WO 2004/098625, WO 2004/098591, WO 2005/039548 и WO 2005/075436, которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки, прежде всего в части, касающейся структуры ингибиторов, их применения и получения.

Определения

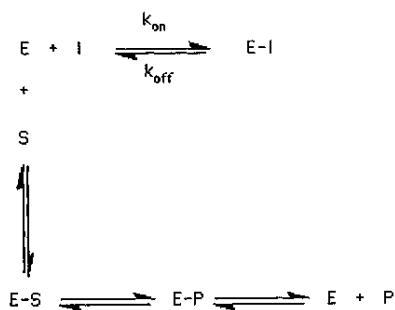
Ингибиторы ферментов

Обратимые ингибиторы ферментов: включают конкурентные ингибиторы, неконкурентные обратимые ингибиторы, медленно связывающиеся или прочно связывающиеся ингибиторы, аналоги переходного состояния и мультисубстратные аналоги.

Для конкурентных ингибиторов характерно:

- I) нековалентные взаимодействия с ферментом,
- II) конкуренция с субстратом за активный сайт фермента.

Основной механизм действия обратимого ингибитора фермента и определение константы диссоциации можно проиллюстрировать с помощью следующей схемы:



$$K_D = K_i = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Образование комплекса фермент-ингибитор [E-I] препятствует связыванию субстратов, в результате не может происходить реакция с образованием обычного физиологического продукта, Р. Более высокая концентрация ингибитора [I] приводит к более высокой концентрации [E-I], что обуславливает снижение уровня свободного фермента, с которым субстрат может связываться.

Для неконкурентных ингибиторов характерно:

- I) связывание в сайте, отличном от активного сайта (аллостерический сайт связывания),
- II) способность вызывать конформационное изменение в ферменте, которое снижает или прекращает катализическую активность.

Для медленно связывающихся или прочно связывающихся ингибиторов характерно:

- I) они представляют собой конкурентные ингибиторы, для которых характерно медленное достижение равновесия между ингибитором и ферментом,
- II) величина k_{on} соответствует медленному процессу, вероятно из-за конформационных изменений, которые должны происходить в ферменте или ингибиторе,
 - a) они часто представляют собой аналоги переходного состояния,
 - б) они обладают эффективностью при концентрации, близкой к концентрации фермента (субнаномолярные значения K_D),
 - в) из-за того, что значения k_{off} являются слишком низкими, эти типы ингибиторов являются "практически (почти) необратимыми".

Аналоги переходного состояния

Представляют собой конкурентные ингибиторы, которые имитируют переходное состояние фермента, катализирующего реакцию. Происходит ферментный катализ, приводящий к снижению энергии переходного состояния, в результате этого связывание в переходном состоянии является предпочтительным по сравнению со связыванием с субстратом.

Мультисубстратные аналоги

Для реакции, включающей два или большее количество субстратов, можно создавать конкурентный ингибитор или аналог переходного состояния, который имеет структурные характеристики, сходные с характеристиками двух или большего количества субстратов.

Необратимые ингибиторы ферментов

Во всех случаях сдвигают равновесие между несвязанным ферментом и ингибитором и комплексом фермент-ингибитор ($E+I \leftrightarrow E-I$) в сторону образования ковалентной связи (~100 ккал/моль), что делает ингибирование необратимым.

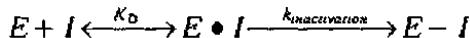
Агенты, действие которых основано на аффинности

Необратимые ингибиторы, связывающиеся с активным сайтом (мишенью которых является активный сайт) (конкурентные необратимые ингибиторы), распознаются ферментом (обратимое специфическое связывание) с последующим формированием ковалентной связи и

I) они обладают структурным сходством с субстратом, переходным состоянием или продуктом, что позволяет осуществлять специфическое взаимодействие между лекарственным средством и ферментом-мишенью,

II) содержат реактивную функциональную группу (например, нуклеофил, $-\text{COCH}_2\text{Br}$), что позволяет осуществлять формирование ковалентной связи.

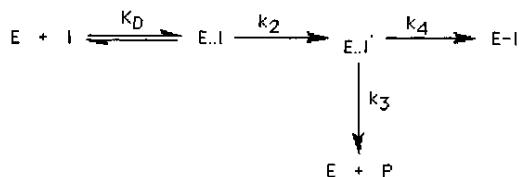
Приведенная ниже реакционная схема описывает взаимодействие реагента, связывающегося с активным сайтом, с ферментом-мишенью, где K_D обозначает константу диссоциации и $k_{inactivation}$ ($k_{inactivation}$) обозначает скорость образования ковалентной связи.



Инактиваторы, действие которых основано на механизме, связанном с ферментом (называемые также ингибиторы-“самоубийцы”), представляют собой связывающиеся с активным сайтом реагенты

(нереактивные), которые связываются с активным сайтом фермента, где они трансформируются в реактивную форму (активированную форму) под воздействием катализической активности фермента. После активации формируется ковалентная связь между ингибитором и ферментом.

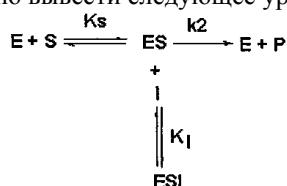
На приведенной ниже реакционной схеме показан механизм действия инактиватора, действие которого основано на механизме, связанном с ферментом, где K_D обозначает комплекс диссоциации, k_2 обозначает скорость активации ингибитора после связывания с ферментом, k_3 обозначает скорость диссоциации активированного ингибитора, P , из фермента (продукт может еще сохранять реактивность) и k_4 обозначает скорость формирования ковалентной связи между активированным ингибитором и ферментом.



Инактивация (формирование ковалентной связи, k_4) должна происходить до диссоциации (k_3), в противном случае реактивный ингибитор будет высвобождаться в окружающую среду. Коэффициент распределения, т.е. k_3/k_4 : т.е. соотношение высвободившегося продукта и инактивированного продукта, должен быть минимизирован для эффективной инактивации системы и получения минимальных нежелательных побочных реакций. Высокое значение коэффициента распределения (преобладающая диссоциация) приводит к неспецифическим реакциям.

Неконкурентные ингибиторы ферментов

Исходя из определения неконкурентного ингибитора (ингибитор, который связывается только с ES-комплексами (субстрат-фермент)), можно вывести следующее уравнение:



Для диссоциации субстрата из ES-комплекса характерно значение константы диссоциации, равное K_s , в то время как диссоциация комплекса ESI не происходит (т.е. значение K_s равно нулю). Ожидается, что значения K_m для ферментов, действие которых удовлетворяет уравнению скорости ферментативной реакции Михаэлиса-Ментен, будет пониженным. Повышение концентрации субстрата приводит к повышению концентрации ESI (из комплекса не может происходить образование продуктов реакции), поэтому не происходит прекращение ингибирования.

Предпочтительными согласно настоящему изобретению являются конкурентные ингибиторы ферментов. Наиболее предпочтительными являются обратимые конкурентные ингибиторы ферментов.

Понятия " K_i " или " K_I " и " K_D " относятся к константам связывания, которые характеризуют связывание ингибитора с ферментом и последующее высвобождение из фермента. Другой мерой является значение " IC_{50} ", отражающее концентрацию ингибитора, которая при данной концентрации субстрата приводит к 50%-ному ингибированию активности фермента.

Понятие "QC" в контексте настоящего описания обозначает глутамилцилазу (QC), синонимом которой является глутамилпептидцилотрансфераза (QPCT); и QC-подобные ферменты, синонимом которых являются белки, напоминающие глутамилпептидцилотрансферазу (QPCTL). QC и QC-подобные ферменты имеют идентичную или сходную ферментативную активность, обозначенную далее как QC-активность. Следует отметить, что QC-подобные ферменты могут принципиально отличаться от QC по молекулярной структуре.

Понятие "QC-активность" в контексте настоящего описания обозначает каталитическую активность как глутамилцилазы (QC, QPCT), так и QC-подобных ферментов (QPCTL). Эти ферменты обнаружены в различных тканях организма млекопитающих, включая почку, печень, кишечник, головной мозг и жидкости организма, такие как СМЖ (спинномозговая жидкость), где они осуществляют высоко специфическую циклизацию глутамина или глутамата на N-конце биологически активных пептидов.

В частности, понятие "QC-активность" в контексте настоящего описания обозначает внутримолекулярную циклизацию N-концевых остатков глутамина с образованием пироглутаминовой кислоты (pGlu*) или N-концевого L-гомоглутамина или L-β-гомоглутамина с образованием циклического пирогомоглутаминового производного с выделением в свободном состоянии аммиака (см. ниже схемы 1 и 2).

Схема 1. Циклизация глутамина с помощью QC
пептид

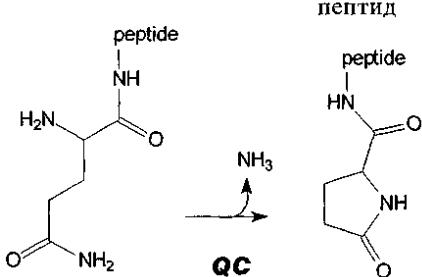
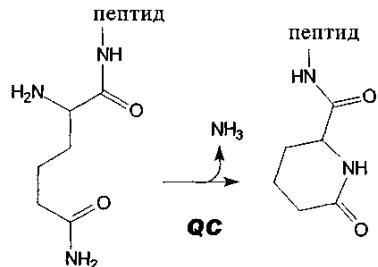


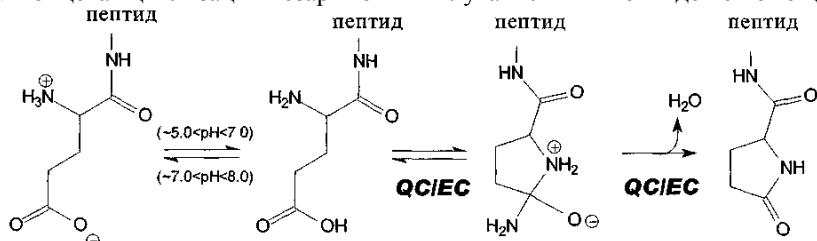
Схема 2. Циклизация L-гомоглутамина с помощью QC



Понятие "ЕС" в контексте настоящего описания относится к побочной активности глутаминилцилазы (QC, QPCT) и QC-подобных ферментов (QPCTL), таких как глутаматцилаза (ЕС), которая обозначена далее как ЕС-активность.

Понятие "ЕС-активность" в контексте настоящего описания обозначает внутримолекулярную циклизацию N-концевых глутаматных остатков с образованием пироглутаминовой кислоты (pGlu*) с помощью глутаминилцилазы (QC, QPCT) и QC-подобных ферментов (QPCTL) (см. ниже схему 3).

Схема 3. N-Концевая циклизация незаряженных глутамильных пептидов с помощью QC (ЕС)



Понятие "ингибитор QC" или "ингибитор глутамилилцилазы" хорошо известно специалистам в данной области и означает ферментные ингибиторы, которые ингибируют каталитическую активность глутамилилцилазы (QC, QPCT) или QC-подобных ферментов (QPCTL) или их глутамилилцилазную (ЕС) активность, предпочтительно путем непосредственного взаимодействия ингибитора с ферментом.

Понятие "избирательный QC-ингибитор" в контексте настоящего описания обозначает ферментные ингибиторы, которые ингибируют каталитическую активность глутамилилцилазы (QC, QPCT), но не ингибируют или ингибируют с меньшей эффективностью по меньшей мере один из QC-подобных ферментов (QPCTL). Предпочтительными являются избирательные QC-ингибиторы, ингибирование которыми глутамилилцилазы (QC, QPCT) характеризуется значением k_i , которое на один порядок ниже значения k_i , характеризующего ингибирование по меньшей мере одного из QC-подобных ферментов (QPCTL). Более предпочтительно значение k_i для избирательного QC-ингибитора, характеризующее ингибирование глутамилилцилазы (QC, QPCT), на два порядка ниже значения k_i , характеризующего ингибирование по меньшей мере одного из QC-подобных ферментов (QPCTL). Еще более предпочтительно значение k_i для избирательных QC-ингибиторов, характеризующее ингибирование глутамилилцилазы (QC, QPCT), на три порядка ниже значения k_i , характеризующего ингибирование по меньшей мере одного из QC-подобных ферментов (QPCTL). Наиболее предпочтительными являются избирательные QC-ингибиторы, которые не ингибируют QC-подобные ферменты (QPCTL).

Понятие "избирательный QPCTL-ингибитор" в контексте настоящего описания обозначает ферментные ингибиторы, которые ингибируют каталитическую активность по меньшей мере одного QC-подобного фермента (QPCTL), но не ингибируют или ингибируют с меньшей эффективностью активность глутамилилцилазы (QC, QPCT). Предпочтительными являются QPCTL-ингибиторы, ингибирование которыми по меньшей мере одного QC-подобного фермента (QPCTL) характеризуется значением k_i , которое на один порядок ниже значения k_i , характеризующего ингибирование глутамилилцилазы (QC, QPCT). Более предпочтительно значение k_i для избирательного QPCTL-ингибитора, характеризующее ингибирование по меньшей мере одного QC-подобного фермента (QPCTL), на два порядка ниже значе-

ния k_i , характеризующего ингибицию глутамилцилазы (QC, QPCT). Еще более предпочтительно значение k_i для избирательных QPCTL-ингибиторов, характеризующее ингибицию по меньшей мере одного QC-подобного фермента (QPCTL), на три порядка ниже значения k_i , характеризующего ингибицию глутамилцилазы (QC, QPCT). Наиболее предпочтительными являются избирательные QPCTL-ингибиторы, которые не ингибируют активность глутамилцилазы (QC, QPCT).

Эффективность ингибиции QC

С учетом корреляции с ингибиением QC в предпочтительных вариантах осуществления изобретения, заявляемом способе и при медицинском применении используют агент, ингибиование которым QC характеризуется значением K_i 10 μ M или менее, более предпочтительно 1 μ M или менее, еще более предпочтительно 0,1 μ M или менее или 0,01 μ M или менее или наиболее предпочтительно 0,01 μ M или менее. Фактически, рассматриваются ингибиторы, для которых значения K_i , составляют менее микромоля, предпочтительно находятся на наномолярном уровне или еще более предпочтительно на пикомолярном уровне. Таким образом, хотя представленные в настоящем описании активные агенты для удобства обозначены как "QC-ингибиторы", должно быть очевидно, что согласно изобретению такая номенклатура не ограничена каким-либо конкретным механизмом действия.

Молекулярная масса ингибиторов QC

В целом, ингибиторы QC, которые используют в заявляемом способе или в медицине, должны представлять собой небольшие молекулы, например, с молекулярной массой 1000 г/моль или менее, 500 г/моль или менее, предпочтительно 400 г/моль или менее и еще более предпочтительно 350 г/моль или менее и наиболее предпочтительно 300 г/моль или менее.

Понятие "индивидуум" в контексте настоящего описания относится к животному, предпочтительно млекопитающему, наиболее предпочтительно человеку, которого подвергают лечению, наблюдению или экспериментальной обработке.

Понятие "терапевтически эффективное количество" в контексте настоящего описания означает количество действующего вещества или фармацевтического агента, вызывающее биологический или медицинский ответ в тканевой системе животного или человека, который требуется получить исследователю, ветеринару или врачу или другому клиницисту, включающий облегчение симптомов заболевания или нарушения, подлежащего лечению.

В контексте настоящего описания понятие "фармацевтически приемлемый" относится к применению, как для лечения человека, так и в ветеринарии: например, к "фармацевтически приемлемым" относятся приемлемое для ветеринарии соединение или соединение, приемлемое для медицины и медико-санитарной помощи человеку.

Синдром Гийена-Барре (GBS)

Другими названиями являются синдром Ландри-Гийена-Барре, острый идиопатический полиневрит, инфекционный полиневрит или острые воспалительные полиневропатии.

Синдром Гийена-Барре представляет собой серьезное нарушение, которое возникает, когда защитная (иммунная) система организма ошибочно атакует часть нервной системы. Это приводит к воспалению нервов, что вызывает мышечную слабость, которая продолжает усугубляться.

Синдром Гийена-Барре представляет собой аутоиммунное нарушение. Точная причина синдрома Гийена-Барре неизвестна. Синдром может возникать в любом возрасте, но наиболее часто им страдают люди обоих полов в возрасте от 30 до 50 лет. Он часто возникает после небольшой инфекции, как правило, респираторной (легочной) инфекции или желудочно-кишечной (кишечной) инфекции. Обычно признаки первичной инфекции исчезают до возникновения симптомов синдрома Гийена-Барре. Синдром Гийена-Барре связан с воспалением, которое поражает часть нервов. Это поражение нервов вызывает покалывание, мышечную слабость и паралич. Воспаление, как правило, поражает покрытие нерва (миелиновую оболочку). Такое поражение называют демиелинизацией. Демиелинизация замедляет передачу сигналов нервом. Поражение других частей нервной системы может вызывать прекращение работы нерва.

Симптомы синдрома Гийена-Барре очень быстро развиваются. Для достижения наиболее серьезных симптомов может потребоваться всего несколько часов. Мышечная слабость или потеря мышечной функции (паралич) поражает обе стороны тела. Если мышечная слабость сначала появляется в ногах и затем быстро распространяется на руки, то ее называют восходящим параличом.

Пациенты могут ощущать покалывание, боль в ногах или руках и ощущение неповоротливости. По мере потери мышечной функции пациентам может потребоваться вспомогательное дыхание.

В настоящее время не существует путей исцеления синдрома Гийена-Барре. Однако многие варианты лечения могут способствовать снижению симптомов, лечению осложнений и ускорению восстановления. Когда симптомы являются серьезными, пациента необходимо помешать в больницу для осуществления вспомогательного дыхания, лечения и физиотерапии. Метод, называемый плазмофорез, применяют для изъятия у пациента крови и замены ее на внутривенные жидкости или донорскую кровь, свободную от антител. Лечение высокими дозами иммуноглобулинов представляет собой еще одну процедуру, которую применяют для снижения серьезности и продолжительности синдрома Гийена-Барре. Другие варианты лечения направлены на предупреждение осложнений.

Хроническая воспалительная демиелинизирующая полирадикулоневропатия (CIDP)

Заболевание, напоминающее GBS, но характеризующееся хроническим течением, называют хронической воспалительной демиелинизирующей полирадикулоневропатий (CIDP). Пока не существует общепринятого определения CIDP за исключением того, что установлено, что в отличие от GBS, фаза развития продолжается более 4 недель, часто более 6 месяцев, и что дефекты у пациентов часто сохраняются. Механизм, обуславливающий серьезный парез при GBS и CIDP, вероятно, включает иммунную реакцию и воспаление, опосредуемое Т-лимфоцитами, после чего возникает демиелинизация периферических нервов. Это предположение подтверждается тем, что в сыворотке и спинномозговой жидкости страдающих GBS пациентов обнаружены повышенные количества комплементов и цитокинов. Процесс демиелинизации, прежде всего в области нервных корешков, в настоящее время рассматривается как имеющий решающее значение механизм в развитии блокады нервной проводимости. Одна из теорий основана на том, что нарушение барьерной функции крови/спинномозговой жидкости (СМЖ) (гемато/СМЖ-барьер) рассматривается как относительно ранняя важная стадия развития заболевания. Другая теория основана на предположении, что в результате заболевания в гемато/СМЖ-барьере образуются "протечки", и это приводит к повышенному содержанию белков в СМЖ. В любом варианте неспецифические компоненты сыворотки, не имеющие прямого отношения к иммунной системе, могут проникать в СМЖ из крови, вызывая дисфункции нейронов или глии и/или модификацию нейронной активности. Альтернативный механизм заключается в снижении скорости потока СМЖ, что может объяснять повышенное содержание белка в СМЖ. Такая интерпретация не предусматривает никакого нарушения или модификации избирательности гемато/СМЖ-барьера. Хотя все указанные выше явления могут быть важными для развития GBS и CIDP, их точная роль в развитии симптомов пока остается не ясной. Пока не удалось установить связь между повышенными концентрациями белков в СМЖ и специфическими электрофизиологическими параметрами или клинической картиной. Недавно описаны факторы, присутствующие в СМЖ страдающих GBS пациентов и страдающих рассеянным склерозом пациентов, которые связаны с зависящими от потенциала натриевыми каналами (Wüz и др., Muscle and Nerve 18, 1995, сс. 772-781). Brinkmeier (Brinkmeier и др., Muscle and Nerve 19, 1996, сс. 54-62) установили, что эти факторы имеют молекулярную массу менее 3 кДа, а при использовании более строгих условий оценки менее 1 кДа. На основе этого наблюдения и данных о том, что активность факторов не снижается существенно даже после инкубации СМЖ с протеазами, вышеуказанные авторы сделали заключение о том, что факторы не представляют собой ни антитела, ни цитокины.

Рассеянный склероз (MS)

Рассеянный склероз представляет собой аутоиммунное заболевание, которое поражает центральную нервную систему (головной мозг и спинной мозг). Рассеянный склероз, как правило, чаще поражает женщин, чем мужчин. Нарушение наиболее часто начинается между 20 и 40 годами, но может возникать в любом возрасте. Точная его причина неизвестна, но, вероятно, MS является результатом поражение миелиновой оболочки, защитного материала, окружающего нервные клетки. Он представляет собой прогрессирующее заболевание, т.е. поражение усиливается с течением времени. Воспаление разрушает миелин, оставляя многочисленные области рубцовой ткани (склероз). Воспаление возникает, когда собственные иммунные клетки организма атакуют нервную систему. Воспаление приводит к тому, что нервные импульсы замедляются или блокируются, что приводит к симптомам MS. Повторяющиеся эпизоды или внезапное обострение воспаления может происходить в любой области головного и спинного мозга. Симптомы варьируются, поскольку локализация и степень атаки каждый раз изменяются. Как правило, эпизоды, сохраняющиеся в течение дней, недель или месяцев, чередуются с периодами со сниженными симптомами или бессимптомными периодами (ремиссия). Рецидивы являются обычными, хотя также может иметь место не прекращающееся развитие без периодов ремиссии.

Не ясно, что инициирует атаки. Пациенты, страдающие MS, как правило, имеют более высокое содержание иммунных клеток по сравнению со здоровым человеком, это позволяет предположить, что может играть роль иммунный ответ. Наиболее распространенные теории основываются на связанном с вирусами или генном дефекте или на комбинации их обоих. Существует также вероятность того, что заболевание имеет генетическую природу. MS существенно чаще встречается в северной Европе, северных Соединенных Штатах, южной Австралии и Новой Зеландии, чем в других зонах. Географические исследования свидетельствуют о возможном участии факторов окружающей среды. Люди с семейным анамнезом MS и живущие в географической зоне, в которой более высокая встречаемость MS, имеют более высокий риск возникновения заболевания.

К настоящему времени отсутствуют данные об исцелении рассеянного склероза. Однако ряд путей лечения могут замедлять развитие заболевания. Целью лечения является контроль симптомов и поддержание нормального качества жизни.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к белкам, обладающим глутамилцилазной активностью, которые являются новыми представителями семейства белков, родственных глутамилцилазе, включая полноразмерные белки, формы, полученные в результате альтернативного сплайсинга, субъединицы и мутанты, а также к нуклеотидным последовательностям, кодирующими их. Настоящее изобретение отно-

сится также к способам скрининга субстратов, взаимодействующих белков, агонистов, антагонистов или ингибиторов вышеуказанных белков, а также к фармацевтическим композициям, которые содержат белки и/или их мутанты, производные и/или аналоги и/или лиганды.

Эти новые белки, имеющие последовательности, практически подобные последовательности глутамилцилазы (нуклеотидная последовательность представлена в SEQ ID NO: 1, белковая последовательность представлена в SEQ ID NO: 10), представляют собой белки (QPCTL), полученные из организма человека (обозначены также как человеческий isoQC) (GenBank, регистрационный № NM_017659), мыши (GenBank, регистрационный № NM_027455), Macaca fascicularis (макак-крабоед) (GenBank, регистрационный № AB168255), Macaca mulatta (макак-резус) (GenBank, регистрационный № XM_001110995), кошки (GenBank, регистрационный № XM_541552), крысы (GenBank, регистрационный № XM_001066591), коровы (GenBank, регистрационный № BT026254), или их аналоги, последовательности которых идентичны/подобны по меньшей мере на 50/75% указанным последовательностям, предпочтительно идентичны/подобны на 70/85%, наиболее предпочтительно идентичны/подобны на 90/95%.

Белковые последовательности представлены в SEQ ID NO: 11-18. Кроме того, описаны нуклеотидные последовательности, кодирующие эти белки (SEQ ID NO: 2-9). В табл. 1 проиллюстрировано подобие между новыми белками и известной глутамилцилазой. В табл. 2 проиллюстрирована идентичность между новыми белками и известной глутамилцилазой.

Таблица 1. Подобие белковых последовательностей новых напоминающих глутамилпептидциклотрансфераз белков и глутамилцилазы

Источник QPCTL	Человеческий белок isoQC (SEQ ID NO: 11)	Человеческая QC (SEQ ID NO: 10)
человеческий белок isoQC (SEQ ID NO: 11)	-	71,98%
<i>M. fascicularis</i> (SEQ ID NO: 13)	99,48%	72,24%
<i>M. mulatto</i> (SEQ ID NO: 14)	99,48%	72,24%
<i>C. familiaris</i> (SEQ ID NO: 15)	95,82%	72,31%
Источник QPCTL	Человеческий белок isoQC (SEQ ID NO: 11)	Человеческая QC (SEQ ID NO: 10)
<i>R. norvegicus</i> (SEQ ID NO: 16)	95,30%	70,77%
<i>M. musculus</i> (SEQ ID NO: 17)	95,04%	70,77%
<i>B. taurus</i> (SEQ ID NO: 18)	96,08%	72,31%

Таблица 2. Идентичность белковых последовательностей новых напоминающих глутамилпептидциклотрансфераз белков и глутамилцилазы

Источник QPCTL	Человеческий белок isoQC (SEQ ID NO: 11)	Человеческая QC (SEQ ID NO: 10)
человеческий белок isoQC (SEQ ID NO: 11)	-	45,24%
<i>M. fascicularis</i> (SEQ ID NO: 13)	98,17%	44,99%
<i>M. mulatto</i> (SEQ ID NO: 14)	98,17%	44,99%
<i>C. familiaris</i> (SEQ ID NO: 15)	88,51%	45,13%
<i>R. norvegicus</i> (SEQ ID NO: 16)	84,33%	45,38%
<i>M. musculus</i> (SEQ ID NO: 17)	84,07%	44,62%
<i>B. taurus</i> (SEQ ID NO: 18)	84,60%	45,64%

Обнаружена высокая степень подобия, находящаяся на уровне 95-99%, и высокая степень идентичности, находящаяся на уровне 84-98%, между QPCTL из различных источников (см. фиг. 2). На основе подобия последовательностей человеческой и мышиной глутамилциклизы (см. фиг. 1), можно предположить, что эти QPCTL должны иметь функции, которые включают (но, не ограничиваясь только ими) их роль в качестве ферментов. Характеристики, полученные при клонировании, экспрессии, биохимическом и молекулярном анализе, подтверждают эту гипотезу.

Схема экспрессии QPCTL в ткани головного мозга, предстательной железы и легкого согласуется с их ролью в описанных ниже заболеваниях.

Ферментативная активность в качестве глутамилциклизы демонстрирует, что активирующие или ингибирующие QPCTL молекулы должны найти различное терапевтическое применение, что будет описано ниже.

Различные виды активности QPCTL, представленные в настоящем описании, и схемы их экспрессии сопоставимы с их функциональными ролями в качестве физиологических регуляторов иммунной и нейроэндокринной систем посредством ферментативной модификации биохимических медиаторов типа гормонов, пептидов и хемокинов. Многочисленные функции QC, описанные ранее на основе применения ингибиторов, могут быть частично обусловлены ее активностью и активностью подобных ей белков типа QPCTL. Таким образом, исследование избирательных и эффективных ингибиторов QC, QPCTL и других родственных ферментов считается основным для достижения эффективного и безопасного фармацевтического применения этих и любых, вновь идентифицированных глутамилпептидилтрансфераз, а также других активных соединений, которые модифицируют функцию(и) этих белков.

Таким образом, изобретение относится к новым белкам или полипептидам, кодирующими их нуклеиновым кислотам, клеткам, модифицированным нуклеиновой кислотой таким образом, чтобы они экспрессировали указанные белки, антителам к этим белкам, способу скринингу для выявления новых терапевтических агентов, которые ингибируют активность этих белков (или которые являются ингибиторами QC, а не этих белков), и к терапевтическим агентам, обнаруженным с помощью указанных способов скрининга. Новые белки и кодирующие их нуклеиновые кислоты можно применять для выявления новых терапевтических агентов, предназначенных для лечения определенных болезней, таких, например, как нейродегенеративных, репродуктивных, воспалительных и метаболических нарушений, а также для получения антител, имеющих терапевтическое или диагностическое значение.

Одним из объектов настоящего изобретения являются новые, зрелые, обладающие биологической активностью белки, преимущественно человеческого происхождения. Такие белки можно выделять в небольших количествах из тканей или биологических жидкостей пригодного животного (включая человека) с помощью стандартных методов; однако более крупные количества принято получать в культурах клеток, генетически модифицированных с целью экспрессии белка.

Другим объектом настоящего изобретения являются выделенные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды, предлагаемые в настоящем изобретении, включая мРНК, ДНК, кДНК, геномные ДНК.

Следующим объектом настоящего изобретения являются также нуклеиновые кислоты-зонды, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, длина которых является достаточной для того, чтобы гибридизоваться с нуклеотидными последовательностями, предлагаемыми в настоящем изобретении.

Еще одним объектом настоящего изобретения являются способы применения методов рекомбинации для получения указанных полипептидов, которые можно применять для научных исследований *in vitro*, например синтеза ДНК и создания ДНК-векторов. Пути получения указанных полипептидов включают культивирование рекомбинантных прокариотических и/или эукариотических клеток-хозяев, трансфектированных ДНК-векторами, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие указанный полипептид и/или зрелый белок, в условиях, усиливающих экспрессию указанного белка, и последующее выделение указанного белка или фрагмента экспрессируемого продукта.

И еще одним объектом изобретения являются способы применения полипептидов и полинуклеотидов QPCTL для лечения болезней.

Таким образом, следующим объектом настоящего изобретения является способ применения указанных полипептидов или полинуклеотидов, кодирующих указанные полипептиды, для выявления соединений, которые ингибируют биологическую активность зрелых белков, например, активность QC или активность EC, а также сами указанные ингибиторы.

Более конкретным объектом изобретения является выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует (а) полипептид QPCTL, выбранный из SEQ ID NO: 11-18, или (б) полипептид, аминокислотная последовательность которого подобна указанным по меньшей мере примерно на 75%, и обладающий такой же биологической функцией, или полученный в результате альтернативного сплайсинга вариант одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2-9, или представляет собой зонд, содержащий по меньшей мере 14 смежных нуклеотидов нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, указанные в (а) или (б), или является комплементарной одной из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

Следующим конкретным объектом изобретения является полипептид, который необязательно может быть гликозилированным и который (а) имеет аминокислотную последовательность зрелого белка,

представленную в одной из SEQ ID NO: 10-18; предпочтительно зрелого белка, последовательность которого представлена в одной из SEQ ID NO: 11-18, (б) имеет аминокислотную последовательность зрелого белка, подобную по меньшей мере примерно на 75% последовательности зрелого белка, представленной в (а), и который обладает такой же биологической функцией; (в) имеет аминокислотную последовательность зрелого белка, идентичную по меньшей мере примерно на 50% последовательности зрелого белка, представленной в одной из SEQ ID NO: 10-18; предпочтительно зрелого белка, последовательность которого представлена в одной из SEQ ID NO: 11-18, или (д) представляет собой иммунологически реактивный фрагмент полипептида, указанного в (а).

Еще одним конкретным объектом изобретения является способ скрининга соединений, обладающих способностью ингибировать ферментативную активность по меньшей мере одного зрелого белка, предлагаемого в настоящем изобретении, предпочтительно выбранного из белков, последовательность которых представлена в SEQ ID NO: 11-18, где способ заключается в том, что инкубируют зрелый белок и приемлемый субстрат для зрелого белка в присутствии одного или нескольких тестируемых соединений или их солей, оценивают ферментативную активность зрелого белка, сравнивают активность с аналогичной активностью, определенной в отсутствии тестируемого соединения, и оценивают тестируемое соединение или соединения, которое(ые) снижают ферментативную активность.

Кроме того, настоящее изобретение относится к диагностическим наборам и способам, основанным на применении QC-ингибитора, избирательного QC-ингибитора или избирательного QPCTL-ингибитора.

Эти и другие объекты настоящего изобретения должны стать очевидными специалистам в данной области из приведенного ниже подробного описания изобретения.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - сравнительный анализ первичной структуры последовательностей человеческой QC (hQC), человеческой isoQC (hisoQC), мышевой QC (mQC) и мышевой isoQC (misoQC). Множественный сравнительный анализ первичной структуры последовательностей осуществляли с помощью программы ClustalW, представленной на сайте PBIL (фирма Pôle Bioinformatique Lyonnais) (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>), с установкой принятых по умолчанию параметров. Консервативные связывающиеся с ионами цинка остатки выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в человеческой QC (hQC; GenBank X71125, SEQ ID NO: 10), человеческой isoQC (hisoQC, GenBank NM_017659, SEQ ID NO: 11), мышевой QC (mQC, GenBank NM-027455, SEQ ID NO: 79) и мышевой isoQC (misoQC, GenBank BC058181, SEQ ID NO: 17);

на фиг. 2 - сравнительный анализ первичной структуры последовательностей isoQC из Homo sapiens (hisoQC, GenBank NM_017659, SEQ ID NO: 11), Macaca fascicularis (M_fascicularis, GenBank AB168255, SEQ ID NO: 13), Macaca mulatta (M_mulatta, GenBank XM_001110995, SEQ ID NO: 14), Canis familiaris (C_familiaris, GenBank XM541552, SEQ ID NO: 15), Rattus norvegicus (R_norvegicus, GenBank XM_001066591, SEQ ID NO: 16), Mus musculus (M_musculus, GenBank BC058181, SEQ ID NO: 17) и Bos taurus (B_taurus, GenBank BT026254, SEQ ID NO: 18). Множественный сравнительный анализ первичной структуры последовательностей осуществляли с помощью программы ClustalW, представленной на сайте PBIL (фирма Pôle Bioinformatique Lyonnais) (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>), с установкой принятых по умолчанию параметров. Аминокислоты, имеющие консервативные связывающиеся с ионами цинка остатки, подчеркнуты и выделены жирным шрифтом;

на фиг. 3 - сравнительный анализ первичной структуры последовательностей человеческой QC (hQC, SEQ ID NO: 10) и человеческой isoQC (hisoQC, SEQ ID NO: 12) и других представителей M28-семейства металлопептидаз Clan MN. Множественный сравнительный анализ первичной структуры последовательностей осуществляли с помощью программы ClustalW, представленной на сайте ch.EMBnet.org, с установкой принятых по умолчанию параметров. Консервативные связывающиеся с ионами цинка остатки выявлены в человеческой QC (hQC; Swiss-Prot Q16769, SEQ ID NO: 10), в человеческой isoQC (isoQC; Swiss-Prot Q53HE4, SEQ ID NO: 12) (остатки 19-382), в Zn-зависимой аминопептидазе из Streptomyces griseus (SGAP; Swiss-Prot P80561, SEQ ID NO: 80) и в зрелой Zn-зависимой лейциламинопептидазе из Vibrio proteolyticus (VpAP; Swiss-Prot Q01693, SEQ ID NO: 81). Соответствующие аминокислотные остатки подчеркнуты и выделены жирным шрифтом;

на фиг. 4 - сравнительный анализ первичной структуры последовательностей человеческой QC (hQC, SEQ ID NO: 10) и человеческой isoQC (hisoQC, SEQ ID NO: 11), показаны два предполагаемых сайта инициации трансляции (метионина I - выделен жирным шрифтом, подчеркнут; метионина II - выделен жирным шрифтом). Множественный сравнительный анализ первичной структуры последовательностей осуществляли с помощью программы ClustalW, представленной на сайте PBIL (фирма Pole Bioinformatique Lyonnais) (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>), с установкой принятых по умолчанию параметров. Трансмембранный домен, присутствующий в QC, обозначен черной полосой;

на фиг. 5 - сравнительный анализ первичной структуры последовательностей человеческой QC (hQC, SEQ ID NO: 10) и человеческой isoQC (hisoQC, SEQ ID NO: 12), начиная с метионина II (выделен жирным шрифтом). Множественный сравнительный анализ первичной структуры последовательностей осуществляли с помощью программы ClustalW, представленной на сайте ch.EMBnet.org, с установкой принятых по умолчанию параметров. Аминокислоты, участвующие в связывании металлов, подчеркнуты

и выделены жирным шрифтом. Трансмембранный домен, присутствующий в QC, обозначен черной полосой;

на фиг. 6 - анализ экспрессии isoQC с помощью ОТ-ПЦР. Осуществляли обнаружение в линиях клеток SH-SY5Y, LN405, HaCaT и Нер-G2. Полосы: количество пар оснований, ДНК-стандарт; 1, амплифицированный ПЦР-продукт человеческой isoQC из SH-SY5Y; 2, амплифицированный ПЦР-продукт человеческой isoQC из LN405; 3, амплифицированный ПЦР-продукт человеческой isoQC из HaCaT; 4, амплифицированный ПЦР-продукт человеческой isoQC из Нер-G2;

на фиг. 7 - анализ субклеточной локализации isoQC (Met I, SEQ ID NO: 11) с помощью иммуногистохимии. Человеческую isoQC, начинающуюся с метионина I (см. фиг. 5), экспрессировали в виде слитого белка с EGFP (isoQC (MetI) EGFP) в LN 405. Осуществляли контрастное окрашивание маннозидазы II с помощью AB3712 (фирма Chemicon). "Совмещение" представляет собой наложение окрашивания isoQC (MetI)-EGFP и маннозидазы II;

на фиг. 8 - анализ субклеточной локализации isoQC (Met I, SEQ ID NO: 11) с помощью иммуногистохимии. Человеческую isoQC, начинающуюся с метионина I (см. фиг. 5), экспрессировали в виде слитого белка с EGFP (isoQC (MetI) EGFP) в LN 405. Осуществляли контрастное окрашивание митохондрий с помощью MAB1273 (фирма Chemicon). "Совмещение" представляет собой наложение окрашивания isoQC (MetI)-EGFP и митохондрий;

на фиг. 9 - анализ субклеточной локализации isoQC (Met II, SEQ ID NO: 12) с помощью иммуногистохимии. Человеческую isoQC, начинающуюся с метионина II, экспрессировали в виде слитого белка с EGFP (isoQC (MetII) EGFP) в LN 405. Осуществляли контрастное окрашивание маннозидазы II с помощью AB3712 (фирма Chemicon). "Совмещение" представляет собой наложение окрашивания isoQC (MetII)-EGFP и маннозидазы II;

на фиг. 10 - анализ субклеточной локализации isoQC (Met II, SEQ ID NO: 12) с помощью иммуногистохимии. Человеческую isoQC, начинающуюся с метионина II, экспрессировали в виде слитого белка с EGFP (isoQC (MetII) EGFP) в LN 405. Осуществляли контрастное окрашивание митохондрий с помощью MAB1273 (фирма Chemicon). "Совмещение" представляет собой наложение окрашивания isoQC (MetII)-EGFP и митохондрий;

на фиг. 11 - анализ субклеточной локализации isoQC (Met I, SEQ ID NO: 11) с помощью иммуногистохимии. Человеческую isoQC, начинающуюся с метионина I, экспрессировали в виде слитого белка с EGFP (isoQC (MetI) EGFP) в COS-7. Осуществляли контрастное окрашивание маннозидазы II с помощью AB3712 (фирма Chemicon). "Совмещение" представляет собой наложение окрашивания isoQC (MetI)-EGFP и маннозидазы II;

на фиг. 12 - анализ субклеточной локализации isoQC (Met I, SEQ ID NO: 11) с помощью иммуногистохимии. Человеческую isoQC, начинающуюся с метионина I, экспрессировали в виде слитого белка с EGFP (isoQC (MetI) EGFP) в COS-7. Осуществляли контрастное окрашивание митохондрий с помощью MAB1273 (фирма Chemicon). "Совмещение" представляет собой наложение окрашивания isoQC (MetI)-EGFP и митохондрий;

на фиг. 13 - анализ субклеточной локализации isoQC (Met II, SEQ ID NO: 12) с помощью иммуногистохимии. Человеческую isoQC, начинающуюся с метионина II, экспрессировали в виде слитого белка с EGFP (isoQC (MetII) EGFP) в COS-7. Осуществляли контрастное окрашивание маннозидазы II с помощью AB3712 (фирма Chemicon). "Совмещение" представляет собой наложение окрашивания isoQC (MetII)-EGFP и маннозидазы II;

на фиг. 14 - анализ субклеточной локализации isoQC (Met II, SEQ ID NO: 12) с помощью иммуногистохимии. Человеческую isoQC, начиная с метионина II, экспрессировали в виде слитого белка с EGFP (isoQC (MetII) EGFP) в COS-7. Осуществляли контрастное окрашивание митохондрий с помощью MAB1273 (фирма Chemicon). "Совмещение" представляет собой наложение окрашивания isoQC (MetII)-EGFP и митохондрий;

на фиг. 15 - ингибирование катализируемого человеческой isoQC превращения H-Gln-AMC в pGlu-AMC с помощью ингибитора P150/03. Данные оценивали на основе кинетической модели Михаэлиса-Ментена, рассматривая линейное конкурентное ингибирование. Применили следующие концентрации ингибиторов:

	0 мкМ
	0,3125 мкМ
	0,625 мкМ
	1,25 мкМ
	2,5 мкМ
	5 мкМ

Установлено, что значение K_i , составляло 240 ± 8 нМ;

на фиг. 16 - катализируемое человеческой isoQC превращение H-Gln-Ala-OH в pGlu-Ala-OH, определенное с помощью спектрофотометрического анализа. Данные оценивали на основе кинетической мо-

дели Михаэлиса-Ментен. Кинетические параметры составляли $324 \pm 28\text{мкM}$ и $7,4 \pm 0,2\text{nM}/\text{мин}$ для значений K_M и V_{max} соответственно;

на фиг. 17 - схематическое изображение конструкций человеческого белка isoQC, которые экспрессировали гетерологично в дрожжах *P. pastoris*. В некоторые белки интродуцировали две мутации, приводящие к получению сайта гликозилирования в положении 55 (I55N) и мутантного остатка цистеина в положении 351 (C351A). Для экспрессии N-конец, содержащий трансмембранный домен, заменили сигналом секреции из дрожжей (YSS). Конструкции, содержащие N-концевой сигнал секреции, должны эффективно секретироваться в среду;

на фиг. 18 - данные об активности QC, которую определяли в среде дрожжевых клеток, в которых происходила экспрессия. Из-за присутствия трансмембранного домена нативные конструкции не секретировались в среду (не применяли). В результате гликозилирования (I55N) белки наиболее эффективно секретировались. Мутация C351A приводила также к более высокой активности QC, обнаруженной в среде. Конструкции представлены на фиг. 17;

на фиг. 19 - очистка человеческой isoQC, включенной в конструкцию YSShisQC155NC351A C-His, из среды, в которой выращивали трансгенный штамм *P.pastoris*. QC очищали путем комбинации IMAC (аффинная хроматография на иммобилизованном металле, полоса 3), НС (хроматография, основанная на гидрофобном взаимодействии, полоса 4) и обессоливания (полоса 5). Гликозилирование фермента подтверждалось с помощью ферментативного дегликозилирования, что приводило к сдвигу миграции белка (полоса 6). Полоса 1, стандарт белка; полоса 2, среда до очистки;

на фиг. 20 - очистка человеческой isoQC, включенной в конструкцию GST-hisoQC C-His, из клеточного гомогената трансформированных *E. coli*. Белок isoQC очищали путем комбинации IMAC (аффинная хроматография на иммобилизованном металле, полоса 3), хроматографии на основе GST-аффинности (полоса 4), обессоливания (полоса 5) и ионообменной хроматографии (полоса 6). Полоса 1, стандарт белка; полоса 2, клеточный гомогенат до очистки. Различие в молекулярной массе hisoQC, которую экспрессировали в дрожжах и *E. coli*, обусловлено наличием слияния на N-конце с GST-меткой. Экспрессируемая конструкция схематически представлена в верхней части чертежа;

на фиг. 21 - константы специфического превращения дипептидов-заменителей (суррогатов), дипептидов и олигопептидов с помощью человеческой isoQC (YSShisQC155NC351A C-His; см. фиг. 17), GST-hisoQC и человеческой QC. Специфичность GST-hisoQC оказалась наименьшей, далее в порядке повышения специфичности следовала YSShisQC155NC351A C-His. Наиболее высокая специфичность обнаружена у человеческой QC, что свидетельствует о более высокой общей ферментативной активности;

на фиг. 22 - зависимость катализа от значения pH, изученная с применением человеческой isoQC (hisoQC), которую экспрессировали в дрожжах, и человеческой QC (hQC). Для обоих белков оптимум pH обнаружен между pH 7 и 8. Подбор кривых был основан на трех полученных в результате диссоциации группах, которые влияют на катализ, одна при кислом значении pH, две при основном значении pH;

на фиг. 23 - анализ превращения глутаминовой кислоты, которая присутствует на N-конце родственного амилоиду- β пептида A β (3-11). Анализ осуществляли с использованием Maldi-ToF-масс-спектрометрии (времяпролетная масс-спектрометрия с использованием опосредуемой матрицей лазерной десорбции/ионизации), при этом различие в соотношении молекулярной массы/заряда субстрата и продукта соответствовало несущей один заряд молекуле с молекулярной массой примерно 18 Да, представляющей собой массу высвободившейся воды. В обоих случаях в образце концентрация белка была одинаковой, что с большой долей вероятности позволяет предположить, что человеческая isoQC превращает также N-концевую глутаминовую кислоту, но медленнее, чем человеческая QC;

на фиг. 24 - распределение в тканях мышиной QC (mQC, SEQ ID NO: 79) и ее изоизома misoQC (SEQ ID NO: 17), проанализированное с помощью ПЦР в реальном времени. Оба фермента экспрессировались в анализируемых органах. Однако уровень экспрессии mQC был выше в головном мозге по сравнению с периферическими органами. В отличие от этого, уровень экспрессии misoQC во всех анализируемых органах и тканях оказался близким, что свидетельствует о том, что этот фермент представляет собой повсеместно распространенный белок "домашнего хозяйства" (конститутивный белок);

на фиг. 25 - зависящее от времени ингибирование человеческой isoQC (hisoQC) соединениями, образующими хелатные комплексы с металлами, такими как 1,10-фенантролин (окружности) и ЭДТК (квадраты). Остаточную hisoQC-активность определяли непосредственно после добавления (закрашенные символы) или предварительной инкубации hisoQC с соответствующим реагентом в течение 15 мин при 30°C (незакрашенные символы);

на фиг. 26 - биохимический анализ субклеточной локализации QC-активности после экспрессии рcДНК и нативных ферментов hisoQC (Met I, SEQ ID NO: 11), hisoQC (Met II, SEQ ID NO: 12) и hQC (SEQ ID NO: 10) в HEK293-клетках. (А)-удельная активность в клеточных фракциях в мкмолях /мин / г. (Б)-абсолютная активность в нМ/мин. (В) Экспрессия h-isoQC (Met I, SEQ ID NO: 11), h-isoQC (Met II, SEQ ID NO: 12) и hQC (SEQ ID NO: 10), несущих C-концевую FLAG-метку, в HEK293-клетках в сравнении с трансфектированным контролем вектором (рcДНК), изученная с помощью анализа методом Вестерн-блоттинга с использованием специфических антител либо к FLAG эпигеноту (антитело к

DYKDDDDK, фирма Cell Signaling), либо белку массой 65 кДа человеческих митохондрий (антитело к человеческим митохондриям, фирма Chemicon), либо к сиалилтрансферазе ST1GAL3 (фирма Abnova);

на фиг. 27 - субклеточная локализация человеческой isoQC (hisoQC), несущей сигнальные последовательности (27А) метионин I - серин 53 и (27Б) метионин II - серин 53, слитые с EGFP (1, 4). Комплекс Гольджи окрашивали с помощью антитела к маннозидазе II (2), а митохондрии окрашивали с использованием антитела к белку массой 65 кДа человеческих митохондрий (5). Совместную локализацию выявляли с помощью наложения EGFP-флуоресценции и Red X-флуоресценции (3, 6);

на фиг. 28 - основная структура человеческой isoQC (hisoQC) и мышьной isoQC (misoQC) в сравнении с опубликованными последовательностями человеческих гликозилтрансфераз: альфа-N-ацетилгалактозаминид-альфа-2,6-сиалилтрансфераза 1 (ST6GalNAC1; К.Ф. 2.4.99.3); бета-1,4-галактозилтрансфераза 1 (b4Gal-T1, К.Ф. 2.4.1.-); галактозид-3(4)-L-фукозилтрансфераза (FucT-III; К.Ф. 2.4.1.65) и гликопротеин-фукозилгалактозид-альфа-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза (NAGAT, К.Ф. 2.4.1.40). Количество аминокислот указано под колонками. Цитозольная часть затенена, трансмембранный спираль окрашена черным цветом, а находящаяся в полости часть обозначена белым цветом;

на фиг. 29 - количественная оценка мРНК человеческой isoQC (QPCTL) в различных линиях клеток карциномы. Экспрессию QPCTL стандартизовали относительно 50 нг общей РНК. Черными полосами внутри прямоугольников обозначены соответствующие медианы;

на фиг. 30 - количественная оценка экспрессии мРНК человеческой isoQC (QPCTL) в различных линиях клеток меланомы. Экспрессию QPCTL стандартизовали относительно 50 нг общей РНК;

на фиг. 31 - количественная оценка экспрессии мРНК человеческой isoQC (QPCTL) в образцах карциномы мягких тканей, карциномы желудка и карциномы щитовидной железы различных пациентов. Экспрессию QPCTL стандартизовали относительно 50 нг общей РНК. Черными полосами внутри прямоугольников обозначены соответствующие медианы;

на фиг. 32 - количественная оценка экспрессии мРНК человеческой isoQC (QPCTL) в различных желудочных карциномах на различных стадиях дифференцировки. Экспрессию QPCTL стандартизовали относительно 50 нг общей РНК. Черными полосами внутри прямоугольников обозначены соответствующие медианы;

на фиг. 33 - сравнение экспрессии мРНК человеческой QC (QPCT) в различных карциномах щитовидной железы. Экспрессию QPCT стандартизовали относительно 50 нг общей РНК. Черными полосами внутри прямоугольника обозначены соответствующие медианы (FTC: фолликулярный рак щитовидной железы; PTC: папиллярный рак щитовидной железы; UTC: недифференцированный рак щитовидной железы);

на фиг. 34 - сравнение уровней экспрессии мРНК человеческой isoQC (QPCTL) в различных карциномах щитовидной железы. Экспрессию QPCTL стандартизовали относительно 50 нг общей РНК. Черными полосами внутри прямоугольников обозначены соответствующие медианы (FTC: фолликулярный рак щитовидной железы; PTC: папиллярный рак щитовидной железы; UTC: недифференцированный рак щитовидной железы);

на фиг. 35 - влияние различных стимулов на экспрессию мРНК человеческой QC (QPCT), человеческой isoQC (QPCTL) и CCL2 в HEK293-клетках. Количество транскриптов обозначено относительно основного уровня экспрессии без стимулов. Применяемая концентрация стимула показана на оси абсцисс;

на фиг. 36 - влияние различных стимулов на экспрессию мРНК человеческой QC (QPCT), человеческой isoQC (QPCTL) и CCL2 в FTC-133-клетках. Количество транскриптов обозначено относительно основного уровня экспрессии без стимулов. Применяемая концентрация стимула показана на оси абсцисс;

на фиг. 37 - влияние различных стимулов на экспрессию мРНК человеческой QC (QPCT), человеческой isoQC (QPCTL) и CCL2 в THP-1-клетках. Количество транскриптов обозначено относительно основного уровня экспрессии без стимулов. Применяемая концентрация стимула показана на оси абсцисс;

на фиг. 38 - влияние различных стимулов на экспрессию мРНК человеческой QC (QPCT), CCL2, CCL7, CCL8 и CCL13 в THP-1-клетках. Количество транскриптов обозначено относительно основного уровня экспрессии без стимулов. Применяемая концентрация стимула показана на оси абсцисс;

на фиг. 39 - влияние гипоксии на уровень мРНК человеческой QC (QPCT), человеческой isoQC (QPCTL) и HIF1 α в HEK29- (А), FTC-133- (Б) и THP-1-клетках (В).

Перечень последовательностей

SEQ ID NO	Описание
1	человеческая QC, нуклеиновая кислота
2	человеческая isoQC Met I, нуклеиновая кислота
3	человеческая isoQC Met II, нуклеиновая кислота
4	<i>Macaca fascicularis</i> QPCTL, нуклеиновая кислота
5	<i>Macaca mulatta</i> QPCTL, нуклеиновая кислота
6	<i>Canis familiaris</i> QPCTL, нуклеиновая кислота
7	крысиная QPCTL, нуклеиновая кислота
8	мышиная QPCTL, нуклеиновая кислота
9	бычья QPCTL, нуклеиновая кислота
10	человеческая QC, белок
11	человеческая isoQC Met I, белок
12	человеческая isoQC Met II, белок
13	<i>Macaca fascicularis</i> QPCTL, белок
14	<i>Macaca mulatta</i> QPCTL, белок
15	<i>Canis familiaris</i> QPCTL, белок
16	крысиная QPCTL, белок
17	мышиная QPCTL, белок
18	бычья QPCTL, белок
19	человеческая isoQC, полученная в результате сплайсинга форма 1, нуклеиновая кислота
20	человеческая isoQC, полученная в результате сплайсинга форма 2, нуклеиновая кислота
21	человеческая isoQC, полученная в результате сплайсинга форма 1, белок
22	человеческая isoQC, полученная в результате сплайсинга форма 2, белок
23	амилоидный бета-пептид (Абета) (1-42)
24	Абета (1-40)
25	Абета (3-42)
26	Абета (3-40)
27	Абета (11-42)
28	Абета (11-40)
29	pGlu ³ -Абета (3-42)
30	pGlu ³ -Абета (3-40)
31	pGlu ³ -Абета (11-42)
32	pGlu ³ -Абета (11-40)
33	Abri
34	Adan
35	гастрин 17
36	гастрин 34
37	pGlu-Abri
38	pGlu-Adan
39	pGlu-гастрин 17
40	pGlu-гастрин 34
41	нейротензин
42	GnRH
43	CCL16
44	CCL8
45	CCL2
46	CCL18
47	фракталкин
48	CCL7
49	орексин A
50	вещество P
51	QYNAD
52	pGlu-YNAD
53	человеческой isoQC «прямой» праймер, применяемый для скрининга клеточных линий

54	человеческой isoQC «обратный» праймер, применяемый для скрининга клеточных линий
55	«прямой» праймер, применяемый для выделения человеческой isoQC
56	«обратный» праймер, применяемый для выделения человеческой isoQC
57	«прямой» праймер, применяемой для клонирования человеческой isoQC (изоформа Met I) в векторе pEGFP-N3
58	«обратный» праймер, применяемый для клонирования человеческой isoQC (изоформа Met II) в векторе pEGFP-N3
59	«обратный» праймер, применяемый для клонирования человеческой isoQC (изоформы Met I и Met II) в векторе pEGFP-N3
60	«прямой» праймер, применяемый для клонирования человеческой isoQC в векторе pET41a
61	«обратный» праймер, применяемый для клонирования человеческой isoQC в векторе pET41a
62	«прямой» праймер, применяемый для клонирования человеческой isoQC в векторе pPICZαA с C-концевой гистидиновой меткой
63	«прямой» праймер, применяемый для клонирования человеческой isoQC в векторе pPICZαA с N-концевой гистидиновой меткой
64	«обратный» праймер, применяемый для клонирования человеческой isoQC в векторе pPICZαA с N-концевой гистидиновой меткой
65	«прямой» праймер для анализа isoQC с помощью ПЦР в реальном времени
66	«обратный» праймер, применяемый для клонирования человеческой isoQC в векторе pPICZαA с C-концевой гистидиновой меткой
67	«обратный» для анализа с помощью ПЦР в реальном времени isoQC
68	«прямой» праймер, применяемый для клонирования кДНК мышиной isoQC
69	«обратный» праймер, применяемый для клонирования кДНК мышиной isoQC
70	«прямой» праймер, применяемый для клонирования кДНК мышиной isoQC
71	«прямой» праймер для анализа мышиной QC с помощью ПЦР в реальном времени
72	«обратный» праймер для анализа мышиной QC с помощью ПЦР в реальном времени
73	«прямой» праймер для анализа мышиной QC с помощью ПЦР в реальном времени
74	«обратный» праймер для анализа мышиной QC с помощью ПЦР в реальном времени
75	«прямой» праймер для сайт-направленного мутагенеза hisoQC I55N
76	«обратный» праймер для сайта-направленного мутагенеза hisoQC I55N
77	«прямой» праймер для сайта-направленного мутагенеза hisoQC C351A
78	«обратный» праймер для сайта-направленного мутагенеза hisoQC C351A
79	белок мышиной глутамилцилазы
80	SGAP <i>Streptomyces griseus</i>
81	VpAP <i>Vibrio proteolyticus</i>
82	«прямой» праймер для встраивания нативной hQC в pcDNA 3.1
83	«обратный» праймер для встраивания нативной hQC в pcDNA 3.1
84	«обратный» праймер для амплификации hisoQC, включая стоп-кодон для инсерции в pcDNA 3.1
85	«прямой» праймер для амплификации EGFP
86	«обратный» праймер для амплификации EGFP
87	«обратный» праймер для амплификации N-концевой последовательности hisoQC для слияния с EGFP
88	«обратный» праймер для амплификации hQC C-FLAG для встраивания в pcDNA 3.1
89	«обратный» праймер для амплификации hisoQC C-FLAG для встраивания в pcDNA 3.1

Подробное описание изобретения

Одним из объектов настоящего изобретения являются выделенные нуклеотидные последовательности (полинуклеотиды), представленные в SEQ ID NO: 2-9, 19 и 20, которые кодируют зрелые полипептиды, имеющие выведенные аминокислотные последовательности QPCTL из различных источников (SEQ

ID NO: 11-18,21 и 22).

Предпочтительными согласно настоящему изобретению являются выделенные нуклеотидные последовательности (полинуклеотиды), представленные в SEQ ID NO: 2 и 3, 19 и 20, которые кодируют зрелые полипептиды, имеющие выведенные аминокислотные последовательности человеческих QPCTL (SEQ ID NO: 11 и 12, 21 и 22).

Более предпочтительными согласно настоящему изобретению являются выделенные нуклеотидные последовательности (полинуклеотиды), представленные в SEQ ID NO: 2 и 3, которые кодируют зрелые полипептиды, имеющие выведенные аминокислотные последовательности человеческих QPCTL, представленные в SEQ ID NO: 11 и 12.

Еще более предпочтительными согласно настоящему изобретению являются выделенные нуклеотидные последовательности (полинуклеотиды), представленные в SEQ ID NO: 19 и 20, которые кодируют зрелые полипептиды, имеющие выведенные аминокислотные последовательности, которые представляют собой полученные в результате альтернативного сплайсинга формы последовательностей человеческих, представленные в QPCTL SEQ ID NO: 21 и 22.

Наиболее предпочтительной согласно настоящему изобретению является выделенная нуклеотидная последовательность (полинуклеотид) SEQ ID NO: 2, которая кодирует зрелый полипептид, имеющий выведенную аминокислотную последовательность человеческой QPCTL, представленную в SEQ ID NO: 11.

Еще более предпочтительной согласно настоящему изобретению является выделенная нуклеотидная последовательность (полинуклеотид) SEQ ID NO: 3, которая кодирует зрелый полипептид, имеющий выведенную аминокислотную последовательность человеческой QPCTL, представленную в SEQ ID NO: 12.

Указанные выше варианты осуществления изобретения и их предпочтительные варианты относятся к нуклеиновым кислотам QPCTL, а также к белкам QPCTL и к любому требуемому способу их применения для диагностики, лечения, скрининга, в качестве эффекторов, ингибиторов и в других вариантах применения и согласно способам, предлагаемым в настоящем изобретении.

Полинуклеотиды, предлагаемые в настоящем изобретении, открыты на основе изучения подобия с использованием программы для поиска нуклеотидов BLAST фирмы NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) с использованием человеческой QC в качестве матрицы. Поиск привел к открытию предполагаемой QPCTL на хромосоме 19, кодирующая область которой представляет собой 19q13.32. На основе поиска были сконструированы праймеры для скрининга человеческой isoQC в клеточных линиях (табл. 4). Выделенная кДНК человеческой QPCTL содержит открытую рамку считывания, кодирующую состоящий из 382 аминокислот белок, родственный человеческой QC, последовательность которого идентична ей на 45,24% и подобна на 71,98%. Применение различных биоинформационных алгоритмов (www.expasy.ch) для предсказания субклеточной локализации не привело к получению достоверного результата. В соответствии с прогнозом, вероятно, местом локализации является комплекс Гольджи или митохондрии.

Сравнительный анализ первичной структуры аминокислотной последовательности человеческой QPCTL и других представителей M28-семейства металлопептидаз Clan MN позволил установить, что белок человеческой QPCTL гомологичен на уровне всей последовательности и структуры с человеческой и мышьей QC (фиг. 1) и с бактериальными аминопептидазами (фиг. 3). Поиск в базах данных дополнительных генов, родственных генам человеческой QPCTL, показал присутствие QPCTL у грызунов, обезьян, коров и собак. Сравнительный анализ первичной структуры этих последовательностей и новой человеческой QPCTL показал, что они обладают выраженной гомологией с их человеческой копией. Образующие комплексы с цинком остатки человеческой QC (Asp-Glu-His) являются консервативными в QPCTL различного происхождения (фиг. 2).

Ген человеческой isoQC содержит по меньшей мере 8 экзонов. Последовательность, кодирующая человеческий белок isoQC, локализована на экзонах 1-7. Человеческая isoQC картируется на хромосоме 19 в положении 19q13.32. Скрининг клеточных линий в отношении человеческой isoQC доказал наличие транскриптов в клетках, полученных из печени (Нер-G2, печеночно-клеточная карцинома), кожи (HaCaT, кератиноциты) и нейронной ткани (LN405, астроцитома; SH-SY5Y, нейробластома) (фиг. 6).

Функциональную экспрессию выделенной кДНК QPCTL оценивали в нескольких хозяевах, в которых имела место экспрессия. Экспрессия в *P. pastoris*, которую с успехом применяли для человеческой QC, не позволила получить обладающий ферментативной активностью белок. Экспрессия в клетках млекопитающих привела к получению активности, однако уровни экспрессии оказались очень низкими. Таким образом, выделение обладающего ферментативной активностью белка оказалось невозможным на основе известных в данной области данных. Обладающий ферментативной активностью белок выделяли только после экспрессии слитого белка GST-QPCTL в *E. coli* с использованием нетрадиционных условий экспрессии: экспрессия в течение 4 ч при 37°C в присутствии 1% глюкозы, индукция экспрессии с помощью 20мМ ИПТГ.

Эти условия экспрессии позволили получить экспрессию невысокого уровня в *E. coli*, необходимую для функциональной складчатости пептидной цепи.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения являются животные с "выключенной" QPCTL, предпочтительно крысы или мыши. Использование мышей с "выключенной" QPCTL для дополнительного анализа функции генов QPCTL является ценным инструментом.

Полинуклеотиды, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь форму РНК или форму ДНК; следует понимать, что ДНК включают кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной и, если является одноцепочечной, может представлять собой кодирующую цепь или некодирующую (антисмысловую) цепь. Кодирующая последовательность, которая кодирует зрелый полипептид, может быть идентична кодирующей последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2-9, или может отличаться от кодирующей последовательности, которая кодирует такой же зрелый полипептид, в результате избыточности или вырожденности генетического кода или полиморфизма одного нуклеотида. Например, она может представлять собой также РНК-транскрипт, который включает полноразмерную любую из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-18.

Полинуклеотиды, которые кодируют зрелые белки, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2-9, могут включать (но, не ограничиваясь только ими) кодирующую последовательность только зрелого белка; кодирующую последовательность зрелого полипептида плюс дополнительную кодирующую последовательность, например лидерную или секреторную последовательность, или последовательность пробелка; и кодирующую последовательность зрелого белка (и необязательно дополнительную кодирующую последовательность) плюс некодирующую последовательность, например, интроны или некодирующую последовательность на 5'- и/или 3'-конце кодирующей последовательности зрелого белка.

Таким образом, следует понимать, что понятие "полинуклеотид, кодирующий полипептид" или "нукleinовая кислота, кодирующая полипептид" относится к полинуклеотиду или нукleinовой кислоте, который/которая включает только кодирующую последовательность зрелого белка, а также который/которая включает дополнительную кодирующую и/или некодирующую последовательность. Понятие полинуклеотиды и нукleinовые кислоты используют взаимозаменяющими.

Настоящее изобретение относится также к полинуклеотидам, в которых кодирующая последовательность зрелого белка может быть слита в одной и той же рамке считывания с полинуклеотидной последовательностью, которая способствует экспрессии и секреции полипептида из клетки-хозяина; например, может быть слита с лидерной последовательностью, которая функционирует в качестве секреторной последовательности для контроля транспорта полипептида из клетки-хозяина. Полипептид, несущий указанную лидерную последовательность, обозначают как пробелок и препробелок, и он может иметь лидерную последовательность, которая отщепляется под воздействием клетки-хозяина с образованием зрелой формы белка. Эти полинуклеотиды могут иметь удлиненную 5'-область, в результате чего они кодируют пробелок, представляющий собой зрелый белок плюс дополнительные аминокислотные остатки на N-конце. Экспрессионный продукт, имеющий такую пропоследовательность, обозначают как пробелок, который представляет собой неактивную форму зрелого белка; однако после расщепления пропоследовательности остается зрелый белок. Так, например, полинуклеотиды, предлагаемые в настоящем изобретении, могут кодировать зрелые белки или белки, имеющие пропоследовательность, или белки, имеющие и пропоследовательность, и препоследовательность (лидерная последовательность).

Полинуклеотиды, предлагаемые в настоящем изобретении, могут иметь также кодирующую последовательность, слитую в рамке считывания с маркерной последовательностью, которая позволяет осуществлять очистку полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении. Маркерная последовательность может представлять собой полигистидиновую метку, гемагглютининовую (НА) метку, с-мус-метку или V5-метку, когда в качестве хозяина применяют клетку млекопитающего, например COS-1-клетки.

НА-метка должна соответствовать эпигопту, выведенному из белка гемагглютинина гриппа (Wilson I. и др., Cell, 37, 1984, с. 767), а с-мус-метка может представлять собой эпигопт из человеческого Мус-белка (Evans G. I. и др., Mol. Cell. Biol. 5, 1985, сс. 3610-3616).

Понятие "ген" означает сегмент ДНК, участвующий в образовании полипептидной цепи; он включает области, расположенные перед кодирующей областью и позади нее (лидер и хвост), а также последовательности (интроны), лежащие между индивидуальными кодирующими сегментами (экзоны).

Понятие "выраженная гомология последовательностей" означает, что по меньшей мере 25%, предпочтительно по меньшей мере 40%, аминокислотных остатков являются консервативными и что из не-консервативных остатков по меньшей мере 40% представляют собой консервативные замены.

Фрагменты полноразмерных генов, предлагаемых в настоящем изобретении, можно использовать в качестве зондов для гибридизации библиотек кДНК с целью выделения полноразмерной кДНК, а также выделения других кДНК, которые имеют выраженную гомологию последовательностей с геном и должны кодировать белки или полипептиды, имеющие сходную биологическую активность или функцию. Под сходной биологической активностью или функцией для целей настоящего описания понимают способность образовывать пироглутамат из N-концевого глутамина или глутаминовой кислоты пептидов, белков, гормонов или других субстратов, т.е. QC- и EC-активность соответственно. Указанный зонд такого типа содержит по меньшей мере 14 оснований (по меньшей мере 14 смежных нуклеотидов из одной

из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2-9), предпочтительно по меньшей мере 30 оснований, и может содержать, например, 50 или большее количество оснований. Предпочтительными являются зонды, имеющие последовательности SEQ ID NO: 53-61. Такой зонд можно применять также для идентификации клона кДНК, соответствующего первичному транскрипту и/или геномному клону или клонам, которые содержат полный ген, включая регуляторные и промоторные области, экзоны и интроны. Меченные олигонуклеотиды, имеющие последовательность, комплементарную последовательности гена, предлагаемого в настоящем изобретении, применяют для скрининга библиотек человеческих кДНК, геномных ДНК или мРНК или подобных библиотек из других источников или животных для локализации представителей библиотек, с которыми зонд гибридизуется. Например, известную последовательность ДНК можно применять для синтеза олигонуклеотидного зонда, который затем используют для скрининга библиотеки с целью выделения кодирующей области представляющего интерес гена.

Настоящее изобретение относится также к полинуклеотидам, которые гибридизуются с указанными выше последовательностями, если существует по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 90% и более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность или подобие между последовательностями, и в результате кодируют белки, обладающие сходной биологической активностью. Кроме того, как известно в данной области, существует "подобие" между двумя полипептидами, когда аминокислотные последовательности содержат одинаковые или консервативные замены каждого индивидуального остатка в последовательности. Идентичность и подобие можно оценивать с помощью программы для анализа последовательностей (например, ClustalW фирмы PBIL (Pôle Bioinformatique Lyonnais) <http://npsa-pbil.ibcp.fr>). Настоящее изобретение относится, в частности, к таким полинуклеотидам, которые гибридизуются в строгих условиях с вышеописанными полинуклеотидами. В контексте настоящего описания понятие "строгие условия" означает условия, обеспечивающие гибридизацию между полинуклеотидными последовательностями и полинуклеотидными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 2-9, когда имеет место по меньшей мере примерно 70% идентичность.

Приемлемые по строгости условия можно определять, например, по концентрациям соли или формамида в растворе до гибридизации и в растворе для гибридизации или по температуре гибридизации, и они хорошо известны в данной области. В частности, строгость можно повышать путем снижения концентрации соли, повышения концентрации формамида и/или повышения температуры гибридизации.

Например, для гибридизации в строгих условиях можно применять формамид в концентрации примерно 50% при температуре примерно от 37 до 42°C, а для гибридизации в условиях пониженной строгости можно применять формамид в концентрации примерно от 35 до 25% при температуре примерно от 30 до 35°C. Один из конкретных вариантов условий для гибридизации в строгих условиях предусматривает использование температуры 42°C, 50%-ного формамида, 5×SSPE, 0,3% ДСН и 200 мкг/мл фрагментированной и денатурированной ДНК спермы лосося. Для гибридизации в условиях пониженной строгости можно применять условия, аналогичные вышеуказанным, но используя 35%-ный формамид при пониженной температуре 35°C. Диапазон температур, соответствующий конкретному уровню строгости, можно дополнительно сужать, рассчитывая соотношение пуриновых и пиrimидиновых оснований в представляющей интерес нукleinовой кислоте и регулируя соответствующим образом температуру. Вариации вышеуказанных диапазонов и условий хорошо известны в данной области. Предпочтительно гибридизация должна происходить только в том случае, когда имеет место по меньшей мере 95% и более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичность последовательностей. Полинуклеотиды, которые гибридизуются с описанными выше полинуклеотидами, в предпочтительном варианте осуществления изобретения кодируют полипептиды, которые обладают практически такой же биологической функцией или активностью, что и зрелый белок, кодируемый одной из кДНК, последовательность которых представлена в SEQ ID NO: 2-9.

Как отмечалось ранее, приемлемый полинуклеотидный зонд может иметь по меньшей мере 14 оснований, предпочтительно 30 оснований и более предпочтительно по меньшей мере 50 оснований и должен гибридизоваться с полинуклеотидом, предлагаемым в настоящем изобретении, который идентичен ему, как указано выше, и который может сохранять или не сохранять активность. Например, указанные полинуклеотиды можно применять в качестве зонда для гибридизации с полинуклеотидами, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 2-9 соответственно, например, для выделения указанного полинуклеотида, или в качестве диагностического зонда или в качестве ПЦР-праймера. Таким образом, настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, идентичным по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 90% и более предпочтительно по меньшей мере на 95% полинуклеотиду, который кодирует полипептиды, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11-18 соответственно, а также их фрагментам, где фрагменты предпочтительно имеют по меньшей мере 30 оснований и более предпочтительно по меньшей мере 50 оснований, и к полипептидам, кодируемым указанными полинуклеотидами.

Как хорошо известно в данной области, генетический код является избыточным в том смысле, что определенные аминокислоты кодируются более чем одним нуклеотидным триплетом (кодон), и изобретение относится к тем полинуклеотидным последовательностям, которые кодируют одни и те же аминокислоты с помощью кодонов, отличных от тех, которые в качестве конкретного примера указаны в при-

веденных в описании последовательностях. Указанные полинуклеотидные последовательности обозначают как "эквивалентные" полинуклеотидные последовательности. Настоящее изобретение включает также варианты описанных выше полинуклеотидов, которые кодируют фрагменты, такие как часть или весь зрелый белок, аналоги и производные одного из полипептидов, имеющих выведенные аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 11-18. Варианты полинуклеотидов могут представлять собой встречающийся в естественных условиях аллельный вариант полинуклеотидов или не встречающийся в естественных условиях аллельный вариант полинуклеотидов. Например, вариант нукleinовой кислоты может просто иметь различие в последовательности кодона аминокислоты, являющееся результатом вырожденности генетического кода, или может представлять собой полученные в результате делеции варианты, полученные в результате замены варианты или полученные в результате инсерции варианты. Как известно в данной области, аллельный вариант представляет собой альтернативную форму полинуклеотидной последовательности, которая может иметь замену, делецию или добавление одного или нескольких нуклеотидов, которые не приводят к заметному изменению биологической функции кодируемого полипептида.

Настоящее изобретение относится также к полипептидам, которые имеют выведенную аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11-18, а также к фрагментам, аналогам и производным таких полипептидов. Понятия "фрагмент", "производное" и "аналог" касательно полипептидов, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11-18, означает полипептиды, которые сохраняют в основном такую же биологическую функцию или активность указанных полипептидов. Аналог может, например, включать пробелок, которые может активироваться в результате отщепления участка пробелка с образованием активного зрелого белка. Полипептиды, предлагаемые в настоящем изобретении, могут представлять собой рекомбинантные полипептиды, встречающиеся в естественных условиях полипептиды или синтетические полипептиды; однако они предпочтительно представляют собой рекомбинантные полипептиды, гликозилированные или негликозилированные.

Фрагмент, производное или аналог полипептида, которые соответствуют одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-18, может представлять собой (I) фрагмент, производное или аналог полипептида, в котором один или несколько аминокислотных остатков заменены консервативным или неконсервативным аминокислотным остатком (предпочтительно консервативным аминокислотным остатком) и такой замененный аминокислотный остаток может кодироваться или не кодироваться одним генетическим кодом, или (II) в котором один или несколько аминокислотных остатков включает группу заместитель, или (III) в котором дополнительные аминокислоты слиты со зрелым белком, такие как лидерная или секреторная последовательность, или последовательность, которую применяют для очистки зрелого полипептида или последовательности пробелка. Подразумевается, что такие фрагменты, производные и аналоги, известные в данной области, можно получать на основе данных, приведенных в настоящем описании.

Полипептиды и полинуклеотиды, предлагаемые в настоящем изобретении, могут находиться в выделенной форме и предпочтительно их очищают до практически гомогенного или чистого состояния. Под практически гомогенным состоянием подразумевают чистоту, составляющую по меньшей мере примерно 85%.

Понятие "выделенный" применяют для обозначения того, что материал удален из его естественного окружения (например, его природного окружения, если он встречается в естественных условиях). Например, встречающийся в естественных условиях полинуклеотид или полипептид, присутствующий в живом организме, не рассматривается как выделенный, но этот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от практически всех совместно существующих материалов в естественной системе, рассматривается как выделенный. Для ДНК понятие включает, например, рекомбинантную ДНК, включенную в вектор, в автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус или в геномную ДНК прокариот или эукариот; или существующую в виде индивидуальной молекулы (например, фрагмент кДНК или фрагмент геномной ДНК, полученный с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или расщепления рестриктазами), не зависящей от других последовательностей. Понятие включает рекомбинантную ДНК, которая является частью гибридного гена, кодирующего дополнительную полипептидную последовательность, например слитый белок. Оно включает также рекомбинантную ДНК, которая несет фрагмент нуклеотидов, представленных в SEQ ID NO: 2-9, который кодирует полученный в результате альтернативного спlicingа вариант QPCTL. Примеры различных полученных в результате альтернативного спlicingа вариантов представлены в SEQ ID NO: 19-22.

Полипептиды, предлагаемые в настоящем изобретении, включают любой из полипептидов, представленных в SEQ ID NO: 11-18 (в частности, зрелые белки), а также полипептиды, подобные по меньшей мере на 75% (например, идентичные предпочтительно по меньшей мере на 50% и более, предпочтительно по меньшей мере на 70%) одному из полипептидов, представленных в SEQ ID NO: 11-18, более предпочтительно подобные по меньшей мере на 85% (например, предпочтительно идентичные по меньшей мере на 70%) одному из полипептидов, представленных в SEQ ID NO: 11-18, и наиболее предпочтительно подобные по меньшей мере на 95% (например, идентичные предпочтительно по меньшей мере на 90%) одному из полипептидов, представленных в SEQ ID NO: 11-18. Кроме того, они должны предпочт-

тительно включать правильные участки указанных полипептидов, содержащих последовательность, состоящую по меньшей мере из 30 аминокислот и более, предпочтительно по меньшей мере из 50 аминокислот.

Фрагменты или участки полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять в качестве промежуточных продуктов для получения соответствующих полноразмерных полипептидов путем пептидного синтеза. Фрагменты или участки полинуклеотидов, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять также для синтеза полноразмерных полинуклеотидов, предлагаемых в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение относится также к векторам, которые включают указанные полинуклеотиды, клеткам-хозяевам, которые создают с помощью генной инженерии с использованием указанных векторов, и к получению полипептидов методами рекомбинации с использованием вышеуказанных векторов. Клетки-хозяева создают методами генной инженерии (путем трансдукции или трансформации или трансфекции) с использованием таких векторов, которые могут представлять собой, например, клонирующий вектор или экспрессионный вектор. Вектор может иметь, например, форму плазиды, вирусной частицы, фага и т.д. Сконструированные клетки-хозяева можно культивировать в общепринятых питательных средах, модифицированных при необходимости для активации промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, предлагаемых в настоящем изобретении. Условия культивирования, такие как температура, значение pH и т.п., представляют собой условия, обычно применяемые для клеток-хозяев, отобранных для экспрессии, которые также хорошо известны обычным специалистам в данной области.

Полинуклеотиды, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для получения полипептидов методами рекомбинации. Так, например, полинуклеотиды можно встраивать в любой из широкого разнообразия экспрессионных векторов с целью экспрессии полипептидов. Указанные векторы включают хромосомные, нехромосомные и синтетические последовательности ДНК, например производные SV40; бактериальные плазиды; фаговые ДНК; бакуловирусы; плазиды на основе дрожжей; векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговых ДНК, вирусные ДНК, такие как вирус кори, аденоовирус, вирус оспы птиц и вирус псевдодобешенства. Однако можно применять любой другой вектор, если он обладает способностью реплицироваться и является жизнеспособным в хозяине.

Соответствующую последовательность ДНК можно встраивать в вектор с помощью любой из широкого разнообразия процедур. В целом, последовательность ДНК встраивают в соответствующий(ие) сайт(ы), распознаваемый(ые) рестриктазами, с помощью методик, которые должны быть известны специалистам в данной области.

Последовательность ДНК в экспрессионном векторе функционально связывают с соответствующей(ими), контролирующей(ими) экспрессию последовательностью(ями) (промотор) для обеспечения синтеза мРНК. Репрезентативными примерами таких промоторов, которые следует упомянуть, являются: промотор LTR или SV40, промотор E. coli lac или trp, промотор фага лямбда P.sub.L и другие промоторы, для которых известна способность контролировать экспрессию генов в прокариотических или эукариотических клетках или их вирусах.

Экспрессионные векторы должны содержать также сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и терминатор транскрипции. Вектор может содержать также соответствующие последовательности для амплификации экспрессии. Кроме того, экспрессионные векторы предпочтительно содержат один или несколько селектируемых маркерных генов для придания фенотипического признака для отбора трансформированных клеток-хозяев, такие как ген дегидрофолатредуктазы и ген, обуславливающий устойчивость к неомицину, для культуры эукариотических клеток, или гены, обуславливающие устойчивость к тетрациклину или ампициллину, для E. coli.

Вектор, содержащий соответствующую последовательность ДНК, указанную выше, а также соответствующий промотор или контролирующую последовательность, можно применять для трансформации соответствующей клетки-хозяина с целью экспрессии белка. В качестве репрезентативных примеров соответствующих хозяев следует упомянуть: клетки бактерий, такие как E. coli, Streptomyces, Salmonella typhimurium; клетки грибов, такие как дрожжи; клетки насекомых, такие как Drosophila S2 и Spodoptera Sf9; клетки животных, такие как CHO, COS или меланома Боузса; аденоовирусы; клетки растений и т.д. Выбор соответствующего хозяина должен быть очевиден специалистам в данной области на основе представленной в настоящем описании информации.

Получение нуклеотидных последовательностей с помощью синтеза хорошо известно в данной области, в частности описано в каталоге фирмы CLONTECH 95/96, сс. 215-216, CLONTECH, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, Calif. 94303. Таким образом, настоящее изобретение относится также к экспрессионным векторам, которые можно применять для получения белков, предлагаемых в настоящем изобретении. Настоящее изобретение относится также к рекомбинантным конструкциям, содержащим одну или несколько последовательностей, которые в целом описаны выше. Конструкции могут содержать вектор, такой как плазмидный или вирусный вектор, в который встроена последовательность, предлагаемая в изобретении, в прямой или обратной ориентации. В предпочтительном аспекте этого варианта осуществления изобретения конструкция содержит также регуляторные последовательности, включая,

например, промотор, функционально связанный с последовательностью. Специалистам в данной области известно широкое разнообразие приемлемых векторов и промоторов, и они поступают в продажу. В качестве примера можно упомянуть следующие векторы: бактериальные: pQE70, pQE60, pQE-9 (фирма Qiagen), pBS, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNHI8A, pNH46A (фирма Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (фирма Pharmacia); и эукариотические: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (фирма Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (фирма Pharmacia). Однако можно применять любую другую приемлемую плазмиду или вектор, если они обладают способностью реплицироваться и обладают жизнеспособностью в хозяине.

Промоторные области можно выбирать из любого требуемого гена, используя несущие CAT (хлорамфениколацетилтрансфераза) векторы или другие векторы, содержащие селектируемые маркеры.

Двумя приемлемыми векторами являются pKK232-8 и pCM7. Среди бактериальных промоторов следует упомянуть lacI, lacZ, T3, T7, gpt, лямбда P.sub.R, P.sub.L и trp. Эукариотические промоторы представляют собой немедленно ранний промотор CMV, промотор тимидинкиназы HSV, ранний и поздний промотор SV40, промотор LTR из ретровирусов и промотор мышного металлионеина-I. Выбор соответствующего вектора и промотора находится в компетенции обычного специалиста в данной области.

Компоненты экспрессионного вектора могут, как правило, представлять собой: 1) ген неомицин-fosfotрансферазы (G418) или фосфотрансферазы гигромицина B (hyg) в качестве маркера для селекции, 2) сайт инициации репликации E. coli, 3) промоторные последовательности фага T7 и SP6, 4) операторные последовательности lac, 5) ген-репрессор оперона лактозы (lacIq) и

6) линкерную область множественного сайта клонирования. Указанный сайт инициации репликации (oriC) можно выводить из pUC19 (фирма LTI, Геттисберг, шт. Мэриленд).

Нуклеотидную последовательность, кодирующую один из полипептидов, представленных в SEQ ID NO: 2-9, которая несет соответствующий сайт рестрикции, создают, как правило, с помощью ПЦР-протокола, описанного ниже в примерах 1 и 2, используя ПЦР-праймеры, несущие сайты рестрикции, распознаваемые EcoR I (в качестве 5'-праймера) и Sal I (в качестве 3'-праймера), для клонирования isoQC-Met I и -Met II в векторе EGFP-N3, или сайтов, распознаваемых Spe I (в качестве 5'-праймера) и EcoR I (в качестве 3'-праймера), для клонирования isoQC в вектор pET41a. ПЦР-вставки очищают на геле и расщепляют соответствующими рестриктазами. Вставку и вектор лигируют с помощью стандартных протоколов.

Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения являются клетки-хозяева, содержащие вышеописанные конструкции. Клетка-хозяин может представлять собой клетку высшего эукариотического организма, такую как клетка млекопитающего, или клетку низшего эукариотического организма, такую как клетка дрожжей, или клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, такую как бактериальная клетка. Интродукцию конструкции в клетку-хозяина можно осуществлять с помощью трансфекции с использованием фосфата кальция, опосредуемой ДЭАЭ ((диэтиламино)этилцеллюлоза)-декстраном трансфекции, с помощью липофектина или путем электропорации (Davis L., Dibner M., Battey J., Basic Methods in Molecular Biology, 1986).

Такие конструкции в клетке-хозяине предпочтительно применяют общепринятым образом для получения генного продукта, кодируемого рекомбинантной последовательностью. В другом варианте полипептиды, предлагаемые в изобретении, можно получать путем синтеза с помощью обычных пептидных синтезаторов или путем химического лигирования приемлемых фрагментов, полученных таким образом.

Зрелые белки можно экспрессировать в клетках млекопитающих, дрожжей, бактерий или в других клетках под контролем соответствующих промоторов. Для получения указанных белков можно применять также бесклеточные системы трансляции, используя РНК, выведенные из конструкций ДНК, предлагаемых в настоящем изобретении. Соответствующие клонирующие и экспрессионные векторы, предназначенные для применения в сочетании с прокариотическими и эукариотическими хозяевами, описаны у Sambrook и др., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2-ое изд., изд-во Cold Spring Harbor, N. Y., 1989.

Транскрипцию ДНК, кодирующей полипептиды, предлагаемые в настоящем изобретении, в высших эукариотических организмах повышают путем встраивания в вектор энхансерной последовательности.

Энхансеры включают цис-активные элементы ДНК, как правило, состоящие примерно из 10-300 пар оснований, которые оказывают воздействие на промотор, повышая транскрипцию. Их примерами являются энхансер SV40 на удаленной стороне сайта инициации репликации длиной 100-270 пар оснований, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер промотора полиомы на удаленной стороне сайта инициации репликации и энхансеры аденоовирусов.

Как правило, рекомбинантные экспрессионные векторы должны включать сайты инициации репликации и селектируемые маркеры, обеспечивающие трансформацию клетки-хозяина, например, ген, обуславливающий устойчивость к ампициллину, в E. coli и ген TRP1 S. cerevisiae, и промотор, выведенный из гена с высоким уровнем экспрессии для обеспечения транскрипции расположенной в прямом направлении.

лении структурной последовательности. Такие промоторы можно выводить из оперонов, кодирующих гликолитические ферменты, такие как (но, не ограничиваясь только ими) 3-фосфоглицераткиназа (PGK), альфа-фактор, кислая фосfatаза или белки теплового шока. Гетерологичную структурную последовательность собирают на соответствующей фазе с последовательностями инициации и терминации трансляции и предпочтительно лидерной последовательностью, обладающей способностью обеспечивать секрецию транслированного белка в периплазматическое пространство или внеклеточную среду. Необходимо гетерологичная последовательность может кодировать слитый белок, включающий N-концевой идентифицирующий пептид, придающий требуемые характеристики, например стабилизацию или упрощение очистки экспрессируемого рекомбинантного продукта.

Приемлемые экспрессионные векторы, предназначенные для использования в бактериях, конструируют путем встраивания последовательности структурной ДНК, кодирующей требуемый белок, в сочетании с приемлемыми сигналами инициации и терминации трансляции в функциональной рамке считывания с использованием функционального промотора.

Вектор должен содержать один или несколько фенотипических селектируемых маркеров и сайт инициации репликации для гарантии сохранения вектора и при необходимости для обеспечения амплификации в хозяине. Пригодные для трансформации прокариотические хозяева представляют собой *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* и различные виды родов *Pseudomonas*, *Streptomyces* и *Staphylococcus*, хотя можно применять также отобранные другие виды.

Репрезентативные экспрессионные векторы, которые можно применять в бактериях, могут содержать (но, не ограничиваясь только ими) селектируемый маркер и бактериальный сайт инициации репликации, выведенный из поступающих в продажу плазмид, которые содержат генетические элементы хорошо известного клонирующего вектора pBR322 (ATCC 37017). Такими поступающими в продажу векторами являются, например, pKK223-3 (фирма Pharmacia Fine Chemicals, Уппсала, Швеция) и GEM1 (фирма Promega Biotec, Мэдисон, шт. Висконсин, США). Эти "каркасные" секции pBR322 объединяют с соответствующим промотором и структурной последовательностью, подлежащей экспрессии.

После трансформации приемлемого штамма-хозяина и выращивания штамма-хозяина до соответствующей клеточной плотности индуцируют выбранный промотор соответствующими средствами (например, изменением температуры или путем химической индукции) и клетки культивируют в течение дополнительного периода времени.

Клетки, как правило, собирают центрифугированием и затем разрушают физическими или химическими средствами, а полученный неочищенный экстракт сохраняют для дополнительной очистки.

Микробные клетки, применяемые для экспрессии белков, можно разрушать любым традиционным методом, включая циклы замораживания-оттаивания, обработку ультразвуком, механическое разрушение и применение лизирующих клетки агентов; указанные методы хорошо известны специалистам в данной области.

Для экспрессии рекомбинантного белка можно применять также различные культуральные системы клеток млекопитающих. Примерами систем экспрессии на основе клеток млекопитающих являются фибробласты почки обезьяны линии COS-7, описанные Gluzman, Cell, 23, 1981, с. 175. Другие клеточные линии, которые могут экспрессировать совместимый с ними вектор, включают, например, клеточные линии C127, 3T3, CHO, HeLa и BHK. Экспрессионные векторы млекопитающих должны содержать, как правило, сайт инициации репликации, приемлемый промотор и энхансер, а также любые необходимые сайты связывания рибосом, сайт полиденилирования, донор и акцептор сплайсинга, последовательности терминаторов транскрипции и 5'-фланкирующие нетранскрибуемые последовательности. Последовательности ДНК, выведенные из сайта сплайсинга SV40, и сайты полиденилирования можно применять для получения требуемых нетранскрибуемых генетических элементов.

Полипептиды можно выделять и очищать из рекомбинантных клеточных культур такими методами, как осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракция кислотами, анионо- или катионообменная хроматография, хроматография на фосфоцеллюлозе, хроматография на основе гидрофобных взаимодействий, аффинная хроматография, хроматография на гидроксилапатите и хроматография на лектине. Выделение может облегчаться, если полипептид экспрессируется на поверхности клеток, но это не является необходимым условием. Может требоваться также выделение расщепленных продуктов, которые расщепляют после экспрессии более длинной формы полипептида. При необходимости можно использовать стадии повторной укладки белка, известные в данной области, для завершения конфигурации зрелого белка. Для конечных стадий очистки можно использовать жидкостную хроматографию высокого разрешения (ЖХВР).

Полипептиды, предлагаемые в настоящем изобретении, могут представлять собой очищенные натуральные продукты или продукты, полученные с помощью методов рекомбинации, из прокариотического или эукариотического хозяина (например, с использованием культур клеток бактерий, дрожжей, высших растений, насекомых или млекопитающих). В зависимости от применяемого хозяина в процессе рекомбинантного получения полипептиды, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть гликозилированными или не гликозилированными. Полипептиды, предлагаемые в изобретении, могут включать также остаток метионина в качестве начального аминокислотного остатка.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения белки, предлагаемые в изобретении, выделяют и очищают так, чтобы они практически не содержали других белковых загрязнителей. Например, на долю белков, предлагаемых в изобретении, должно приходиться по меньшей мере 80 мас.% от общего содержания белка в образце, более предпочтительно по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98 мас.% от общего содержания белка.

Эти белки могут иметь форму раствора в воде, другом приемлемом растворителе, таком как диметилсульфоксид (ДМСО) или этанол, или в смеси приемлемых растворителей.

Примерами смесей растворителей являются смеси, включающие 10 мас.% этанола в воде и 2 мас.% ДМСО в воде. Раствор может содержать также соли, забуферивающие агенты, хаотропные агенты, детергенты, консерванты и т.п. В другом варианте белки могут находиться в форме твердого вещества, такого как лиофилизированный порошок или кристаллическое твердое вещество, которое может включать остаточные количества растворителя, соль или т.п.

В контексте настоящего описания понятие "антитела" включает поликлональные антитела, очищенные на основе аффинности поликлональные антитела, моноклональные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, такие как протеолитические F(ab')₂- и Fab'-фрагменты. Под определение подпадают также созданные с помощью генной инженерии интактные антитела или фрагменты, такие как химерные антитела, Fv-фрагменты, одноцепочечные антитела и т.п., а также синтетические антигенсвязывающие пептиды и полипептиды. Нечеловеческие антитела можно гуманизировать путем трансплантации нечеловеческих CDR в человеческие каркасные и константные области или путем включения полных нечеловеческих вариабельных областей (необязательно "маскируя" их с помощью поверхности, напоминающей человеческую, путем замены выставленных "напоказ" (презентуемых) остатков, результатом чего является "облицованное" антитело). В некоторых случаях гуманизированные антитела могут сохранять нечеловеческие остатки в каркасных участках человеческой вариабельной области для усиления соответствующих характеристик связывания. Благодаря гуманизации антител можно повышать биологическое время полужизни и снижать возможные отрицательные иммунные реакции при введении человеку.

Другие методы создания или отбора антител, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают обработку *in vitro* лимфоцитов человеческим белком или пептидом isoQC и отбор презентующих антитела библиотек в фаговых или подобных векторах (например, путем применения иммобилизованного или меченого человеческого белка или пептида isoQC).

Гены, кодирующие полипептиды, которые несут потенциальные домены связывания с человеческим полипептидом isoQC, можно получать путем случайного скрининга презентующих пептиды фаговых (фаговая презентация) или бактериальных (например, с использованием *E. coli*) библиотек. Нуклеотидные последовательности, кодирующие указанные полипептиды, можно получать различными путями, известными в данной области.

Как должно быть очевидно обычному специалисту в данной области, поликлональные антитела можно получать путем введения различным теплокровным животным, таким как лошади, коровы, козы, овцы, куры, кролики, мыши и крысы, человеческого полипептида isoQC или его фрагмента. Иммуногенность человеческого полипептида isoQC можно повышать с помощью адьюванта, такого как квасцы (гидроксид алюминия) или полного или неполного адьюванта Фрейнда, или поверхностно-активных веществ, таких как лизолецитин, плюроневые полиолы, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, KLH или динитрофенол. Среди адьювантов, которые можно применять для введения человеку, наиболее предпочтительными являются БЦЖ (бацилла Кальмета-Герена) и *Corynebacterium parvum*. Полипептиды, которые можно применять для иммунизации, включают слитые полипептиды, такие как слияния полипептида isoQC или его участка с полипептидом иммуноглобулина или связывающим мальтозу белком. Иммуногенный полипептид может представлять собой полноразмерную молекулу или ее часть. Если полипептидный участок является "гаптенподобным", то такой участок для иммунизации может оказаться целесообразным соединять или сцеплять с макромолекулярным носителем, таким как гемоцианин лимфы улитки (KLH), бычий сывороточный альбумин (БСА) или токсOID столбняка. Антитела к isoQC можно создавать также с помощью методов, хорошо известных в данной области. Такие антитела могут представлять собой (но, не ограничиваясь только ими) поликлональные, моноклональные, химерные и одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты и фрагменты, полученные с помощью экспрессионных библиотек Fab-фрагментов.

Нейтрализующие антитела (т.е. антитела, которые блокируют или модифицируют взаимодействия на активных сайтах) являются наиболее предпочтительными для терапевтического применения.

Для получения антител, связывающих белков или пептидов, которые специфически связываются с QPCTL, можно подвергать скринингу библиотеки одноцепочечных антител, Fab-фрагментов, других фрагментов антител, белковых доменов субстанций, не относящихся к антителам, или пептидов. Библиотеки можно создавать с помощью фаговой презентации, других методов рекомбинантной ДНК или пептидного синтеза (Vaughan T. J. и др., *Nature Biotechnology* 14, 1996, с. 309-314). Такие библиотеки, как правило, подвергают скринингу с использованием методов, которые хорошо известны в данной области, для идентификации последовательностей, для которых характерно специфическое связывание с QPCTL.

Предпочтительно олигопептиды, пептиды или их фрагменты, применяемые для индукции антител к QPCTL, имеют аминокислотную последовательность, состоящую по меньшей мере примерно из 5 аминокислот и более предпочтительно по меньшей мере примерно из 10 аминокислот. Предпочтительно также эти олигопептиды, пептиды или фрагменты идентичны части аминокислотной последовательности встречающегося в естественных условиях белка. Короткие участки аминокислотной последовательности QPCTL можно также сливать с другим белком, таким как KLH, и получать в результате антитела к химерной молекуле.

Моноклональные антитела к QPCTL можно получать с помощью любого хорошо известного метода, обеспечивающего получение молекул антител с помощью непрерывных культур клеточных линий. Они включают (но, не ограничиваясь только ими) метод гибридом, метод человеческих В-клеточных гибридом и метод на основе EBV-гибридом, хотя предпочтительными являются моноклональные антитела, полученные с помощью клеток гибридом.

Кроме того, можно применять методы, разработанные для производства "химерных антител", такие как сплайсинг мышиных генов антител с генами человеческих антител с получением молекулы с соответствующей антигенспецифичностью и биологической активностью (см. Neuberger M. S. и др., Nature 312, 1984, сс. 604-608). В другом варианте методики, описанные для производства одноцепочечных антител, можно адаптировать, используя известные в данной области методы, для получения QPCTL-специфических одноцепочечных антител. Антитела с родственной специфичностью, но с различным идиотипическим составом можно создавать путем перестановки цепи из произвольных комбинаторных библиотек иммуноглобулинов (Burton D. R., Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 1991, сс. 11120-11123).

Антитела можно получать также путем индукции *in vivo* производства в популяции лимфоцитов или путем скрининга библиотек иммуноглобулинов или панелей высоко специфических связывающихся реагентов согласно известным из литературы методам (Orlandi R. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 1989, сс. 3833-3837).

Можно создавать также фрагменты антител, которые содержат специфические сайты связывания QPCTL. Например, такие фрагменты включают (но, не ограничиваясь только ими) F(ab')₂-фрагменты, которые образуются в результате расщепления пепсином молекулы антитела, и Fab-фрагменты, которые образуются при восстановлении дисульфидных мостиков F(ab')₂-фрагментов. В другом варианте можно конструировать экспрессионные библиотеки Fab-фрагментов, что позволяет быстро и просто идентифицировать моноклональные Fab-фрагменты с требуемой специфичностью (Huse W. D. и др., Science 254, 1989, сс. 1275-1281).

Различные иммуноанализы можно применять для идентификации антител, имеющих требуемую специфичность. В данной области хорошо известны многочисленные протоколы конкурентного связывания или иммунорадиометрических анализов, в которых используют либо поликлональные, либо моноклональные антитела с установленной специфичностью. Такие иммуноанализы, как правило, включают оценку комплексообразования между QPCTL и специфическим для него антителом. Предпочтительным является двусайтовый, основанный на применении моноклональных антител, реактивных к двум не взаимодействующим эпитопам QPCTL, но можно применять также анализ, основанный на конкурентном связывании.

Как отмечалось ранее, QPCTL можно применять для лечения болезней.

Фармацевтические композиции, приемлемые для применения в этом объекте изобретения, включают композиции, в которых действующие вещества присутствуют в эффективных касательно одного из заболеваний количествах для достижения поставленной цели. Определение терапевтически эффективной дозы находится в компетенции специалистов в данной области и ее можно определять первоначально либо с помощью анализов в клеточных культурах, например в неопластических клетках, или на моделях, созданных на животных, как правило, таких как мыши, крысы, кролики, собаки или свиньи. Созданную на животном модель можно применять также для определения соответствующего диапазона концентраций и пути введения, указанную информацию затем, как правило, используют для определения доз и путей введения, которые можно применять на людях.

Терапевтически эффективная доза означает количество действующего вещества, например, QPCTL или фрагмента, антител к DPRP или агониста, антагониста или ингибитора QPCTL, которое облегчает конкретные симптомы или состояния заболевания. Например, количество, подлежащее введению, может обладать эффективностью в отношении циклизации N-концевого Glu или Gln требуемого субстрата-миши при контакте с ним. Терапевтическую эффективность и токсичность можно определять также стандартными фармацевтическими процедурами в культурах клеток или на экспериментальных животных, например, статистически рассчитывая значение ED₅₀ (доза, обладающая терапевтической эффективностью в отношении 50% популяции) или LD₅₀ (доза, смертельная для 50% популяции). Соотношение доз, вызывающих токсическое и терапевтическое действие, представляет собой терапевтический индекс, и его можно выражать в виде соотношения LD₅₀/ED₅₀. Фармацевтические композиции, для которых характерен высокий терапевтический индекс, являются предпочтительными. Данные, полученные с помощью анализов клеточных культур и в опытах на животных, применяют при определении диапазона входящих в препартивную форму доз для применения на человеке. Доза, входящая в такие композиции,

предпочтительно соответствует диапазону присутствующих в кровотоке концентраций, которые включают ED₅₀, обладающих невысокой токсичностью или не обладающих токсичностью. Уровень доз в указанном диапазоне зависит от применяемой формы лекарственного средства, чувствительности пациента и пути введения.

Точную дозу, как правило, должен определять специалист в области медицины с учетом таких факторов, как индивидуум, подлежащий лечению, при этом дозу и ее применение регулируют для обеспечения достаточного уровня активного фрагмента или поддержания требуемого действия. Факторы, которые следует учитывать, включают серьезность болезненного состояния, общее состояние здоровья индивидуума, возраст, вес и пол индивидуума, диету, время и частоту введения, комбинацию(и) лекарственных средств, реакцию чувствительности, переносимость/ответ на терапию. Фармацевтические композиции пролонгированного действия можно вводить каждые 3-4 дня, каждую неделю или даже каждые две недели в зависимости от времени полужизни и скорости клиренса конкретной формы.

Еще одним объектом изобретения являются молекулы полинуклеотидов, имеющие последовательности, которые являются антисмысловыми относительно МРНК-транскриптов полинуклеотидов, представленных в SEQ ID NO: 2-9. Введение молекулы антисмылового полинуклеотида может блокировать производство белка, кодируемого генами QPCTL, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 2-9. Методы получения молекул антисмыловых полинуклеотидов и введение таких молекул известно в данной области. Например, молекулы антисмыловых полинуклеотидов можно капсулировать в липосомах для слияния с клетками.

В частности, экспрессия генов QPCTL, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 2-9, в ткани головного мозга, предстательной железы, легкого, сердца, печени, селезенки и почки свидетельствует о ее возможной роли в патофизиологии указанных ниже болезней. Таким образом, следующим объектом изобретения являются диагностические анализы, предназначенные для выявления болезней, ассоциированных с неадекватной активностью или уровнем экспрессии QPCTL. Антитела, которые специфически связываются с QPCTL, можно применять для диагностики нарушений, характеризующихся экспрессией QPCTL, или в анализах, предназначенных для выявления пациентов, которых можно лечить с помощью QPCTL или агонистов или антагонистов (ингибиторов) QPCTL. Антитела, которые можно применять для целей диагностики, можно получать аналогично методам, описанным выше для получения терапевтических агентов. Диагностические анализы, предназначенные для выявления QPCTL, основаны на методах, которые предусматривают применение антитела и метки для выявления QPCTL в общей воде организма человека или в экстрактах клеток или тканей. Антитела можно применять с модификацией или без модификаций и их можно метить путем ковалентного или нековалентного связывания с репортерной молекулой. В данной области известно широкое разнообразие репортерных молекул. Рекомбинантные белки QPCTL, модифицированные так, чтобы они становились каталитически неактивными, можно применять также в качестве домinantных ингибиторов отрицательного действия. Такие модификации включают, например, мутацию активного сайта.

В данной области известны различные протоколы для оценки QPCTL, включая ELISA, РИА и FACS, и они являются основой для диагностирования измененных или аномальных уровней экспрессии QPCTL. Нормальные или стандартные значения уровня экспрессии QPCTL определяют, объединяя общую воду организма или клеточные экстракти, взятые у здоровых млекопитающих, преимущественно людей, с антителом к QPCTL в условиях, приемлемых для образования комплекса. Метод выявления QPCTL в биологическом образце должен включать стадии, на которых а) получают биологический образец; б) объединяют биологический образец с антителом к QPCTL в условиях, приемлемых для образования комплекса между QPCTL и антителом; и в) выявляют образование комплекса между QPCTL и антителом, выявляя тем самым присутствие QPCTL в биологическом образце.

Уровень комплексообразования затем можно оценивать количественно различными методами, преимущественно фотометрически. Уровни QPCTL, экспрессируемые в индивидууме, контроле и образце пораженной болезнью ткани, полученном с помощью биопсии, сравнивают со стандартным значением. Различие между стандартными и полученными для индивидуума значениями представляет собой параметры, позволяющие диагностировать болезнь.

В другом варианте осуществления изобретения полинуклеотиды, кодирующие QPCTL, применяют для диагностических целей, при этом полинуклеотиды могут включать олигонуклеотидные последовательности, комплементарные молекулам РНК и ДНК, а также ПНК. Эти полинуклеотиды можно применять для выявления и количественной оценки экспрессии гена в полученных путем биопсии тканях, в которых экспрессия QPCTL может коррелировать с одним из заболеваний. Диагностический анализ можно применять для выявления отсутствия, присутствия или избыточного уровня экспрессии QPCTL и для мониторинга регуляции уровней QPCTL в процессе терапевтического вмешательства. Кроме того, фармакогеномный, основанный на полиморфизмах одного нуклеотида (SNP) анализ генов QPCTL можно применять в качестве метода скрининга мутаций, свидетельствующих о предрасположенности к заболеванию или измененному ответу на лекарственные средства.

Полинуклеотидные и полипептидные последовательности QPCTL, их фрагменты, антитела к QPCTL и агонисты, антагонисты или ингибиторы QPCTL можно применять в качестве диагностических

инструментов для идентификации случаев молекулярного распознавания и белков, полипептидов и пептидов, которые взаимодействуют с белками QPCTL. Конкретным примером являются фаговые дисплейные пептидные библиотеки, содержащие более 108 пептидных последовательностей, которые можно подвергать скринингу в одном цикле пэннинга. Такие методы, а также другие, известные в данной области, можно использовать для идентификации соединений, которые ингибируют или усиливают активность одной из QPCTL, представленных в SEQ ID NO: 11-18.

Полученные в результате сочетания связи представляют собой функциональные взаимодействия, такие как комплексы или каскады реакций, и белки, которые взаимодействуют с QPCTL, можно идентифицировать с помощью дрожжевой двухгибридной системы, такой как протеомикс (дифференциальный анализ в 2D-гелях и масс-спектрометрия), и геномный анализ (дифференциальный анализ генной экспрессии с помощью микромассива или серийный анализ генной экспрессии (SAGE)).

Белки, идентифицированные в качестве функционально связанных с QPCTL, и процессы их взаимодействия составляют основу методов скрининга ингибиторов, агонистов и антагонистов и модуляторов этих взаимодействий QPCTL-белоков.

Понятие "антагонист" в контексте настоящего описания относится к молекуле-ингибитору, которая при связывании с QPCTL снижает уровень или продолжительность действия биологической или иммунологической активности QPCTL, например, снижая ферментативную активность пептидазы в отношении циклизации остатков Glu или Gln на N-конце субстратов QPCTL. Антагонисты могут представлять собой белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, антитела или любые другие молекулы, которые снижают действие QPCTL; например, они могут представлять собой небольшие молекулы и органические соединения, которые связываются с QPCTL и инактивируют их путем механизма конкурентного или неконкурентного типа. Предпочтительными являются небольшие молекулы-ингибиторы QPCTL. Наиболее предпочтительными являются конкурентные небольшие молекулы-ингибиторы QPCTL.

Специфические примеры ингибиторов ферментативной активности QPCTL представлены в примере 4. Ингибиторы могут представлять собой, например, ингибиторы циклазной активности QPCTL или в другом варианте ингибиторы активности связывания QPCTL с белками, с которыми они взаимодействуют. Конкретными примерами указанных ингибиторов могут являться, например, антитела к QPCTL антитела, пептиды, белковые фрагменты или небольшие ингибиторы пептидилпротеаз, или небольшие непептидные органические молекулы-ингибиторы, которые приготавливают в среде, которую можно интродуцировать в требуемый тип клеток. В другом варианте указанные ингибиторы можно присоединять к обеспечивающим направленный перенос лигандам для интродукции путем опосредуемого клеткой эндоцитоза и других опосредуемых рецептором событий. Указанные методы описаны дополнительно ниже и их могут использовать на практике специалисты в данной области с учетом данных о нуклеотидных и аминокислотных последовательностях QPCTL, представленных в настоящем описании.

Еще одним вариантом применения QPCTL является скрининг потенциальных антагонистов для применения в качестве терапевтических агентов, например для ингибирования связывания с QPCTL, а также скрининг агонистов. Таким образом, QPCTL, ее иммуногенные фрагменты или олигопептиды можно применять для скрининга библиотек соединений, которые являются перспективными агонистами или антагонистами, с использованием любого из разнообразных методов скрининга лекарственных средств. Фрагмент, применяемый для указанного скрининга, может присутствовать в растворе в свободном состоянии, может фиксироваться на твердой подложке, находиться на клеточной поверхности или может иметь внутриклеточную локализацию. Затем оценивают образование полученных путем связывания комплексов между QPCTL и агентом, подлежащим тестированию. Другие анализы, предназначенные для выявления антагонистов, которые должны ингибировать QPCTL, представлены в заявках на патент WO 2004/098625, WO 2004/098591 и WO 2005/075436, в которых описаны ингибиторы QC и которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки. Другим вариантом применения этих QPCTL, который следует отметить, является скрининг ингибиторов QC, осуществляемый для того, чтобы продемонстрировать, что они не обладают нежелательными побочными действиями, путем ингибирования также одной или нескольких QPCTL.

Метод, предложенный для скрининга библиотек небольших молекул с целью идентификации молекулы, которая связывается с QPCTL, как правило, заключается в том, что: а) получают библиотеку небольших молекул; б) объединяют библиотеку небольших молекул с полипептидом, последовательность которого представлена в одной из SEQ ID NO: 11-18, или его фрагментом в условиях, которые являются пригодными для образования комплекса; и в) выявляют образование комплекса, при этом присутствие такого комплекса позволяет идентифицировать небольшую молекулу, которая связывается с QPCTL.

Один из методов идентификации антагониста заключается в том, что вводят небольшую молекулу, которая связывается с QPCTL, в экстракти клеток, трансформированных вектором, который экспрессирует QPCTL, наряду с хромогенным субстратом (например, Ala-Pro-AFC или Ala-Pro-AMC) в условиях, в которых в норме должно происходить расщепление, а затем оценивают ингибирование расщепления ферментом по изменениям флуоресценции или абсорбции УФ-света, с помощью спектрофотометрии для идентификации молекул, которые ингибируют расщепление. Пониженная скорость реакции или общий уровень флуоресценции или абсорбции УФ-света в присутствии молекулы свидетельствуют о том, что

небольшая молекула является антагонистом, который снижает каталитическую/ферментативную активность QPCTL. После идентификации таких молекул их можно вводить для снижения или ингибирования циклизации находящихся на N-конце остатков Glu или Gln с помощью QPCTL.

Еще одним конкретным объектом изобретения является способ скрининга соединений, обладающих способностью ингибировать ферментативную активность по меньшей мере одного зрелого белка, предлагаемого в настоящем изобретении, предпочтительно выбранного из белков, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11-18, где способ заключается в том, что инкубируют зрелый белок и приемлемый субстрат зрелого белка в присутствии одного или нескольких тестируемых соединений или их солей, оценивают ферментативную активность зрелого белка, сравнивают указанную активность с соответствующей активностью, определенной в отсутствие тестируемого соединения, и отбирают тестируемое соединение или соединения, которое(ые) снижает(ют) ферментативную активность.

Изобретение относится также к способу скрининга избирательных QC-ингибиторов, т.е. соединений, обладающих способностью ингибировать ферментативную активность QC, где QC предпочтительно представляет собой белок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 10, который не ингибирует ферментативную активность по меньшей мере одного зрелого белка, предлагаемого в настоящем изобретении, предпочтительно выбранного из белков, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11-18, где способ заключается в том, что инкубируют указанный зрелый белок и приемлемый субстрат в присутствии одного или нескольких ингибиторов QC или их солей, оценивают ферментативную активность зрелого белка, сравнивают указанную активность с соответствующей активностью, определенной в отсутствие ингибитора QC, и отбирают соединение, которое не снижает ферментативную активность зрелого белка.

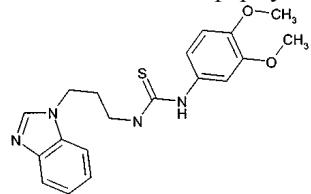
Изобретение относится также к способу скрининга избирательных QPCTL-ингибиторов, т.е. соединений, обладающих способностью ингибировать ферментативную активность по меньшей мере одного белка QPCTL, который предпочтительно выбирают из белков, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11-18; которые не ингибируют ферментативную активность QC, где QC предпочтительно представляет собой белок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 10, где способ заключается в том, что инкубируют указанный белок QC и приемлемый субстрат в присутствии одного или нескольких ингибиторов QPCTL или их солей, оценивают ферментативную активность QC, сравнивают указанную активность с соответствующей активностью, определенной в отсутствие ингибитора QPCTL, и отбирают соединение, которое не снижает ферментативную активность указанного белка QPCTL.

Ценные ингибиторы QC, которые можно применять также в качестве ингибиторов QPCTL, описаны в WO 2004/098625, WO 2004/098591, WO 2005/039548 и WO 2005/075436, которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки, прежде всего касательно структуры ингибиторов и их получения.

Примеры QPCTL-ингибиторов

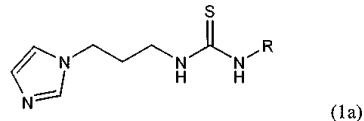
Потенциальные QPCTL-ингибиторы, которые пригодны для применения, и способы, предлагаемые в настоящем изобретении, описаны в WO 2005/075436, которая полностью включена в настоящее описание касательно структуры, синтеза и методов применения QC-ингибиторов.

В частности, приемлемым является соединение формулы 1*:



формула 1*

В другом варианте осуществления изобретения ингибиторы QPCTL могут представлять собой соединения формулы 1a,

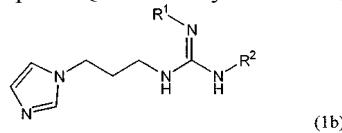


(1a)

в которой R имеет значения, указанные в примерах 1-53.

Пример	R	ESI-MC (M+H)
1	метил	199,3
2	трет-бутил	241,4
3	бензил	275,4
4	фенил	261,4
5	4-(фтор)фенил	279,35
6	4-(хлор)фенил	295,80
7	4-(этил)фенил	289,41
8	4-(трифторметил)фенил	329,4
9	4-(метоксикарбонил)фенил	319,4
10	4-(ацетил)фенил	303,4
11	4-(метокси)фенил	291,4
12	бицикло[2.2.1]гепт-5-ен-2-ил	277,5
13	3,4-(диметокси)фенил	321,5
14	2,4-(диметокси)фенил	321,5
15	3,5-(диметокси)фенил	321,5
16	2-(метоксикарбонил)фенил	319,4
17	4-(оксазол-5-ил)фенил	328,5
18	4-(пиразол-1-ил)фенил	327,4
19	4-(изопропил)фенил	303,5
20	4-(пиперидин-1-сульфонил)фенил	408,6
21	4-(морфолин-4-ил)фенил	346,5
22	4-(циан)фенил	286,4
23	2,3-дигидробензо[1,4]диоксин-6-ил	319,4
24	бензо[1,3]диоксол-5-ил	305,4
25	3,4,5(триметокси)фенил	351,5
26	3-(метокси)фенил	291,4
27	4-(этокси)фенил	305,5
28	4-(бензилокси)фенил	367,5
29	4-(метокси)бензил	305,5
30	3,4-(диметокси)бензил	335,5
31	2-(метоксикарбонил)-тиофен-3-ил	325,5
32	3-(этоксикарбонил)-4,5,6,7-тетрагидробензо[б]тиофен-2-ил	392,6
33	2-(метоксикарбонил)-4-(метил)тиофен-3-ил	339,5
34	бензо[c][1,2,5]тиазол-4-ил	319,5
35	бензо[c][1,2,5]тиазол-5-ил	319,5
36	5-(метил)-3-(фенил)изооксазол-4-ил	342,5
37	3,5-(диметил)изооксазол-4-ил	280,4
38	4-(йод)фенил	387,3
39	4-(бром)фенил	340,3
40	4-(метил)фенил	275,4
41	нафталин-1-ил	311,5
42	4-(нитро)фенил	306,4
43	бутил	241,4
44	циклооктил	295,5
45	фуран-2-илметил	265,4
46	тетрагидрофуран-2-илметил	269,4
47	бензо[1,3]диоксол-5-илметил	319,4
48	2-(морфолин-4-ил)этил	298,5
49	4-(метилсульфанил)фенил	307,5
50	4-(диметиламино)фенил	304,5
51	4-(трифторметокси)фенил	345,4
52	бензоил	288,3
53	пиридин-4-ил	261,1

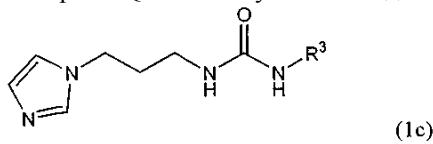
Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения формула 1b,



в которой R¹ и R² имеют значения, указанные в примерах 54-95

Пример	R ¹	R ²
54	циан	метил
55	циан	3,4-(диметокси)фенил
56	циан	2,4-(диметокси)фенил
57	циан	3,5-(диметокси)фенил
58	циан	2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-7-ил
59	циан	бензо[d][1,3]диоксол-6-ил
60	циан	3,4,5-(тристетокси)фенил
61	циан	3-(метокси)фенил
62	циан	4-(этокси)фенил
63	циан	4-(бензилокси)фенил
64	циан	фенил
65	циан	4-(метокси)фенил
66	циан	4-(ацетил)фенил
67	циан	4-(нитро)-фенил
68	циан	бензил
69	циан	нафталин-1-ил
70	циан	4-(фтор)фенил
71	циан	4-(йод)фенил
72	циан	4-(бром)фенил
73	циан	циклооктил
74	циан	<i>трем</i> -бутил
75	циан	4-(метил)фенил
76	циан	4-(метилтиоо)-фенил
77	циан	4-(этил)фенил
78	циан	4-(диметиламино)фенил
79	циан	бутил
80	циан	тритил
81	циан	(бензо[d][1,3]диоксол-6-ил)метил
82	циан	(тетрагидрофуран-2-ил)метил
83	циан	4-(трифторметил)фенил
84	циан	(фуран-2-ил)метил
85	циан	2-(морфолин-4-ил)этил
86	циан	4-(оксазол-5-ил)фенил
87	циан	пиридин-3-ил
88	циан	4-(циан)фенил
89	циан	4-(трифторметокси)фенил
90	циан	4-(пиперидиносульфонил)фенил
91	циан	4-(1Н-пиразол-1-ил)фенил
92	Н	3,4-(диметокси)фенил
93	метил	3,4-(диметокси)фенил
94	циан	2,3,4-(тристетокси)фенил
95	циан	циклогептил

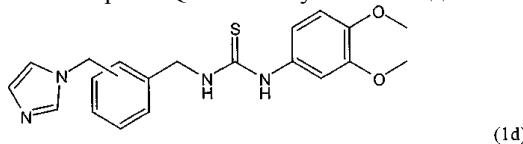
Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения формулы 1c,



в которой R³ имеет значения, указанные в примерах 96-102.

Пример	R ³	ESI-MC (M+H)
96	этил	197,3
97	6-фтор-4Н-бензо[d] [1,3]диоксин-8-ил	321,4
98	3-(цикlopентилокси)-4- (метокси)фенил	359,4
99	4-(гептилокси)фенил	359,5
100	3,4-дигидро-2Н-бензо[b] [1,4]диоксипин-7-ил	317,4
101	4-(бутокси)фенил	317,4
102	3,4-(диметокси)фенил	305,4

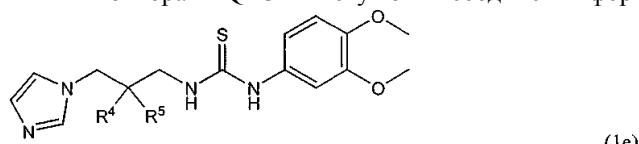
Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения формулы 1d,



в которой положение в кольце указано в примерах 103-105.

Пример	Положение замещения в бензиле	ESI-MC (M+H)
103	2	383,5
104	3	383,5
105	4	383,5

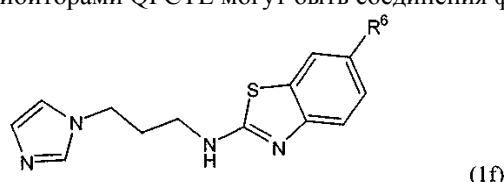
Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения формулы 1e,



в которой R⁴ и R⁵ имеют значения, указанные в примерах 106-109.

Пример	R ⁴	R ⁵	ESI-MC (M+H)
106(S)	H	метил	335,5
107(R)	метил	H	335,5
108	метил	метил	349,5
109	-CH ₂ -CH ₂ -		347,5

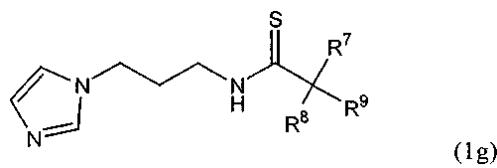
Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения формулы 1f,



в которой R⁶ имеет значения, указанные в примерах 110-112.

Пример	R ⁶	ESI-MC (M+H)
110	H	259,4
111	хлор	293,8
112	метокси	289,4

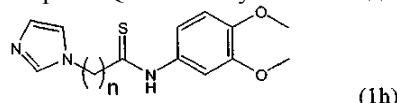
Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения формулы 1g,



в которой R⁷, R⁸ и R⁹ имеют значения, указанные в примерах 113-132.

Пример	R ⁷	R ⁸	R ⁹	ESI-MC (M+H)
113	фенил	H	H	260,4
114	тиофен-2-ил	H	H	266,5
115(R)	фенил	метил	H	274,5
116(S)	фенил	H	метил	274,5
117	фенил	H	этил	288,5
118	фенил	H	фенил	336,5
119	3,4-(диметокси)фенил	H	H	320,5
120	3,4-(диметокси)фенил	метил	метил	347,2
121	4-(хлор)фенил	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -		334,9
122	4-(хлор)фенил	-CH ₂ -C ₂ H ₄ -CH ₂ -		349,0
123	4-(метокси)фенил	-CH ₂ -C ₃ H ₆ -CH ₂ -		358,6
124	4-(метокси)фенил	-CH ₂ -CH ₂ -		316,5
125	3,4-(диметокси)фенил	-CH ₂ -CH ₂ -		346,5
126	3,4,5-(триметокси)фенил	-CH ₂ -CH ₂ -		376,6
127	2,3,4-(триметокси)фенил	-CH ₂ -CH ₂ -		376,6
128	2-(метокси)фенил	-CH ₂ -CH ₂ -		316,5
129	3-(метокси)фенил	-CH ₂ -CH ₂ -		316,5
130	2,3-(диметокси)фенил	-CH ₂ -CH ₂ -		346,5
131	3,5-(диметокси)фенил	-CH ₂ -CH ₂ -		346,5
132	2,5-(диметокси)фенил	-CH ₂ -CH ₂ -		346,5

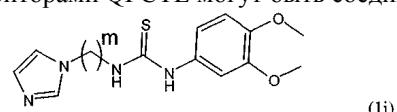
Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения формулы 1h,



в которой n имеет значения, указанные в примерах 133-135.

Пример	n	ESI-MC (M+H)
133	3	306,4
134	4	320,5
135	5	334,5

Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения формулы 1i,



в которой m имеет значения, указанные в примерах 136-137.

Пример	m	ESI-MC (M+H)
136	2	307,4
137	4	335,5

Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения, формулы которых представлены в примерах 138-141.

Пример	Структура	ESI-MC (M+H) ⁺
138		347,5
139		347,2
140		226,3
141		370,4

Понятие "агонист" в контексте настоящего описания относится к молекуле, которая при связывании с QPCTL усиливает или пролонгирует действие QPCTL.

Агонисты могут представлять собой белки, нуклеиновые кислоты, углеводы или любые другие молекулы, которые связываются и модулируют действие QPCTL. Хотя маловероятно, что небольшие молекулы могут являться эффективными агонистами QPCTL, способ идентификации указанных небольших молекул, которые связываются с QPCTL, в качестве агонистов заключается в том, что интродуцируют хромогенную форму небольшой молекулы, которая связывается с QPCTL, в клетки, трансформированные вектором, который экспрессирует QPCTL, и анализируют изменение флуоресценции или абсорбции УФ-света с помощью спектрофотометрии. Повышенные уровни УФ-абсорбции или флуоресценции свидетельствуют о том, что небольшая молекула является агонистом, который повышает активность QPCTL.

Другой метод скрининга лекарственных средств, который можно применять для масштабного скрининга соединений, имеющих приемлемую аффинность связывания с представляющим интерес белком, описан в опубликованной заявке PCT WO 84/03564. Согласно этому методу большое количество различных небольших исследуемых соединений синтезируют на твердом субстрате, таком как пластиковые иголки или некоторые другие поверхности. Исследуемые соединения подвергают взаимодействию с белком QPCTL или его фрагментами, а затем отмывают. Затем связанный белок QPCTL выявляют методами, хорошо известными в данной области. Очищенный белок QPCTL можно также непосредственно наносить на планшеты для применения в вышеуказанных методах скрининга лекарственных средств. В другом варианте не обладающие нейтрализующей способностью антитела можно применять для захвата пептида и иммобилизации его на твердой подложке.

В другом варианте осуществления изобретения можно использовать анализы, основанные на конкурентном скрининге лекарственных средств, в которых нейтрализующие антитела, обладающие способностью связывать QPCTL, специфично конкурируют с исследуемыми соединениями за связывание с QPCTL. В этом методе антитела можно применять для выявления присутствия любого пептида, который имеет одну или несколько антигенных детерминант, общих с QPCTL.

Как указано выше, путем исследования сайтов связывания можно создавать лиганды, которые, например, обладают более выраженным взаимодействием с белком QPCTL, чем его присутствующие в естественных условиях лиганды. Такие обладающие антагонистическим действием лиганды должны связываться с QPCTL с большей аффинностью и поэтому функционировать в качестве конкурентных лигандов. В другом варианте можно создавать синтетические или рекомбинантные белки, гомологичные или аналогичные сайту связывания лиганда нативного белка QPCTL, которые могут представлять собой другие молекулы, обладающие высокой аффинностью к QPCTL. Такие молекулы должны также обладать способностью замещать QPCTL и обеспечивать защитное действие.

Как указано выше, данные о структурах QPCTL позволяют создавать гомологичные или аналогичные синтетические сайты связывания. Такие молекулы могут значительно облегчать использование способности к связыванию с представляющими собой мишень потенциальных терапевтических агентов и их можно также применять для скрининга потенциальных терапевтических агентов. Кроме того, их можно применять в качестве иммуногенов при производстве моноклональных антител, причем сами эти антитела можно применять для диагностики/терапии согласно описанным выше методам.

Терапевтические применения

В данной области известно, что амилоидные пептиды, например, Абета 1-42 (SEQ ID NO: 23) и Абета 1-40 (SEQ ID NO: 24) укорачиваются на N-конце с помощью протеолитических ферментов, таких, например, как аминопептидазы или дипептидиламинопептидазы, что приводит к образованию Абета-

пептидов 3-42 (SEQ ID NO: 25), 3-40 (SEQ ID NO: 26), 11-42 (SEQ ID NO: 27) и 11-40 (SEQ ID NO: 28). В этих укороченных Абета-пептидах первым N-концевым остатком является остаток глутамата, и поэтому они представляют собой субстраты для QC (см. также WO 2004/09862), а возможно также для QPCTL, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11-18, 21 и 22, предпочтительно для человеческих isoQC, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11, 12, 21 и 22, наиболее предпочтительно человеческих isoQC, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11 и 12. Образовавшиеся pGlu-Абета-пептиды, последовательности которых представлены в SED ID NO: 29-32, являются существенно более гидрофобными по сравнению с непироглутаматными пептидами, в большей степени способны к образованию агрегатов А-бета-пептидов, таких как олигомеры и фибриллы, и, как установлено, обладают более высокой нейротоксичностью. И, наконец, Абета-пептиды, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 29-32, играют основную роль в развитии болезни Альцгеймера и синдрома Дауна.

Таким образом, ингибиторы QPCTL, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11-18, 21 и 22, предпочтительно человеческих isoQC, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11, 12, 21 и 22, наиболее предпочтительно человеческих isoQC, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11 и 12, можно применять для лечения связанных с амилоидным пептидом заболеваний, прежде всего нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера и синдрома Дауна.

Другими потенциальными физиологическими субстратами QPCTL у млекопитающих являются субстраты, выбранные из группы, включающей Glu¹-ABr (SEQ ID NO: 33), Glu¹-ADan (SEQ ID NO: 34) и Gln¹-гастроны (17 и 34) (SEQ ID NO: 35 и 36). Их пироглутаматные формы (SEQ ID NO: 37-40) вызывают патологии, например, выбранные из группы, включающей рак двенадцатиперстной кишки, связанный и несвязанный с заражением Helicobacter pyloris, колоректальный рак, синдром Золлингера-Эллисона, семейную британскую деменцию (СБД) и семейную датскую деменцию (СДД). Таким образом, ингибиторы QPCTL можно применять для лечения указанных патологий.

Другие потенциальные физиологические субстраты QPCTL представлены в табл. 3.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности физиологически активных пептидов с N-концевым остатком глутамина

Пептид	Аминокислотная последовательность	Функция
гастрин 17 Swiss-Prot: P01350	QGPWL EEEEEAYGWM DF (амид)	Гастрин стимулирует слизистую желудка к производству и секреции соляной кислоты и поджелудочную железу к секреции ее пищеварительных ферментов. Он стимулирует также сокращение гладких мышц и усиливает кровоток и секрецию воды в желудке и тонком кишечнике.
нейротензин Swiss-Prot: P30990	QLYENKPRRP YIL	Нейротензин играет эндокринную и паракринную роль в регуляции метаболизма жиров. Он вызывает сокращение гладких мышц.
FPP	QEP (амид)	Трипептид, родственный тиреотропин-рилизинг-фактору (TRH), обнаружен в семенной плазме. В современных исследованиях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> установлено, что FPP играет важную роль в регуляции fertильности спермы.
TRH Swiss-Prot: P20396	QHP (амид)	TRH функционирует в качестве регулятора биосинтеза TSH в передней доле гипофиза и качестве нейротрансмиттера/нейромодулятора в центральной и периферической нервной системе.
GnRH Swiss-Prot: P01148	QHWSYGL RP(G) (амид)	Стимулирует секрецию гонадотропинов; стимулирует секрецию, как лютеинизирующего, так и фолликулостимулирующего гормона.

CCL16 (малый индуцибельный цитокин A16) Swiss-Prot: O15467	QPKVPEW VNTPSTCCLK YYEKVLPRRL VVGYRKALNC HLPAIIFVTK RNREVCTNPN DDWVQEYIKD PNPLLPTRN LSTVKIITAK NGPQLLNSQ	Обладает хемотаксической активностью для лимфоцитов и макрофагов, но не для нейтрофилов. Проявляет также высокую миелосупрессорную активность, подавляя пролиферацию миелоидных клеток-предшественников. Рекомбинантный SCYA16 обладает хемотаксической активностью для макрофагов и ТНР-1-моноцитов, но не для покоящихся лимфоцитов и нейтрофилов. Индуцирует поток кальция в ТНР-1-клетках, которые предварительно десенсибилизированы посредством предыдущей экспрессии RANTES.
CCL8 (малый индуцибельный цитокин A8) Swiss-Prot: P80075	QPDSVSI PITCCFNVIN RKIPIQRLS YTRITNIQCP KEAVIFKTKR GKEVCADPKE RWVRDSMKHL DQIFQNLKP	Хемотаксический фактор, привлекающий макрофаги, лимфоциты, базофилы и эозинофилы. Может играть роль в онкологии и воспалительных реакциях хозяина. Этот белок может связывать гепарин.
CCL2 (малый индуцибельный цитокин A2) Swiss-Prot: P13500	QPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ KWVQDSMDHL DKQTQTPKT	Хемотаксический фактор, привлекающий макрофаги и базофилы, но не нейтрофилы или эозинофилы. Повышает противоопухолевую активность макрофагов. Участвует в патогенезе заболеваний, характеризующихся инфильтрацией макрофагов, таких как псориаз, ревматоидный артрит или атеросклероз. Может участвовать в рекрутменте макрофагов в стенке артерий в процессе развития атеросклероза. Связывается с CCR2 и CCR4.
CCL18 (малый индуцибельный цитокин A18) Swiss-Prot: P55774	QVGTNKELC CLVYTSWQIP QKFIVDYSET SPQCPKPGVI LLTKRGRQIC ADPNKKWVQK YISDLKLNA	Хемотаксический фактор, привлекающий лимфоциты, но не макрофаги или гранулоциты. Может участвовать в В-клеточной миграции в В-клеточные фолликулы в лимфатических узлах. Привлекает нестимулированные Т-лимфоциты к дендритным клеткам и активированные макрофаги в лимфатические узлы, обладает хемотаксической активностью для нестимулированных Т-клеток, CD4+ и CD8+-T-клеток и поэтому может играть роль, как в гуморальных, так и в клеточно-опосредованных иммунных ответах.

фракталкин (нейротактин) Swiss-Prot: P78423	QHHGVT KCNITCSKMT SKIPVALLIH YQQNQASC GK RAIILETRQH RLFCADPKEQ WVKDAMQHLD RQAAALTRNG GTFEKQIGEV KPRTTPAAGG MDESVVLEPE ATGESSSLEP TPSSQEAQRA LGTSPELPTG VTGSSGTRL P PTPKAQDGPP VGTTELFRVPP VSTAATWQSS APHQPGPSLW AEAKTSEAPS TQDPSTQAST ASSPAPEENA PSEGQRVWVGQ GQSPRPENS L EREEMGPVPA HTDAFQDWGP GSMAHVSVVP VSSEGTPSRE PVASGSWTPK AEEPIHATMD PQRLGVLT P VPDAQAATRR QAVGLLAFLG LLFCLGVAMF TYQLSLQGCPR KMAGEMAEGL RYIPRSCGSN SYVLVPV	Растворимая форма является хемотаксической для Т-клеток и макрофагов, но не для нейтрофилов. Связанная с мембраной форма усиливает адгезию таких лейкоцитов с эндотелиальными клетками. Может играть роль в регуляции процессов адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелии. Связывается с cx3cr1.
CCL7 (малый индуциальный цитокин A7) Swiss-Prot: P80098	QPVGINT STTCCYRFIN KKIPKQRLES YRRTTSSHCP REAVIFKTKL DKEICADPTQ KWVQDFMKHL DKKTQTPKL	Хемотаксический фактор, привлекающий макрофаги и эозинофилы, но не нейтрофилы. Усиливает противоопухолевую активность макрофагов. Индуцирует также высвобождение желатиназы B. Этот белок может связывать гепарин. Связывается с CCR1, CCR2 и CCR3.
орексин А (гипокретин-1) Swiss-Prot O43612	QPLPDCCRQK TCSCRLYELL HGAGNHAAGI LTL	Нейропептид, который играет важную роль в регуляции всасывания пищи и в нарушении сна, вероятно, из-за координации комплекса поведенческих и физиологических реакций этих комплементарных, связанных с гомеостазом функций. Он играет также существенную роль в связанной с гомеостазом регуляции энергетического метаболизма, нарушении функции вегетативной нервной системы, нарушении гормонального баланса и нарушении регуляции общей воды организма. Орексин-А связывается как с OX1R, так и с OX2R с высокой аффинностью.
вещество Р	RPK PQQFFGLM (циклизация Gln ⁵ после отщепления остатков 1-4)	Принадлежит к тахикининам. Тахикинины представляют собой активные пептиды, которые возбуждают нейроны, вызывают поведенческие реакции, являются эффективными вазодилататорами и усиливающими секрецию факторами и сокращают (прямо или косвенно) целый ряд гладких мышц.

В качестве новых физиологических субстратов для QPCTL идентифицированы пептиды Gln¹-гастрин (длиной 17 и 34 аминокислоты), Gln¹-нейротензин и Gln¹-FPP. Гастрин, нейротензин и FPP несут остаток pGlu в N-концевом положении. Установлено, что у всех пептидов этот N-концевой остаток pGlu может быть образован из N-концевого глутамина в результате QPCTL-катализа. Вследствие этого указанные пептиды активизируются с точки зрения их биологической функции при превращении N-концевого остатка глутамина в pGlu.

Клетки, обладающие способностью к трансдукции через эпителий, прежде всего несущие гастрин (G) клетки, осуществляют координацию секреции желудочной кислоты с поступающей в желудок пи-

щей. В современных исследованиях установлено, что из предшественника гастрин образуются продукты, обладающие несколькими видами активности, и что существует целый ряд важных моментов в биосинтезе гастрин. Участвующие в биосинтезе предшественники и промежуточные продукты (прогастрин и Gly-гастрин), возможно, представляют собой факторы роста; их продукты, амидированные гастрин, регулируют пролиферацию эпителиальных клеток, дифференцировку продуцирующих кислоту париетальных клеток и секреции гистамина энteroхромаффиноцит-подобных клеток (ECL-клетки), и экспрессию генов, связанных с синтезом и хранением гистамина в ECL-клетках, а также острую стимуляцию секреции кислоты. Гастрин стимулирует также производство представителей семейства эпидермального фактора роста (EGF), которые, в свою очередь, ингибируют функцию париетальных клеток, но стимулируют рост поверхностных эпителиальных клеток. Концентрации гастрин в плазме у пациентов, зараженных *Helicobacter pylori*, у которых, как известно, существует повышенный риск возникновения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и рака желудка, повышены (Dockray G.J., J Physiol, 15, 1999, cc. 315-324).

Известно, что пептидный гормон гастрин, который выделяется из антравальных G-клеток, стимулирует синтез и высвобождение гистамина из ECL-клеток в кислородопродуцирующую слизистую через ССК-2-рецепторы. Мобилизованный гистамин индуцирует секрецию кислоты в результате связывания с H(2)-рецепторами, локализованными на париетальных клетках. В современных исследованиях сделано предположение о том, что гастрин, как в виде полностью амидированной, так и в виде менее процессырованных форм (прогастрин и удлиненный глицином гастрин), также является фактором роста в желудочно-кишечном тракте. Было установлено, что основное трофическое действие амидированного гастрин связано с кислородопродуцирующей слизистой оболочкой желудка, где он вызывает повышенную пролиферацию стволовых клеток желудка и ECL-клеток, что приводит к увеличению массы париетальных и ECL-клеток. С другой стороны, основной мишенью трофического действия менее процессырованного гастринина (например, удлиненного глицином гастрин), вероятно, является слизистая оболочка ободочной кишки (Koh T.J. и Chen D., Regul Pept 93, 2000, cc. 337-344).

Согласно следующему варианту осуществления настоящего изобретения предложено применение повышающих активность эффекторов QPCTL для стимуляции пролиферации клеток желудочно-кишечного тракта, прежде всего пролиферации слизистых клеток желудка, пролиферации эпителиальных клеток, дифференцировки продуцирующих кислоту париетальных клеток и секреции гистамина энteroхромаффиноцит-подобных клеток (ECL) и экспрессии генов, связанных с синтезом и хранением гистамина в ECL-клетках, а также для стимуляции острой секреции кислоты у млекопитающих путем поддерживания или повышения концентрации активного pGlu¹-гастринина (SEQ ID NO: 39 и 40).

Согласно следующему варианту осуществления настоящего изобретения предложено применение ингибиторов QPCTL для лечения у млекопитающих язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и рака желудка, связанного или не связанного с заражением *Helicobacter pylori*, путем снижения скорости превращения неактивного Gln¹-гастринина (SEQ ID NO: 35 и 36) в активный pGlu¹-гастрин (SEQ ID NO: 30 и 40).

Нейротензин (НТ) (SEQ ID NO: 41) представляет собой нейропептид, участвующий в патофизиологии шизофрении, который специфически модулирует системы нейротрансмиттеров (нейромедиаторов), регуляция которых, как продемонстрировано ранее, нарушается при этом заболевании. Клинические исследования, при которых определяли концентрации НТ в спинномозговой жидкости (СМЖ), позволили выявить группу страдающих шизофренией пациентов с пониженными концентрациями НТ в СМЖ, которые восстанавливались при эффективном лечении с помощью антидепрессивных лекарственных средств. Известны также данные, которые подтверждают роль НТ-систем в механизме действия антидепрессивных лекарственных средств. Поведенческие и биохимические реакции при введении НТ в центральную нервную систему очень сходны с реакциями на системное введение антидепрессивных лекарственных средств, и антидепрессивные лекарственные средства повышают нейротрансмиссию НТ. Совокупность этих данных привела к гипотезе о том, что НТ функционирует в качестве эндогенного антидепрессивного агента. Кроме того, обычные и атипичные антидепрессивные лекарственные средства по-разному изменяют нейротрансмиссию НТ в области черного тела и в мезолимбических допаминсодержащих конечных областях, и эти эффекты обусловливают способность вызывать побочные действия и эффективность соответственно (Binder E. B. и др., Biol Psychiatry, 50, 2001, cc. 856-872).

Таким образом, настоящее изобретение относится к применению повышающих активность эффекторов QPCTL для приготовления антидепрессивных лекарственных средств и/или для лечения шизофрении у млекопитающих. Эффекторы QPCTL либо поддерживают, либо повышают концентрацию активного pGlu¹-нейротензина.

Стимулирующий оплодотворение пептид (FPP), трипептид, родственный тиреотропин-рилизинг-фактору (TRH), обнаружен в семенной плазме. Современные исследования *in vitro* и *in vivo* позволили установить, что FPP играет важную роль в регуляции fertильности спермы. В частности, FPP прежде всего стимулирует "включение" неспособных к оплодотворению (неактивных) сперматозоидов и существенно быстрее делает их fertильными, а затем поддерживают эту способность посредством того, что сперматозоиды не подвергаются спонтанной потере акросомы и вследствие этого не теряют способность

к оплодотворению. Аденозин который, как известно, регулирует путь трансдукции сигнала аденилилциклизы (АС)/цАМФ, приводит к аналогичным реакциям и фактически усиливает их. Установлено, что и FPP, и аденозин стимулируют производство цАМФ в неактивных клетках, но ингибируют его в активных клетках, причем FPP-рецепторы каким-то образом взаимодействуют с аденозиновыми рецепторами и G-протеинами для осуществления регуляции АС. Эти события влияют на состояние фосфорилирования тирозина различных белков, некоторые из которых важны для начального "включения", другие, вероятно, участвуют в самой реакции акросомы. Кальцитонин и ангиотензин II, также обнаруженные в семенной плазме, оказывают аналогичные действия *in vitro* на неактивные сперматозоиды и могут усиливать реакции на FPP. Эти молекулы оказывают аналогичные действия *in vivo*, оказывая влияние на fertильность путем стимуляции и затем поддержания способности к оплодотворению. Любое уменьшение доступности FPP, аденозина, кальцитонина и ангиотензина II или дефекты в их рецепторах приводят к развитию мужского бесплодия (Fraser L.R. и Adeoya-Osigwa S. A., Vitam Horm 63, 2001, сс. 1-28).

Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения является применение ингибиторов QPCTL для приготовления препятствующих оплодотворению лекарственных средств и/или для снижения fertильности у млекопитающих. Ингибиторы QPCTL снижают концентрацию активного pGlu-FPP, что приводит к предупреждению способности к оплодотворению спермы и к инактивации сперматозоидов. В противоположность этому установлено, что повышающие активность эффекторы QC могут стимулировать fertильность особей мужского пола и их можно применять для лечения бесплодия.

Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения являются дополнительные идентифицированные физиологические субстраты QPCTL. Они представляют собой Gln¹-CCL2 (SEQ ID NO: 45), Gln¹-CCL7 (SEQ ID NO: 48), Gln¹-CCL8 (SEQ ID NO: 44), Gln¹-CCL16 (SEQ ID NO: 43), Gln¹-CCL18 (SEQ ID NO: 46) и Gln¹-фракталкин (SEQ ID NO: 47) (более подробные характеристики приведены в табл. 3). Эти полипептиды играют важную роль в таких патофизиологических состояниях, как подавление пролиферации миелодных клеток-предшественников, неоплазии, воспалительные реакции хозяина, рак, псориаз, ревматоидный артрит, атеросклероз, гуморальные и клеточно-опосредуемые иммунные ответы, процессы адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелий.

В настоящее время в клинических опытах изучено несколько цитотоксических вакцин на основе Т-лимфоцитарных пептидов против гепатита В, вируса иммунодефицита человека и меланомы. Одной из перспективных вакцин против меланомы, которую применяют индивидуально или в сочетании с другими опухолевыми антигенами, является декапептид ELA. Этот пептид является аналогом иммунодоминантного пептида антигена Melan-A/MART-1, который несет N-концевую глутаминовую кислоту. Известно, что аминогруппа и гамма-карбоксильная группа глутаминовых кислот, а также аминогруппа и гамма-карбоксамидная группа глутаминов легко конденсируются с образованием пироглутаминовых производных. Для решения указанных проблем, связанных со стабильностью, было разработано несколько пептидов, представляющих интерес с фармацевтической точки зрения, которые содержали пироглутаминовую кислоту вместо N-концевого глутамина или глутаминовой кислоты без потери фармакологических свойств. Однако по сравнению с ELA у производного пироглутаминовой кислоты (PyrELA), а также N-концевого кэпированного ацетилом производного (AcELA) не удалось сохранить цитотоксическую активность, присущую Т-лимфоцитами (CTL). Несмотря на то, что в PyrELA и AcELA были внесены кажущиеся очень небольшими модификации, эти два производных, вероятно, обладают более низкой аффинностью по сравнению с ELA к специфическому классу I главного комплекса гистосовместимости. Следовательно, для того, чтобы полностью сохранить активность ELA, следует избегать образования PyrELA (Beck A. и др., J Pept Res 57, 2001, сс. 528-538). В последние годы установлено, что при меланомах происходит также сверхэкспрессия глутаминилциклизы (QC) (Ross D.T. и др., Nat Genet 24, 2000, сс. 227-235).

Таким образом, настоящее изобретение относится к применению ингибиторов QPCTL для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения патофизиологических состояний, например для подавления пролиферации миелоидных клеток-предшественников, неоплазии, воспалительных реакций хозяина, рака, злокачественного метастаза, меланомы, псориаза, ревматоидного артрита, атеросклероза, нарушенных гуморальных и клеточно-опосредуемых иммунных ответов, процессов адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелий.

Кроме того, при создании настоящего изобретения Gln¹-орексин A (SEQ ID NO: 49) был идентифицирован в качестве физиологического субстрата QPCTL. Орексин A представляет собой нейропептид, который играет важную роль в регуляции всасывания пищи и нарушении сна, вероятно, в результате координации комплекса поведенческих и физиологических реакций этих комплементарных связанных с гомеостазом функций. Он играет также определенную роль в связанной с гомеостазом регуляции энергетического метаболизма, функции вегетативной нервной системы, гормональном балансе и регуляции общей воды организма.

Еще одним вариантом осуществления настоящего изобретения является применение ингибиторов QPCTL для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения нарушенного всасывания пищи и сна, нарушенной, связанной с гомеостазом регуляции энергетического метаболизма, нарушенной функции вегетативной нервной системы, нарушенного гормонального баланса и нарушенной

регуляции общей воды организма.

Экспансия полиглутамина в некоторые белки приводит к возникновению нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Кеннеди. Их механизм пока остается неясным. Биохимические свойства полиглутаминовых повторов позволяют дать одно из возможных объяснений: эндоплазматическое расщепление связи глутамил-глутамил с последующим образованием пироглутамата может принимать участие в патогенезе в результате повышения катаболитической стабильности, гидрофобности, амилоидогенности и нейротоксичности полиглутамильных белков (Saido T., Med. Hypotheses, 54(3), март 2000, сс. 427-429). Таким образом, настоящее изобретение относится также к применению ингибиторов QPCTL для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения болезни Паркинсона и болезни Гентингтона.

Еще одним субстратом QPCTL является пептид QYNAD (SEQ ID NO: 51). Его пироглутаматная форма pGlu-Tyr-Asn-Ala-Asp (pEYNAD) (SEQ ID NO: 52) является эффективным агентом, который обладает блокирующим действием на потенциалзависимые натриевые каналы. Натриевые каналы экспрессируются с высокой плотностью в миелинированных аксонах и являются необходимыми для проведения потенциалов действия вдоль аксонов в головном и спинном мозге млекопитающих. Таким образом, можно предположить, что они участвуют в некоторых аспектах патофизиологии рассеянного склероза (MS), синдрома Гийена-Барре и хронической воспалительной демиелинизирующей полирадикулоневропатии.

Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения является применение ингибиторов QPCTL для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения воспалительных аутоиммунных заболеваний, прежде всего рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре и хронической воспалительной демиелинизирующей полирадикулоневропатии, при этом ингибируется блокирующий образование потенциалзависимых натриевых каналов пептид pEYNAD.

Кроме того, настоящее изобретение относится к диагностическому анализу с использованием QC-ингибитора.

Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ диагностики любого из перечисленных выше заболеваний и/или состояний, заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых

получают образец из индивидуума, который, как ожидается, поражен указанным заболеванием и/или состоянием,

приводят образец в контакт с QC-ингибитором и

определяют, поражен ли индивидуум указанным заболеванием и/или состоянием.

Предпочтительно образец, применяемый в указанном способе диагностики, представляет собой образец крови, образец сыворотки, образец спинномозговой жидкости или образец мочи.

Предпочтительно индивидуум в указанном способе диагностики, представляет собой человека.

Предпочтительно QC-ингибитор, применяемый в указанном способе диагностики, представляет собой избирательный QC-ингибитор.

Предпочтительно также в указанном диагностическом анализе используют избирательные QPCTL-ингибиторы.

Настоящее изобретение относится также к диагностическому набору, предназначенному для осуществления способа диагностики, который содержит средства выявления, указанные выше для диагностического анализа, и средства измерения.

Пример 1. Получение человеческой isoQC.

Клеточные линии и среды

Клеточную линию почки зелено-зеленой африканской мартышки COS-7, клеточную линию человеческой нейробластомы S-SY5Y, клеточную линию человеческой астроцитомы LN405, клеточную линию человеческой кератокарциномы HaCaT и клеточную линию человеческой печеночно-клеточной карциномы Нер-G2 культивировали в соответствующих средах для клеточных культур (DMEM, 10% ФБС для Cos-7, SH-SY5Y, LN405, HaCaT), (RPMI 1640, 10% ФБС для Нер-G2), в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂ (HaCaT, Нер-G2, COS-7) или 10% CO₂ (SH-SY5Y, LN405) при 37°C.

Анализ экспрессии человеческой isoQC с помощью ОТ-ПЦР

Общую РНК выделяли из клеток линий SH-SY5Y, LN405, HaCaT и Нер-G2 с помощью набора RNeasy Mini Kit (фирмы Qiagen) и подвергали обратной транскрипции с помощью Superscript II (фирма Invitrogen). Затем человеческую isoQC амплифицировали, используя разведение 1:12,5 полученного кДНК-продукта, в 25 мкл реакционной смеси, содержащей ДНК-полимеразу типа Herculase Enhanced (фирма Stratagene), используя праймеры isoQCh-1 (смысловой, SEQ ID NO: 53) и isoQCh-2 (антисмысловой, SEQ ID NO: 54). ПЦР-продукт Нер-G2 очищали с помощью набора для очистки Strataprep PCR (фирма Stratagene) и подтверждали секвенированием.

Результаты

Анализ экспрессии человеческой isoQC с помощью ОТ-ПЦР

Установлено, что транскрипты человеческой isoQC присутствуют в клеточных линиях SH-SY5Y (фиг. 6, полоса 1), LN405 (фиг. 6, полоса 2), HaCaT (фиг. 6, полоса 3) и Нер-G2 (фиг. 6, полоса 4). ПЦР-

продукт подтверждала секвенированием.

Выделение человеческой isoQC

Полноразмерную кДНК человеческой isoQC выделяли из клеток линии Нер-G2 с помощью ОТ-ПЦР. В целом, метод состоял в следующем: общую РНК клеток Нер-G2 подвергали обратной транскрипции с помощью Superscript II (фирма Invitrogen). Затем человеческую isoQC амплифицировали, используя разведение 1:12,5 полученного кДНК-продукта, в 25 мкл реакционной смеси, содержащей ДНК-полимеразу типа Herculase Enhanced (фирма Stratagene), используя праймеры isoQChu-1 (смысловой, SEQ ID NO: 55) и isoQChu-2 (антисмысловой, SEQ ID NO: 56). Образовавшийся ПЦР-продукт субклонировали в векторе pPCRSscript CAM SK (+) (фирма Stratagene) и подтверждала секвенированием.

Пример 2. Получение и экспрессия человеческой isoQC в культуре клеток млекопитающих.

Молекулярное клонирование плазмидных векторов, кодирующих слитый белок, содержащий человеческий белок isoQC-EGFP

Все процедуры клонирования осуществляли с помощью стандартных методов молекулярной биологии. Для экспрессии слитого белка, содержащего человеческий белок isoQC-EGFP, в человеческих клетках применяли вектор pEGFP-N3 (фирма Invitrogen). кДНК нативного человеческого белка isoQC, начинающегося либо с метионина I, либо с метионина II, сливали на N-конце в рамке считывания с плазмидой, кодирующей усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP). Праймеры isoQC EGFP-1 Met I (SEQ ID NO: 57) и isoQC EGFP-3 (SEQ ID NO: 59) применяли для амплификации белка человеческой isoQC, начинающегося с метионина I, а праймеры isoQC EGFP-2 Met II (SEQ ID NO: 58) и isoQC EGFP-3 (SEQ ID NO: 59) применяли для амплификации белка человеческой isoQC, начинающегося с метионина II. Фрагмент встраивали в вектор pEGFP-N3 (фирма Invitrogen), используя сайты рестрикции EcoRI и SalI, и правильность вставки подтверждала секвенированием. Затем векторы выделяли для культивирования клеток с помощью набора EndoFree Maxi (фирма Qiagen).

Процедура клонирования N-концевых последовательностей hisoQC

Кроме того, EGFP-последовательность вектора pEGFP-N3 (фирма Invitrogen) интродуцировали в вектор pcDNA 3.1 (фирма Invitrogen), используя для амплификации праймеры EGFP-1 (смысловой) (SEQ ID NO: 85) и EGFP-2 (антисмысловой) (SEQ ID NO: 86). Фрагмент интродуцировали в сайт XhoI pcDNA 3.1. N-концевые последовательности hisoQC, начинающиеся с метионина I и II, каждая из которых заканчивалась серином 53, сливали на C-конце с EGFP в векторе pcDNA 3.1, используя праймеры isoQC EGFP-1 Met I (смысловой, SEQ ID NO: 57) и hisoQC SS EGFP pcDNA (антисмысловой) (SEQ ID NO: 87) для N-концевого фрагмента hisoQC, начинающегося с метионина I, и isoQC EGFP-2 Met II (смысловой, SEQ ID NO: 58) и hisoQC SS EGFP pcDNA (антисмысловой) (SEQ ID NO: 87) для N-концевого фрагмента hisoQC, начинающегося с метионина II. Фрагменты встраивали в сайты рестрикции EcoRI и NotI вектора pcDNA 3.1. Затем векторы выделяли для культивирования в клетках с помощью набора EndoFree Maxi (фирма Qiagen).

Процедура клонирования для экспрессии нативных hisoQC и hQC

Нативную hQC встраивали в сайты рестрикции HindIII и NotI, а нативную hisoQC встраивали в сайты рестрикции EcoRI и NotI вектора pcDNA 3.1 (+) (фирма Invitrogen) после амплификации с использованием праймеров hQC-1 (смысловой) (SEQ ID NO: 82) и hQC-2 (антисмысловой) (SEQ ID NO: 83) для hQC, isoQC EGFP-1 Met I (смысловой) (SEQ ID NO: 57) и hisoQC pcDNA (антисмысловой) (SEQ ID NO: 84) для белка hisoQC, начинающегося с метионина I, и isoQC EGFP-2 Met II (смысловой) (SEQ ID NO: 58) и hisoQC pcDNA (антисмысловой) (SEQ ID NO: 84) для белка hisoQC, начинающегося с метионина II.

Процедура клонирования меченых с помощью FLAG hisoQC и hQC

Человеческую QC клонировали с C-концевой FLAG-меткой после амплификации с использованием праймеров hQC-1 (смысловой) (SEQ ID NO: 82) и hQC C-FLAG pcDNA (антисмысловой) (SEQ ID NO: 88) в сайтах рестрикции HindIII и NotI вектора pcDNA 3.1. Последовательность человеческой isoQC встраивали в сочетании с C-концевой FLAG-меткой в pcDNA 3.1 после амплификации с использованием праймеров isoQC EGFP-1 Met I (смысловой) (SEQ ID NO: 57) и hisoQC C-FLAG pcDNA (антисмысловой) (SEQ ID NO: 89) для белка hisoQC, начинающегося с метионина I, и праймеров isoQC EGFP-2 Met II (смысловой) (SEQ ID NO: 58) и hisoQC C-FLAG pcDNA (антисмысловой) (SEQ ID NO: 89) для белка hisoQC, начинающегося с метионина II.

Пример 3. Иммуноhistохимическое окрашивание человеческой isoQC в клетках млекопитающих.

Трансфекция и гистохимическое окрашивание клеток линий COS-7 и LN405

Для экспрессии слитых белков, содержащих человеческий белок isoQC-EGFP (слитый белок: человеческий isoQC-EGFP), начинающийся либо с метионина I, либо с метионина II, клетки линии COS-7 и LN405 культивировали в 6-луночных планшетах, снабженных покровными стеклами. Клетки выращивали до достижения 80%-ной конфлюэнтности, трансфектировали липофектамином 2000 (фирма Invitrogen) согласно руководству производителя и инкубировали в растворе для трансфекции в течение 5 ч. Затем раствор заменяли соответствующими средами для роста и клетки выращивали в течение ночи.

На следующий день клетки отмывали дважды D-ЗФР (фирма Invitrogen) и фиксировали в охлажденном на льду метаноле в течение 10 мин при -20°C, а затем подвергали трем стадиям отмывки с использованием D-ЗФР в течение 10 мин при комнатной температуре. Для окрашивания зоны комплекса

Гольджи клетки линии COS-7 и LN405 инкубировали с кроличьим поликлональным антителом к маннозидазе II (фирма Chemicon), используя антитело в разведении 1:50 в D-ЗФР, в течение 3 ч. Для окрашивания митохондрий в клетках COS-7 и LN405 клетки инкубировали с мышесмышиным моноклональным антителом к человеческим митохондриям (фирма Chemicon), используя антитело в разведении 1:100 в D-ЗФР, в течение 3 ч при комнатной температуре. Затем клетки отмывали трижды в D-ЗФР в течение 10 мин. Клетки с окрашенной зоной комплекса Гольджи инкубировали с используемым в качестве вторичного антитела козьим антикроличьим IgG, коньюгированным с красителем Rhodamin-RedX (фирма Dianova), в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте. Клетки с окрашенными митохондриями инкубировали с используемым в качестве вторичного антитела козьим антимышесмышиным IgG, коньюгированным с красителем Rhodamin-RedX (фирма Dianova), в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте. Затем клетки отмывали трижды D-ЗФР в течение 5 мин при комнатной температуре и в завершение наносили на покровные стекла, которые помещали на предметные стекла для микроскопа, используя заливочная среду CitiFlour. Клетки оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа (фирма Carl-Zeiss).

Результаты

1. Трансфекция и гистохимическое окрашивание клеток LN405.

Экспрессия слитого белка: человеческий isoQC-EGFP, начинающегося с метионина I и метионина II, в клетках линии LN405 (зеленая флуоресценция) приводила к компартментализации образовавшегося белка. Контрастное окрашивание зоны комплекса Гольджи в клетках LN405 с помощью антитела к маннозидазе II (красная флуоресценция) и последующее наложение окрашивания слитого белка: человеческий isoQC-EGFP и маннозидазы II позволяет предположить, что слитый белок: человеческий isoQC-EGFP локализован в комплексе Гольджи (желтое окрашивание совмещенных изображений (фиг. 7, 9). При этом установлено, что окрашивание человеческого белка isoQC, начинающегося с метионина II, является достаточным для того, чтобы доказать локализацию в комплексе Гольджи слитого белка, содержащего человеческий белок isoQC.

Экспрессия слитого белка: человеческий isoQC-EGFP, начинающегося с метионина I и II (зеленая флуоресценция), и контрастное окрашивание митохондрий (красная флуоресценция) не доказало локализацию слитого белка: человеческий isoQC-EGFP, начинающегося с метионина I или II, в митохондриях из-за отсутствия желтого окрашивания совмещенных изображений после наложения окрашивания (фиг. 8, 10).

2. Трансфекция и гистохимическое окрашивание клеток COS-7.

Аналогично экспрессии слитого белка: человеческий isoQC-EGFP, начинающегося с метионина I и метионина II, в клетках линии LN405, экспрессия слитого белка: человеческий isoQC-EGFP, начинающегося с метионина I и метионина II, в клетках линии COS-7 приводила к компартментализации образовавшегося белка (зеленая флуоресценция). Контрастное окрашивание зоны комплекса Гольджи в клетках линии COS-7 с помощью антитела к маннозидазе II (красная флуоресценция) и последующее наложение окрашивания слитого белка: человеческий isoQC-EGFP и маннозидазы II позволяет предположить, что слитый белок: человеческий isoQC-EGFP локализован в комплексе Гольджи в клетках линии COS-7 (желтое окрашивание совмещенных изображений (фиг. 11, 13). И в этом случае установлено, что окрашивание слитого белка: человеческий isoQC-EGFP, начинающегося с метионина II, является достаточным для того, чтобы доказать его локализацию в комплексе Гольджи в клетках линии COS-7.

Как и ожидалось, экспрессия слитого белка: человеческий isoQC-EGFP, начинающегося с метионина I и II, в клетках линии COS-7 (зеленая флуоресценция), и контрастное окрашивание митохондрий (красная флуоресценция) не позволила выявить локализацию слитого белка: человеческий isoQC-EGFP, начинающегося с метионина I или II, в митохондриях из-за отсутствия желтого окрашивания совмещенных изображений после их наложения (фиг. 12, 14).

Пример 4. Экспрессия и очистка человеческой isoQC в E. coli.

Штаммы-хозяева и среды

Штамм Escherichia coli DH5 α применяли для размножения плазмид, а штамм E. coli BL21 применяли для экспрессии человеческой isoQC. Штаммы E. coli выращивали, трансформировали и анализировали согласно инструкциям производителя (фирма Qiagen (DH5 α), фирма Stratagene (BL21)). Среды, необходимые для E. coli, т.е. среду Луриа-Бергтани (LB), получали согласно рекомендациям производителя.

Молекулярное клонирование плазмидных векторов, кодирующих человеческую QC

Все процедуры клонирования осуществляли, применяя стандартные методы молекулярной биологии. Для экспрессии в E. coli BL21 использовали вектор pET41a (фирма Novagen). кДНК зрелого белка человеческой isoQC, начинающуюся с кодона 30 (считая от метионина II),сливали в рамке с плазмидой, кодирующей GST-метку. После амплификации с использованием праймеров hisoQC pET41a-1 (SEQ ID NO: 60) и hisoQC pET41a-2 (SEQ ID NO: 61) (табл. 4) интродуцировали N-концевой протеазный сайт расщепления, распознаваемый энтерокиназой, и С-концевую (His)₆-метку. После субклонирования фрагмент встраивали в экспрессионный вектор, используя сайты рестрикции Spe I и EcoR I.

Экспрессия и очистка в штамме E. coli BL21

Конструкцией, кодирующей человеческую isoQC, трансформировали BL21-клетки (фирма

Stratagene) и выращивали на агаровых планшетах с селективной LB-средой при 37°C. Экспрессию белка осуществляли в LB-среде, содержащей 1% глюкозы, при 37°C. После достижения значения ОП₆₀₀ приблизительно 0,8, экспрессию isoQC индуцировали с помощью 20мкМ ИПТГ в течение 4 ч при 37°C. Клетки отделяли от среды центрифугированием (4000×g, 20 мин), ресуспендировали в ЗФР (140 мМ NaCl, 2,7мМ KCl, 10мМ Na₂HPO₄, 1,8мМ KH₂PO₄, pH 7,3) и лизировали с помощью одного цикла замораживания и оттаивания с последующим одним циклом обработки с использованием устройства типа French Press. Клеточный лизат разводили до конечного объема 1,5 л с помощью содержащего фосфат буфера (50мМ Na₂HPO₄, 500мМ NaCl, pH 7,3) и центрифугировали при 13400×g при 4°C в течение 1 ч. После центрифугирования определяли концентрацию белка образовавшегося супернатанта методом Бредфорда. При необходимости раствор еще раз разводили до получения конечной концентрации общего белка 0,6 мг/мл. Слитый белок GST-isoQC очищали с помощью 4-стадийного протокола (табл. 5). Очистка с помощью метода ДСН-ПААГ проиллюстрирована на фиг. 20.

Пример 5. Анализ глутамилцилазной активности.

Флуорометрические анализы

Все измерения осуществляли с использованием с помощью ридера типа NOVOStar для микропланшетов (фирма BMG Labtechnologies) при 30°C. Активность QC оценивали флуорометрически с использованием в качестве субстрата H-Gln-βNA. Образцы содержали 0,2мМ флуорогенный субстрат, 0,25 ед. пироглутамиламинопептидазы (фирма Qiagen, Гильден, Германия) в 0,05М Трис/HCl, pH 8,0 и аликвоту соответствующим образом разбавленной QC в конечном объеме 250 мкл. Длины волны возбуждения/испускания составляли 320/410 нм. Предназначенные для анализа реакции инициировали, добавляя глутамилцилазу. Активность QC определяли из стандартной кривой для β-нафтамина в условиях анализа. За единицу принимали количество QC, катализирующее образование 1 мкмоль pGlu-βNA из H-Gln-βNA в мин в описанных условиях.

Во втором флуорометрическом анализе активность QC определяли, используя в качестве субстрата H-Gln-AMC. Реакции осуществляли при 30°C с помощью ридера типа NOVOStar для микропланшетов (фирма BMG Labtechnologies). Образцы содержали различные концентрации флуорогенного субстрата, 0,1 ед. пироглутамиламинопептидазы (фирма Qiagen) в 0,05М Трис/HCl, pH 8,0 и аликвоту соответствующим образом разбавленной QC в конечном объеме 250 мкл. Длины волны возбуждения/испускания составляли 380/460 нм. Предназначенные для анализа реакции инициировали, добавляя глутамилцилазу. Активность QC определяли из стандартной кривой для 7-амино-4-метилкумарина в условиях анализа. Результаты кинетических анализов обрабатывали с помощью программы GraFit.

Спектрофотометрический анализ isoQC

Этот анализ применяли для оценки кинетических параметров большинства субстратов QC. Активность QC анализировали спектрофотометрически с помощью непрерывного анализа (Schilling S. и др., Biol Chem 384, 2003, сс. 1583-1592) с использованием глутаматдегидрогеназы в качестве вспомогательного фермента. Образцы содержали соответствующий субстрат QC, 0,3мМ НАД·Н, 14мМ α-кетоглутаровую кислоту и 30 ед./мл глутаматдегидрогеназы в конечном объеме 250 мкл. Реакции инициировали, добавляя QC, и оценивали снижение абсорбции при 340 нм в течение 8-15 мин.

Оценивали начальные скорости и ферментативную активность определяли из стандартных кривых для аммиака в условиях анализа. Все образцы оценивали при 30°C с использованием ридера для микропланшетов типа Sunrise. Данные кинетических анализов обрабатывали с помощью программы GraFit.

Анализ ингибиравания

При анализе ингибиравания состав образца соответствовал описанному выше, за исключением того, что в него добавляли предполагаемый ингибитор. Для быстрой оценки ингибиравания QC использовали образцы, содержащие 4мМ соответствующий ингибитор и субстрат в концентрации, соответствующей 1 K_M. Для более детального исследования ингибиравания и определения значений K_i сначала оценивали влияние ингибитора на вспомогательные ферменты. В каждом случае не было выявлено никакого влияния на любые другие применяемые ферменты, что позволяет достоверно оценивать ингибиравание QC. Константу ингибиравания определяли путем аппроксимации набора характеризующих процесс кривых с помощью общего уравнения для конкурентного ингибиравания с использованием программы GraFit.

Результаты

Оценивали ряд различных субстратов в отношении превращения с помощью человеческой isoQC (табл.3). Для всех анализируемых субстратов характерно превращение под действием isoQC, что свидетельствует об относительно невысокой общей специфичности, что свойственно также и человеческой QC (Schilling S. и др., Biol Chem 384, 2003, сс. 1583-1592). Как установлено ранее для человеческой QC (Schilling S. и др., Biol Chem 384, 2003, сс. 1583-1592), наиболее высокие константы специфичности (k_{cat}/K_M) выявлены для субстратов, несущих крупные гидрофобные аминокислоты, расположенные по соседству с N-концевым глутамильным остатком, например, Gln-AMC. В противоположность этому, присутствие отрицательно заряженных остатков в этом положении приводило к резкому снижению специфичности, что установлено для Gln-Glu, что свидетельствует о том, что активный сайт isoQC несет

отрицательный заряд. По сравнению с человеческой QC обе рекомбинантные isoQC обладали более низкой ферментативной активностью (фиг. 21). Различие достигало одного порядка. На основе данных о специфичности isoQC можно предположить, что этот фермент ответственен за превращение различных субстратов *in vivo*, т.е. isoQC участвует в образовании многих различных физиологических субстратов.

Активность человеческой isoQC конкурентно ингибиравалась имидазольными производными (табл. 6, фиг. 15). Константы ингибирования K_i , для имидазола и бензимидазола оказались очень близки к значению, ранее полученному для человеческой QC. Однако для эффективного ингибитора QC P150/03 обнаружено 10-кратное снижение значения K_i . Таким образом, механизм связывания хелатирующего фрагмента, т.е. имидазольного кольца, по-видимому, является очень похожим. Вероятно, это является результатом образования комплекса между активным сайтом иона цинка QC и isoQC и основным азотом имидазола. Различия в значения K_i для P150/03 ясно демонстрирует, что активные сайты обоих ферментов характеризуются тонкими различиями. Таким образом, можно создавать ингибиторы, обладающие избирательным действием в отношении одной изоформы фермента. Избирательные ингибиторы являются важными для лечения заболеваний.

Таблица 3. Кинетическая оценка пептидных субстратов человеческой QC и человеческой isoQC. Человеческую isoQC экспрессировали в *E. coli* BL21 (hisQCDt) или *P. pastoris* (YSShisoQC). Субстраты обозначены с помощью однобуквенного кода аминокислот

Субстрат	K_M (mM) hisQCDt	K_M (mM) YSShisoQC	k_{cat} (c^{-1}) hisQCDt	k_{cat} (c^{-1}) YSShisoQC	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \times \text{c}^{-1}$) hisQCDt	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \times \text{c}^{-1}$) YSShisoQC
Q- β NA	$0,03 \pm 0,002$	$0,035 \pm 0,0005$	$3,37 \pm 0,12$	$8,16 \pm 0,87$	$93,26 \pm 6,68$	$228,70 \pm 22,22$
QAMC	$0,01 \pm 0,0009$	$0,03 \pm 0,0064$	$1,07 \pm 0,03$	$3,72 \pm 0,44$	$62,57 \pm 5,68$	$102,87 \pm 29,22$
QQ	$0,11 \pm 0,027$	$0,11 \pm 0,007$	$2,72 \pm 0,25$	$6,08 \pm 0,17$	$24,50 \pm 4,009$	$54,32 \pm 4,61$
QE	$0,7 \pm 0,13$	$0,61 \pm 0,064$	$2,64 \pm 0,21$	$5,33 \pm 0,43$	$3,85 \pm 0,56$	$8,75 \pm 0,87$
QG	$0,42 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,047$	$1,65 \pm 0,04$	$3,24 \pm 0,18$	$3,93 \pm 0,31$	$9,01 \pm 1,75$
QGP	$0,21 \pm 0,016$	$0,23 \pm 0,02$	$4,01 \pm 0,14$	$8,98 \pm 0,07$	$18,82 \pm 1,26$	$38,42 \pm 3,55$
QYA	$0,22 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,022$	$7,7 \pm 0,4$	$16,47 \pm 0,72$	$66,48 \pm 13,07$	$206,9 \pm 57,54$
QFA	$0,11 \pm 0,016$	$0,104 \pm 0,025$	$7,49 \pm 0,28$	$11,68 \pm 2,39$	$33,03 \pm 2,38$	$116,99 \pm 34,37$
QEYF	$0,03 \pm 0,004$	$0,04 \pm 0,004$	$3,34 \pm 0,15$	$5,64 \pm 0,39$	$109,57 \pm 21,03$	$122,56 \pm 5,6$
QEDL	$0,63 \pm 0,052$	$0,16 \pm 0,01$	$6,41 \pm 0,15$	$9,24 \pm 0,65$	$10,2 \pm 0,84$	$55,04 \pm 5,14$

Таблица 4. Используемые праймеры

Праймер	Последовательность 5' → 3'	Применение
isoQCh-1 (SEQ ID NO: 53)	GGTCTACACCATTGGAGCGGCTGGC	Скрининг клеточных линий
isoQCh-2 (SEQ ID NO: 54)	GGGTTGGAAGTACATCACTCCTGGGG	Скрининг клеточных линий

isoQChu-1 (SEQ ID NO: 55)	ACCATGCGTCCGGGGGCCGCGG	Выделение hisoQC
isoQChu-2 (SEQ ID NO: 56)	ACGCTAGAGCCCCAGGTATTCAGCCAG	Выделение hisoQC
isoQC EGFP-1 Met I (SEQ ID NO: 57)	ATATATGAATTCATGCGTCCGGGGGCCGC	Клонирование человеческой isoQC (Met I) в векторе pEGFP-N3
isoQC EGFP-2 Met II (SEQ ID NO: 58)	ATATATGAATTCATGGAGCCACTCTGCCGCG	Клонирование человеческой isoQC (Met II) в векторе pEGFP-N3
isoQC EGFP-3 (SEQ ID NO: 59)	ATATATGTCGACGAGCCCCAGGTATTCAGCCAG	Клонирование человеческой isoQC (Met I и Met II) в векторе pEGFP-N3
hisoQC pET41a-1 (SEQ ID NO: 60)	ATATACTAGTGATGACGAC GACAAGTTCTACACCATTGGAGCG	Клонирование человеческой isoQC в векторе pET41a
hisoQC pET41a-2 (SEQ ID NO: 61)	TATAGAATTCCCTAGTGATGGT GATGGTGATGGAGCCCCAGGTATTCAGC	Клонирование человеческой isoQC в векторе pET41a
hisoQC HIS C-Term pPICZAA-1 (SEQ ID NO: 62)	ATA TGA ATT CTT CTA CAC CAT TTG GAG C	Клонирование человеческой isoQC в векторе PPICZ α A
hisoQC HIS N-Term pPICZAA-1 (SEQ ID NO: 63)	ATA TGA ATT CCA TCA CCA TCA CCA TCA CTT CTA CAC CAT TTG GAG CGG C	Клонирование человеческой isoQC в векторе PPICZ α A
hisoQC HIS N-Term pPICZAA-2 (SEQ ID NO: 64)	5'- ATA TAT GCG GCC GCC TAG AGC CCC AGG TAT TCA GC-3'	Клонирование человеческой isoQC в векторе PPICZ α A
isoQCm RT s (смысловой) (SEQ ID NO: 65)	CCA GGA TCC AGG CTA TTG AG	ПЦР-анализ в реальном времени isoQC
hisoQC HIS C-Term pPICZAA-2 (SEQ ID NO: 66)	ATA TAT GCG GCC GCC TAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG AGC CCC AGG TAT TCA GCC AG	Клонирование человеческой isoQC в векторе PPICZ α A
isoQCm RT as (антисмысловой) (SEQ ID NO: 67)	TTC CAC AGG GCC GGG GGG C	ПЦР-анализ в реальном времени isoQC
isoQCm MetI s (SEQ ID NO: 68)	ATG AGT CCC GGG AGC CGC	Клонирование кДНК мышевой isoQC
isoQCm MetI as (SEQ ID NO: 69)	CTA GAG TCC CAG GTA CTC	Клонирование кДНК мышевой isoQC
isoQCm kurz s (SEQ ID NO: 70)	AGT TCC TGC CCC TGC TGC TG	Клонирование кДНК мышевой isoQC
mQC RT s (SEQ ID NO: 71)	ATC AAG AGG CAC CAA CCA AC	ПЦР-анализ в реальном времени mQC
mQC RT as (SEQ ID NO: 72)	CTG GAT AAT ATT TCC ATA G	ПЦР-анализ в реальном времени mQC

mQC RT N-конц. s (SEQ ID NO: 73)	ACA GCT GGG AAT CTG AGT C	ПЦР-анализ в реальном времени mQC
mQC RT N-конц. as (SEQ ID NO: 74)	GAG CAG AAT AGC TTC CGG GCG	ПЦР-анализ в реальном времени mQC
iso-I55Ns (SEQ ID NO: 75)	CTG CGG GTC CCA TTG AAC GGA AGC CTC CCC GAA	Сайтнаправленный мутагенез hisoQC I55N
iso-I55N as (SEQ ID NO: 76)	TTC GGG GAG GCT TCC GTT CAA TGG GAC CCG CAG	Сайтнаправленный мутагенез hisoQC I55N
iso-C351 as (SEQ ID NO: 77)	ACG GTA CAC AAC TTG GCC CGC ATT CTC GCT GTG	Сайтнаправленный мутагенез hisoQC C351A
iso-C351Aas (SEQ ID NO: 78)	CAC AGC GAG AAT GCG GCC CAA GTT GTG TAC CGT	Сайтнаправленный мутагенез hisoQC C351A
hQC-1 (SEQ ID NO: 82)	ATATATAAGCTTATGGCAGGCCGAAGACAC	Инсерция нативного белка hQC в pcDNA 3.1
hQC-2 (SEQ ID NO: 83)	ATATGCGGCCGCTTACAAATGAAGATATTCC	Инсерция нативного белка hQC в pcDNA 3.1
hisoQC pcDNA as (SEQ ID NO: 84)	ATATATGCGGCCGCCTAGAGCCCCAGGTATTCA	Амплификация hisoQC, включая стоп-кодон для инсерции в pcDNA 3.1
EGFP-1 (SEQ ID NO: 85)	ATATCTCGAGTCCATGCCACCATGGTGAGC	Амплификация EGFP
EGFP-2 (SEQ ID NO: 86)	ATATCTCGAGTTACTTGTACA GCTCGTCCAT	Амплификация EGFP
hisoQC SS EGFP pcDNA as (SEQ ID NO: 87)	ATATGCGGCCGCATGTCGACGCTCAAATGGTGTAGAACGC	Амплификация N-концевой последовательности hisoQC
hQC C-FLAG pcDNA as (SEQ ID NO: 88)	ATATGCGGCCGCTTACTTGTCATCGTCATCCTTGTAAATC CAAATGAAGATATTCAA	Амплификация hQC C-FLAG
hisoQC C-FLAG pcDNA as (SEQ ID NO: 89)	ATATGCGGCCGCCTACTTGTCATCGTCATCCTTGTAAATC ATCGAGCCCCAGGTATTCA	Амплификация h-isoQC C-Flag
Hs_QPCT_1_SG	QuantiTect Primer Assay (200), фирма Qiagen, Гильден	qПЦР hQC
Hs_QPCTL_1_SG	QuantiTect Primer Assay (200), фирма Qiagen, Гильден	qПЦР h-isoQC
CCL2-F (SEQ ID NO: 90)	GCCTCCAGCATGAAAGTCTC	qПЦР CCL2
CCL2-R (SEQ ID NO: 91)	CAGATCTCCTTGGCCACAAT	
CCL7-F (SEQ ID NO: 92)	ATGAAAGCCTCTGCAGCACT	qПЦР CCL7
CCL7-R (SEQ ID NO: 93)	TGGCTACTGGTGGTCCTTCT	

CCL8-F (SEQ ID NO: 94) CCL8-R (SEQ ID NO: 95)	TCACCTGCTGCTTAACGTG ATCCCTGACCCATCTCTCCT	qПЦР CCL8
CCL13-F (SEQ ID NO: 96) CCL13-R (SEQ ID NO: 97)	ATCTCCTTGCAGAGGCTGAA AGAAGAGGAGGCCAGAGGAG	qПЦР CCL13
HIF1α-F (SEQ ID NO: 98) HIF1α-R (SEQ ID NO: 99)	CACAGAAATGGCCTTGTGAA CCAAGCAGGTCAAGGTGGT	qПЦР HIF1α
AIM1-F (SEQ ID NO:100) AIM1-R (SEQ ID NO:101)	TCCCTTCATCCTGGAACCTG CGCCTCTCTGTTCACCTC	qПЦР AIM1
AIM2-F (SEQ ID NO:102) AIM2-R (SEQ ID NO:103)	AAGCGCTGTTGCCAGITAT CACACGTGAGGCCTATTAA	qПЦР AIM2
MAGEA1-F (SEQ ID NO:104) MAGEA1-R (SEQ ID NO:105)	GTCAACAGATCCTCCCCAGA CAGCATTCTGCCTTGTA	qПЦР MAGEA1
MAGEA2-F (SEQ ID NO:106) MAGEA2-R (SEQ ID NO:107)	AGGTGGAGAGCCTGAGGAAT CTCGGGTCTACTTGTCA	qПЦР MAGEA2
MAGEA10-F (SEQ ID NO:108) MAGEA10-R (SEQ ID NO:109)	AAGCGAGGTTCTCGTTCTGA TGACCTCTGCTCTCCCTGT	qПЦР MAGEA10
MAGEB2-F (SEQ ID NO:110) MAGEB2-R (SEQ ID NO:111)	CTTCAAGCTCCTGCTGCT CGACCTGACTTCCCTGGTTA	qПЦР MAGEB2
MART1-F (SEQ ID NO:112) MART1-R (SEQ ID NO:113)	GCTCATCGGCTGTTGGTATT ATAAGCAGGTGGAGCATTGG	qПЦР MART1
MCL1-F (SEQ ID NO:114) MCL1-R (SEQ ID NO:115)	ATGCTCGGAAACTGGACAT ATGGTTCGATGCAGCTTCT	qПЦР MCL1
TYR-F (SEQ ID NO:116) TYR-R (SEQ ID NO:117)	TACGGCGTAATCCTGGAAAC ATTGTGCATGCTGCTTGAG	qПЦР TYR
TYRP1-F (SEQ ID NO:118) TYRP1-R (SEQ ID NO:119)	CCGAAACACAGTGGAAAGGTT TCTGTGAAGGTGTGCAGGAG	qПЦР TYRP1
TYRP2-F (SEQ ID NO:120) TYRP2-R (SEQ ID NO:121)	GGTTCCCTTCTCCCTCCAG AACCAAAGCCACCAGTGTTC	qПЦР TYRP2

Таблица 5. Очистка слитого белка GST-isoQC после экспрессии в *E. coli*. Очищенный слитый белок использовали для определения QC-активности

Стадия очистки	1	2	3	4
Метод	Ni ²⁺ -IMAC (EVA)	GST-метка АС	GF (обессоливание)	IEX (UNO S)
Тип колонки (фирма Amersham Biosciences AB, Швеция)	хелатирующая сефароза Fast Flow	глутатион сефароза 4 Fast Flow	сепадекс G-25 Fine	Матрикс типа «непрерывного слоя» (фирма BIO-Rad)
Размер колонки	d=2,5 см l=42 см CV=206 см ³	d=1,6 см l=10 см CV=20 см ³	d=2,6 см l=10 см CV=53 см ³	d=1,2 см l=5,3 см CV=6 см ³
Уравновешивающий буфер рН Объем	3ФР 7,3 10CV	3ФР 7,3 10CV	25мM Mes 6,0 10CV	25мM Mes 6,0 10CV
Промежуточный буфер (буфер для отмыки) рН Объем	3ФР, 0,5мM гистидин 7,3 10CV	3ФР 7,3 10CV	-	25мM Mes 6,0 10CV
Буфер для элюции рН Объем	3ФР, 100мM гистидин 7,3 1,5 CV	50мM Трис, 10мM глутатион (восстановленный) 8,0 («обратный» поток	25мM Mes 6,0 1 CV	25мM Mes, элюция в градиенте NaCl 6,0 CV

Таблица 6. Значения K_i, характеризующие конкурентное ингибиование человеческой QC и человеческой isoQC имидазольными производными. Человеческую isoQC экспрессировали в *E. coli* BL21 (hisoQCdt) или *P. pastoris* (YSShisoQC).

Ингибитор	K _i (мкM) hisoQCdt	K _i (мкM) YSShisoQC	K _i (мкM) hQC
имидазол	220 ± 1	235 ± 13	103 ± 2
бензимидазол	200 ± 8	250 ± 5	138 ± 4
1-бензилимидазол	7,3 ± 0,5	6,2 ± 0,2	7,1 ± 0,1
1-метилимидазол	80 ± 5	82 ± 3	39,7 ± 0,2
PBD150 1-(3,4-диметоксифенил)-3-(3-имидазол-1-ил-пропил)тиомочевина	0,48 ± 0,03	0,519 ± 0,001	0,0584 ± 0,0002

Пример 6. Экспрессия и очистка человеческой isoQC в *P. pastoris*.

Штаммы-хозяева и среды

Штамм *Escherichia coli* DH5α применяли для размножения плазмид, а штамм *P. pastoris* X-33 применяли для экспрессии человеческой isoQC в дрожжах. Штаммы *E. coli* и *P. pastoris* выращивали, трансформировали и анализировали согласно инструкциям производителя (фирма Qiagen (DH5α), фирма Invitrogen (X-33)). Среды, необходимые для *E. coli*, т.е. среду Луриа-Бертани (LB) получали согласно рекомендациям производителя. Среды, необходимые для *Pichia pastoris*, т.е. BMMY, BMGY,YPD, YPDS, включающие требуемую концентрацию антибиотиков, т.е. зеоцина, приготавливали согласно методу, описанному в руководстве для *Pichia* (фирма Invitrogen, каталожный номер. K1740-01). В руководстве представлены также все необходимые требования по работе с дрожжами.

Молекулярное клонирование плазмидных векторов, кодирующих человеческую QC

Все процедуры клонирования осуществляли согласно стандартным методам молекулярной биологии. Для экспрессии в *Pichia pastoris* X-33 использовали pPiCZαA (фирма Invitrogen). кДНК зрелого белка человеческой isoQC, начинающуюся с кодона 30 (считая от метионина II), сливали в рамке считывания с плазмидой, кодирующей α-фактор, что обеспечивало секреторный путь для белка. После амплификации с использованием праймеров hisoQC HIS C-Term pPICZAA-1 (SEQ ID NO: 62) или hisoQC HIS N-Term pPICZAA-1 (SEQ ID NO: 63) в качестве смысловых праймеров и hisoQC HIS N-Term pPICZAA-2 (SEQ ID NO: 64) и hisoQC HIS C-Term pPICZAA-2 (SEQ ID NO: 66) (табл. 4) в качестве антисмысловых праймеров фрагмент встраивали в экспрессионный вектор с помощью сайтов рестрикции NotI и EcoR I. В зависимости от конструкции интродуцировали мутации в кодоны 55 (Ile) и 351 (Cys). Мутагенез осуществляли с помощью стандартного метода ПЦР с последующим расщеплением родительской ДНК с помощью DpnI (набор для сайтнаправленного мутагенеза типа quik-change II, фирма Stratagene, каталожный номер 200524). Созданные конструкции проиллюстрированы схематически на фиг. 17.

Трансформация *P. pastoris* и маломасштабная экспрессия

Плазмидную ДНК (1-2 мкг) применяли для трансформации компетентных клеток *P. pastoris* путем электропорации согласно инструкциям производителя (фирма BioRad). Отбор осуществляли на планшетах, содержащих 100 мкг/мл зеоцина. Для оценки рекомбинантных клонов дрожжей в отношении экспрессии isoQC рекомбинанты выращивали в течение 24 ч в 10-миллилитровых конических пробирках, содержащих 2 мл BMGY. После этого дрожжи центрифугировали и ресуспенсировали в 2 мл среды BMMY, содержащей 0,5% метанола. Эту концентрацию поддерживали, добавляя метанол каждые 24 ч в течение примерно 72 ч. Затем определяли активность QC в супернатанте. Клоны, характеризующиеся наиболее высокой активностью, отбирали для дополнительных экспериментов и ферментации. В зависимости от экспрессируемой конструкции активность isoQC в среде оказалась различной (фиг. 18).

Экспрессия и очистка hisoQC в *P. pastoris*

Для крупномасштабной экспрессии isoQC в *Pichia pastoris* сохраняли условия, описанные для маломасштабной экспрессии, однако используемый общий объем составлял 8 л. Экспрессию осуществляли во встряхиваемых колбах. После экспрессии клетки отделяли от среды центрифугированием (1500×g, 20 мин) и дебрис отбрасывали. Значение pH супернатанта доводили до нейтрального, вновь центрифугировали и использовали для первой стадии очистки. Белок isoQC очищали с помощью трехстадийного протокола (табл. 7). Результаты очистки продемонстрированы по данным ДСН-ПААГ на фиг. 19.

Таблица 7. Очистка hisoQC (YSShisQCN55IC351A C-His) после экспрессии в *P. pastoris*. Очищенный белок использовали для определения QC-активности и зависимости от значения pH.

Стадия очистки	1	2	3
Метод	Ni ²⁺ -IMAC	HIC	GF (обессоливание)
Тип колонки (фирма Amersham Biosciences AB, Швеция)	хелатирующая сепароза Fast Flow	бутил-сепароза 4Fast Flow	сепадекс G-25 Fine
Размер колонки	d=2,5 см l=42 см CV=206 см ³	D=1,6 см l=15,5 см CV=23 см ³	d=2,6 см l=10 см CV=53 см ³
Уравновешивающий буфер	50 mM NaH ₂ PO ₄	30 mM NaH ₂ PO ₄ 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	50 mM бис-Трис 100 mM NaCl
pH	7,0	7,0	6,8
Объем	10 CV	10 CV	10 CV
Промежуточный буфер (для отмычки)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 0,5 mM гистидин	30 mM NaH ₂ PO ₄ 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	-
pH	7,0	7,0	
Объем	10 CV	6 CV	
Буфер для элюции	50 mM NaH ₂ PO ₄ 100 mM гистидин	30 mM NaH ₂ PO ₄	50 mM бис-Трис 100 mM NaCl
pH	7,0	7,0	6,8
Объем	1,5 CV	5 CV	1 CV

Результаты

Человеческую isoQC можно успешно экспрессировать в метилтрофных дрожжах *P. pastoris*. Создавали несколько различных конструкций для выбора наилучших условий экспрессии в дрожжах (фиг. 17). Как проиллюстрировано на фиг. 18, активность QC, которая экспрессируется и присутствует в среде экспрессирующих клеток, варьирует в зависимости от экспрессируемой конструкции. Интродукция сайта гликозилирования приводила к правильной секреции, что можно обнаружить при использовании конструкций YSShisQCN55IC351A C-His и YSShisQCN55I C-His. Поскольку конструкция YSShisQCN55IC351A C-His обладала наиболее высокой активностью в среде, осуществляли ее крупномасштабную экспрессию и очищали. Очистку проводили согласно схеме, представленной в табл. 7, выход очищенного продукта составлял 59%. Белок, кажущийся гомогенным, был гликозилированным, что установлено по сдвигу миграции в сторону, соответствующую более низкой молекулярной массе (фиг. 19). Гликозилирование не влияло на каталитическую активность ферmenta.

Пример 7. Зависимость от каталитической активности hisoQC от значения pH.

Флуорометрический анализ с использованием H-Gln-βNA (описанный в примере 5) применяли для изучения зависимости каталитической специфичности от значения pH. Реакции осуществляли при концентрации субстрата 7 мкМ, т.е. при [S] << K_M. При этом, установленные константы специфичности можно непосредственно выводить из начальной скорости, определенной с помощью кривых превращения субстрата. В этом исследовании реакционный буфер содержал 0,075 М уксусную кислоту, 0,075 М Mes и 0,15 М Трис, при этом для достижения требуемого значения pH использовали HCl или NaOH. Буфер гарантировал постоянную ионную силу в широком диапазоне значений pH. Оценку полученных кинетических данных для фермента осуществляли с помощью следующего уравнения:

$$k_{cat}/K_M(pH) = k_{cat}/K_M(\text{предел}) \times 1/(1 + [H^+]/K_{HS} + K_{E1}/[H^+] + K_{E1}/[H^+] \times K_{E2}/[H^+]),$$

в котором $k_{cat}/K_M(pH)$ обозначает зависимый от значения pH (измеренный) кинетический параметр, k_{cat}/K_M (предел) обозначает независящее от значения pH ("ограничивающее, предельное") значение, K_{HS} , K_{E1} и K_{E2} обозначают константы диссоциации диссоциирующей группы при кислых значениях pH и двух диссоциирующих групп фермента соответственно. Оценку всех кинетических данных осуществляли с помощью программы GraFit software (версия 5.0.4. для Windows, фирма ERITHACUS SOFTWARE Ltd., Хорлей, Великобритания).

Результаты

Для hisoQC оптимум специфичности обнаружен при значении pH 7-8. Такие оптимальные для катализа значения pH очень близки к значениям, установленным для человеческой QC. Подгонка данных к соответствующей модели, включающей в качестве основы три диссоциирующих группы, позволил получать легко объяснимую зависимость от значений pH hisoQC и hQC (фиг. 22). Так, на катализ обеих ферментативных реакций оказывают влияние сходные диссоциирующие группы, что позволяет предположить наличие сходного механизма катализа в целом.

Определенные значения pKa представлены в табл. 8. Очевидно, что существенное различие значения pKa между hisoQC и hQC обнаружено только в одном случае. Для hQC pKa соответствует pKa константы диссоциации субстрата. Возможно, очень небольшие различия между hQC и hisoQC вызываются структурными изменениями, имеющими место при катализе с помощью isoQC (вызванные подгонкой), которые влияют на зависимость от pH.

Пример 8. Изучение глутамилциклизной активности.

Известно, что человеческая QC представляет собой фермент, который катализирует циклизацию N-концевой глутаминовой кислоты в пироглутаминовую кислоту. Таким образом, QC принимает участие в образовании модифицированных pGlu амилоидных пептидов.

Для изучения циклизации глутаминовой кислоты человеческую QC и человеческую isoQC очищали и оценивали образование модифицированного pGlu амилоида β (3-11) [pGlu- $\text{A}\beta$ (3-11)] из $\text{A}\beta$ (3-11). Реакционные смеси содержали 20 мкл субстрата ($\text{A}\beta$ (3-11), 2,5М маточный раствор в 50 mM Mes-буфере, pH 6,5) и 80 мкл фермента (маточный раствор hQC, 0,62 мг/мл; маточный раствор hisoQC, 0,61 мг/мл, в 50 mM Mes, pH 6,5). Образцы (15 мкл) отбирали через 0 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч и кипятили в течение 5 мин для прекращения реакции. Анализ превращения субстрата осуществляли с помощью Maldi-Tof-массспектрометрии. Субстрат и продукт отличались по молекулярной массе на 18 Да, т.е. на массу воды, высвобождающейся в процессе циклизации.

Как видно из фиг. 23, человеческая QC и человеческая isoQC (YSShisQCI55NC351A C-His) катализировали превращение $\text{A}\beta$ (3-11) в pGlu- $\text{A}\beta$ (3-11). Однако с учетом одинаковых концентраций белков в обоих образцах можно заключить, что превращение N-концевой глутаминовой кислоты с помощью hisoQC является существенно более медленным по сравнению с hQC. Так, более низкие константы специфичности, характеризующие превращение глутамильных субстратов, обнаружены также при использовании глутамильных субстратов. В этих условиях при использовании неактивированного фермента не обнаружено никакой циклизации (Schilling S. и др., FEBS Lett. 563, 2004, сс. 191-196).

Пример 9. Тканеспецифичность мышиной isoQC.

Оценивали распределение в тканях мышиной QC и мышиной isoQC с использованием количественной ПЦР в реальном времени. Перед анализом кДНК из нескольких различных органов и тканей открытую рамку считывания мышиной isoQC выделяли с помощью специфических праймеров (isoQCm MetI s (SEQ ID NO: 68), isoQCm MetI as (SEQ ID NO: 69) (табл. 4), которые выводили из хромосомной кодирующей области мышиной isoQC.

Открытую рамку считывания клонировали в векторе pPCR-Script CAM SK (+) (набор PCR-Script CAM Cloning, фирма Stratagene) и применяли в качестве положительного контроля для оценки с помощью ПЦР в реальном времени и построения стандартной кривой для условий анализа.

Для характеристизации тканеспецифичности экспрессии misoQC применяли кДНК 3-6-месячных мышей. Общую РНК выделяли из 30 мг ткани с помощью набора для выделения РНК (RNA-isolation kit II) (фирмы Macherey и Nagel). Концентрацию и чистоту РНК оценивали с помощью гель-электрофореза (агарозный гель) и спектрофотометрии. Для синтеза кДНК использовали 1 мкг РНК. Для осуществления реакции применяли обратную транскриптазу Superscript II RT (фирма Invitrogen) согласно рекомендациям поставщика, кДНК хранили при -80°C.

Количественный анализ концентрации транскриптов в различных тканях осуществляли с помощью термоячееки "Light Cycler" (фирма Corbett research), используя набор "QuantiTect SYBR Green PCR" (фирма Qiagen). Для количественной оценки применяли ДНК-стандарт (клонированная кДНК мышиной isoQC). Количество копий рассчитывали согласно следующему уравнению: $(X^r/mkl \text{ ДНК})/(длина плазмида в парах нуклеотидов} \times 660) \times 6,022 \times 1023 = Y^{\text{молекул}}/\text{мкл}$. ДНК-стандарт применяли в 4 концентрациях в диапазоне $10^{-7}-10^{-1}$ молекул/mkl и предельной концентрации (10^0). Протокол реакции приведен в табл. 8. Результаты представлены на фиг. 24.

Для амплификации мышиной QC применяли такой же протокол, используя праймеры mQC RT N-terminal s (SEQ ID NO: 73) и mQC RT N-terminal as (SEQ ID NO: 74).

Таблица 8. Протокол реакции ПЦР в реальном времени с использованием Roto-Gene RG 3000 (фирма Corbett Research)

ПЦР-цикли	T в °C	t в с
Стадия		
0 денатурация	95	900
1 денатурация	95	15
2 отжиг праймеров	55	20
3 удлинение	72	20
количество циклов	45	

Результаты

Как видно из фиг. 24, мышиная QC и мышиная isoQC экспрессировались во всех изученных органах. По сравнению с мышью QC различия в экспрессии мышьей isoQC между различными органами оказались менее выраженными, что свидетельствует о меньшей строгости регуляции транскрипции. Данные об экспрессии mQC соответствовали данным, полученным ранее для бычьей QC, которую анализировали с помощью Нозерн-блоттинга (Poh, T. и др., Proc Natl Acad Sci U S A 88, 1991, сс. 10059-10063). Наиболее высокие уровни экспрессии QC обнаружены в таламусе, гиппокампе и коре головного мозга. Таким образом, экспрессия QC обнаружена прежде всего в нервной ткани. Невысокий уровень экспрессии QC выявлен в периферических органах, таких как селезенка и почки. misoQC также экспрессировалась в нервной ткани, но уровни оказались более низкими по сравнению с mQC. При этом уровни экспрессии isoQC и QC в периферических органах оказались очень близкими.

На основе результатов о концентрации транскриптов можно заключить, что общая активность (isoQC и QC) должна быть самой высокой в головном мозге. Так, наиболее высокие уровни белка QC присутствуют в органах, пораженных амилоидозами типа болезни Альцгеймера, семейной британской деменции и семейной датской деменции.

Пример 10. Ингибирование человеческой isoQC гетероциклическими хелаторами.

Результаты

Ранее было изучено зависящее от времени ингибирование QC из различных источников гетероциклическими хелаторами, такими как 1,10-фенантролин и дипиколиновая кислота (6,9). Аналогично этому hisoQC также ингибировалась в зависимости от времени гетероциклическими хелаторами 1,10-фенантролином (фиг. 25) и дипиколиновой кислотой (данные не представлены), что убедительно доказывает ее зависящую от металла активность. Кроме того, hisoQC ингибировалась также ЭДТК (фиг. 25). Это является резким отличием от различных QC, поскольку установлено, что ни человеческая QC, ни свиная QC, ни мышиная QC не ингибировались в заметной степени ЭДТК. Однако ингибирование hisoQC ЭДТК с еще большей уверенностью позволяет предположить зависимость катализа от металлов.

Пример 11. Субклеточная локализация hisoQC, изученная с помощью фракционирования клеток.

Фракционирование клеток

Через 1 день после трансфекции HEK293-клетки, в которых проходила экспрессия, отмывали D-ЗФР и собирали центрифугированием при 500×g в течение 5 мин при 4°C. Затем D-ЗФР отбрасывали и клетки ресуспендировали в 1 мл буфера для расщепления (50мМ Трис, 50мМ KCl, 5мМ ЭДТК, 2мМ MgCl₂, pH 7,6, значение pH в котором доводили до требуемого с помощью HCl) и разрушали 30 ударами в гомогенизаторе Поттера для клеток. Суспензию центрифугировали при 700×g в течение 10 мин при 4°C. Полученный клеточный дебрис ресуспендировали в 300 мкл буфера для расщепления и обозначали как фракция дебриса (D). Образовавшийся супернатант дополнительно центрифугировали при 20000×g в течение 30 мин при 4°C. Клеточный дебрис включал мембранные тяжелой фракции (HM) и его ресуспендировали в 200 мкл буфера для расщепления. Образовавшийся супернатант центрифугировали при 100000×g в течение 1 ч при 4°C с помощью ультрацентрифуги (фирма Beckmann). Образовавшийся клеточный дебрис ресуспендировали в 200 мкг буфера для расщепления и обозначали его как мембранные легкой фракции (LM). Супернатант обозначали как растворимая фракция (S). Дебрис, тяжелую мембранный и легкую мембранный фракции обрабатывали ультразвуком в течение 10 с и содержание белка во всех фракциях определяли методом Брэдфорда. Затем фракции анализировали в отношении QC-активности и окрашивали для выявления маркерных белков с помощью Вестерн-блоттинга.

Результаты

Для дополнительного подтверждения осуществляли биохимический анализ распределения активности QC, полученной в результате экспрессии hisoQC и hQC. Нативную hisoQC, начинающуюся на метионине I и II, и hQC экспрессировали соответственно в HEK293-клетках. После фракционирования клеток определяли QC-активность в каждой фракции с помощью анализа флуоресценции с использованием H-Gln-βNA в качестве субстрата. В клетках, трансфектированных "незагруженным" вектором (pcDNA), специфическая QC-активность трудно поддавалась оценке. При экспрессии нативной hisoQC (MetI) и hisoQC (MetII) QC-активность легко выявлялась, при этом наиболее высокая удельная активность обнаружена в мембранных тяжелой фракции (MetI: 40 ± 2 мкмоля/мин/г; MetII: 36 ± 1,5 мкмоля/мин/г) и в среде (MetI: 30 ± 2 мкмоля/мин/г; MetII: 54 ± 3 мкмоля/мин/г). В отличие от этого, при оценке hQC ус-

становлено, что наиболее высокая удельная QC-активность присутствует в среде (1339 ± 76 мкмоль/мин/г), далее в порядке убывания следуют мембранные тяжелой фракции (251 ± 21 мкмоль/мин/г) (фиг. 26А).

Кроме того, рассчитывали абсолютные активности, иллюстрирующие, что экспрессия hisoQC (MetI) и hisoQC (MetII) приводила главным образом к повышению внутриклеточной QC-активности, а именно в дебрисе (MetI: 1032 ± 9 нМ/мин; MetII: 1110 ± 10 нМ/мин) и мембранных тяжелой фракции (MetI: 374 ± 20 нМ/мин; MetII: 281 ± 12 нМ/мин). Лишь незначительная QC-активность обнаружена в среде (MetI: 27 ± 2 нМ/мин; MetII: 53 ± 3 нМ/мин). В отличие от этого QC-активность, полученная в результате экспрессии hQC, оказалась наиболее высокой в среде (1138 ± 65 нМ/мин) и во внутриклеточных компартментах (дебрис: 1089 ± 14 нМ/мин; мембранные тяжелой фракции: 583 ± 38 нМ/мин), что подтверждает локализацию hisoQC в комплексе Гольджи, что установлено с помощью гистохимического анализа (фиг. 26Б).

Данные, полученные с помощью экспрессии нативных ферментов, дополнительно подтверждены с помощью экспрессии hisoQC (MetI и MetII) и hQC, несущих C-концевую FLAG-метку (фиг. 26В). Анализ методом Вестерн-блоттинга образовавшихся меченых с помощью FLAG белков в сравнении с маркерными белками для комплекса Гольджи и митохондрий позволил установить преимущественно внутриклеточную локализацию hisoQC(MetI) и hisoQC (MetII) в дебрисе и мембранных тяжелой фракции, в то время как наиболее высокое содержание hQC обнаружено в среде, но также этот фермент обнаружен в дебрисе и мембранных тяжелой фракции. Визуализация маркерных белков комплекса Гольджи (ST1GAL3) и митохондрий показала присутствие этих компартментов в дебрисе и мембранных тяжелой фракции. Кроме того, митохондриальный белок молекулярной массы 65 кДа обнаружен в меньшем количестве в растворимой фракции.

Пример 12. Анализ сохранения сигнала hisoQC в комплексе Гольджи.

Для дополнительного доказательства того, что предсказанная N-концевая трансмембранный спираль ответственна за сохранение hisoQC в комплексе Гольджи, сигнальные пептиды, начинающиеся на MetI и MetII, включая трансмембранный спираль, клонировали в рамке считывания с EGFP. Образовавшиеся векторы hisoQC (MetI) SS EGFP и hisoQC (MetII) SS EGFP экспрессировали в LN405-клетках и оценивали аналогично полноразмерным слитым белкам hisoQC EGFP, с помощью конфокального лазерсканирующего микроскопа. Экспрессия hisoQC (MetI) SS EGFP приводила к такой же локализации в комплексе Гольджи, которая была обнаружена для полноразмерного слитого белка hisoQC (MetI) EGFP. И в этом случае транспорт hisoQC (MetI) SS EGFP в митохондрии не обнаружен (фиг. 27А). Кроме того, экспрессия укороченного на N-конце пептида hisoQC (MetII) SS EGFP также приводила к повышенному содержанию белка в комплексе Гольджи. Аналогично hisoQC (MetI) SS EGFP, в митохондриях не обнаружено EGFP-флуоресценции (фиг. 27Б). Следовательно, N-концевая последовательность hisoQC обеспечивала котрансляционную транслокацию белка мембранный эндоплазматического ретикулума (ER) и сохранение в комплексе Гольджи. Кроме того, в результате экспрессии hisoQC (MetII) SS EGFP сохраненный сигнал в комплексе Гольджи в основном картировался на остатке между метионином 19 и серином 53 (положение аминокислот, начиная с MetI).

Дополнительный топологический анализ позволил установить возможность функциональной гомологии N-конца hisoQC и гликозилтрансфераз. Гликозилтрансферазы представляют собой трансмембранные белки типа II, несущие короткую цитоплазматическую последовательность, за которой следует трансмембранный спираль и крупный полостной каталитический домен. Очевидно, что это практически такая же структура, которая обнаружена для misoQC и hisoQC (фиг. 28). Для большинства гликозилтрансфераз обнаружен сохраненный сигнал в трансмембранным домене, находящемся в комплексе Гольджи. Кроме того, для некоторых из этих ферментов обнаружено, что укорочение цитоплазматической последовательности не влияет на активность или локализацию белка. В целом, получено доказательство того, что hisoQC относится к трансмембранным белкам типа II, для которых сохранение в комплексе Гольджи аналогично сохранению, характерному для гликозилтрансфераз.

Пример 13. Выявление мРНК QPCTL в различных клеточных линиях человеческой карциномы и в тканях.

ОПЦР-анализ

Анализ экспрессии человеческой QPCTL в линиях клеток человеческой карциномы осуществляли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (qПЦР), в основном согласно методу, описанному в примере 9. Для оценки мРНК QPCTL применяли праймеры из набора праймеров для анализа QuantiTect®, перекрывающие экзон/экзонную область, для исключения совместной амплификации геномной ДНК. QPCR осуществляли согласно рекомендациям производителя. Реакционная смесь представлена в табл., ПЦР-программа проиллюстрирована в табл. 8.

Таблица 9. Состав смеси для qПЦР

Компонент	Объем в мкл
2× мастер-смесь типа QuantiTect SYBR Green PCR (2,5мМ MgCl ₂)	7,5
10× набор типа QuantiTect Primer Assay	1,5
кДНК (<100 нг/Реакция)	1
вода бидистиллированная	5

Для количественного анализа концентрации транскриптов в различных тканях применяли термоячейку "Light Cycler" (фирма Corbett research), используя набор "QuantiTect SYBR Green PCR" (фирма Qiagen). Для количественной оценки применяли ДНК-стандарт (клонированная кДНК человеческой isoQC). Количество копий рассчитывали согласно следующему уравнению:

$$(X^g/\mu\text{l} \text{ДНК}) / (\text{длина плазмида в парах нуклеотидов} \times 660) \times 6,022 \times 1023 = Y^{\text{молекул}} / \text{мкл.}$$

ДНК-стандарт применяли в 4 концентрациях в диапазоне 10^7 - 10^1 молекул/мкл и предельной концентрации (10^0). Результаты qПЦР оценивали с помощью операционного программного обеспечения для устройства Rotor-Gene (фирма Corbett research).

Результаты

Экспрессия QPCTL в различных линиях клеток карциномы

Из изученных раковых линий клеток клетки человеческой меланомы характеризовались наиболее высоким уровнем экспрессии QPCTL-транскриптов (примерно 7000 копий/50 нг общей РНК), в то время как в линиях клеток саркомы мягких тканей обнаружен самый низкий уровень экспрессии QPCTL (365 копий/50 нг общей РНК). В карциноме поджелудочной железы обнаружено в среднем 2100 копий, в карциноме щитовидной железы 3500 копий и в карциноме желудка обнаружено 4100 копий (фиг. 29).

Экспрессия QPCTL в различных линиях клеток меланомы.

В современных исследованиях доказано, что клетки меланомы отличаются сопоставимым высоким уровнем экспрессии QPCT (Gillis J.S., J. Transl. Med. 4, 2006, сс. 4-27). Поэтому при создании настоящего изобретения анализировали экспрессию QPCTL в различных линиях клеток меланомы. Как показано на фиг. 30, экспрессия QPCTL обнаружена во всех проанализированных клетках меланомы. Уровни экспрессии в различных линиях клеток были разными, они составляли от 2025 копий/50 нг общей РНК в линии Mel_ZL_11 до 18043 копий/50 нг общей РНК в линии Mel_ZL12.

Таблица 10. Корреляция между уровнем QPCT и QPCTL и ассоциированными с опухолью антигенами (taa) и корреляция taa между собой

Корреляция	Значимость	Корреляция	Значимость
QPCT - MAGEB2	0,0436	AIM1 - MCL1	0,0163
QPCT - MART1	0,0020	MAGEA1 - MAGEA2	0,00002
QPCT - TYR	0,0023	MAGEA1 - MAGEB2	0,0058
QPCT - MAGEA1	0,0591	TYRP2 - MART1	0,0042
QPCTL - MART1	0,0008	TYR - MART1	0,0335
		TYR - TYRP2	0,0408
AIM1 - AIM2	0,0082	TYR - MCL-1	0,0151

Кроме того, экспрессия QPCT и QPCTL коррелировала с экспрессией ассоциированных с опухолью антигенов (taa). Специфические для меланомы ассоциированные с опухолью антигены выбирали путем исследования баз данных и получали из опубликованных сведений. Среди прочего, AIM1 и AIM2 (отсутствуют в меланомах), MAGEA1, -A2, -A10 и MAGEB2 (антиген меланом, принадлежащий к семейству A и B), MART1 (антиген меланом, распознаваемый Т-клетками), TYR (тироzinаза), TYRP1 и TYRP2 (родственный тирозиназ белок) и MCL-1 (белок миелобластного лейкоза) представляют собой ассоциированные с опухолью антигены в меланомах. Данные сравнивали с помощью программы для статистического анализа SPSS.

Корреляция между QPCT и MAGEB2 оказалась значимой ($p=0,0436$). Кроме того, корреляция между QPCT и MART1 ($p=0,002$), QPCTL и MART1 ($p = 0,008$) и QPCT и TYR ($p = 0,0023$) оказалась также выражено статистически значимой. Корреляции свидетельствуют о наличии прямой зависимости, а именно: более высокие уровни экспрессии QPCT/QPCTL соответствуют более высоким уровням экспрессии ассоциированных с опухолью антигенов. Единственным исключением являлась корреляция между TYR и MCL1, свидетельствующая об обратной зависимости.

Экспрессия QPCT и QPCTL в различных опухолевых тканях.

Экспрессию QPCT и QPCTL оценивали в следующих опухолевых тканях: саркома мягких тканей, желудочная карцинома и карцинома щитовидной железы. Наиболее высокий уровень экспрессии QPCT обнаружен в карциноме щитовидной железы, далее в порядке убывания следовали желудочная карцинома и карцинома мягких тканей (табл. 11). Такой же порядок обнаружен для экспрессии QPCTL, однако количество копий QPCTL-транскриптов во всех случаях оказалось ниже по сравнению с количеством копий QPCT-транскриптов, что доказано с помощью t-критерия Стьюдента

($p_{\text{карцинома мягких тканей}} = 0,001$; $p_{\text{желудочная карцинома}} = 4,8E-7$, $p_{\text{карцинома щитовидной железы}} = 0,04$) (табл. 11; фиг. 31).

Таблица 11. Сравнение экспрессии QPCT и QPCTL в различных опухолевых тканях

	Саркома мягких тканей (119 образцов)	Желудочная карцинома (47 образцов)	Карцинома щитовидной железы (29 образцов)
QPCT	1293	2985	8303
QPCTL	170	469	2540

Дополнительные исследования уровня экспрессии QPCT и QPCTL позволили установить наличие значимой двухсторонней корреляции при оценке с помощью критерия Пирсона для саркомы мягких тканей ($p = 2E-31$) и желудочной карциномы ($p = 0,015$). Обнаружено отсутствие корреляции между уровнем экспрессии QPCT и QPCTL при карциноме щитовидной железы ($p = 0,46$).

Экспрессия QPCTL зависит от стадии дифференцировки желудочной карциномы

Исследовали экспрессию QPCTL в образцах желудочных карцином, соответствующих разным стадиям дифференцировки опухолей. Контролем служила окружающая опухоль здоровая ткань. Сравнение здоровой и опухолевой ткани позволило выявить существенно более высокий уровень экспрессии QPCTL ($p = 0,04$) в опухолевых тканях. В недифференцированных желудочных карциномах обнаружен более низкий уровень экспрессии QPCTL, чем в здоровой ткани. В мало дифференцированной и хорошо или средне дифференцированных желудочных карциномах не обнаружено различий в медианных значениях по сравнению со здоровой тканью (фиг. 32).

Экспрессия QPCT и QPCTL на различных стадиях карциномы щитовидной железы

На различных стадиях карциномы щитовидной железы исследовали уровни экспрессии QPCT и QPCTL. Стадии классифицировали согласно номенклатуре Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) как фолликулярный рак щитовидной железы (FTC), папиллярный рак щитовидной железы (PTC), недифференцированный рак щитовидной железы (UTC). В качестве контроля служили образцы, полученные из организма пациентов с зобом.

Уровень мРНК QPCT (медианный) при дифференцированных карциномах щитовидной железы типа FTC (6700 копий/50 нг общей РНК) и PTC (16000 копий/50 нг общей РНК) оказался более высоким, чем в не пораженной опухолью ткани (зоб: 2100 копий/50 нг общей РНК). При UTC уровень составлял 5400 копий/50 нг общей РНК, и этот показатель оказался в 2,5 раза выше, чем обнаруженный в зобе. Количество копий мРНК QPCT при всех опухолях щитовидной железы был существенно выше, чем при зобе ($p = 0,04$, t-критерий Стьюдента) (фиг. 33).

Уровни мРНК QPCTL при карциномах щитовидной железы были однородными. В образцах, полученных из FTC (2600 копий/50 нг общей РНК) и UTC (2500 копий/50 нг общей РНК), уровни оказались почти такими же, как и в зобе (2500 копий/50 нг общей). Экспрессия QPCTL в образцах PTC оказалась несколько пониженной до 1900 копий/50 нг общей РНК (фиг. 34).

В заключение следует отметить, что уровень экспрессии QPCT и QPCTL в зобе оказался одинаковым. Однако в опухолевой тканях экспрессия QPCT возрастала, а экспрессия QPCTL оставалась стабильной.

Пример 14. Исследование экспрессии QPCT и QPCTL в человеческих линиях клеток после инкубации с различными стимулами.

Линии клеток и среды

Эксперименты по стимуляции осуществляли с использованием линии клеток почки человеческого эмбриона HEK293, линии клеток человеческого острого моноцитарного лейкоза THP-1 и линии клеток фолликулярного рака щитовидной железы FTC-133. Клетки выращивали в соответствующих культуральных средах (DMEM, 10% ФБС для HEK293, RPMI 1640, 10% ФБС для THP-1 и DMEM/F12, 10% ФБС для FTC-133) в увлажненной атмосфере при 37°C и 5% CO₂.

Стимуляция с использованием биологически активных пептидов, химических агентов или LPS

Клетки линии HEK293 и FTC-133 культивировали в виде прикрепленных культур, а клетки линии THP-1 выращивали в супензии. Для анализа стимуляции 2×10^5 клеток FTC-133 и HEK293 переносили в 24-луночные планшеты. При использовании клеток HEK293 планшеты покрывали коллагеном I для гарантии соответствующего прилипания. Кроме того, 2×10^6 клеток THP-1 выращивали в 24-луночных планшетах для супензионных культур. Все эксперименты по стимуляции проводили в бессывороточной среде. Клетки FTC-133 выращивали в течение ночи. После этого клетки адаптировали к бессывороточной среде в течение еще 24 ч и стимуляцию начинали, заменяя кондиционированную среду на свежую бессывороточную среду. Клетки HEK293 выращивали в течение ночи и после этого начинали стимуляцию соответствующими агентами без адаптации к бессывороточной среде из-за морфологических изменений, происходящих, если клетки культивировали в бессывороточной среде в течение более 24 ч. Клетки высевали в бессывороточную среду в сочетании с соответствующим агентом. Применяемые стимулы и их конечные концентрации представлены в табл. 12.

Таблица 12. Стимулы, применяемые в исследованиях по регуляции hQC и hisoQC в человеческих клеточных линиях

Название стимула	Конечная концентрация
масляная кислота (BA)	2мМ
фактор роста гепатоцитов (HGF)	10 нг/мл
липоолисахарид (LPS)	1, 10 мкг/мл
трансформирующий фактор роста β (TGF β)	10, 100 нг/мл
фактор некроза опухоли α (TNF α)	10, 100 нг/мл

Клетки инкубировали с соответствующим стимулом в течение 24 ч. После этого выделяли из клеток общую РНК с помощью набора Nucleo-Spin® RNA II (фирма Macherey-Nagel) и хранили вплоть до осуществления qПЦР-анализа.

Стимуляция с помощью гипоксии

Клетки THP-1, HEK293 и FTC-133 высевали каждую на два матраса для культуры ткани площадью 25 см² соответственно. Затем один матрас с каждой клеточной линией, который служил в качестве отрицательного контроля, культивировали в нормальных условиях выращивания в течение 24 с. Другие матрасы помещали в анаэробный контейнер, содержащий анаэробный реагент (Anaerocult® P, фирма Merck) и индикатор. Контейнер запечатывали для гарантии непроницаемости для воздуха. Клетки выращивали также в течение 24 ч и затем выделяли с помощью набора Nucleo-Spin® RNA II (фирма Macherey-Nagel) и хранили вплоть до осуществления qПЦР-анализа.

Результаты

Основной уровень экспрессии QPCT и QPCTL в клетках HEK293, FTC-133 и THP-1

Основной уровень экспрессии в применяемых клеточных линиях HEK293, FTC-133 и THP-1 оценивали при подготовке к проведению последующих экспериментов по стимуляции. Количество копий транскриптов QPCT и QPCTL обобщено в табл. 13.

Таблица 13. Основной уровень экспрессии QPCT и QPCTL в различных линиях клеток

линия клеток	Абсолютное количество копий мРНК на 50 нг общей РНК	
	QPCT	QPCTL
HEK-293 (8 образцов)	37196 ± 18928	3206 ± 855
FTC-133 (8 образцов)	24790 ± 7605	10262 ± 1899
THP-1 (8 образцов)	3588 ± 853	6725 ± 1763

Воздействие выбранных стимулов на экспрессию QPCT и QPCTL

К настоящему времени не были описаны регуляторные сайты связывания промоторов QPCT и QPCTL и пути трансдукции сигналов, приводящие к их регулированию. Поэтому были проведены эксперименты по стимулированию с использованием различных клеточных линий и стимулов. Уровни мРНК QPCT в HEK293-клетках повышались при стимуляции с помощью TNF- α , HGF и масляной кислоты. Кроме того, была изучена регуляция CCL2 в качестве субстрата QPCT/QPCTL. Стимуляция TNF- α и масляной кислотой приводила к повышению. Количество CCL2-транскриптов в клетках HEK293. HGF не оказывал воздействие на экспрессию CCL2. В отличие от этого QPCTL не регулировалась TNF- α , HGF и масляной кислотой (фиг. 35).

Кроме того, клетки FTC-133 стимулировали с помощью LPS и TGF- β и оценивали регуляцию QPCT, QPCTL и CCL2. В клетках FTC-133 LPS и TGF- β стимулировали экспрессию мРНК QPCT, но не индуцировали экспрессию QPCTL и CCL2 (фиг. 36).

Результаты этих экспериментов согласовывались также с данными о стимуляции клеток THP-1 с помощью LPS (1 мкг/мл), LPS (10 мкг/мл), TGF- β и TNF- α . Как установлено при использовании клеток линии FTC-133 и HEK293, экспрессию QPCT можно индуцировать, используя различные стимулы. Кроме того, экспрессию CCL2 индуцировали с помощью LPS и TNF- α . И в этом случае не обнаружено ни индукции, ни подавления мРНК QPCTL (фиг. 37).

Таким образом, из этих экспериментов следует, что QPCT можно регулировать с помощью набора стимулов в различных линиях клеток (LPS, TNF- α , HGF, масляная кислота и др.). В противоположность этому, QPCTL не удалось ни стимулировать, ни подавлять с помощью изученных стимулов, это позволяет предположить, что функция QPCTL является конститутивной.

Влияние выбранных стимулов на экспрессию QPCT и ее субстратов

Поскольку экспрессия QPCT индуцировалась рядом стимулов, возник вопрос о том, может ли индукция QPCT иметь место в сочетании с индукцией субстратов QPCT CCL2, CCL7, CCL8 и CCL13. Для этой цели осуществляли стимуляцию с помощью LPS (1 мкг/мл), LPS (10 мкг/мл), TGF- β (100 нг/мл) и TNF- α (100 нг/мл) соответственно с использованием моноцитов линии THP-1. Для клеток линии THP-1

характерен основной уровень экспрессии всех хемокинов, что важно для сравнения стимулированных клеток с отрицательным контролем.

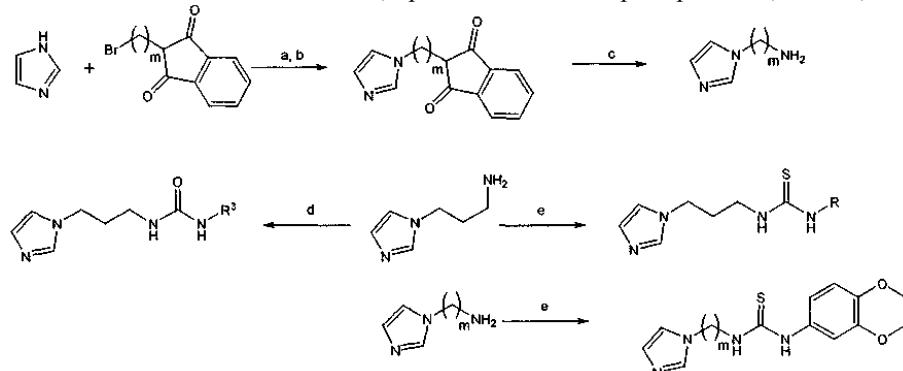
Обработка LPS и TNF- α приводила к заметной индукции всех изученных хемокинов и QPCT в клетках THP-1. TGF- β оказался менее эффективным в качестве стимула и индуцировал экспрессию QPCT, CCL2, CCL7 и CCL8 максимум в 2 раза. CCL13 подавлялся при стимуляции TGF- β (фиг. 38).

Стимуляция экспрессии QPCT и OPCTL с помощью гипоксии

Экспрессия QPCTL не регулировалась химическими агентами, биологически активными пептидами или LPS. В связи с этим при создании изобретения оценивали, можно ли регулировать экспрессию QPCTL с помощью гипоксии. Как обобщено на фиг. 39, гипоксия избирательно индуцировала экспрессию QPCTL, но не QPCT. Для сравнения, индуцируемый гипоксией фактор 1a (HIF1a) подавлялся на 15% (фиг. 39A) и 45% (фиг. 39B). Эти данные позволяют предположить связь QPCTL с гипоксией.

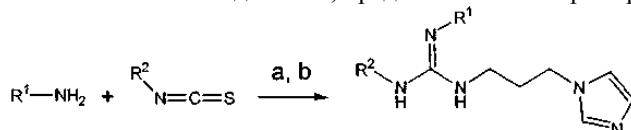
Синтез ингибиторов

Схема синтеза 1. Синтез соединений, представленных в примерах 1-53, 96-102, 136-137



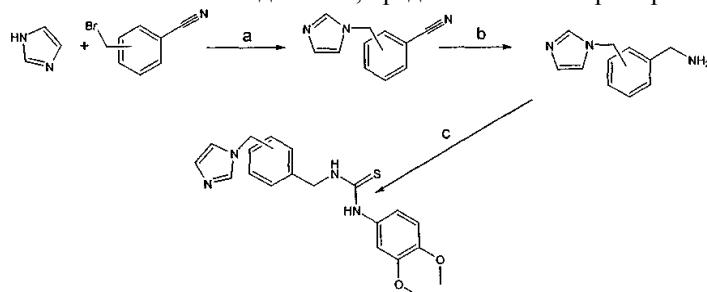
Реагенты и условия: (а) NaH, ДМФ, 4 ч, КТ.; (б), 8 ч, 100°C; (в) H₂N-NH₂, EtOH, 8 ч, кипячение с обратным холодильником, затем 4н. HCl, 6 ч, кипячение с обратным холодильником, (г) R³-NCO, EtOH, 6 ч, кипячение с обратным холодильником; (д) 3,4 диметоксифенилизотиоцианат.

Схема синтеза 2. Синтез соединений, представленных в примерах 54-95



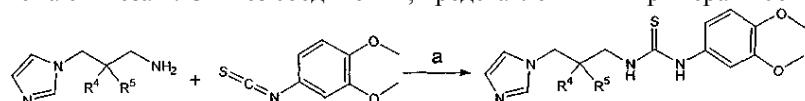
Реагенты и условия: (а) R-NCS, EtOH, 6 ч, кипячение с обратным холодильником; (б) водорастворимый карбодиимид (ВРКД), 1Н-имидазол-1-пропанамин, ДМФ, 2 ч, КТ.

Схема синтеза 3. Синтез соединений, представленных в примерах 103-105



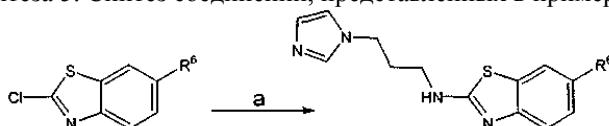
Реагенты и условия: (а) NaH, ДМФ, КТ., 3 ч; (б) LiAlH₄, диоксан, кипячение с обратным холодильником, 1 ч; (в) R-NCS, EtOH, кипячение с обратным холодильником 6 ч.

Схема синтеза 4: Синтез соединений, представленных в примерах 106-109



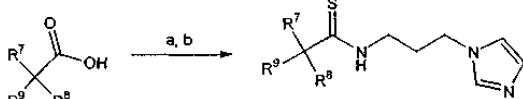
Реагенты и условия: (а) EtOH, 2 ч, кипячение с обратным холодильником.

Схема синтеза 5. Синтез соединений, представленных в примерах 110-112



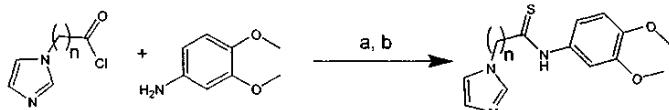
Реагенты и условия: (а) 1Н-имидазол-1-пропанамин, триэтиламин, толуол, 12 ч, кипячение с обратным холодильником.

Схема синтеза 6. Синтез соединений, представленных в примерах 113-132



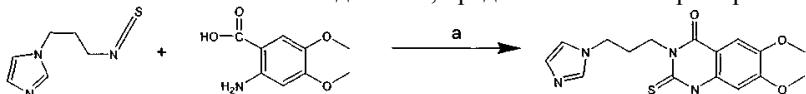
Реагенты и условия: (а) CAIBE, 1Н-имидазол-1-пропанамин, диоксан, 0°C, 12 ч; (б) реагент Лавес-сона, EtOH, кипячение с обратным холодильником, 8 ч.

Схема синтеза 7. Синтез соединений, представленных в примерах 133-135



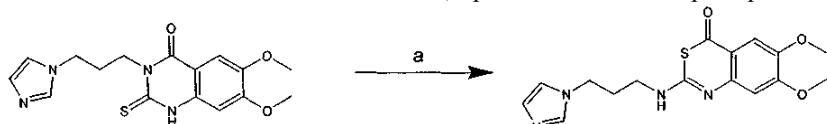
Реагенты и условия: (а) хлорангидрид 1Н-имидазол-1-пропана, CH_2Cl_2 , - 10°C, 1 ч; (б) реагент Лавес-сона, диоксан, кипячение с обратным холодильником, 8 ч.

Схема синтеза 8. Синтез соединения, представленного в примере 138



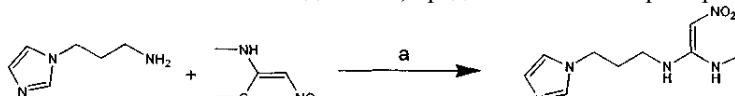
Реагенты и условия: (а) EtOH, кипячение с обратным холодильником, 8 ч.

Схема синтеза 9. Синтез соединения, представленного в примере 139



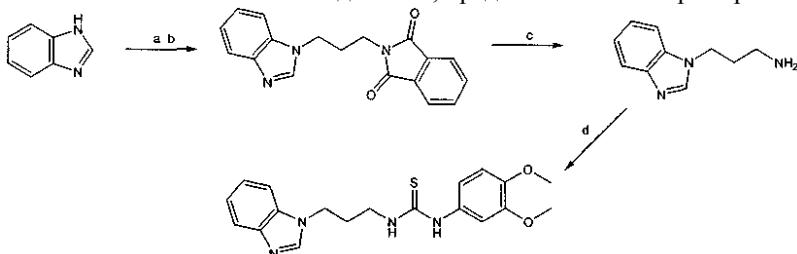
Реагенты и условия: (а) 75% конц. H_2SO_4 , 4 ч.

Схема синтеза 10. Синтез соединения, представленного в примере 140



Реагенты и условия: (а) ацетонитрил, кипячение с обратным холодильником 2 ч.

Схема синтеза 11. Синтез соединения, представленного в примере 141



Реагенты и условия: (а) NaH , ДМФ, 4 ч, КТ; (б) 8 ч, 100°C; (в) $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$, EtOH, 8 ч, кипячение с обратным холодильником, затем 4 ч. HCl , 6 ч, кипячение с обратным холодильником, (г) 3,4 диметоксифенилизотиоцианат, EtOH, 6 ч, кипячение с обратным холодильником.

Аналитические методы

ESI-масс-спектры получали с помощью спектрометра типа SCIEX API 365 (фирма Perkin Elmer). ^1H -ЯМР (500 МГц) данные получали с помощью устройства типа BRUKER AC 500, используя DMCO-D_6 в качестве растворителя. Химические сдвиги выражали в частях на миллион (част./млн) относительно обработки тетраметилсиланом. Схемы расщепления обозначали следующим образом: s (синглет), d (дублет), dd (двойной дублет), t (триплет), m (мультиплет) и br (широкий сигнал).

Подробное описание синтеза

Примеры 1-12 и 14-53.

1Н-Имидазол-1-пропанамин подвергали взаимодействию с соответствующим изотиоцианатом в этаноле при температуре дефлекции в течение 8 ч. Затем растворитель удаляли и оставшееся масло растворяли в метиленхлориде. Органический слой промывали дважды насыщенным раствором NaHCO_3 , а затем NaHSO_4 и соляным раствором, сушили и упаривали.

Оставшийся твердый продукт перекристаллизовывали из этилацетата, получая конкретную тимочевину, выход 80-98%.

Пример 13. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(3,4-диметоксифенил)тиомочевина.

4,0 ммоль 3,4-диметоксифенилизотиоцианата и 4,0 ммоль 3-(1Н-имидазол-1-ил)алкил-1-амина растворяли в 10 мл абсолютного этанола. После перемешивания в течение 2 ч при температуре дефлекции растворитель выпаривали и образовавшийся твердый продукт перекристаллизовывали из этанола.

Выход: 0,66 г (51,3%); $t_{\text{пл.}}$: 160,0-161,0°C.

^1H -ЯМР δ 1,8 - 2,0 (m, 2H), 3,4 - 3,5 (m, 2H), 3,75 (s, 6H), 3,9 - 4,0 (m, 2H), 6,7 - 6,8 (m, 1H), 6,9 (br m, 2H), 6,95 (s, 1H), 7,15 (s, 1H), 7,55 (br s, 1H), 7,6 (s, 1H), 9,3 (s, 1H); МС m/z 321,2 (M+H), 253,3 (M-C₃H₃N₂•).

Примеры 96-102.

1Н-Имидазол-1-пропанамин подвергали взаимодействию с соответствующим изоцианатом в этаноле при температуре дефлегмации в течение 8 ч. Затем растворитель удаляли и оставшееся масло растворяли в метиленхлориде. Органический слой промывали дважды насыщенным раствором NaHCO₃, а затем NaHSO₄ и соляным раствором, сушили и упаривали. Оставшийся твердый продукт перекристаллизовывали из этилацетата, получая конкретную мочевину, выход 85-90%.

Примеры 136, 137.

1Н-Имидазол-1-алкиламины получали с помощью известных из литературы методов из фбромалкилфталимидов и соли имидазолия с последующим гидролизом. Образовавшиеся продукты трансформировали в тиомочевины согласно методу, изложенному в примерах 1-53, выход 88% (пример 136) и 95% (пример 137).

Примеры 54-95.

Во всех примерах из соответствующих тиомочевин путем взаимодействия с водорастворимым карбодиимидом (ВРКД) и 1Н-имидазол-1-пропанамидом в безводном диметилформамиде в течение 24 ч при комнатной температуре (КТ) получали тризамещенные гуанидины, выход 40-87%.

Примеры 103-105.

Имидазол подвергали взаимодействию с соответствующим бромометилфенилцианидом в ДМФ, используя 1 эквивалент NaH, в течение 3 ч при КТ, получая 1Н-имидазол-1-метилфенилцианиды. Растворитель удаляли и образовавшееся масло повторно растворяли в диоксане. Цианиды превращали в соответствующие амины, используя 1 эквивалент LiAlH₄. После добавления насыщенного раствора KHSO₄ диоксан выпаривали и водный слой экстрагировали CHCl₃. Органический слой концентрировали в вакууме и амин превращали в вакууме и амин превращали в соответствующие тиомочевины с помощью методов, изложенных в примерах 1-53, выход 78% (пример 103) и 65% (пример 104) и 81% (пример 105).

Примеры 106-109.

Используя в качестве исходных продуктов соответствующие метансульфонат-2-метилпропилфталимиды, амины синтезировали согласно методам, описанным для аминов в примерах 136-137. Образовавшиеся продукты трансформировали в тиомочевины с помощью методов, изложенных в примерах 1-53, общие выходы продуктов из примеров 106-109 составляли 25-30%.

Примеры 110-112.

1Н-Имидазол-1-пропанамин подвергали взаимодействию с соответствующим 2-хлорбензо[d]тиазолом в толуоле в течение 24 ч при температуре 130°C. После удаления растворителя и перекристаллизации из метанола получали продукты из примеров 110-112, выход 55-65%.

Примеры 113-118, 120-124 и 126-132.

1Н-Имидазол-1-пропанамин подвергали взаимодействию с соответствующей 2-фенилуксусной кислотой в безводном диоксане путем добавления эквивалента CAIBE и N-метилморфоролина при температуре 0°C. После этого смеси давали нагреться в течение 2 ч до К.Т. и смесь перемешивали в течение 12 ч. После удаления растворителя образовавшееся масло повторно растворяли в метиленхлориде и органический слой промывали водным раствором NaHCO₃ и водой, сушили и растворитель выпаривали. Оставшееся масло растворяли в диоксане, добавляя реагент Лавессона. После перемешивания в течение 12 ч добавляли насыщенный раствор NaHCO₃.

Диоксан выпаривали и водный слой экстрагировали этилацетатом. Органический слой отделяли, сушили и растворитель выпаривали. Оставшийся твердый продукт кристаллизовали из этилацетата/простого эфира, получая продукты из примеров 113-118, 120-124 и 126-132, общие выходы 62-85%.

Пример 119. N-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-2-(3,4-диметоксифенил)этантиоамид.

Смесь, содержащую 4,0 ммоль триэтиламина и 4,0 ммоль 3-(1Н-имидазол-1-ил)алкил-1-амина в 20 мл диоксана, добавляли по каплям при перемешивании к охлажденному на льду раствору, содержащему 4,0 ммоль 2-(3,4-диметоксифенил)ацетилхлорида в 30 мл диоксана. Смеси давали нагреться до К.Т. и затем перемешивали в течение 1 ч. После удаления растворителя при пониженном давлении остаток повторно растворяли в 50 мл дихлорметана. Органический слой промывали с помощью 30 мл насыщенного водного раствора NaHCO₃ и воды. Органический раствор сушили, фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении. После повторного растворения в 50 мл безводного диоксана добавляли 2,2 ммоль реагента Лавессона и смесь нагревали до 90°C и перемешивали в течение 8 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток повторно растворяли в 50 мл дихлорметана. Органический слой промывали трижды насыщенным водным раствором NaHCO₃, а затем трижды водой, сушили, фильтровали и затем органический растворитель удаляли. Соединение очищали хроматографией, используя устройство для хроматографии с центрифугой (фирма Hartison Research Ltd.) с применением силикагелевых пластинок с толщиной слоя 2 мм и градиент CHCl₃/MeOH в качестве системы для элюирования.

Выход: 0,14 г (10,6 %); $t_{пл}$: 148,0-150,0°C

^1H -ЯМР δ 2,0 - 2,15 (br m, 2H), 3,4 - 3,5 (m, 2H), 3,7 (s, 6H), 6,75 - 6,8 (m, 2H), 4,1 - 4,2 (m, 2H), 6,8 - 6,9 (m, 2H), 6,95 - 7,0 (m, 1H), 7,4 (s, 1H), 7,75 - 7,85 (br m, 1H), 8,6 (s, 1H), 10,2 (s, 1H); MC m/z 320,2 (M+H), 252,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 125. N-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-1-(3,4-диметоксифенил)циклогексанкарбонатоамид.

11,06 ммоль 3,4-диметоксифенилацетонитрила, 34,8 ммоля 2-бром-1-хлорэтанола и 1,16 ммоль гидрохлорида триэтилбензиламмония растворяли в 10 мл водного раствора KOH (60%). Смесь переносили в баню для обработки ультразвуком и интенсивно перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Образовавшуюся суспензию разводили 40 мл воды и экстрагировали трижды 20 мл дихлорметана. Объединенные органические слои промывали водным раствором соляной кислоты (1н.), сушили над Na₂SO₄ и растворитель удаляли при пониженном давлении. Оставшееся масло очищали экспресс-хроматографией на силикагеле, используя в качестве системы для элюирования этилацетат/гептан, получая 0,81 г (34,4%) 1-(3,4-диметоксифенил)циклогексанкарбонитрила. 3,9 ммоль 1-(3,4-диметоксифенил)циклогексанкарбонитрила и 11,2 ммоль KOH суспендировали в 80 мл этиленгликоля. Смесь перемешивали в течение 12 ч при температуре дефлегмации. Затем добавляли 80 мл воды и водный слой экстрагировали дважды простым эфиrom. После доведения значения pH до 4-5 с помощью HCl (1н.) водный слой экстрагировали трижды простым эфиrom, затем объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄ и растворитель удаляли, получая 0,81 г (93,5%) 1-(3,4-диметоксифенил)циклогексанкарбоновой кислоты.

3,44 ммоль 1-(3,4-диметоксифенил)циклогексанкарбоновой кислоты, 3,5 ммоль N-метилморфолина и 3,5 ммоль изобутилхлорамиата растворяли в безводном тетрагидрофуране перемешивали в течение 15 мин при -15°C. Затем добавляли 3,5 ммоль 3-(1Н-имидазол-1-ил)алкил-1-амина и смеси давали нагреться до 0°C и перемешивали в течение 12 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении и оставшееся масло повторно растворяли в хлороформе. Затем органический слой промывали дважды насыщенным водным раствором NaHCO₃, затем сушили над Na₂SO₄ и растворитель удаляли. Очистку осуществляли с помощью хроматографии с центрифугой на устройстве типа Chromatotron® (фирма Harrison Research Ltd.), применяя силикагелевые пластинки с толщиной слоя 2 мм и градиент CHCl₃/MeOH в качестве системы для элюирования, получая 0,671 г (59,3%) N-(3-(1Н-имидазол-1-ил)пропил)-1-(3,4-диметоксифенил)циклогексанкарбоксамида.

После повторного растворения в 30 мл безводного диоксана добавляли 1,43 ммоль реагента Лавессона и смесь нагревали до 90°C и перемешивали в течение 8 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении, остатку давали раствориться в 50 мл дихлорметана. Органический слой промывали трижды насыщенным водным раствором NaHCO₃, а затем трижды водой, сушили, фильтровали и затем органический растворитель удаляли. Соединение очищали с помощью устройства для хроматографии с центрифугой (фирма Harrison Research Ltd.), применяя силикагелевые пластинки с толщиной слоя 2 мм и градиент CHCl₃/MeOH в качестве системы для элюирования.

Выход: 0,33 г (46,2 %); $t_{пл}$: 127,0-127,5°C.

^1H -ЯМР δ 1,1 - 1,2 (t, 2H), 1,55 - 1,6 (t, 2H), 2,0 - 2,1 (m, 2H), 3,5 - 3,6 (m, 2H), 3,7 - 3,8 (s, 6H), 4,1 - 4,2 (t, 2H), 6,8 - 6,9 (m, 3H), 7,65 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 8,8 (m, 1H), 9,05 (s, 1H); MC m/z 346,0 (M+H), 278,2 (M-C₃H₃N₂•), 177,1 (M-C₆H₈N₃S).

Примеры 133-135.

Смесь, содержащую 1 эквивалент триэтиламина и 3,4-диметоксианилина в диоксане, добавляли при перемешивании к раствору соответствующего ω-бромалкилхлорангидрида при температуре 0°C. Раствору давали нагреться до К.Т. и перемешивали в течение 2 ч. Растворитель выпаривали и оставшееся масло повторно растворяли в дихлорметане. Органический слой промывали водой, сушили, фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении.

Имидазол и гидрид натрия суспендировали и смесь перемешивали в инертных условиях при К.Т. в течение 3 ч. Добавляли ω-бром-N-(3,4-диметоксифенил)алкиламид и смесь нагревали до 100°C и перемешивали в течение 8 ч. Затем растворитель выпаривали, добавляли горячий толуол и раствор фильтровали. Затем растворитель удаляли при пониженном давлении. Трансформацию в тиоамиды осуществляли согласно методам, описанным в примерах 113-132, с помощью реагента Лавессона, получая соединения, указанные в примерах 133-135, общие выходы которых составляли 13-20%.

Для других указанных в примерах соединений, которые синтезировали с помощью описанных выше общих схем синтеза, получены следующие аналитические данные.

Пример 1. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-метилтиомочевина.

$t_{пл}$: 122-122,5°C.

^1H -ЯМР δ 1,85 - 1,95 (m, 2H), 2,8 (s, 3H), 3,2 - 3,5 (br d, 2H), 3,8 - 3,9 (m, 2H), 6,85 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,3 - 7,5 (br d, 2H), 7,65 (s, 1H); MC m/z 199,1 (M+H), 221,3 (M+Na), 131,0 (M-C₃H₃N₂•)

Пример 2. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-трет-бутилтиомочевина.

$t_{пл}$: 147,0-147,5°C.

^1H -ЯМР δ 1,3 - 1,4 (s, 9H), 1,85 - 1,95 (m, 2H), 3,5 (t, 2H), 3,8 (t, 2H), 6,85 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,3 - 7,5 (br d, 2H), 7,65 (s, 1H); MC m/z 241,1 (M+H), 173,1 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 3. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-бензилтиомочевина.

t_{пл}: 127,0-128,0°C.

¹Н-ЯМР δ 1,85 - 1,95 (m, 2H), 3,2 - 3,5 (br d, 2H), 3,8 - 3,9 (m, 2H), 4,6 (s, 2H), 6,8 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,19 - 7,35 (m, 5H), 7,5 - 7,6 (br d, 2H), 7,85 (s, 1H); MC m/z 275,3 (M+H), 207,1 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 5. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-фенилтиомочевина.

t_{пл}: 166,5-167,0°C.

¹Н-ЯМР δ 1,95 - 2,05 (m, 2H), 3,3 - 3,5 (br d, 2H), 3,9 - 4,0 (m, 2H), 6,85 (d, 1H), 7,05 (m, 1H) 7,15 (d, 1H), 7,25 (m, 2H), 7,35 (m, 2H), 7,6 (s, 1H), 7,8 (br s, 1H), 9,5 (br s, 1H); MC m/z 261,1 (M+H), 193,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 6. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(4-фторфенил)тиомочевина.

t_{пл}: 147,0-148,0°C.

¹Н-ЯМР δ 1,95 - 2,05 (m, 2H), 3,3 - 3,5 (br d, 2H), 3,9 - 4,05 (m, 2H), 6,85 (d, 1H), 7,05 - 7,15 (m, 3H), 7,3 - 7,4 (m, 2H), 7,6 (s, 1H), 7,7 - 7,8 (br s, 1H), 9,4 (br s, 1H); MC m/z 279,3 (M+H), 211,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 7. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(4-этилфенил)тиомочевина.

t_{пл}: 100,0- 100,5°C.

¹Н-ЯМР δ 1,15 - 1,2 (t, 3H), 1,9 - 2,0 (m, 2H), 2,5 - 2,6 (m, 2H), 3,3 - 3,5 (br d, 2H), 3,9 - 4,05 (m, 2H), 6,85 (d, 1H), 7,1 - 7,2 (m, 3H), 7,25 - 7,3 (m, 2H), 7,6 (s, 1H), 7,7 - 7,8 (br s, 1H), 9,4 (br s, 1H); MC m/z 289,3 (M+H), 221,1 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 8. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(4-(трифторметил)фенил)тиомочевина.

t_{пл}: 154,5-155,0°C.

¹Н-ЯМР δ 1,9 - 2,1 (br m, 2H), 3,4 - 3,6 (br d, 2H), 3,95 - 4,1 (br m, 2H), 6,85 (d, 1H), 7,2 (d, 1H), 7,6 - 7,8 (m, 5H), 8,2 (br s, 1H), 9,9 (br s, 1H); MC m/z 329,3 (M+H), 261,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 10. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(4-ацетилфенил)тиомочевина.

t_{пл}: 170,0-171,0°C.

¹Н-ЯМР δ 1,9 - 2,1 (br m, 2H), 2,4 - 2,5 (s, 3H), 3,2 - 3,5 (br m, 2H), 3,9 - 4,1 (m, 2H), 6,85 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,5 - 7,65 (br m, 3H), 7,8 - 7,9 (m, 2H), 8,1 (m, 2H), 9,8 (br s, 1H); MC m/z 303,2 (M+H), 235,1 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 11. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(4-метоксифенил)тиомочевина.

t_{пл}: 125,0-125,5°C.

¹Н-ЯМР δ 1,8 - 2,0 (br m, 2H), 3,2 - 3,5 (br m, 2H), 3,7 (s, 3H), 3,9 - 4,0 (m, 2H), 6,7 - 6,9 (m, 3H), 7,1 - 7,2 (m, 3H), 7,5 (s, 1H), 7,6 (s, 1H), 9,2 (s, 1H); MC m/z 291,1 (M+H), 223,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 14. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(2,4-диметоксифенил)тиомочевина.

t_{пл}: 120,0-120,5°C.

¹Н-ЯМР δ 1,8 - 2,0 (br m, 2H), 3,4 - 3,5 (br m, 2H), 3,75 (s, 6H), 3,9 - 4,0 (m, 2H), 6,5 (d, 1H), 6,6 (s, 1H), 6,9 (s, 1H), 7,15 (s, 1H), 7,3 (d, 1H), 7,5 (br s, 1H), 7,6 (s, 1H), 9,75 (s, 1H); MC m/z 321,2 (M+H), 253,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 15. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(3,5-диметоксифенил)тиомочевина.

t_{пл}: 142,0 -143,0°C.

¹Н-ЯМР δ 1,8 - 2,0 (br m, 2H), 3,4 - 3,5 (br m, 2H), 3,6 (s, 6H), 3,95 - 4,0 (m, 2H), 6,25 (m, 1H), 6,6 (m, 2H), 6,9 (s, 1H), 7,2 (s, 1H), 7,6 (s, 1H), 7,8 (s, 1H), 9,5 (s, 1H); MC m/z 321,2 (M+H), 253,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 23. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-7-ил)тиомочевина.

t_{пл}: 103,0-103,5°C.

¹Н-ЯМР δ 1,9 - 2,0 (br m, 2H), 3,3 - 3,5 (br d, 2H), 3,9 - 4,0 (m, 2H), 4,2 - 4,3 (m, 4H), 6,7 (m, 1H), 6,8 - 6,8 (m, 1H), 6,9 (m, 2H), 7,2 (s, 1H), 7,6 (m, 2H), 9,3 (s, 1H); MC m/z 319,3 (M+H), 251,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 24:1 -(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(бензо[d][1,3]диоксол-6-ил)тиомочевина.

t_{пл}: 115,0-115,6°C.

¹Н-ЯМР δ 1,9 - 2,1 (br m, 2H), 3,4 - 3,5 (br d, 2H), 4,05 - 4,15 (m, 2H), 6,0 (s, 2H), 6,7 (m, 1H), 6,8 - 6,85 (m, 1H), 6,95 (d, 1H), 7,25 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,7 (br s, 1H), 8,5 (br s, 1H), 9,4 (br s, 1H); MC m/z 305,2 (M+H), 237,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 25. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(3,4,5-триметоксифенил)тиомочевина.

t_{пл}: 124,5-125,5°C.

¹Н-ЯМР δ 1,8 - 2,0 (m, 2H), 3,4 - 3,5 (br m, 2H), 3,6 (s, 3H), 3,7 (s, 6H), 3,9 - 4,0 (m, 2H), 6,65 (m, 2H), 6,85 (s, 1H), 7,2 (s, 1H), 7,6 (s, 1H), 7,7 (br s, 1H), 9,4 (s, 1H); MC m/z 351,3 (M+H), 283,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 26. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(3-метоксифенил)тиомочевина.

t_{пл}: 89,5-90,0°C.

¹Н-ЯМР δ 1,9 - 2,1 (br m, 2H), 3,4 - 3,5 (br m, 2H), 3,7 (s, 3H), 3,9 - 4,0 (m, 2H), 6,6 - 6,7 (m, 1H), 6,8 - 6,9 (m, 2H), 7,1 (m, 2H), 7,15 - 7,25 (br m, 1H), 7,6 (s, 1H), 7,8 (br s, 1H), 9,5 (s, 1H); MC m/z 291,1 (M+H), 223,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 27. 1-(3-(1Н-имидазол-1-ил)пропил)-3-(4-этоксифенил)тиомочевина *t_{пл}*: 126,0-126,5°C.

¹H-ЯМР δ 1,5 (br m, 3H), 1,9 - 2,0 (br m, 2H), 3,4 - 3,5 (br m, 2H), 3,9 - 4,0 (br m, 4H), 6,8 - 6,9 (m, 2H), 6,95 (s, 1H), 7,15 - 7,2 (m, 2H), 7,25 (s, 1H), 7,55 - 7,6 (br s, 1H), 7,8 (s, 1H), 9,3 (s, 1H); MC m/z 305,2 (M+H), 237,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 33. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(4-(метилтио)фенил)тиомочевина.
t_{пл}: 140,0-140,5°C.

¹H-ЯМР δ 1,8 - 2,05 (br m, 2H), 2,5 (s, 3H), 3,3 - 3,5 (br m, 2H), 3,9 - 4,1 (m, 2H), 6,9 (m, 1H), 7,1 - 7,3 (br m, 5H), 7,6 (s, 1H), 7,75 (br s, 1H), 9,4 (s, 1H); MC m/z 307,2 (M+H), 239,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 42. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(4-нитрофенил)тиомочевина.
t_{пл}: 165,0-166,0°C.

¹H-ЯМР δ 1,9 - 2,05 (m, 2H), 3,3 - 3,5 (br d, 2H), 3,95 - 4,05 (m, 2H), 6,85 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,6 (d, 1H), 7,7 (m, 2H), 8,1 (m, 2H), 8,3 (br s, 1H), 10,1 (br s, 1H); MC m/z 306,2 (M+H), 237,9 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 50. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(4-(диметиламино)фенил)тиомочевина.
t_{пл}: 146,5 - 147,0°C.

¹H-ЯМР δ 1,9 - 2,0 (m, 2H), 2,9 (s, 6H), 3,4 (m, 2H), 3,9 - 4,0 (m, 2H), 6,7 (m, 2H), 6,9 (s, 1H), 7,05 - 7,1 (m, 2H), 7,15 (s, 1H), 7,4 (br s, 1H), 7,6 (s, 1H), 9,2 (s, 1H); MC m/z 304,2 (M+H), 236,0 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 102. 1-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(3,4-диметоксифенил)тиомочевина.
t_{пл}: 114,5-115,0°C.

¹H-ЯМР δ 1,7 - 1,9 (m, 2H), 2,9 - 3,1 (m, 2H), 3,7 (2s, 6H), 3,9 - 4,0 (m, 2H), 6,1 (t, 1H), 6,7 (s, 2H), 6,8 (s, 1H), 7,15 (d, 2H), 7,6 (s, 1H), 8,2 (s, 1H); MC m/z 321,2 (M+H), 253,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 106. 1-((S)-3-(1Н-Имидазол-1-ил)-2-метилпролил)-3-(3,4-диметоксифенил)тиомочевина.
t_{пл}: 150,5- 151,5°C.

¹H-ЯМР δ 0,9 (d, 3H), 2,3 - 2,4 (m, 2H), 2,5 (s, 1H), 3,7 (d, 6H), 4,0 - 4,1 (br m, 1H), 4,15 - 4,25 (br m, 1H), 6,75 - 6,8 (m, 1H), 6,85 (m, 1H), 6,9 - 7,0 (m, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,75 (s, 2H), 9,1 (s, 1H), 9,5 (s, 1H); MC m/z 335,6 (M+H), 267,1 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 107. 1-((R)-3-(1Н-Имидазол-1-ил)-2-метилпропил)-3-(3,4-диметоксифенил)тиомочевина.
t_{пл}: 155,0-157,5°C.

¹H-ЯМР δ 0,9 (d, 3H), 2,3 - 2,4 (m, 2H), 2,5 (s, 1H), 3,7 (d, 6H), 4,0 - 4,1 (br m, 1H), 4,15 - 4,25 (br m, 1H), 6,75 - 6,8 (m, 1H), 6,85 (m, 1H), 6,9 - 7,0 (m, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,75 (s, 2H), 9,1 (s, 1H), 9,5 (s, 1H); MC m/z 335,4 (M+H), 267,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 109. 1-((1-(1Н-Имидазол-1-ил)метил)циклогексил)-3-(3,4-диметоксифенил)тиомочевина.
t_{пл}: 166,5-168,5°C.

¹H-ЯМР δ 0,7 - 0,8 (br m, 2H), 1,85 - 1,9 (m, 1H), 2,15 - 2,2 (m, 1H), 2,2 - 2,3 (m, 1H), 3,4 - 3,5 (m, 1H), 3,7 (d, 6H), 4,2 (s, 1H), 4,95 (s, 1H), 6,75 - 6,8 (br m, 1H), 6,85 - 6,9 (br m, 1H), 7,0 (s, 1H), 7,5 (m, 1H), 7,6 (m, 1H), 7,7 (s, 0,5H), 7,8 (s, 0,5H), 8,85 (s, 0,5H), 9,1 (s, 0,5H), 9,35 (s, 0,5H), 9,45 (s, 0,5H); MC m/z 347,2 (M+H), 279,2 (M-C₃H₃N₂•), 137,5 (M-C₉H₁₃N₄S).

Пример 110. N-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)бензо[d]тиазол-2-амин.

¹H-ЯМР δ 1,95 - 2,15 (m, 2H), 3,25 - 3,35 (m, 2H), 4,0 - 4,1 (t, 2H), 6,9 (s, 1H), 6,95 - 7,05 (t, 1H), 7,15 - 7,2 (m, 2H), 7,35 - 7,4 (d, 1H), 7,60 - 7,70 (m, 2H), 8,0 - 8,1 (br s, 1H); MC m/z 259,4 (M+H), 191,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 111. N-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-6-хлорбензо[d]тиазол-2-амин.

¹H-ЯМР δ 1,95 - 2,15 (m, 2H), 3,25 - 3,35 (m, 2H), 4,0 - 4,1 (t, 2H), 6,9 (s, 1H), 7,1 - 7,2 (d, 2H), 7,3 - 7,4 (d, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,8 (s, 1H), 8,2 (s, 1H); MC m/z 293,3 (M+H), 225,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 112. N-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-6-метоксибензо[d]тиазол-2-амин.

¹H-ЯМР δ 1,9 - 2,05 (m, 2H), 3,2 - 3,3 (m, 2H), 3,7 (s, 3H), 4,0 - 4,1 (t, 2H), 6,7 - 6,8 (d, 1H), 6,9 (s, 1H), 7,15 - 7,2 (s, 1H), 7,2 - 7,3 (m, 2H), 7,65 (s, 1H), 7,8 (s, 1H); MC m/z 289,1 (M+H), 221,4 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 115. (R)-N-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-2-фенилпропантиоамид.

t_{пл}: 82,0 - 82,5°C.

¹H-ЯМР δ 1,4 - 1,55 (d, 3H), 1,9 - 2,0 (m, 2H), 3,4 - 3,5 (m, 2H), 3,85 - 3,95 (m, 2H), 4,0 - 4,1 (q, 1H), 6,8 - 6,9 (s, 1H), 7,1 (s, 1H), 7,15 - 7,2 (m, 1H), 7,2 - 7,3 (m, 2H), 7,35 - 7,4 (m, 2H), 7,55 (s, 1H), 10,1 (s, 1H); MC m/z 274,4 (M+H), 206,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 116. (S)-N-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-2-фенилпропантиоамид.

t_{пл}: 82,5-83,5°C.

¹H-ЯМР δ 1,4 - 1,55 (d, 3H), 1,9 - 2,0 (m, 2H), 3,4 - 3,5 (m, 2H), 3,85 - 3,95 (m, 2H), 4,0 - 4,1 (q, 1H), 6,8 - 6,9 (s, 1H), 7,1 (s, 1H), 7,15 - 7,2 (m, 1H), 7,2 - 7,3 (m, 2H), 7,35 - 7,4 (m, 2H), 7,55 (s, 1H), 10,1 (s, 1H); MC m/z 274,4 (M+H), 206,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 121. N-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-1-(4-хлорфенил)циклогексанкарбонтиоамид.

t_{пл}: 137,5-139,0°C.

¹H-ЯМР δ 1,55 - 1,75 (br m, 2H), 1,85 - 1,95 (br m, 2H), 2,4 - 2,5 (br m, 2H), 2,7 - 2,85 (br m, 2H), 3,3 - 3,5 (br m, 2H), 3,8 (m, 2H), 6,9 (s, 1H), 7,0 (s, 1H), 7,3 (m, 2H), 7,45 (s, 1H), 7,5 (m, 2H), 9,6 (t, 1H); MC m/z

334,3 (M+H), 266,1 (M-C₃H₃N₂).

Пример 122. N-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-1-(4-хлорфенил)цикlopентанкарботиоамид.
t_{пл}: 140,0-141,0°C.

¹Н-ЯМР δ 1,5 - 1,65 (br m, 4H), 1,8 - 1,9 (m, 2H), 2,0 - 2,1 (m, 2H), 2,6 (m, 2H), 3,4 - 3,5 (m, 2H), 3,7 - 3,8 (m, 2H), 6,85 (s, 1H), 7,0 (s, 1H), 7,35 (m, 2H), 7,4 (m, 2H), 7,5 (s, 1H), 9,4 (t, 1H); MC m/z 348,2 (M+H), 280,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 123. N-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-1-(4-метоксифенил)циклогексанкарботиоамид.
t_{пл}: 162,5-164,0°C.

¹Н-ЯМР δ 1,2 - 1,3 (m, 1H), 1,35 - 1,5 (br m, 5H), 1,85 - 2,0 (br m, 4H), 2,4 - 2,6 (br m, 2H), 3,4 - 3,5 (m, 2H), 3,7 (s, 3H), 3,8 (m, 2H), 6,8 (m, 3H), 7,0 (s, 1H), 7,3 (m, 2H), 7,5 (s, 1H), 9,2 (t, 1H); MC m/z 358,3 (M+H), 290,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 124. N-(3-(1Н-Имидазол-1-ил)пропил)-1-(4-метоксифенил)цикlopропанкарботиоамид.
t_{пл}: 129,0-129,5°C.

¹Н-ЯМР δ 1,0 - 1,1 (m, 2H), 1,5-1,6 (m, 2H), 1,9 - 2,0 (br m, 2H), 3,4 - 3,5 (m, 2H), 3,7 (s, 3H), 3,9 (m, 2H), 6,9 (m, 3H), 7,1 (s, 1H), 7,2 - 7,3 (m, 2H), 7,6 (s, 1H), 8,9 (br s, 1H); MC m/z 316,0 (M+H), 248,4 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 134. 5-(1Н-Имидазол-1-ил)-N-(3,4-диметоксифенил)пентантиоамид.
t_{пл}: 128,0-128,5°C.

¹Н-ЯМР δ 1,65-1,70 (m, 2H), 1,75-1,80 (m, 2H), 2,7-2,75 (m, 2H), 3,7 (s, 3H), 3,75 (s, 3H), 4,0 - 4,05 (t, 2H), 6,9 - 7,0 (m, 2H), 7,2 (s, 1H), 7,3 (d, 1H), 7,5 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 11,0 (s, 1H); MC m/z 320,2 (M+H), 252,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 136. 1-(2-(1Н-Имидазол-1-ил)этил)-3-(3,4-диметоксифенил)тиомочевина.
t_{пл}: 157,5-159,0°C.

¹Н-ЯМР δ 3,7 (2s, 6H), 3,8 (m, 2H), 4,2 (m, 2H), 6,7 (m, 1H), 6,85 (m, 1H), 6,9 (m, 2H), 7,15 (s, 1H), 7,5 (br s, 1H), 7,6 (s, 1H), 9,5 (s, 1H); MC m/z 307,2 (M+H), 239,1 (M-C₃H₃N₂•).

Сокращения

°C - градус Цельсия;

A, Ala - аланин;

Аβ - амилоидный-β-пептид;

AB₁ - амилоидный пептид, обнаруженный при семейной британской деменции;

AC - аденилилциклизаза;

ADan - амилоидный пептид, обнаруженный при семейной датской деменции;

AIM - отсутствует в меланоме;

AMC - аминометилкумарин;

as - антисмысловой;

Asp - аспартат;

βNA - бета-нафтиламин;

ВА - масляная кислота;

bp - пара оснований;

БСА - бычий сывороточный альбумин;

C - цистеин;

CAT - хлорамфениколацетилтрансфераза;

ЦАМФ - циклический аденоzinмонофосфат;

CCL2 - MCP-1, макроцитарный хемоаттрактантный белок 1;

CCL7 - MCP-3, макроцитарный хемоаттрактантный белок 3;

CCL8 - MCP-2, макроцитарный хемоаттрактантный белок 2;

CCL13 - MCP-4, макроцитарный хемоаттрактантный белок 4;

κДНК - комплементарная ДНК;

C-His - C-концевая гистидинова метка;

CIDP - хроническая воспалительная демиелинизирующая полирадикулоневропатия;

Cl - хлор;

CSF - спинномозговая жидкость;

С-конец - карбоксиконец;

CTL - цитотоксический Т-лимфоцит;

CV - объем колонки;

d - диаметр;

Да - Дальтон;

ДМСО - диметилсульфоксид;

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;

E - фермент;

EBV - вирус Эпштейна-Барра;

ECL - энteroхромафиноцит-подобный;
 E. coli - Escherichia coli;
 EC - глутамилцилаза;
 ED - эффективная доза;
 EGFP - усиленный зеленый флуоресцентный белок;
 ES - комплекс фермент-субстрат;
 FPP - стимулирующий оплодотворение пептид;
 FTC - фолликулярный рак щитовидной железы;
 g - относительная центробежная сила;
 GBS - синдром Гийена-Барре;
 GF - гель-фильтрация;
 Gln - глутамин;
 Glu - глутаминовая кислота;
 GnRH - гонадотропин-релизинг гормон (гонадолиберин);
 GST - глутатион-S-трансфераза;
 H - водород;
 h - человеческий, час
 HGF - фактор роста гепатоцитов;
 HIC - хроматография, основанная на гидрофобном взаимодействии;
 HIF1a - индуцирующий гипоксию фактор 1a;
 His - гистидин;
 ЖХВР - жидкостная хроматография высокого разрешения;
 I - ингибитор, изолейцин;
 ID - идентификация;
 IMAC - аффинная хроматография на иммобилизованном металле;
 ИПТГ - изопропил- β -D-тиогалактопиранозид;
 К - калий;
 k - константа;
 кДа - килодальтон;
 k_i - константа ингибирования;
 KLH - гемоцианин лимфы улитки;
 l - длина;
 LB - Луриа-Бертани;
 LD - смертельная доза;
 LPS - липополисахарид;
 М - молярный;
 мкл - микролитр;
 мкМ - микромолярный;
 MAGEA - антиген меланомы семейства A;
 MAGEB - антиген меланомы семейства B;
 Maldi-tof - времяпролетная масс-спектрометрия с использованием опосредуемой матрицей лазерной десорбции/ионизации;
 MART1 - антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками;
 max - максимум;
 MCL-1 - белок миелобластного лейкоза 1;
 Met - метионин;
 Мин - минуты;
 mM - миллимолярный;
 MS - рассеянный склероз;
 мРНК - матричная РНК;
 N - аспарагин;
 Na - натрий;
 НАД·Н - никотинамидадениндинуклеотид;
 нм - нанометр;
 NO - номер;
 НТ - нейротензин;
 N-конец - аминоконец;
 О - кислород;
 ОП - оптическая плотность;
 Р - продукт, фосфор;
 ЗФР - забуференный фосфатом физиологический раствор;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;
pGlu - прирглутаминовая кислота;
рН - водородный показатель;
Pro - пролин;
PTC - папиллярный рак щитовидной железы;
Рут - пироглутамат;
QC - глутамилцилаза (глутаминилпептидцилтрансфераза);
qПЦР - количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени;
QPCTL - напоминающий глутаминилпептидцилтрансферазу белок;
РНК - рибонуклеиновая кислота;
OT - обратная транскрипция; обратная транскриптаза;
S - субстрат;
s - смысловой;
SAGE - серийный анализ генной экспрессии;
ДСН - додецилсульфат натрия;
ДСН-ПААГ - электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН;
SGAP - аминопептидаза *Streptomyces griseus*;
SEQ - последовательность;
SNP - полиморфизм одного нуклеотида;
taa - ассоциированный с опухолью антиген;
TGF- β - трансформирующий фактор роста бета;
TNF- α - фактор некроза опухоли альфа;
TRH - тиреотропин-рилизинг-фактор (тиреолиберин);
TSH - тиреостимулирующий гормон;
TYR - тирозиназа;
TYRP - родственный тирозиназе белок;
Ед. - единица;
UTC - недифференцированный рак щитовидной железы;
УФ - ультрафиолетовый;
V - скорость;
VpAP - аминопептидаза *Vibrio proteolytica*;
YSS - сигнальная последовательность дрожжей;
Zn - цинк.

Перечень последовательностей

<110> ПРОБИОДРУГ АГ

<120> Новые гены, родственные гену глутаминилцилазы

<130> PBD 00060/WO

<150> US 60/846,244

<151> 2006-09-21

<150> US 60/947,780

<151> 2007-07-03

<160> 121

<170> PatentIn версия 3.1

<210> 1

<211> 1086

<212> ДНК

<213> человек

<400> 1

atggcaggcg gaagacacccg gcgcgtcggt ggcaccctcc acctgctgtct gctgggtggcc	60
gcacctgcacct gggcatccag ggggggtcagt ccgagtgccct cagcctggcc agaggagaag	120
aattaccacc agccagccat tttgaattca tcggctcttc ggaaatttgc agaaggcacc	180
agtatctctg aaatgtggca aaatgactta cagccattgc tgatagagcg atacccggga	240
tccccctggaa gctatgtgc tcgtcageac atcatgcagc gaattcagag gttcaggct	300
gactgggtct tggaaataga caccttcttg agtcagacac cctatggta ccggctttc	360
tcaaataatca tcagcacccat caatcccact gctaaacgac atttggctct cgcctgccac	420
tatgactcca agtattttc ccacttggAAC aacagagtgt ttgttaggagc cactgattca	480
gccgtgccccat gtgcaatgtat gtttggactt gtcgtgcct tagacaagaa actcctttcc	540
ttaaaagactg tttcagactc caagccagat ttgtcaactcc agctgatctt ctttgatgg	600
gaagaggctt ttcttcactg gtctccctcaa gattctctct atgggtctcg acacttagct	660
gcaaaagatgg catcgacccc gcacccaccc ggagcgagag gcaccagccaa actgcattgc	720
atggatTTTt tggctttattt ggatttgattt ggagctccaa acccaacgtt tcccaatttt	780
tttccaaaact cagccaggtg gttcgaaaga cttaagccaa ttgaacatga acttcatgaa	840

016584

ttgggttgc tcaaggatca ctcttggag gggcggtatt tccagaatta cagttatgga 900
ggtgtgattc aggatgacca tattccattt ttaagaagag gtgttccagt tctgcatactg 960
ataccgtctc ctttccctga agtctggcac accatggatg acaatgaaga aaatttggat 1020
gaatcaacca ttgacaatct aaacaaaatc ctacaagtct ttgtgttggaa atatcttcata 1080
ttgtaa 1086

<210> 2
<211> 1149
<212> ДНК
<213> человек

<400> 2
atgcgttccg gggggccgcgg gcgcaccccgcc ctgcggctgg gggAACGTGG cctcatggag 60
ccactcttgc cgccogaagcg ccgcctgcta ccgcgggttc ggctcttgcc tctgtttgt 120
gcgcgtggccg tgggctcgcc gttctacacc atttggagcg gctggcacccg caggactgag 180
gagctgccgc tggggccggga gctgcgggtc ccattgtatcg gaagcctccc cgaagcccc 240
ctgcggaggg tgggtgggaca actggatcca cagcgtctct ggagcactta tctgcgcaccc 300
ctgctggttt tgcaaacccc gggcagcccg ggaaatctcc aagtcagaaa gttctggag 360
gccacgcgtgc ggccctgac agcagggttgg cacgtggagc tggatccctt cacagcctca 420
acacccctgg ggccagtggaa ctggcaat gtgggtggcca cactggaccc aagggtgtcc 480
cgtaacctca cccttgcctg ccattatgac tcgaagctct tcccaacccgg atcgacccccc 540
ttttagggg ccacggattc ggctgtgccc tggccctgc tgctggagct ggcccaagca 600
cttgacctgg agctgagcag ggccaaaaaa caggcagcccg cggtgaccct gcaactgctc 660
ttcttggatg gtgaagaggc gctgaaggag tggggaccca aggactccct ttacggttcc 720
cggtcacctgg cccagctcat ggagtctata cctcacagcc cggccccac caggatccag 780
gctattgagc tctttatgtct tcttgatctc ctggggagcccg ccaatccac cttctacagc 840
cacttcccttc gcacggtccg ctgggtccat cggctgagga gcattgagaa gcgtctgcac 900
cgtttgaacc tgctgcagtc tcattcccaag gaagtgtatgt acttccaacc cggggagccc 960
tttggctctg tggaaagacga ccacatcccc ttctctccgca gaggggttacc cgtgtccat 1020
ctcatctcca cggcccttcccc tgctgtctgg cacacccctg cggacacccga ggtcaatctc 1080

016584

caccaccca cggcacaca	ttgtccgc	attctcgctg	tgttcctggc	tgaatacctg	1140	
gggctctag					1149	
<210>	3					
<211>	1145					
<212>	ДНК					
<213>	человек					
<400>	3					
atgcgttccg	ggggccgcgg	gcaaaaaa	ctgcggctgg	ggaaacgtgg	atggagccac	60
tcttgccgcc	gaagcgccgc	ctgttaccgc	gggttcggct	cttgcctctg	ttgctggcgc	120
tggccgtgg	ctcggcggtc	tacaccattt	ggagcggctg	gcacccgagg	actgaggagg	180
tgccgctgg	ccgggagctg	cggttccccat	tgatcggaa	cctccccc	gccccggctgc	240
ggagggttgt	gggacaactg	gatccacagg	gtctctggag	cacttatctg	cgccccctgc	300
tggttgtgcg	aacccggg	agccccggaa	atctccaagt	cagaaagg	ctggaggcca	360
cgctgcggtc	cctgacagca	ggttggcactg	tggagctgga	tcccttcaca	gcctcaacac	420
ccctggggcc	agtggactt	ggcaatgtgg	tggccacact	ggacccaa	gctgccccgtc	480
acctcaccct	tgcctgcct	tatgactcga	agctttccc	acccggatcg	acccctttg	540
tagggccac	ggattcggct	gtgcctgtg	ccctgctgt	ggagctggcc	caagcaactt	600
acctggagct	gagcagggcc	aaaaaacagg	cagccccgg	gaccctgaa	ctgcctttt	660
tggatggta	agaggcgctg	aaggagtgg	gacccaagga	ctcccttac	ggttccggc	720
acctggccca	gctcatggag	tctatacctc	acagccccgg	ccccaccagg	atccaggcta	780
ttgagcttt	tatgttttt	gatctctgg	gagccccaa	tcccacctt	tacagccact	840
tcctcgcac	ggtccgcgtgg	ttccatggc	tgaggagcat	tgagaagegt	ctgcacccgtt	900
tgaacctgt	gcagtctcat	ccccaggaag	tgtgtactt	ccaaacccgg	gagcccttt	960
gctctgtgga	agacgaccac	atcccccttc	tccgcagagg	ggtacccgtg	ctccatctca	1020
tctccacggc	cttccctgt	gtctggcaca	cccctgegga	caccgagg	aatctccacc	1080
cacccacgg	acacaactt	tgccgcattt	tcgtgtgtt	cctggctgaa	tacctggggc	1140
tctag						1145

016584

<210> 4
 <211> 1149
 <212> ДНК
 <213> Macaca fascicularis

<400> 4
 atgcgttccg ggggccgcgg gcggccccgc ctgcggctag gggAACGTGG cgttatggag 60
 ccactcttgc ccccgaaagcg cccgcctgcta ccgcgggttc ggctcttgcc cctgttgctg 120
 gcgcgtggccg tgggcctggc gttctacacc atttggagcg gctggcacccg caggactgag 180
 gagotgcgcg tgggcgggga gctgcgggta ccgttgcata gaagccttcc cgaagccgg 240
 ctgcggaggg tgggtggaca actggaccca cagcgtctct ggggcactta tctgegcccc 300
 ctgcgtggttg tgcaaacccc aggcagcccg gaaaatctcc aagtcaaaaa gttccctggag 360
 gccacgctgc ggtccctgac agcagggtgg cacgtggagc tggatccctt cacagcctcg 420
 acgccccctgg ggccagtggc ctggcataat gtgggtggcca cgctggaccc gggggctgcc 480
 cgtcacctca cccttgcctg ccattatgac tcaagctct tcccaacccgg atcgaccccg 540
 ttttagggg ccacggactc ggctgtgccc tgtccctgc tgctggagct ggcccaaggca 600
 cttgacctgg agctgagcag gcccaaagaa caggcagccc cggtgaccct gcaactgctc 660
 ttccctggatg gtgaagaggc gctgaaggag tggggaccca aggactccct ttacggttcc 720
 cggcacctgg cccagctcat ggagtctata cctcatagcc cggccccac caggatccag 780
 gctattgagc tcttatgtc tcttgcata ctgggagccc ccaatccac cttctacago 840
 cactccctc gcacggtccg ctggttccat cggctgagaa gcattgagaa gcgtctgcac 900
 cgtttgaacc tgctgcagtc tcattccctc gaagtgtatgt acttccaaacc cggggagccc 960
 ttccggctctg tggaagacga ccacatcccc ttccctccca gaggggtccc cgtgtccat 1020
 ctcatctcta cgcccttccc tgctgtctgg cacacccctg cggacacaga ggccaatctc 1080
 cacccgcccc caaggtaaccaa cttaagccgc attctggccg tggccctggc tgaatacctg 1140
 gggctctag 1149

<210> 5
 <211> 1149
 <212> ДНК
 <213> Macaca mulatta

016584

<400> 5
atgcgttccg ggggcccgcgg gcggccccgc ctgcggctag gggAACGTGG cgttatggag 60
ccactcttgc ccccgaagcg cgcgcgtcta ccgcgggttc ggctcttgcc cctgttgcgt 120
gcgcgtggccg tgggctcggc gttctacacc atttggagcg gctggcacccg caggactgag 180
gagctgcgcg tgggcccgggaa gctgcgggtc ccgttgcgtcg gaagccttcc cgaagcccg 240
ctgcggaggg tgggtgggaca actggaccca cagcgtctct ggggcactta tctgcgcgcc 300
ctgctggttt tgcaaacccc aggccggccg gaaaatctcc aagtcaaaaa gttcctggag 360
gccacgcgtgc ggtccctgac agcaggttgg cacgtggagc tggatccctt cacagcctcg 420
acgccccctgg gcccagtggaa ctttggcaat gtgggtggcca cgctggaccc gggggctgcc 480
cgtcacctca cccttgcctg ccattatgac tcgaagctct tccccccccc atcgaccccg 540
ttttaggggg ccacagactc ggctgtgccccc tggatccctgc tgctggagct gcccaggca 600
cttgaccttgg agctgagcag ggc当地agaa caggcagccc cggtgaccct gcaactgctc 660
ttcctggatg gtgaagaggc gctgaaggag tggggaccca aggactccct ttacggttcc 720
cggcacctgg cccagctcat ggagtctata cctcatagcc cggccccac caggatccag 780
gctattgagc tcttatgtct tcttgcgtcc ctgggagccc ccaatccccac cttctacagc 840
cacttccctc gcacggtccg ctgggtccat cggctgagaa gcattgagaa gcgtctgcac 900
cgtttgaacc tgctgcagtc tcataccctg gaagtgtatgt acttccaaacc cggggagccc 960
tttggctctg tggaaagacga ccacatcccc ttctccgca gaggggtccc cgtgcctccat 1020
ctcatctcta cggcccttccc tgctgtctgg cacacccctg cggacacaga ggccaatctc 1080
cacccggccca cggtaacacaa cttaagccgc attctggccg tggatccctggc tgaataacctg 1140
gggctctag 1149

<210> 6
<211> 1152
<212> ДНК
<213> Canis familiaris

<400> 6
atgcgttccg ggggcccgcgg gcgggtccgg ctacggctcg gggAACGTGG cctcttggag 60
ccgcctccccc cggccaaagcg cgcgcgtcta ccgcggccgc acttcttgcc tctgttgcgt 120

016584

ctggccctgg ccctggcttc ggcgacacctac accatctggaa gcgggtggca ccaccagact	180
gaggagctgc cgcgaaaaaagg ggagctgcgg ggccgcttga tcggaaggct ctccgaagcc	240
cggctgcggc ggggtgggtgg gcaactggac ccacacccgtc tctggAACAC ttatctgcgc	300
ccccctgtgg ttgtgcggac cccgggcaggc cccggcaatc tccaagttag aaagttctg	360
gagggtacac tacggaccctt gacagcaggc tggcatgtgg aactggaccc ctgcacagcc	420
ttgacacccc tggggccact ggactttggc aatgtgggtgg ccacgctggaa cccagggct	480
gcccgtaacc tcacccttgc ctgcattat gactccaagc tcttcgcata tgagtccgtt	540
ccctttgtgg gggcaacaga ttccggctgtaa ccttgcgccc tgctgctggaa gctggctcag	600
gccctcgaca gggagtttag tagggcaag gaggcaggaag ccccggtgac tctgcagctg	660
ctctttttgg atggtaaga agcaactgaag gagtggggac ccacagactc cctctatggc	720
tcccgccacc tggcccagct catggagtct gcaccccaaca gccccggccccc caccaggatc	780
caggctatcg agctttcat gtcccttgat ctccctgggtg ccccgaaatcc aaacttctac	840
agtcacttcc ctcatacagc ccgctgggttc catcggtga ggagcatcga gaagcgccctt	900
caccgcatga acctgctgca gtctcatccc caggaagtga tgtacttcca gcccggggag	960
ccccctggtt ctgtggaaaga tgaccacatc cccttcctcc gccgaggggt ccctgtgtc	1020
cacccatctt ccatgcctt cccctccgtc tggcacaccc ccgtatgactc tgaggccaac	1080
ctgcacccac ccaccgtaca caatctgagc cgcatttcgt ccgtgttctt ggccgaatat	1140
ctggggctct ag	1152

<210> 7
<211> 1152
<212> ДНК
<213> Rattus norvegicus

atgagtcgg ccagccgggg gcggtctcgg cagcggtctcg gggatcgggg cctcatgaaa	60
ccaccctcac tttccaagcg ccgtcttctg ccgcgggtgc agctcctgcc cctgtgtcg	120
ctggcgctgg ccctgggtt ggcttttat atcgctggaa atagctggca ccctggggtt	180
gaggaggtat cacggagccg ggatctgcgg gtcccgctga tcggaaggct ttcagaagcc	240

016584

aagctgccc	ttgtggtagg	gcagctggat	ccacagcgtc	tctgggaaac	ttttctgcgt	300
cccttgttga	ttgtacgacc	cccaggtagt	cctggcaate	tccaagttag	aaagttectg	360
gaggctacgt	tgcagtcct	atcggcaggg	tggcacgtgg	aactggaccc	attcacagcc	420
tcaacccct	tggggccact	ggacttcggg	aacgtggtgg	ccacccttga	cccaggagct	480
gccccgtcacc	tcaccctcgc	ctgccattat	gactctaagt	tcttcctcc	tgggttaccc	540
ccctttgtgg	ggggcacaga	ttcagccgtg	ccctgtgcc	tgcttcttgg	gttagtccag	600
gcccttgatg	tcatgctgag	cagaatcaag	cagcaggcag	caccagtgac	cctgcagctg	660
ctcttcttgg	acggggagga	ggcactgaag	gagtggggac	caaaggactc	cctctatgg	720
tcccgccacc	tagctcagat	catggagtct	ataccgcaca	gccctggccc	caccaggatc	780
caggcttattg	agctctttgt	ccttcttgc	cttctggag	cgcccagtcc	aatcttcttc	840
agtcaactcc	cccgacacgc	ccgctggtcc	caacgactgc	ggagcatcga	gaagcgcctt	900
caccgtctga	acctactgca	gtctcacccc	caggaagtga	tgtacttcca	accggggag	960
ccccctggcc	ctgtggaaaga	tgaccacatc	cccttcttcc	gcagaggggt	cccggtgctc	1020
caccttattg	cgatgccctt	ccctgccgtg	tggcacacac	ctgctgacac	tgaggctaac	1080
ctccacccgc	caacggtgca	caacctgagc	cgcatectcg	ccgtgttcct	ggctgagttac	1140
ctqqqtctct	aq					1152

```
<210> 8  
<211> 1152  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus
```

<400> 8
atgagtccccggagccgggg cggggcccccgg cagcggctcg aggatcgtagg cctcatgaaa 60
ccaccctcac ttccaaggcg ccgtttcttg ccgcgagtc agttctctgg cctgctgctg 120
ctggcgctgg ctatgggctt ggctttctat atcgctctggaa acagctggca ccctggggtt 180
gaggagatgt cacggagccggatctgggg gtcccgctga tcggaaaccttcaagaagcc 240
aagctgcggc tgggtggtagg gcagctggat ccgcagcgatc tctggggaaac ttccctgcgt 300
cccttattgtt ttttgtggacc cccgggttagt tctggcaatc tccaaatgttagaaatgg 360
gaggctacgt tgcaatccct gtcggcaggg tggcatgttg aactggaccc attcacggcc 420

016584

tcaacccct tggggccact ggacttcggg aacgtggtgg ccacacttga cccaggagct	480
gcccgtaacc tcaccctcgc ctgcattat gactctaagt ttttcctcc ggggttgccc	540
ccctttgtgg gggccacaga ttcaagttgtg ccctgtgccc tgtttttggaa gttggtccag	600
gcctttagtgc ccatgctgag cagaatcaag cagcaggcag caccggtgac cctgcagctg	660
cttttcttgg atggggagga ggcactgaag gagttgggac caaaggactc cctctatggc	720
tccggcacc tagtcagat catggagtct ataccacaca gccttggccc caccaggatc	780
caggctatttgc agcttttgt ctcctcgac cttctggag catccagttcc gatcttttc	840
agtcaacttcc ctgcacagc cctgtggtc cagcgactga ggagcattga gaagcgcctt	900
cacccggctga acctactgca gtctcacccc caggaagtga tgtacttcca acccggggag	960
ccccccggcc ctgtggaaaga tgaccacata cccttccttc gcagaggggt cccgtgtc	1020
caccttatttgc ccacgcctt ccctgtgtg tggcacacac ctgctgacac cgaggccaac	1080
ctccacccac ccactgtgca taacctgagc cgcatttttg ctgtgttctt ggccgagttac	1140
ctgggactct ag	1152

<210> 9
<211> 1152
<212> ДНК
<213> Bos taurus

<400> 9 atgccttcgg gggggccgggg gggggccgggg ctccaggatcg gggAACGCAAG cttttggag	60
cgaccctcac cgcccaagcg cgcctgata ccgcgggcac agctgttgc ccagctgtg	120
ctggctctga cggtagccctc ggtgttctat accatttggaa ggatctggca tagccagact	180
gaagagctac cgctggggcg ggagctgcgg ggccctttga tcggaaggct ccccaagct	240
cgggtgcggga gggtagtgggg gcaactggac cctcaccgtc tctggaaacac tttctgcgc	300
cctctgtgg ttgtacggac tccgggcage cggggcaatc tccaaagtggaa aaaggttctg	360
gaggctacgc tgcggacact ttcagcaggc tggcatatag aactcgactc cttcaactgcc	420
tccacaccccg tggggccatt ggacttcagc aatgtggtgg ccacgtggaa cccagggct	480
gcccgccacc ttacccttgc ctgcattat gactccaagc tttccatc tgactcagcc	540

016584

ccctttgtgg gggccacgga ttccggcagtg cttgtccc tgctactgga gctggccaa 600
 gcccttgcacc aggagctggg caaagccaag gagagggcag cgccaatgac cttgcagctg 660
 atcttcctgg atggtaaga ggcactgaag cagtggggac ccaaggactc gctttatggc 720
 tccccggcacc tggcccagct catggagtct acaccccaacg gcctgggctc caccaggatc 780
 caggctatty agcttttat gcttcttgcat ctcctggag cccccaaccc gaccttctac 840
 agtcacttcc ctgcacggc cccgtggttc catcggtca ggagcattga gaagcgctg 900
 caccgtctga acctcctgca gtctcatcct tggaaagtga tgtacttcca gaccggggag 960
 ccccccggct ccgtggaaga cgaccacatc cccgttccctcc gccgaggagt tcccggtctc 1020
 cacctcatecg ccacaccctt cccctctgtc tggcacacgt ccgatgactc cgaggccaac 1080
 ctgcacccac ccacggtaca caacctgagc cgcattctgg ccgtgttcct ggctgagtag 1140
 ctggggctct ag 1152

<210> 10
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> человек

<400> 10

Met Ala Gly Gly Arg His Arg Arg Val Val Gly Thr Leu His Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Val Ala Ala Leu Pro Trp Ala Ser Arg Gly Val Ser Pro Ser
 20 25 30

Ala Ser Ala Trp Pro Glu Glu Lys Asn Tyr His Gln Pro Ala Ile Leu
 35 40 45

Asn Ser Ser Ala Leu Arg Gln Ile Ala Glu Gly Thr Ser Ile Ser Glu
 50 55 60

Met Trp Gln Asn Asp Leu Gln Pro Leu Leu Ile Glu Arg Tyr Pro Gly
 65 70 75 80

Ser Pro Gly Ser Tyr Ala Ala Arg Gln His Ile Met Gln Arg Ile Gln
 85 90 95

016584

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

Thr Pro Tyr Gly Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ile Ile Ser Thr Leu Asn
115 120 125

Pro Thr Ala Lys Arg His Leu Val Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys
130 135 140

Tyr Phe Ser His Trp Asn Asn Arg Val Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser
145 150 155 160

Ala Val Pro Cys Ala Met Met Leu Glu Leu Ala Arg Ala Leu Asp Lys
165 170 175

Lys Leu Leu Ser Leu Lys Thr Val Ser Asp Ser Lys Pro Asp Leu Ser
180 185 190

Leu Gln Leu Ile Phe Phe Asp Gly Glu Glu Ala Phe Leu His Trp Ser
195 200 205

Pro Gln Asp Ser Leu Tyr Gly Ser Arg His Leu Ala Ala Lys Met Ala
210 215 220

Ser Thr Pro His Pro Pro Gly Ala Arg Gly Thr Ser Gln Leu His Gly
225 230 235 240

Met Asp Leu Leu Val Leu Leu Asp Leu Ile Gly Ala Pro Asn Pro Thr
245 250 255

Phe Pro Asn Phe Phe Pro Asn Ser Ala Arg Trp Phe Glu Arg Leu Gln
260 265 270

Ala Ile Glu His Glu Leu His Glu Leu Gly Leu Leu Lys Asp His Ser
275 280 285

Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Gln Asn Tyr Ser Tyr Gly Gly Val Ile Gln
290 295 300

016584

Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly Val Pro Val Leu His Leu
305 310 315 320

Ile Pro Ser Pro Phe Pro Glu Val Trp His Thr Met Asp Asp Asn Glu
325 330 335

Glu Asn Leu Asp Glu Ser Thr Ile Asp Asn Leu Asn Lys Ile Leu Gln
340 345 350

Val Phe Val Leu Glu Tyr Leu His Leu
355 360

<210> 11
<211> 382
<212> PRT
<213> человек

<400> 11

Met Arg Ser Gly Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Arg Leu Gly Glu Arg
1 5 10 15

Gly Leu Met Glu Pro Leu Leu Pro Pro Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg
20 25 30

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

Tyr Thr Ile Trp Ser Gly Trp His Arg Arg Thr Glu Glu Leu Pro Leu
50 55 60

Gly Arg Glu Leu Arg Val Pro Leu Ile Gly Ser Leu Pro Glu Ala Arg
65 70 75 80

Leu Arg Arg Val Val Gly Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp Ser Thr
85 90 95

Tyr Leu Arg Pro Leu Leu Val Val Arg Thr Pro Gly Ser Pro Gly Asn
100 105 110

016584

Leu Gln Val Arg Lys Phe Leu Glu Ala Thr Leu Arg Ser Leu Thr Ala
115 120 125

Gly Trp His Val Glu Leu Asp Pro Phe Thr Ala Ser Thr Pro Leu Gly
130 135 140

Pro Val Asp Phe Gly Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Arg Ala Ala
145 150 155 160

Arg His Leu Thr Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys Leu Phe Pro Pro
165 170 175

Gly Ser Thr Pro Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys Ala
180 185 190

Leu Leu Leu Glu Leu Ala Gln Ala Leu Asp Leu Glu Leu Ser Arg Ala
195 200 205

Lys Lys Gln Ala Ala Pro Val Thr Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asp Gly
210 215 220

Glu Glu Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Lys Asp Ser Leu Tyr Gly Ser
225 230 235 240

Arg His Leu Ala Gln Leu Met Glu Ser Ile Pro His Ser Pro Gly Pro
245 250 255

Thr Arg Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Met Leu Leu Asp Leu Leu Gly
260 265 270

Ala Pro Asn Pro Thr Phe Tyr Ser His Phe Pro Arg Thr Val Arg Trp
275 280 285

Phe His Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Leu Asn Leu
290 295 300

Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu Pro
305 310 315 320

016584

Phe Gly Ser Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly Val
325 330 335

Pro Val Leu His Leu Ile Ser Thr Pro Phe Pro Ala Val Trp His Thr
340 345 350

Pro Ala Asp Thr Glu Val Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn Leu
355 360 365

Cys Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
370 375 380

<210> 12
<211> 364
<212> PRT
<213> человек

<400> 12

Met Glu Pro Leu Leu Pro Pro Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg Val Arg
1 5 10 15

Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Ala Val Gly Ser Ala Phe Tyr Thr
20 25 30

Ile Trp Ser Gly Trp His Arg Arg Thr Glu Glu Leu Pro Leu Gly Arg
35 40 45

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

Arg Val Val Gly Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp Ser Thr Tyr Leu
65 70 75 80

Arg Pro Leu Leu Val Val Arg Thr Pro Gly Ser Pro Gly Asn Leu Gln
85 90 95

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

016584

His Val Glu Leu Asp Pro Phe Thr Ala Ser Thr Pro Leu Gly Pro Val
115 120 125

Asp Phe Gly Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Arg Ala Ala Arg His
130 135 140

Leu Thr Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys Leu Phe Pro Pro Gly Ser
145 150 155 160

Thr Pro Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys Ala Leu Leu
165 170 175

Leu Glu Leu Ala Gln Ala Leu Asp Leu Glu Leu Ser Arg Ala Lys Lys
180 185 190

Gln Ala Ala Pro Val Thr Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asp Gly Glu Glu
195 200 205

Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Lys Asp Ser Leu Tyr Gly Ser Arg His
210 215 220

Leu Ala Gln Leu Met Glu Ser Ile Pro His Ser Pro Gly Pro Thr Arg
225 230 235 240

Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Met Leu Leu Asp Leu Leu Gly Ala Pro
245 250 255

Asn Pro Thr Phe Tyr Ser His Phe Pro Arg Thr Val Arg Trp Phe His
260 265 270

Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Leu Asn Leu Leu Gln
275 280 285

Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu Pro Phe Gly
290 295 300

Ser Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly Val Pro Val
305 310 315 320

016584

Leu His Leu Ile Ser Thr Pro Phe Pro Ala Val Trp His Thr Pro Ala
325 330 335

Asp Thr Glu Val Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn Leu Cys Arg
340 345 350

Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
355 360

<210> 13
<211> 382
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 13

Met Arg Ser Gly Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Arg Leu Gly Glu Arg
1 5 10 15

Gly Val Met Glu Pro Leu Leu Pro Pro Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg
20 25 30

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

Tyr Thr Ile Trp Ser Gly Trp His Arg Arg Thr Glu Glu Leu Pro Leu
50 55 60

Gly Arg Glu Leu Arg Val Pro Leu Ile Gly Ser Leu Pro Glu Ala Arg
65 70 75 80

Leu Arg Arg Val Val Gly Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp Gly Thr
85 90 95

Tyr Leu Arg Pro Leu Leu Val Val Arg Thr Pro Gly Ser Pro Gly Asn
100 105 110

Leu Gln Val Arg Lys Phe Leu Glu Ala Thr Leu Arg Ser Leu Thr Ala
115 120 125

Gly Trp His Val Glu Leu Asp Pro Phe Thr Ala Ser Thr Pro Leu Gly

016584

130 135 140

Pro Val Asp Phe Gly Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Gly Ala Ala
145 150 155 160

Arg His Leu Thr Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys Leu Phe Pro Pro
165 170 175

Gly Ser Thr Pro Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys Ala
180 185 190

Leu Leu Leu Glu Leu Ala Gln Ala Leu Asp Leu Glu Leu Ser Arg Ala
195 200 205

Lys Glu Gln Ala Ala Pro Val Thr Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asp Gly
210 215 220

Glu Glu Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Lys Asp Ser Leu Tyr Gly Ser
225 230 235 240

Arg His Leu Ala Gln Leu Met Glu Ser Ile Pro His Ser Pro Gly Pro
245 250 255

Thr Arg Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Met Leu Leu Asp Leu Leu Gly
260 265 270

Ala Pro Asn Pro Thr Phe Tyr Ser His Phe Pro Arg Thr Val Arg Trp
275 280 285

Phe His Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Leu Asn Leu
290 295 300

Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu Pro
305 310 315 320

Phe Gly Ser Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly Val
325 330 335

Pro Val Leu His Leu Ile Ser Thr Pro Phe Pro Ala Val Trp His Thr

016584

340 345 350

Pro Ala Asp Thr Glu Ala Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn Leu
355 360 365

Ser Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
370 375 380

<210> 14
<211> 382
<212> PRT
<213> *Macaca mulatta*

<400> 14

Met Arg Ser Gly Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Arg Leu Gly Glu Arg
1 5 10 15

Gly Val Met Glu Pro Leu Leu Pro Pro Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg
20 25 30

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

Tyr Thr Ile Trp Ser Gly Trp His Arg Arg Thr Glu Glu Leu Pro Leu
 50 55 60

Gly Arg Glu Leu Arg Val Pro Leu Ile Gly Ser Leu Pro Glu Ala Arg
65 70 75 80

Leu Arg Arg Val Val Gly Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp Gly Thr
85 90 95

Tyr Leu Arg Pro Leu Leu Val Val Arg Thr Pro Gly Ser Pro Gly Asn
 100 105 110

Leu Gln Val Arg Lys Phe Leu Glu Ala Thr Leu Arg Ser Leu Thr Ala
115 120 125

Gly Trp His Val Glu Leu Asp Pro Phe Thr Ala Ser Thr Pro Leu Gly
130 135 140

016584

Pro Val Asp Phe Gly Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Gly Ala Ala
145 150 155 160

Arg His Leu Thr Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys Leu Phe Pro Pro
165 170 175

Gly Ser Thr Pro Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys Ala
180 185 190

Leu Leu Leu Glu Leu Ala Gln Ala Leu Asp Leu Glu Leu Ser Arg Ala
195 200 205

Lys Glu Gln Ala Ala Pro Val Thr Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asp Gly
210 215 220

Glu Glu Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Lys Asp Ser Leu Tyr Gly Ser
225 230 235 240

Arg His Leu Ala Gln Leu Met Glu Ser Ile Pro His Ser Pro Gly Pro
245 250 255

Thr Arg Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Met Leu Leu Asp Leu Leu Gly
260 265 270

Ala Pro Asn Pro Thr Phe Tyr Ser His Phe Pro Arg Thr Val Arg Trp
275 280 285

Phe His Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Leu Asn Leu
290 295 300

Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu Pro
305 310 315 320

Phe Gly Ser Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly Val
325 330 335

Pro Val Leu His Leu Ile Ser Thr Pro Phe Pro Ala Val Trp His Thr
340 345 350

016584

Pro Ala Asp Thr Glu Ala Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn Leu
355 360 365

Ser Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
370 375 380

<210> 15
<211> 383
<212> PRT
<213> Canis familiaris

<400> 15

Met Pro Ser Gly Gly Arg Gly Arg Ser Arg Leu Arg Leu Gly Glu Arg
1 5 10 15

Gly Leu Leu Glu Pro Pro Ser Pro Pro Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg
20 25 30

Ala His Phe Leu Pro Leu Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Ser Ala
35 40 45

Thr Tyr Thr Ile Trp Ser Gly Trp His His Gln Thr Glu Glu Leu Pro
50 55 60

Arg Gly Arg Glu Leu Arg Gly Arg Leu Ile Gly Ser Leu Ser Glu Ala
65 70 75 80

Arg Leu Arg Arg Val Val Gly Gln Leu Asp Pro His Arg Leu Trp Asn
85 90 95

Thr Tyr Leu Arg Pro Leu Leu Val Val Arg Thr Pro Gly Ser Pro Gly
100 105 110

Asn Leu Gln Val Arg Lys Phe Leu Glu Ala Thr Leu Arg Thr Leu Thr
115 120 125

Ala Gly Trp His Val Glu Leu Asp Pro Phe Thr Ala Leu Thr Pro Leu
130 135 140

016584

Gly Pro Leu Asp Phe Gly Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ala Arg His Leu Thr Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys Leu Phe Ala
165 170 175

Ser Glu Ser Val Pro Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys
180 185 190

Ala Leu Leu Leu Glu Leu Ala Gln Ala Leu Asp Arg Glu Leu Ser Arg
195 200 205

Ala Lys Glu Gln Glu Ala Pro Val Thr Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asp
210 215 220

Gly Glu Glu Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Thr Asp Ser Leu Tyr Gly
225 230 235 240

Ser Arg His Leu Ala Gln Leu Met Glu Ser Ala Pro His Ser Pro Gly
245 250 255

Pro Thr Arg Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Met Leu Leu Asp Leu Leu
260 265 270

Gly Ala Pro Asn Pro Asn Phe Tyr Ser His Phe Pro His Thr Ala Arg
275 280 285

Trp Phe His Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Met Asn
290 295 300

Leu Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Pro Pro Gly Ser Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly
325 330 335

Val Pro Val Leu His Leu Ile Ser Met Pro Phe Pro Ser Val Trp His
340 345 350

016584

Thr Pro Asp Asp Ser Glu Ala Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn
355 360 365

Leu Ser Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
370 375 380

<210> 16
<211> 383
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 16

Met	Ser	Pro	Ala	Ser	Arg	Gly	Arg	Ser	Arg	Gln	Arg	Leu	Gly	Asp	Arg
1				5					10					15	

Gly Leu Met Lys Pro Pro Ser Leu Ser Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg
20 25 30

Val Gln Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ala Leu Gly Leu Ala
35 40 45

Phe Tyr Ile Val Trp Asn Ser Trp His Pro Gly Val Glu Glu Val Ser
50 55 60

Arg Ser Arg Asp Leu Arg Val Pro Leu Ile Gly Ser Leu Ser Glu Ala
65 70 75 80

Lys Leu Arg Leu Val Val Gly Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp Gly
85 90 95

Thr Phe Leu Arg Pro Leu Leu Ile Val Arg Pro Pro Gly Ser Pro Gly
100 105 110

Asn Leu Gln Val Arg Lys Phe Leu Glu Ala Thr Leu Gln Ser Leu Ser
 115 120 125

Ala Gly Trp His Val Glu Leu Asp Pro Phe Thr Ala Ser Thr Pro Leu
130 135 140

016584

Gly Pro Leu Asp Phe Gly Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ala Arg His Leu Thr Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys Phe Phe Pro
165 170 175

Pro Gly Leu Pro Pro Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys
180 185 190

Ala Leu Leu Leu Glu Leu Val Gln Ala Leu Asp Val Met Leu Ser Arg
195 200 205

Ile Lys Gln Gln Ala Ala Pro Val Thr Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asp
210 215 220

Gly Glu Glu Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Lys Asp Ser Leu Tyr Gly
225 230 235 240

Ser Arg His Leu Ala Gln Ile Met Glu Ser Ile Pro His Ser Pro Gly
245 250 255

Pro Thr Arg Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Val Leu Leu Asp Leu Leu
260 265 270

Gly Ala Pro Ser Pro Ile Phe Phe Ser His Phe Pro Arg Thr Ala Arg
275 280 285

Trp Phe Gln Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Leu Asn
290 295 300

Leu Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Pro Pro Gly Pro Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly
325 330 335

Val Pro Val Leu His Leu Ile Ala Met Pro Phe Pro Ala Val Trp His
340 345 350

016584

Thr Pro Ala Asp Thr Glu Ala Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn
355 360 365

Leu Ser Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
370 375 380

<210> 17
<211> 383
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 17

Met	Ser	Pro	Gly	Ser	Arg	Gly	Arg	Pro	Arg	Gln	Arg	Leu	Glu	Asp	Arg
1				5					10					15	

Gly Leu Met Lys Pro Pro Ser Leu Ser Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg
20 25 30

Val Gln Phe Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ala Met Gly Leu Ala
35 40 45

Phe	Tyr	Ile	Val	Trp	Asn	Ser	Trp	His	Pro	Gly	Val	Glu	Glu	Met	Ser
50							55							60	

Arg Ser Arg Asp Leu Arg Val Pro Leu Ile Gly Ser Leu Ser Glu Ala
65 70 75 80

Lys Leu Arg Leu Val Val Gly Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp Gly
85 90 95

Thr Phe Leu Arg Pro Leu Leu Ile Val Arg Pro Pro Gly Ser Ser Gly
100 105 110

Asn	Leu	Gln	Val	Arg	Lys	Phe	Leu	Glu	Ala	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser
							115				120				125

Ala Gly Trp His Val Glu Leu Asp Pro Phe Thr Ala Ser Thr Pro Leu
130 135 140

Gly Pro Leu Asp Phe Gly Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Gly Ala

016584

145 150 155 160

Ala Arg His Leu Thr Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys Phe Phe Pro
165 170 175

Pro Gly Leu Pro Pro Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys
180 185 190

Ala Leu Leu Leu Glu Leu Val Gln Ala Leu Asp Ala Met Leu Ser Arg
195 200 205

Ile Lys Gln Gln Ala Ala Pro Val Thr Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asp
210 215 220

Gly Glu Glu Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Lys Asp Ser Leu Tyr Gly
225 230 235 240

Ser Arg His Leu Ala Gln Ile Met Glu Ser Ile Pro His Ser Pro Gly
245 250 255

Pro Thr Arg Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Val Leu Leu Asp Leu Leu
260 265 270

Gly Ala Ser Ser Pro Ile Phe Phe Ser His Phe Pro Arg Thr Ala Arg
275 280 285

Trp Phe Gln Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Leu Asn
290 295 300

Leu Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Pro Pro Gly Pro Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly
325 330 335

Val Pro Val Leu His Leu Ile Ala Thr Pro Phe Pro Ala Val Trp His
340 345 350

Thr Pro Ala Asp Thr Glu Ala Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn

016584

355

360

365

Leu Ser Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
 370 375 380

<210> 18
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 18

Met Pro Ser Gly Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Gln Val Gly Glu Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Glu Arg Pro Ser Pro Pro Lys Arg Arg Leu Ile Pro Arg
 20 25 30

Ala Gln Leu Leu Pro Gln Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val Ala Ser Val
 35 40 45

Phe Tyr Thr Ile Trp Arg Ile Trp His Ser Gln Thr Glu Glu Leu Pro
 50 55 60

Leu Gly Arg Glu Leu Arg Gly Pro Leu Ile Gly Ser Leu Pro Glu Ala
 65 70 75 80

Arg Val Arg Arg Val Val Gly Gln Leu Asp Pro His Arg Leu Trp Asn
 85 90 95

Thr Phe Leu Arg Pro Leu Leu Val Val Arg Thr Pro Gly Ser Pro Gly
 100 105 110

Asn Leu Gln Val Arg Lys Phe Leu Glu Ala Thr Leu Arg Thr Leu Ser
 115 120 125

Ala Gly Trp His Ile Glu Leu Asp Ser Phe Thr Ala Ser Thr Pro Val
 130 135 140

Gly Pro Leu Asp Phe Ser Asn Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Gly Ala
 145 150 155 160

016584

Ala Arg His Leu Thr Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser Lys Leu Phe Pro
165 170 175

Ser Asp Ser Ala Pro Phe Val Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys
180 185 190

Ser Leu Leu Leu Glu Leu Ala Gln Ala Leu Asp Gln Glu Leu Gly Lys
195 200 205

Ala Lys Glu Arg Ala Ala Pro Met Thr Leu Gln Leu Ile Phe Leu Asp
210 215 220

Gly Glu Glu Ala Leu Lys Gln Trp Gly Pro Lys Asp Ser Leu Tyr Gly
225 230 235 240

Ser Arg His Leu Ala Gln Leu Met Glu Ser Thr Pro His Gly Leu Gly
245 250 255

Ser Thr Arg Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Met Leu Leu Asp Leu Leu
260 265 270

Gly Ala Pro Asn Pro Thr Phe Tyr Ser His Phe Pro Arg Thr Ala Arg
275 280 285

Trp Phe His Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Leu Asn
290 295 300

Leu Leu Gln Ser His Pro Trp Glu Val Met Tyr Phe Gln Thr Gly Glu
305 310 315 320

Pro Pro Gly Ser Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly
325 330 335

Val Pro Val Leu His Leu Ile Ala Thr Pro Phe Pro Ser Val Trp His
340 345 350

Thr Ser Asp Asp Ser Glu Ala Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn
355 360 365

Leu Ser Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu
 370 375 380

<210> 19
 <211> 1457
 <212> ДНК
 <213> человек

<400> 19		
gtctggtaca ggtttcaggg caaaggccc atgcgttccg ggggcccggg gcgacccccc	60	
ctgcggctgg gggAACGTGG cctcatggag ccactcttgc cgccgaagcg ccgcctgcta	120	
ccgcgggttc ggcttttgc tctgttgctg gcgcgtggccg tgggctcggc gtttacacc	180	
atttggagcg gctggcacccg caggactgag gagctgccgc tgggcccggga gctgcgggtc	240	
ccattgatcg gaaggctccc cgaagcccg ctgcggaggg tggtgggaca actggatcca	300	
cagcgtctct ggagcaactta tctgcgcctt ctgcgtggttg tgcaaacccc gggcagcccc	360	
ggaaatctcc aagtcaaaaa gttcctggag gccacgctgc ggtccctgac agcaggttgg	420	
cacgtggagc tggatccctt cacagcctca acacccctgg ggccagtgga ctttggcaat	480	
gtggtggcca cactggaccc aagggtgtcc cgtcacctca cccttgcctg ccattatgac	540	
tcgaagctct tccccccccgg atcgacccccc ttgttagggg ccacggatcc ggctgtgccc	600	
tgtgcctgc tgctggagct ggcccaagca cttgacctgg agctgagcag ggccaaaaaaaa	660	
caggcagccc cggtgacctt gcaactgttc ttcttggatg gtgaagaggg gctgaaggag	720	
tggggaccca aggactccct ttacggttcc cggcacctgg cccagctcat ggagtctata	780	
cctcacagcc cggccccccac caggatccag gctattgagc tctttatgtc tcttgcattc	840	
ctgggagccc ccaatcccac cttctacagc cacttccctc gcacggtcgg ctggttccat	900	
cggctgagga gcattgagaa gcgtctgcac cgtttgaacc tgctgcagtc tcateccccag	960	
gaagtgtatgt acttccaaacc cggggagccc ttggctctg tggaagacga ccacatcccc	1020	
ttcctccgca gaggggtacc cgtgcctccat ctcatctcca cggcccttccc tgctgtctgg	1080	
cacacccctg cggacacccga ggtcaatctc caccacccca cggtacaccaa ctttgtccgc	1140	
atttcgttg tggatccctggc tgaataccctg gggctcttagc gtgcttggcc aatgactgtg	1200	

016584

gagaggactg tgagagagaa ggtcccagcg ggggccagtg aagctcaggc aggatctgcc	1260
tagggtgtgc tggtttgc ttttcatacc tttgtctcct aattgtgcta caattggaag	1320
accttcttgc ttgttattgt ctcaagctgc caccctteaa ggacaggaa gagaccactg	1380
tggatgaca gccagaggaa taagaacttg ctccctcccc agaggtaaac acttggtcca	1440
aaggtttgcg gggacca	1457

<210> 20
<211> 1088
<212> ДНК
<213> человек

<400> 20	
agcgccatg cgttccgggg gcccggggcg accccgcctg cggctggggg aacgtggct	60
catggagcca ctcttgcgc cgaagcgccg cctgctaccg cgggttcggc tcttgcctct	120
gttgcgtggcg ctggccgtgg gtcggcggtt ctacaccatt tggagcggtt ggcacccgtag	180
gactgaggag ctgcccgtgg gcccggagct gcccgtccca ttgatcgaa gcctcccgaa	240
agcccggtg cggagggtgg tgggacaact ggatccacag cgtctctggg gcaacttatct	300
gcgccttcgt ctgggtgtgc gaacccgggg cagccggaa aatctccaag tcagaaaggc	360
agcccccgtg accctgcaac tgcgtttttt ggatggtaa gaggcgctga aggagtgggg	420
acccaaggac tccctttacg gttccggca cctggccag ctcatggagt ctatacctca	480
cagccccggc cccaccagga tccaggctat tgagctttt atgcttttg atctctggg	540
agcccccaat cccaccttct acagccactt ccctcgacg gtccgttgtt tccatcggtt	600
gaggaggatt gagaagcggtc tgcaccgttt gaaacctgtt cagtcate cccaggaagt	660
gatgtacttc caacccgggg agccctttgg ctctgtggaa gacgaccaca tccccttct	720
cgcgcagggg gtacccgtgc tccatctcat ctccacgccc ttccctgtt gtcggcacac	780
ccctgcggac accgagggtca atctccaccc acccaggtt cacaacttgt gcccattct	840
cgtgtgtttc ctgggtaat acctggggct ctgcgtgtt tggccatgtt ctgtggagag	900
gactgtgaga gagaagggtcc cagcgggggc cagtgaagct caggcaggat ctgccttaggg	960
tgtgtgtttt attgtctcaa gctgccaccc ttcaaggaca gggaaagagac cactgtgggaa	1020
ctttcttttg	1080

016584

tgacagcc

1088

<210> 21
<211> 481
<212> PRT
<213> человек

<400> 21

Val Trp Tyr Arg Phe Gln Gly Lys Ala Ala Met Arg Ser Gly Gly Arg
1 5 10 15

Gly Arg Pro Arg Leu Arg Leu Gly Glu Arg Gly Leu Met Glu Pro Leu
20 25 30

Leu Pro Pro Lys Arg Arg Leu Leu Pro Arg Val Arg Leu Leu Pro Leu
35 40 45

Leu Leu Ala Leu Ala Val Gly Ser Ala Phe Tyr Thr Ile Trp Ser Gly
50 55 60

Trp His Arg Arg Thr Glu Glu Leu Pro Leu Gly Arg Glu Leu Arg Val
65 70 75 80

Pro Leu Ile Gly Ser Leu Pro Glu Ala Arg Leu Arg Arg Val Val Gly
85 90 95

Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp Ser Thr Tyr Leu Arg Pro Leu Leu
100 105 110

Val Val Arg Thr Pro Gly Ser Pro Gly Asn Leu Gln Val Arg Lys Phe
115 120 125

Leu Glu Ala Thr Leu Arg Ser Leu Thr Ala Gly Trp His Val Glu Leu
130 135 140

Asp Pro Phe Thr Ala Ser Thr Pro Leu Gly Pro Val Asp Phe Gly Asn
145 150 155 160

Val Val Ala Thr Leu Asp Pro Arg Ala Ala Arg His Leu Thr Leu Ala

016584

165

170

175

Cys His Tyr Asp Ser Lys Leu Phe Pro Pro Gly Ser Thr Pro Phe Val
 180 185 190

Gly Ala Thr Asp Ser Ala Val Pro Cys Ala Leu Leu Leu Glu Leu Ala
 195 200 205

Gln Ala Leu Asp Leu Glu Leu Ser Arg Ala Lys Lys Gln Ala Ala Pro
 210 215 220

Val Thr Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asp Gly Glu Glu Ala Leu Lys Glu
 225 230 235 240

Trp Gly Pro Lys Asp Ser Leu Tyr Gly Ser Arg His Leu Ala Gln Leu
 245 250 255

Met Glu Ser Ile Pro His Ser Pro Gly Pro Thr Arg Ile Gln Ala Ile
 260 265 270

Glu Leu Phe Met Leu Leu Asp Leu Leu Gly Ala Pro Asn Pro Thr Phe
 275 280 285

Tyr Ser His Phe Pro Arg Thr Val Arg Trp Phe His Arg Leu Arg Ser
 290 295 300

Ile Glu Lys Arg Leu His Arg Leu Asn Leu Leu Gln Ser His Pro Gln
 305 310 315 320

Glu Val Met Tyr Phe Gln Pro Gly Glu Pro Phe Gly Ser Val Glu Asp
 325 330 335

Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Arg Gly Val Pro Val Leu His Leu Ile
 340 345 350

Ser Thr Pro Phe Pro Ala Val Trp His Thr Pro Ala Asp Thr Glu Val
 355 360 365

Asn Leu His Pro Pro Thr Val His Asn Leu Cys Arg Ile Leu Ala Val

016584

370 375 380

Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Gly Leu Arg Ala Trp Pro Met Thr Val Glu
385 390 395 400

Arg Thr Val Arg Glu Lys Val Pro Ala Gly Ala Ser Glu Ala Gln Ala
405 410 415

Gly Ser Ala Gly Val Leu Val Cys Pro Phe His Thr Phe Val Ser Leu
420 425 430

Cys Tyr Asn Trp Lys Thr Phe Phe Leu Leu Ile Val Ser Ser Cys His
435 440 445

Pro Ser Arg Thr Gly Lys Arg Pro Leu Trp Asp Asp Ser Gln Arg Asn
450 455 460

Lys Asn Leu Leu Pro Pro Gln Arg Thr Leu Gly Pro Lys Val Cys Arg
465 470 475 480

Asp

<210> 22
<211> 359
<212> PRT
<213> человек

<400> 22

Ala Ala Met Arg Ser Gly Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Arg Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Gly Leu Met Glu Pro Leu Leu Pro Pro Lys Arg Arg Leu Leu
20 25 30

Pro Arg Val Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ala Leu Ala Val Gly Ser
35 40 45

Ala Phe Tyr Thr Ile Trp Ser Gly Trp His Arg Arg Thr Glu Glu Leu
50 55 60

016584

Pro Leu Gly Arg Glu Leu Arg Val Pro Leu Ile Gly Ser Leu Pro Glu
65 70 75 80

Ala Arg Leu Arg Arg Val Val Gly Gln Leu Asp Pro Gln Arg Leu Trp
85 90 95

Ser Thr Tyr Leu Arg Pro Leu Leu Val Val Arg Thr Pro Gly Ser Pro
100 105 110

Gly Asn Leu Gln Val Arg Lys Ala Ala Pro Val Thr Leu Gln Leu Leu
115 120 125

Phe Leu Asp Gly Glu Glu Ala Leu Lys Glu Trp Gly Pro Lys Asp Ser
130 135 140

Leu Tyr Gly Ser Arg His Leu Ala Gln Leu Met Glu Ser Ile Pro His
145 150 155 160

Ser Pro Gly Pro Thr Arg Ile Gln Ala Ile Glu Leu Phe Met Leu Leu
165 170 175

Asp Leu Leu Gly Ala Pro Asn Pro Thr Phe Tyr Ser His Phe Pro Arg
180 185 190

Thr Val Arg Trp Phe His Arg Leu Arg Ser Ile Glu Lys Arg Leu His
195 200 205

Arg Leu Asn Leu Leu Gln Ser His Pro Gln Glu Val Met Tyr Phe Gln
210 215 220

Pro Gly Glu Pro Phe Gly Ser Val Glu Asp Asp His Ile Pro Phe Leu
225 230 235 240

Arg Arg Gly Val Pro Val Leu His Leu Ile Ser Thr Pro Phe Pro Ala
245 250 255

Val Trp His Thr Pro Ala Asp Thr Glu Val Asn Leu His Pro Pro Thr
260 265 270

016584

Val His Asn Leu Cys Arg Ile Leu Ala Val Phe Leu Ala Glu Tyr Leu
275 280 285

Gly Leu Arg Ala Trp Pro Met Thr Val Glu Arg Thr Val Arg Glu Lys
290 295 300

Val Pro Ala Gly Ala Ser Glu Ala Gln Ala Gly Ser Ala Gly Val Leu
305 310 315 320

Val Cys Pro Phe His Thr Phe Val Ser Leu Cys Tyr Asn Trp Lys Thr
325 330 335

Phe Phe Leu Leu Ile Val Ser Ser Cys His Pro Ser Arg Thr Gly Lys
340 345 350

Arg Pro Leu Trp Asp Asp Ser
355

<210> 23
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 24
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

016584

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

<210> 25
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val
1 5 10 15

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu
20 25 30

Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 26
<211> 38
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val
1 5 10 15

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu
20 25 30

Met Val Gly Gly Val Val
35

<210> 27
<211> 32

<212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический пептид

<400> 27

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
 1 5 10 15

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 20 25 30

<210> 28
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический пептид

<400> 28

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
 1 5 10 15

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 20 25 30

<210> 29
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> человек

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> пирролидонкарбоновая кислота

<400> 29

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val
 1 5 10 15

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu
 20 25 30

016584

Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 30
<211> 38
<212> PRT
<213> человек

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> пирролидонкарбоновая кислота

<400> 30

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val
1 5 10 15

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu
20 25 30

Met Val Gly Gly Val Val
35

<210> 31
<211> 32
<212> PRT
<213> человек

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> пирролидонкарбоновая кислота

<400> 31

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
1 5 10 15

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
20 25 30

<210> 32
<211> 30
<212> PRT
<213> человек

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> пирролидонкарбоновая кислота

<400> 32

Glu	Val	His	His	Gln	Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser
1															15

Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val		
														25	30

<210> 33
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu	Ala	Ser	Asn	Cys	Phe	Ala	Ile	Arg	His	Phe	Glu	Asn	Lys	Phe	Ala
1															15

Val	Glu	Thr	Leu	Ile	Cys	Ser	Arg	Thr	Val	Lys	Lys	Asn	Ile	Ile	Glu
														25	30

Glu Arg

<210> 34
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Glu	Ala	Ser	Asn	Cys	Phe	Ala	Ile	Arg	His	Phe	Glu	Asn	Lys	Phe	Ala
1															15

Val	Glu	Thr	Leu	Ile	Cys	Ser	Arg	Thr	Val	Lys	Lys	Asn	Ile	Ile	Glu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

016584

20

25

30

Glu Arg

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> амидирование

<400> 35

Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp
1 5 10 15

Phe

<210> 36
<211> 34
<212> PRT
<213> человек

<400> 36

Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His Leu Val Ala Asp Pro Ser Lys
1 5 10 15

Lys Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met
20 25 30

Asp Phe

<210> 37
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> пирролидонкарбоновая кислота

<400> 37

Glu Ala Ser Asn Cys Phe Ala Ile Arg His Phe Glu Asn Lys Phe Ala
1 5 10 15

Val Glu Thr Leu Ile Cys Ser Arg Thr Val Lys Lys Asn Ile Ile Glu
20 25 30

Glu Arg

<210> 38
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> пирролидонкарбоновая кислота

<400> 38

Glu Ala Ser Asn Cys Phe Ala Ile Arg His Phe Glu Asn Lys Phe Ala
1 5 10 15

Val Glu Thr Leu Ile Cys Ser Arg Thr Val Lys Lys Asn Ile Ile Glu
20 25 30

Glu Arg

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> человек

<220>
<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)
<223> пирролидонкарбоновая кислота

<400> 39

Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp
1 5 10 15

Phe

<210> 40
<211> 34
<212> PRT
<213> человек

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> пирролидонкарбоновая кислота

<400> 40

Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His Leu Val Ala Asp Pro Ser Lys
1 5 10 15

Lys Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met
20 25 30

Asp Phe

<210> 41
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 41

Gln Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu
1 5 10

<210> 42
<211> 10

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> амидирование

<400> 42

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
 1 5 10

<210> 43
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

Gln Pro Lys Val Pro Glu Trp Val Asn Thr Pro Ser Thr Cys Cys Leu
 1 5 10 15

Lys Tyr Tyr Glu Lys Val Leu Pro Arg Arg Leu Val Val Gly Tyr Arg
 20 25 30

Lys Ala Leu Asn Cys His Leu Pro Ala Ile Ile Phe Val Thr Lys Arg
 35 40 45

Asn Arg Glu Val Cys Thr Asn Pro Asn Asp Asp Trp Val Gln Glu Tyr
 50 55 60

Ile Lys Asp Pro Asn Leu Pro Leu Leu Pro Thr Arg Asn Leu Ser Thr
 65 70 75 80

Val Lys Ile Ile Thr Ala Lys Asn Gly Gln Pro Gln Leu Leu Asn Ser
 85 90 95

Gln

<210> 44
 <211> 76

016584

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Gln Pro Asp Ser Val Ser Ile Pro Ile Thr Cys Cys Phe Asn Val Ile
1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Pro Ile Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Thr Arg Ile Thr
20 25 30

Asn Ile Gln Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gly
35 40 45

Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu Arg Trp Val Arg Asp Ser Met
50 55 60

Lys His Leu Asp Gln Ile Phe Gln Asn Leu Lys Pro
65 70 75

<210> 45
<211> 76
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
50 55 60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
65 70 75

016584

<210> 46
<211> 68
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Gln Val Gly Thr Asn Lys Glu Leu Cys Cys Leu Val Tyr Thr Ser Trp
1 5 10 15

Gln Ile Pro Gln Lys Phe Ile Val Asp Tyr Ser Glu Thr Ser Pro Gln
20 25 30

Cys Pro Lys Pro Gly Val Ile Leu Leu Thr Lys Arg Gly Arg Gln Ile
35 40 45

Cys Ala Asp Pro Asn Lys Lys Trp Val Gln Lys Tyr Ile Ser Asp Leu
50 55 60

Lys Leu Asn Ala
65

<210> 47
<211> 373
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Gln His His Gly Val Thr Lys Cys Asn Ile Thr Cys Ser Lys Met Thr
1 5 10 15

Ser Lys Ile Pro Val Ala Leu Leu Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln Ala
20 25 30

Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln His Arg Leu
35 40 45

Phe Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln Trp Val Lys Asp Ala Met Gln His
50 55 60

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

016584

Lys Gln Ile Gly Glu Val Lys Pro Arg Thr Thr Pro Ala Ala Gly Gly
85 90 95

Met Asp Glu Ser Val Val Leu Glu Pro Glu Ala Thr Gly Glu Ser Ser
100 105 110

Ser Leu Glu Pro Thr Pro Ser Ser Gln Glu Ala Gln Arg Ala Leu Gly
115 120 125

Thr Ser Pro Glu Leu Pro Thr Gly Val Thr Gly Ser Ser Gly Thr Arg
130 135 140

Leu Pro Pro Thr Pro Lys Ala Gln Asp Gly Gly Pro Val Gly Thr Glu
145 150 155 160

Leu Phe Arg Val Pro Pro Val Ser Thr Ala Ala Thr Trp Gln Ser Ser
165 170 175

Ala Pro His Gln Pro Gly Pro Ser Leu Trp Ala Glu Ala Lys Thr Ser
180 185 190

Glu Ala Pro Ser Thr Gln Asp Pro Ser Thr Gln Ala Ser Thr Ala Ser
195 200 205

Ser Pro Ala Pro Glu Glu Asn Ala Pro Ser Glu Gly Gln Arg Val Trp
210 215 220

Gly Gln Gly Gln Ser Pro Arg Pro Glu Asn Ser Leu Glu Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Gly Pro Val Pro Ala His Thr Asp Ala Phe Gln Asp Trp Gly Pro
245 250 255

Gly Ser Met Ala His Val Ser Val Val Pro Val Ser Ser Glu Gly Thr
260 265 270

Pro Ser Arg Glu Pro Val Ala Ser Gly Ser Trp Thr Pro Lys Ala Glu
275 280 285

016584

Glu Pro Ile His Ala Thr Met Asp Pro Gln Arg Leu Gly Val Leu Ile
290 295 300

Thr Pro Val Pro Asp Ala Gln Ala Ala Thr Arg Arg Gln Ala Val Gly
305 310 315 320

Leu Leu Ala Phe Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Gly Val Ala Met Phe
325 330 335

Thr Tyr Gln Ser Leu Gln Gly Cys Pro Arg Lys Met Ala Gly Glu Met
340 345 350

Ala Glu Gly Leu Arg Tyr Ile Pro Arg Ser Cys Gly Ser Asn Ser Tyr
355 360 365

Val Leu Val Pro Val
370

<210> 48
<211> 76
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile
1 5 10 15

Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr
20 25 30

Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe Met
50 55 60

Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu
65 70 75

<210> 49
<211> 33
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Pro Leu Pro Asp Cys Cys Arg Gln Lys Thr Cys Ser Cys Arg Leu
1 5 10 15

Tyr Glu Leu Leu His Gly Ala Gly Asn His Ala Ala Gly Ile Leu Thr
20 25 30

Leu

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met
1 5 10

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический пептид

<400> 51

Gln Tyr Asn Ala Asp
1 5

<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> синтетический пептид

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> пирролидонкарбоновая кислота

<400> 52

Gln Tyr Asn Ala Asp
 1 5

<210> 53
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический нуклеотид

<400> 53
 gggtctacacc atttggagcg gctggc

26

<210> 54
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический нуклеотид

<400> 54
 gggtttggaaag tacatcaactt cctgggg

27

<210> 55
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический нуклеотид

<400> 55
 accatgcgtt ccggggggccg cggg

24

<210> 56
 <211> 27
 <212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический нуклеотид

<400> 56

acgctagac cccaggtatt cagccag

27

<210> 57

<211> 30

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический нуклеотид

<400> 57

atatatgaat tcatgcgttc cggggggccgc

30

<210> 58

<211> 33

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический нуклеотид

<400> 58

atatatgaat tcatggagcc actcttgcgc ccg

33

<210> 59

<211> 33

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический нуклеотид

<400> 59

atatatgtcg acgagccccca ggtattcagc cag

33

<210> 60

<211> 44

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический нуклеотид

<400> 60		
atatactagt gatgacgacg acaagttcta caccatttgg agcg		44
<210> 61		
<211> 49		
<212> ДНК		
<213> искусственная последовательность		
<220>		
<223> синтетический нуклеотид		
<400> 61		
tatagaattc ctatgtatgg ttagttgtat ggagccccag gtattcagc		49
<210> 62		
<211> 28		
<212> ДНК		
<213> искусственная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР-праймер		
<400> 62		
atatgaattc ttctacacca tttggagc		28
<210> 63		
<211> 49		
<212> ДНК		
<213> искусственная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР-праймер		
<400> 63		
atatgaattc catcaccatc accatcaatt ctacaccatt tggagcgcc		49
<210> 64		
<211> 35		
<212> ДНК		
<213> искусственная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР-праймер		
<400> 64		
atatatgcgg ccgccttagat ccccaaggat tcagc		35

<210> 65		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> искусственная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР-праймер		
<400> 65		
ccaggatcca ggctattgag	20	
<210> 66		
<211> 56		
<212> ДНК		
<213> искусственная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР-праймер		
<400> 66		
atatatgcgg ccgcctagtg atgggtatgg ttagggagcc ccaggttattc agccag	56	
<210> 67		
<211> 19		
<212> ДНК		
<213> искусственная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР-праймер		
<400> 67		
ttccacacaggc ccggggggc	19	
<210> 68		
<211> 18		
<212> ДНК		
<213> искусственная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР праймер		
<400> 68		
atgagtcggc ggagccgc	18	
<210> 69		
<211> 18		
<212> ДНК		

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 69

ctagagtccc aggtactc

18

<210> 70

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 70

agttccctgcc cctgctgctg

20

<210> 71

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 71

atcaagaggc accaaccaac

20

<210> 72

<211> 19

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 72

ctggataata tttccatag

19

<210> 73

<211> 19

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 73	
acagctggga atctgagtc	19
<210> 74	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> искусственная последовательность	
<220>	
<223> ПЦР-праймер	
<400> 74	
gaggcagaata gttccgggc g	21
<210> 75	
<211> 33	
<212> ДНК	
<213> искусственная последовательность	
<220>	
<223> ПЦР-праймер	
<400> 75	
ctgcgggtcc cattgaacgg aagcctcccc gaa	33
<210> 76	
<211> 33	
<212> ДНК	
<213> искусственная последовательность	
<220>	
<223> ПЦР-праймер	
<400> 76	
ttcggggagg cttccgttca atgggaccgg cag	33
<210> 77	
<211> 33	
<212> ДНК	
<213> искусственная последовательность	
<220>	
<223> ПЦР-праймер	
<400> 77	
acggtagacaca acttggcccg cattctcgct gtg	33

<210> 78
<211> 33
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 78
cacagcgaga atgcgggcca agttgtgtac cgt

33

<210> 79
<211> 362
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 79

Met Ala Gly Ser Glu Asp Lys Leu Val Val Gly Thr Leu His Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Gln Ala Thr Val Leu Ser Leu Thr Ala Gly Asn Leu Ser Leu
20 25 30

Val Ser Ala Ala Trp Thr Gln Glu Lys Asn His His Gln Pro Ala His
35 40 45

Leu Asn Ser Ser Ser Leu Gln Gln Val Ala Glu Gly Thr Ser Ile Ser
50 55 60

Glu Met Trp Gln Asn Asp Leu Arg Pro Leu Leu Ile Glu Arg Tyr Pro
65 70 75 80

Gly Ser Pro Gly Ser Tyr Ser Ala Arg Gln His Ile Met Gln Arg Ile
85 90 95

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

Arg Thr Pro Tyr Gly Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ile Ile Ser Thr Leu
115 120 125

016584

Asn Pro Glu Ala Lys Arg His Leu Val Leu Ala Cys His Tyr Asp Ser
130 135 140

Lys Tyr Phe Pro Arg Trp Asp Ser Arg Val Phe Val Gly Ala Thr Asp
145 150 155 160

Ser Ala Val Pro Cys Ala Met Met Leu Glu Leu Ala Arg Ala Leu Asp
165 170 175

Lys Lys Leu His Ser Leu Lys Asp Val Ser Gly Ser Lys Pro Asp Leu
180 185 190

Ser Leu Arg Leu Ile Phe Phe Asp Gly Glu Glu Ala Phe His His Trp
195 200 205

Ser Pro Gln Asp Ser Leu Tyr Gly Ser Arg His Leu Ala Gln Lys Met
210 215 220

Ala Ser Ser Pro His Pro Pro Gly Ser Arg Gly Thr Asn Gln Leu Asp
225 230 235 240

Gly Met Asp Leu Leu Val Leu Leu Asp Leu Ile Gly Ala Ala Asn Pro
245 250 255

Thr Phe Pro Asn Phe Phe Pro Lys Thr Thr Arg Trp Phe Asn Arg Leu
260 265 270

Gln Ala Ile Glu Lys Glu Leu Tyr Glu Leu Gly Leu Leu Lys Asp His
275 280 285

Ser Leu Glu Arg Lys Tyr Phe Gln Asn Phe Gly Tyr Gly Asn Ile Ile
290 295 300

Gln Asp Asp His Ile Pro Phe Leu Arg Lys Gly Val Pro Val Leu His
305 310 315 320

Leu Ile Ala Ser Pro Phe Pro Glu Val Trp His Thr Met Asp Asp Asn
325 330 335

016584

Glu Glu Asn Leu His Ala Ser Thr Ile Asp Asn Leu Asn Lys Ile Ile
340 345 350

Gln Val Phe Val Leu Glu Tyr Leu His Leu
355 360

<210> 80
<211> 284
<212> PRT
<213> *Streptomyces griseus*

<400> 80

Ala Pro Asp Ile Pro Leu Ala Asn Val Lys Ala His Leu Thr Gln Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ile Ala Ala Asn Asn Gly Gly Asn Arg Ala His Gly Arg Pro
20 25 30

Gly Tyr Lys Ala Ser Val Asp Tyr Val Lys Ala Lys Leu Asp Ala Ala
35 40 45

Gly Tyr Thr Thr Thr Leu Gln Gln Phe Thr Ser Gly Gly Ala Thr Gly
50 55 60

Tyr Asn Leu Ile Ala Asn Trp Pro Gly Gly Asp Pro Asn Lys Val Leu
65 70 75 80

Met Ala Gly Ala His Leu Asp Ser Val Ser Ser Gly Ala Gly Ile Asn
85 90 95

Asp Asn Gly Ser Gly Ser Ala Ala Val Leu Glu Thr Ala Leu Ala Val
100 105 110

Ser Arg Ala Gly Tyr Gln Pro Asp Lys His Leu Arg Phe Ala Trp Trp
115 120 125

Gly Ala Glu Glu Leu Gly Leu Ile Gly Ser Lys Phe Tyr Val Asn Asn
130 135 140

Leu Pro Ser Ala Asp Arg Ser Lys Leu Ala Gly Tyr Leu Asn Phe Asp

016584

145 150 155 160

Met Ile Gly Ser Pro Asn Pro Gly Tyr Phe Val Tyr Asp Asp Asp Pro
165 170 175

Val Ile Glu Lys Thr Phe Lys Asn Tyr Phe Ala Gly Leu Asn Val Pro
180 185 190

Thr Glu Ile Glu Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ser Asp His Ala Pro Phe
195 200 205

Lys Asn Val Gly Val Pro Val Gly Gly Leu Phe Thr Gly Ala Gly Tyr
210 215 220

Thr Lys Ser Ala Ala Gln Ala Gln Lys Trp Gly Gly Thr Ala Gly Gln
225 230 235 240

Ala Phe Asp Arg Cys Tyr His Ser Ser Cys Asp Ser Leu Ser Asn Ile
245 250 255

Asn Asp Thr Ala Leu Asp Arg Asn Ser Asp Ala Ala Ala His Ala Ile
260 265 270

Trp Thr Leu Ser Ser Gly Thr Gly Glu Pro Pro Thr
275 280

<210> 81
<211> 299
<212> PRT
<213> Vibrio proteolyticus

<400> 81

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

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

Thr Asn Arg Phe Tyr Thr Thr Ser Gly Ala Gln Ala Ser Asp Trp
35 40 45

016584

Ile Ala Ser Glu Trp Gln Ala Leu Ser Ala Ser Leu Pro Asn Ala Ser
50 55 60

Val Lys Gln Val Ser His Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Ser Val Val Met
65 70 75 80

Thr Ile Thr Gly Ser Glu Ala Pro Asp Glu Trp Ile Val Ile Gly Gly
85 90 95

His Leu Asp Ser Thr Ile Gly Ser His Thr Asn Glu Gln Ser Val Ala
100 105 110

Pro Gly Ala Asp Asp Asp Ala Ser Gly Ile Ala Ala Val Thr Glu Val
115 120 125

Ile Arg Val Leu Ser Glu Asn Asn Phe Gln Pro Lys Arg Ser Ile Ala
130 135 140

Phe Met Ala Tyr Ala Ala Glu Glu Val Gly Leu Arg Gly Ser Gln Asp
145 150 155 160

Leu Ala Asn Gln Tyr Lys Ser Glu Gly Lys Asn Val Val Ser Ala Leu
165 170 175

Gln Leu Asp Met Thr Asn Tyr Lys Ser Ala Gln Asp Val Val Phe
180 185 190

Ile Thr Asp Tyr Thr Asp Ser Asn Phe Thr Gln Tyr Leu Thr Gln Leu
195 200 205

Met Asp Glu Tyr Leu Pro Ser Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Thr Cys Gly
210 215 220

Tyr Ala Cys Ser Asp His Ala Ser Trp His Asn Ala Gly Tyr Pro Ala
225 230 235 240

Ala Met Pro Phe Glu Ser Lys Phe Asn Asp Tyr Asn Pro Arg Ile His
245 250 255

016584

Thr Thr Gln Asp Thr Leu Ala Asn Ser Asp Pro Thr Gly Ser His Ala
260 265 270

Lys Lys Phe Thr Gln Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Ile Glu Met Gly Ser
275 280 285

Ala Thr Gly Asp Thr Pro Thr Pro Gly Asn Gln
290 295

<210> 82
<211> 30
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> праймер для клонирования

<400> 82
atatataagg ttatggcagg cggaagacac 30

<210> 83
<211> 31
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> праймер для клонирования

<400> 83
atatgcggcc gcttacaaat gaagatattc c 31

<210> 84
<211> 35
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 84
atatatgcgg ccgcctagag ccccaggtat tcagc 35

<210> 85
<211> 31

<212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 85
 atatctcgag tccatcgcca ccatggtag c 31

<210> 86
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 86
 atatctcgag ttacttgtac agctcgtcca t 31

<210> 87
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 87
 atatgcggcc gcatgtcgac gtccaaattg gtgttagaactc 41

<210> 88
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 88
 atatgcggcc gcttacttgt catcgatc cttgtaatcc aaatgaagat attccaa 57

<210> 89
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 89

atatgcggcc gcctacttgt catcgcatc cttgtaatcg agccccaggt attcagc

57

<210> 90

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 90

gcctccagca tgaaaagtctc

20

<210> 91

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> CAGATCTCCTTGGCCACAAT

<400> 91

cagatctcct tggccacaat

20

<210> 92

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 92

atgaaaggct ctgcagcact

20

<210> 93

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 93

tggctactgg tggtccttct

20

<210> 94
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 94
 tcacacctgctg ctttaacgtg

20

<210> 95
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 95
 atccacctgacc catctctcct

20

<210> 96
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 96
 atctcattgc agaggctgaa

20

<210> 97
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 97
 agaagaggag gccagaggag

20

<210> 98
 <211> 20

<212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 98
 cacagaaatg gccttgtgaa

20

<210> 99
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 99
 ccaagcaggt cataggtggt

20

<210> 100
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 100
 tcctttcatc ctggaacctg

20

<210> 101
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 101
 cgcctttctt gtttcacctc

20

<210> 102
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 102

aagcgtgtt tgccagttat

20

<210> 103

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 103

cacacgttag gcgcattttta

20

<210> 104

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 104

gtcaacagat cctccccaga

20

<210> 105

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 105

cagcatttct gcctttgtga

20

<210> 106

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 106

agggtggagag cctgaggaat

20

```

<210> 107
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 107
ctcgggttcct acttgtcagc                                20

<210> 108
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 108
aagcgagggtt ctcggtctga                                20

<210> 109
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 109
tgaccttttg ctctccctgt                                20

<210> 110
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 110
cttcaagctc tcctgtgtgt                                20

<210> 111
<211> 20

```

<212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 111
 cgaccctgac ttccctggat

20

<210> 112
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 112
 gctcatcggc tgggttatt

20

<210> 113
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 113
 ataaggcaggat ggagcattgg

20

<210> 114
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 114
 atgcttcggaa aactggacat

20

<210> 115
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 115

atggttcgat gcagcttct

20

<210> 116

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 116

tacggcgtaa tcctggaaac

20

<210> 117

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 117

atttgtcatg ctgcgttgag

20

<210> 118

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 118

ccgaaacaca gtggaaggtt

20

<210> 119

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 119

tctgtgaagg tgtgcaggag

20

```

<210> 120
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 120
ggttccttcc ttccctccag 20

<210> 121
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 121
aaccaaagcc accagtgttc 20

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует (а) полипептид, включающий аминокислотную последовательность, которая представлена в одной из SEQ ID NO: 11-18, или (б) полипептид, аминокислотная последовательность которого подобна указанным выше последовательностям по меньшей мере на 75%, и который обладает такой же биологической функцией; или полученный в результате альтернативного сплайсинга вариант одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2-9; или которая представляет собой зонд, содержащий по меньшей мере 14 смежных нуклеотидов нукleinовой кислоты, кодирующими полипептиды, указанные в (а) или (б), или которая является комплементарной любой из вышеуказанных нукleinовых кислот.

2. Выделенная нуклеиновая кислота по п.1, которая представляет собой ДНК или РНК.

3. Выделенная нуклеиновая кислота по п.1, которая представляет собой ДНК-транскрипт, включающий одну из полноразмерных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2-9, или которая является комплементарной полной кодирующей области одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2-9.

4. Антисмыловой олигонуклеотид к ДНК по п.3.

5. Выделенная нуклеиновая кислота по п.1, которая представляет собой РНК-транскрипт, включающий одну из полноразмерных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2-9.

6. Выделенная нуклеиновая кислота по п.1, которая представляет собой полученный в результате альтернативного сплайсинга вариант одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2-9.

7. Полученный в результате альтернативного сплайсинга вариант по п.6, соответствующий SEQ ID NO: 19 или 20.

8. Полипептид, кодируемый нукleinовой кислотой по п.6 или 7.

9. Выделенная нукleinовая кислота по п.1, которая кодирует полипептид, аминокислотная последовательность которого подобна по меньшей мере на 85% одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-18.

10. Выделенная нукleinовая кислота по п.1, которая кодирует полипептид, аминокислотная последовательность которого подобна по меньшей мере на 95% одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-18.

11. Выделенная нукleinовая кислота по п.1, которая кодирует полипептид, идентичный по меньшей мере на 50% одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-18.

12. Нукleinовая кислота-зонд по п.1, содержащая по меньшей мере 14 смежных нуклеотидов одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2-9.

13. Нукleinовая кислота-зонд по п.12, соответствующая одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 53-61.

14. Выделенная рекомбинантная полинуклеотидная молекула, содержащая нукleinовую кислоту по п.1 плюс контролирующие экспрессию элементы, функционально связанные с нукleinовой кислотой для обеспечения ее экспрессии.

15. Экспрессионный вектор, содержащий нукleinовую кислоту по п.1, кодирующую полипептид, который имеет полную аминокислотную последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 11-18, функционально связанную с промотором, где экспрессионный вектор присутствует в совместимой клетке-хозяине.

16. Клетка-хозяин млекопитающего, насекомого или бактерии, созданная с помощью генной инже-

нерии путем инсерции нуклеиновой кислоты по п.1, которая кодирует по меньшей мере часть зрелого белка, соответствующего одной из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-18.

17. Способ получения полипептида, включающего часть зрелого белка, соответствующего одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-18, заключающийся в том, что культивируют клетку-хозяина по п.16 в условиях, достаточных для получения указанного полипептида.

18. Способ по п.17, в котором полипептид экспрессируют на поверхности указанной клетки и который дополнительно включает стадию, на которой выделяют полипептид или его фрагмент из культуры.

19. Полипептид, который может быть необязательно гликозилированным и который (а) имеет аминокислотную последовательность зрелого белка, представленную в одной из SEQ ID NO: 11-18; (б) имеет аминокислотную последовательность зрелого белка, подобную по меньшей мере на 75% одному из зрелых белков, указанных в (а), и который обладает такой же биологической функцией; (в) имеет аминокислотную последовательность зрелого белка, которая по меньшей мере на 50% идентична зрелому белку, представленному в одной из SEQ ID NO: 11-18; или (г) представляет собой иммунологически реактивный фрагмент белка, указанного в (а).

20. Полипептид по п.19, представляющий собой зрелый белок, подобный по меньшей мере на 85% зрелому белку, указанному в (а).

21. Полипептид по п.19, представляющий собой зрелый белок, подобный по меньшей мере на 95% зрелому белку, указанному в (а).

22. Полипептид по п.19, имеющий аминокислотную последовательность зрелого белка, представленную в одной из SEQ ID NO: 11-18, или его фрагмент, обладающий такой же биологической функцией, что и соответствующий зрелый белок.

23. Антитело, которое распознает полипептид или его фрагмент по одному из пп.19-22.

24. Антитело по п.23, которое распознает полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 11-18.

25. Способ скрининга соединения, которое обладает способностью ингибировать ферментативную активность по меньшей мере одного зрелого белка по п.19, заключающийся в том, что инкубируют зрелый белок и приемлемый субстрат для зрелого белка в присутствии одного или нескольких исследуемых соединений или их солей, оценивают ферментативную активность зрелого белка, сравнивают активность с соответствующей активностью, определенной в отсутствие исследуемого соединения, и отбирают исследуемое(ые) соединение или соединения, которое(ые) снижает(ют) ферментативную активность.

26. Способ скрининга избирательного ингибитора глутамилцилазы, который не ингибирует ферментативную активность по меньшей мере одного зрелого белка по п.19, заключающийся в том, что ингибируют зрелый белок и приемлемый субстрат для зрелого белка в присутствии одного или нескольких ингибиторов глутамилцилазы или их солей, оценивают ферментативную активность зрелого белка, сравнивают активность с соответствующей активностью, определенной в отсутствие ингибитора глутамилцилазы, и отбирают соединение, которое не снижает ферментативную активность зрелого белка.

27. Способ скрининга избирательного ингибитора белка глутамилпептидилтрансферазы, который не ингибирует ферментативную активность глутамилцилазы, заключающийся в том, что инкубируют глутамилцилазы в присутствии одного или нескольких ингибиторов белка глутамилпептидилтрансферазы или их солей, оценивают ферментативную активность глутамилцилазы, сравнивают активность с соответствующей активностью, определенной в отсутствие ингибитора белка глутамилпептидилтрансферазы, и отбирают соединение, которое не снижает ферментативную активность белка глутамилпептидилтрансферазы.

28. Антагонист белка глутамилпептидилтрансферазы, который ингибирует биологическую функцию одного из зрелых белков по одному из пп.19-22.

29. Антагонист белка глутамилпептидилтрансферазы по п.28, который представляет собой низкомолекулярный ингибитор.

30. Ингибитор по п.29, идентифицированный с помощью способа скрининга по п.25 или 27.

31. Избирательный ингибитор глутамилцилазы, идентифицированный с помощью способа скрининга по п.26.

32. Фармацевтическая композиция, предназначенная для парентерального, энтерального или орального введения, содержащая по меньшей мере один ингибитор белка глутамилпептидилтрансферазы или его фармацевтически приемлемую соль, необязательно в сочетании с общепринятыми носителями и/или эксципиентами.

33. Применение фармацевтической композиции по п.32 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для предупреждения или лечения заболевания, выбранного из группы, включающей болезнь Альцгеймера, семейную британскую деменцию, семейную датскую деменцию, синдром Дауна, болезнь Гентингтона, болезнь Кеннеди, язвенную болезнь, рак двенадцатиперстной кишки, связанный и несвязанный с заражением *Helicobacter pylori*, колоректальный рак, синдром Золлингера-Эллисона, рак желудка, связанный и несвязанный с заражением *Helicobacter pylori*, патогенные психические состояния, шизофрению, бесплодие, неоплазию, воспалительные реакции хозяина, рак, злокачест-

венные метастазы, меланому, псориаз, ревматоидный артрит, атеросклероз, нарушенные гуморальные и клеточно-опосредуемые иммунные ответы, нарушенные процессы адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелий, нарушенное всасывание пищи, нарушенный сон, нарушенная связанная с гомеостазом регуляция энергетического метаболизма, нарушенная функция вегетативной нервной системы, нарушенный гормональный баланс и нарушенная регуляция общей воды организма, рассеянный склероз, синдром Гийена-Барре и хроническую воспалительную демиелинизирующую полирадикулоневропатию.

34. Применение ингибитора белка глутамилпептидилтрансферазы или его фармацевтически приемлемой соли для приготовления лекарственного средства, предназначенного для предупреждения или лечения заболевания, выбранного из группы, включающей болезнь Альцгеймера, семейную британскую деменцию, семейную датскую деменцию, синдром Дауна, болезнь Гентингтона, болезнь Кеннеди, язвенную болезнь, рак двенадцатиперстной кишки, связанный и несвязанный с заражением *Helicobacter pyloris*, колоректальный рак, синдром Золлингера-Эллисона, рак желудка, связанный и несвязанный с заражением *Helicobacter pylori*, патогенные психические состояния, шизофрению, бесплодие, неоплазию, воспалительные реакции хозяина, рак, злокачественные метастазы, меланому, псориаз, ревматоидный артрит, атеросклероз, нарушенные гуморальные и клеточно-опосредуемые иммунные ответы, нарушенные процессы адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелий, нарушенное всасывание пищи, нарушенный сон, нарушенная связанная с гомеостазом регуляция энергетического метаболизма, нарушенная функция вегетативной нервной системы, нарушенный гормональный баланс и нарушенная регуляция общей воды организма, рассеянный склероз, синдром Гийена-Барре и хроническую воспалительную демиелинизирующую полирадикулоневропатию.

35. Применение по одному из пп.33-34, где ингибитор белка глутамилпептидилтрансферазы представляет собой конкурентный ингибитор.

36. Применение по одному из пп.33-35, где ингибитор белка глутамилпептидилтрансферазы связывается с активным сайтом белка глутамилпептидилтрансферазы, связанным с ионом металла.

37. Применение по одному из пп.33-36, где последовательность белка глутамилпептидилтрансферазы выбрана из одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-18, 21 и 22.

38. Применение по п.37, где последовательность белка глутамилпептидилтрансферазы выбрана из одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11 и 12.

39. Применение по одному из пп.33-38, в которых применяют ингибитор по одному из пп.28-30.

40. Способ диагностики заболевания и/или состояния, выбранного из группы, включающей болезнь Альцгеймера, семейную британскую деменцию, семейную датскую деменцию, синдром Дауна, болезнь Гентингтона, болезнь Кеннеди, язвенную болезнь, рак двенадцатиперстной кишки, связанный и несвязанный с заражением *Helicobacter pyloris*, колоректальный рак, синдром Золлингера-Эллисона, рак желудка, связанный и несвязанный с заражением *Helicobacter pylori*, патогенные психические состояния, шизофрению, бесплодие, неоплазию, воспалительные реакции хозяина, рак, злокачественные метастазы, меланому, псориаз, ревматоидный артрит, атеросклероз, нарушенные гуморальные и клеточно-опосредуемые иммунные ответы, нарушенные процессы адгезии и миграции лейкоцитов в эндотелий, нарушенное всасывание пищи, нарушенный сон, нарушенная связанная с гомеостазом регуляция энергетического метаболизма, нарушенная функция вегетативной нервной системы, нарушенный гормональный баланс и нарушенная регуляция общей воды организма, рассеянный склероз, синдром Гийена-Барре и хроническую воспалительную демиелинизирующую полирадикулоневропатию, включающий этапы

получения образца из индивидуума, который, как ожидается, поражен указанным заболеванием и/или состоянием,

контактирования с ингибитором глутамилпептидилтрансферазы и определения, поражен ли индивидуум указанным заболеванием и/или состоянием.

41. Способ по п.40, в котором индивидуум представляет собой человека.

42. Способ по п.40 или 41, в котором образец представляет собой образец крови, образец сыворотки, образец спинно-мозговой жидкости или образец мочи.

43. Диагностический набор для осуществления способа по пп.40-42, содержащий в качестве средства выявления набор для диагностического анализа, включающий ингибитор белка, подобного глутамилпептидилтрансферазе, и средства измерения.

hQC	-----	-MAGGRHRRVVGTLHLL---	-LLVAALPWASRG--VSPSASAWE--											
hisoQC	MRSGGRGRPRLRLGERGLMEPLLPPKRRLLPRVRLLP-	LLLALAVGSAFYTIWSGWHRRT												
mQC	-----	-MAGSEDKLVVGTLHLL---	-LLQATVLSLTAGN-LSLVSAAWIQ--											
misoQC	MSPGSRGRPRQRLEDRGLMKPPSLSKRRLPRVQFLPLLL	LALAMGLAFYIVWNSWHPGV												
	*	.	:**	:	*	:	*	.	*					
hQC	-----	-EKNYHQPAI -LNSSALRQIAEGTSISEMWQNDLQPLLIERYPGSPGSYSARQHI												
hisoQC	EELPLGRELRVPLIGSLPEARLRRVVQGLDPQRLWSTYLRLPVLVVRTPGSPGNLQVRKFL													
mouse	-----	-EKNHHQPAH -LNSSSLQQVABCTSISEMWQNDLRPLLIERYPGSPGSYSARQHI												
misoQC	EEMSRSRDLRVPLIGSLSEAKLRLVVGQLDPQRLWGTFLRPLLIVRPPGSSGNLQVRKFL													
	:	:	*	*	.	:	*	.	:	*	:	*		
hQC	MQRIRQLQADWVLEIDTFLSQTPYGYRSFSNIISTLNPTAKRHLVLACHYDSKYFSHWNN													
hisoQC	EATLRSLSLAGWHVELDPFTASTPLGPVDGFNVVATLDPRAARHHTLACHYDSKLFPPG-S													
mouse	-----	MQRIRQLQAEWVVEVDTFLSRTPYGYRSFSNIISTLNPEAKRHLVLACHYDSKYFPWDS												
misoQC	EATLQSLSAGWHVELDPFTASTPLGPILDGFNVVATLDPGAARHHTLACHYDSKFFPPG-L													
	:	:	*	*	*	:	*	.	*	:	*	:	*	
hQC	RVFVGATDSAVERPCAMMLEELARALDKKLHSLKTVSDSKPDLSQLLIFFDGEAEFLHWSPQD													
hisoQC	TPFVGATDSAVERPCALLLELAQALDDELSRAK--KQAAP-VTLQLLFLDGEAEALKEWGPKD													
mouse	-----	RVFVGATDSAVERPCAMMLEELARALDKKLHSLKDVSGSKPDLSLRLIFFDGEAEFHHWSPQD												
misoQC	PPFVGATDSAVERPCALLLELVQALDAMLSRIK--QQAAP-VTLQLLFL-GEEALKEWGPKD													
	*****	*****	:	*****	*	*	.	:	*	:	*	:	*	
hQC	SLYGSRHLAAKMASTPHPPGARGTSQLHGMDLLVLLDLIGAPNPTFPNFFPNSARWFERL													
hisoQC	SLYGSRHLAQLMESIPHS PG--PTRIQAIELFMLLDLIGAPNPTFYSHFPRTVRWFHRL													
mouse	-----	TLYGSRHLAQKMASSHPPGSRGTNQLDGM DLLVLLDLIGAANPTFPNFFPKTRWFNRL												
misoQC	SLYGSRHLAQIMESIPHS PG--PTRIQAIELFVLLDLIGASSPIFFSHFPRTARWFQRL													
	*****	*	*	***	.	:	*****	:	***	.	***	,	***	
hQC	QAIIEHELHEGLLKDHSLLEGRYFQNYSYGGVIQDDHIPFLRRGVPVHLHILIPSFFPEVWHT													
hisoQC	RSIEKRLHRLNLQSHPQBVMYFQPGEPSGSVEDDHIPFLRRGVPVHLHISTPFPAVWHT													
mouse	-----	QAIKEKELYELGLLKDHSLERKYFQNFGYGNIIQDDHIPFLRKGVPVHLIAPSPEVWHT												
misoQC	RSIEKRLHRLNLQSHPQBVMYFQPGEPPGPVEDDHIPFLRRGVPVHLIATPFPAVWHT													
	*****	,	***	.	*	***	.	:	*****	:	*****	,	*	*
hQC	MDDNEENLDESTIDNLNKILQVFVLEYLHL													
hisoQC	PADTEVNLLHPPTVHNLCRILAVFLAEYLGL													
mouse	MDDNEENLHASTIDNLNKIIQVFVLEYLHL													
misoQC	PADTEANLHPPTVHNLSRILAVFLAEYLGL													
	*	*	.	*	*	:	*	:	*	;	*	*	*	

Идентичность: 38,97%
 Подобие: 65,64%

Фиг. 1

Идентичность: 71,28% Подобие: 90,86%

Фиг. 2

Фиг. 3

hisoQC	MRSGGRGRPLRLGERGLMEPLLPPKRRLLPVRLLFLLLALVGSAFYTIWSGWHRRTE
hQC	MAGG-----R-----HRRVVTGLHLLLVAALPWAS--R---GVSPSAS
hisoQC	ELPL/GRELRVPLIGSLPBEARLRRVVGQLDPQLRWSSTYLRLPPLLWVTPGSPGNLQVRKFLE
hQC	AWPEEKNYHQPAI--LNSSALRQIAEGTSISEMWQNDLQPLLIERYPGSPGSYAAQRQHIM
hisoQC	ATLRSLTAGWHVLELPFTASTPLGPVDFGNVATLDPRAARHLLACHYDSKLFPPGS-T
hQC	QRIQLQADWVLEIDTFLSQTPYGRSFNSNIISTLNPATAKRHLVLACHYD SKYFSHWNRR
hisoQC	PFVGATDSA VPCALLLEAQALDL ELSRAKKQAAP--VTLQLLFLDGEA EALKEWGP KDS
hQ	VFVGATDSA VPCAMMELA RALDKKL LSLKT VSDSKPDLSLQLIFFDGEAEFLHWSPQDS
hisoQC	LYGSRH LAQLMESTIPHSP--GPTRIQAI ELMFMLL D L LGAPN PTFYSHFPRTVRFHRLR
hQC	LYGSRH LAAKMA STPHPPGARGTSQ L HGM DL L VLLD L I G A P N P T F P N F F P N S A R W F E R L Q
hisoQC	SIEKRLHRLNL LQSH PQEV MYFQPQGP EPGS VEDDHIPFLRRGVPVLH LISTPFP AVWHTP
hQC	AIEHELH L E L G L L K D H S L E G R Y F Q N Y S Y G G V I Q D D H I PFLRRGVPVLH L I P S P F P E V W H T M
hisoQC	ADTEVN LHPPTVHNLCRILAVFLAEYI GL
hQC	DDNEENLDESTIDLNKLNKILQVFPLEYHL

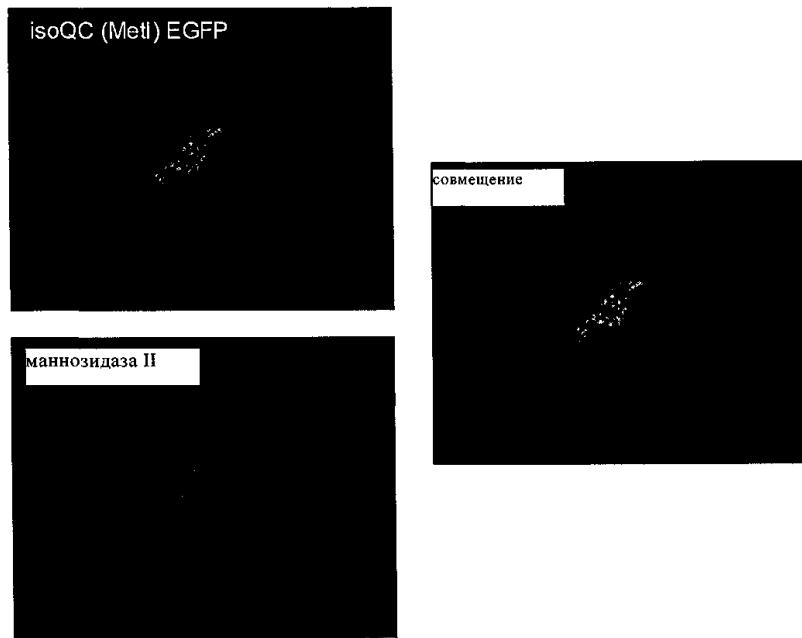
Идентичность: 45,24%
Подобие: 71,98%

Фиг. 4

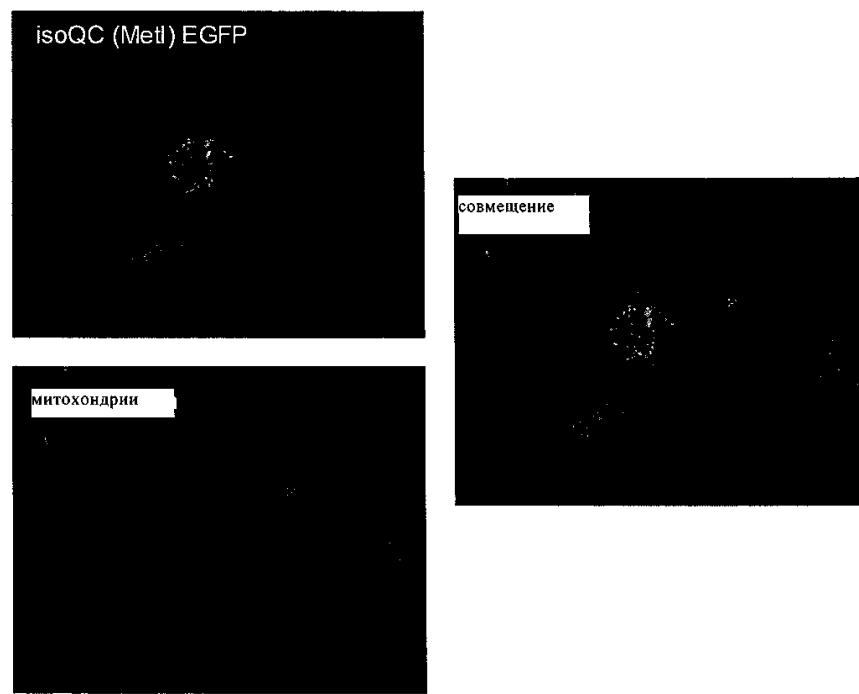
016584

Фиг. 5

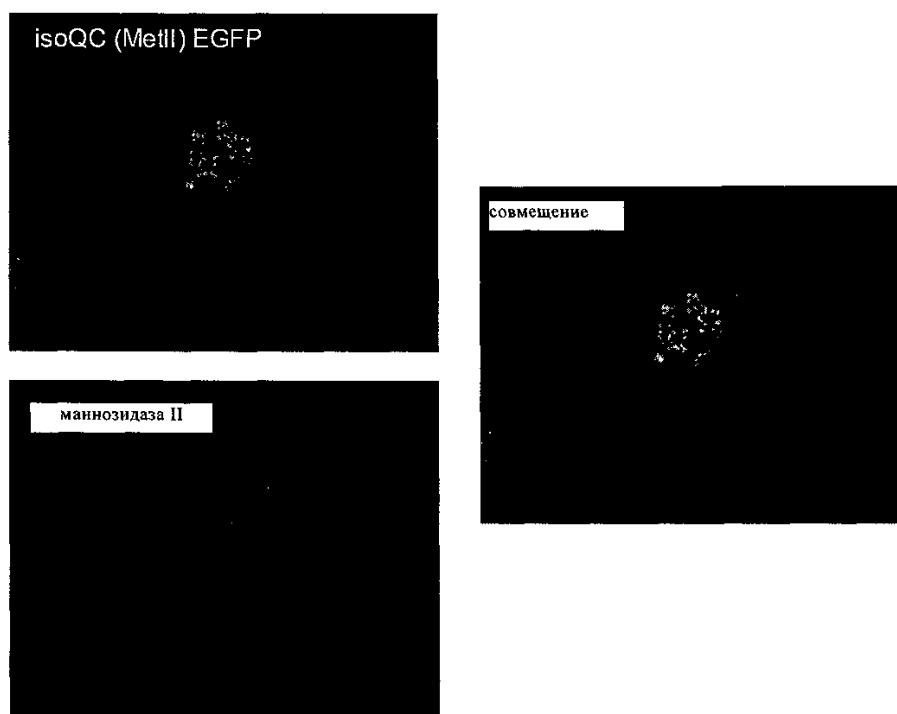
Фиг. 6



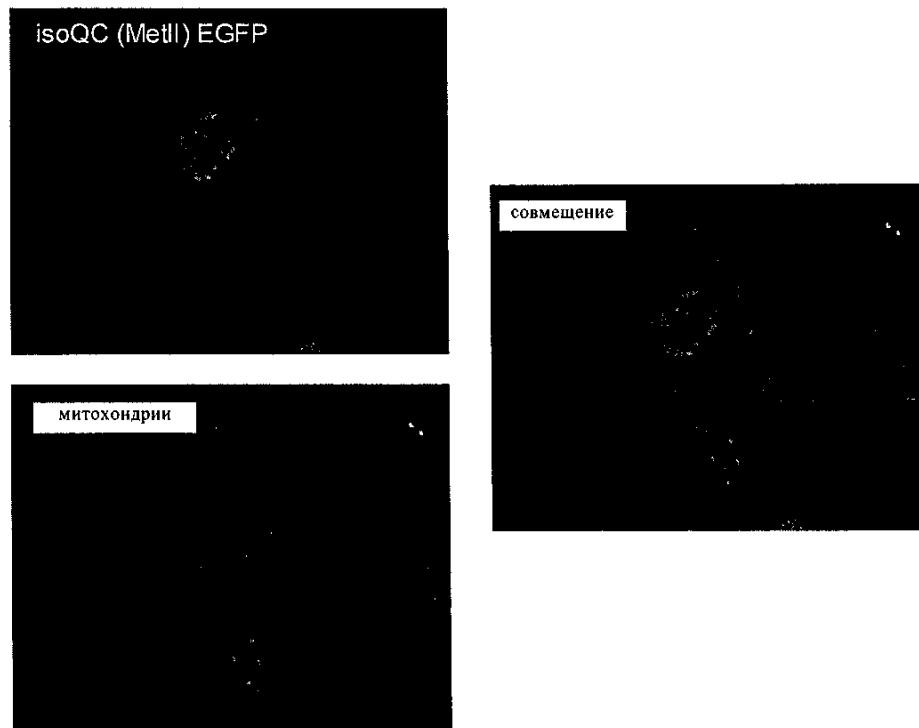
Фиг. 7



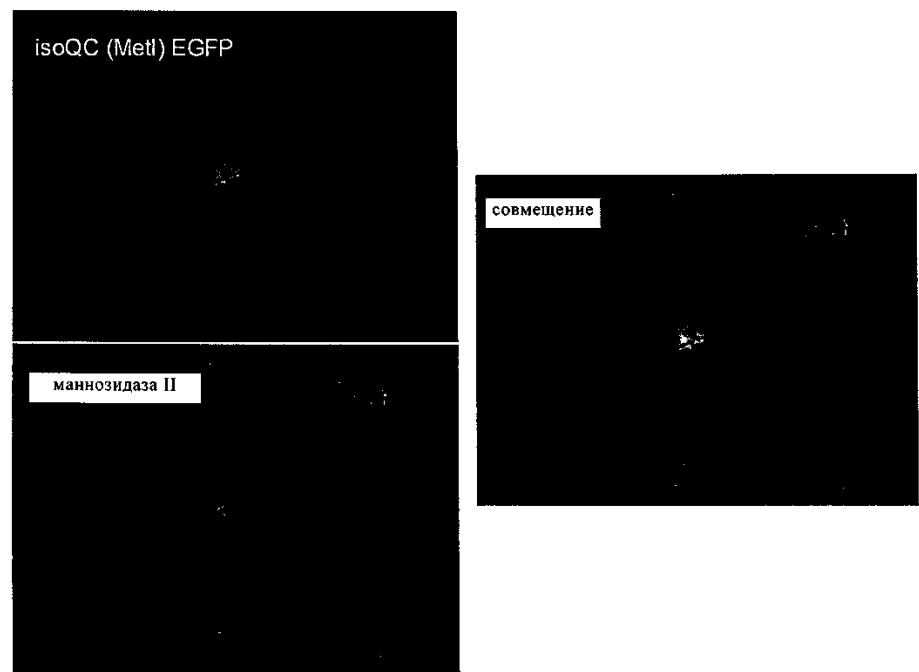
Фиг. 8



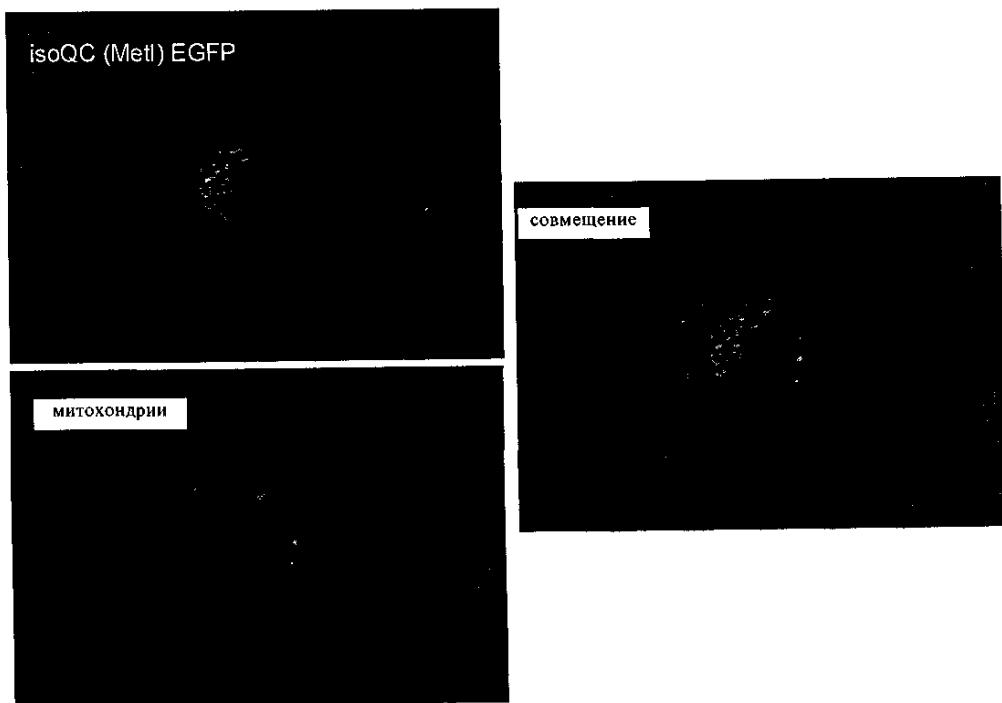
Фиг. 9



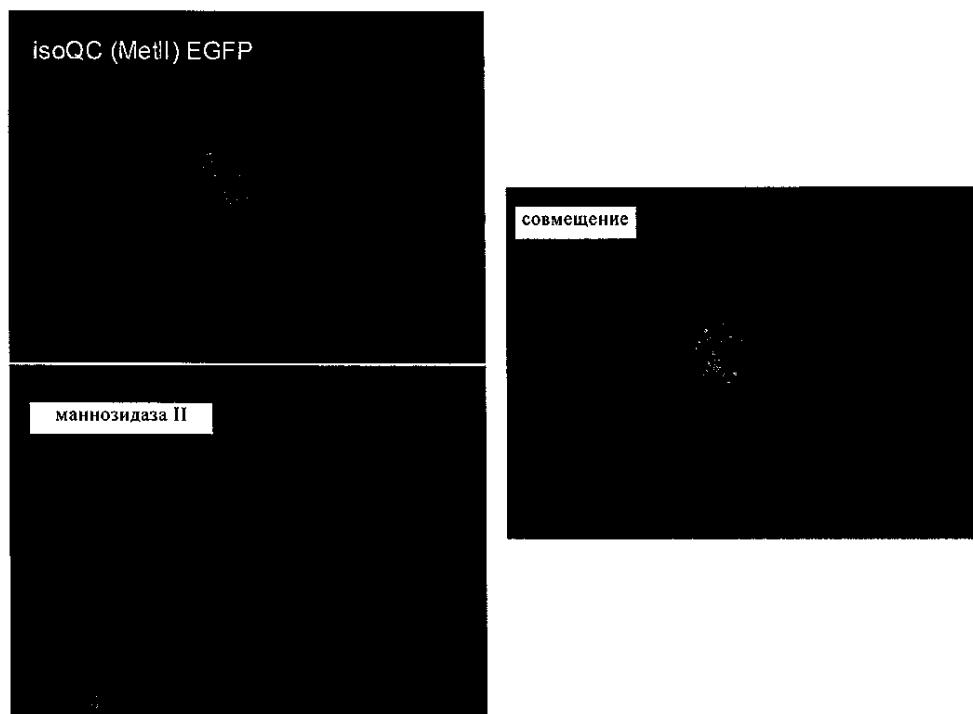
Фиг. 10



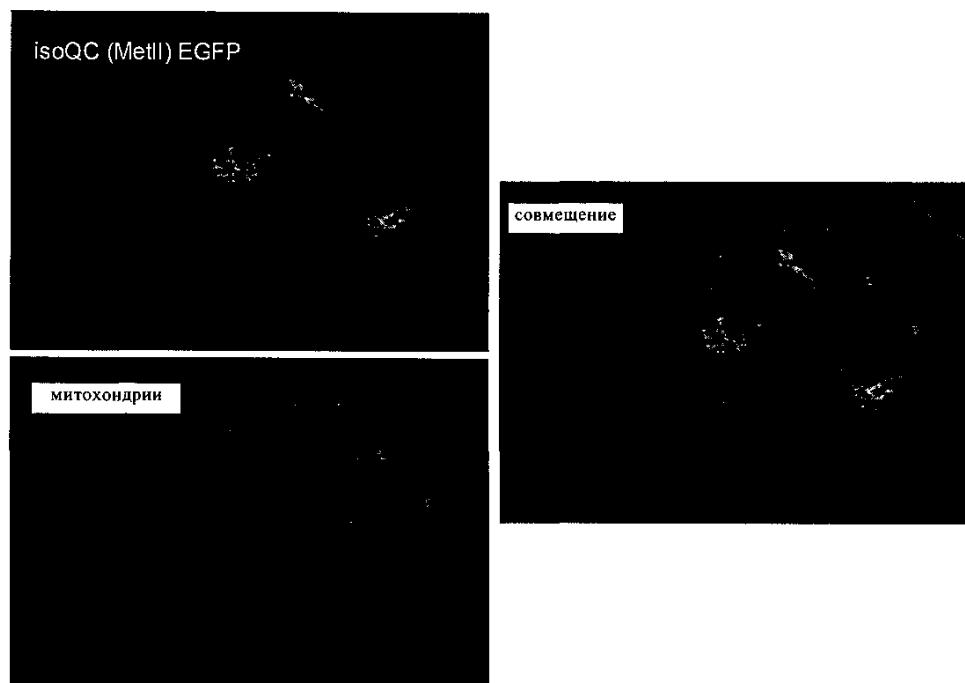
Фиг. 11



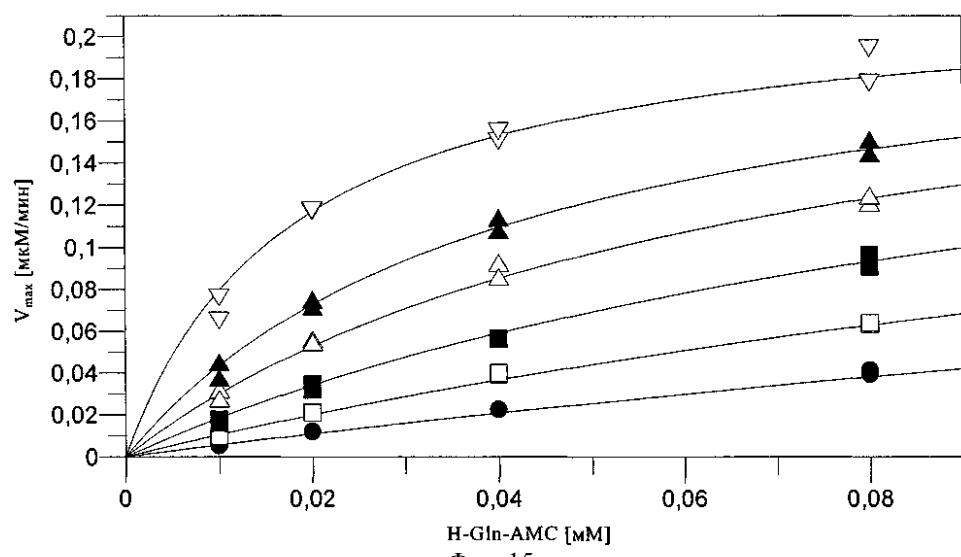
Фиг. 12



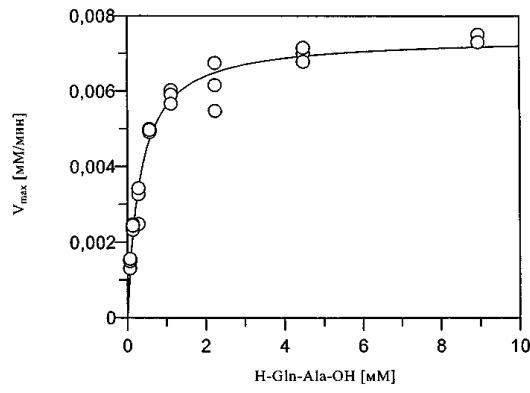
Фиг. 13



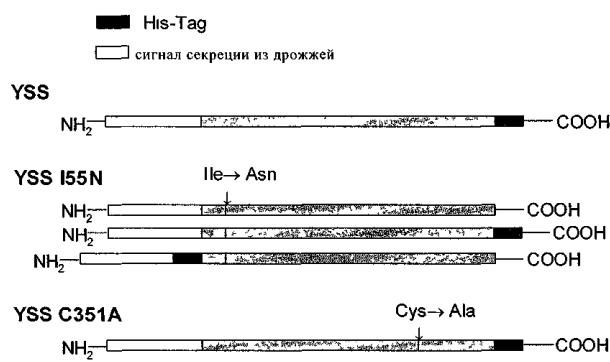
Фиг. 14



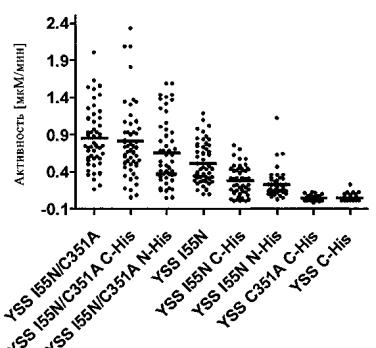
Фиг. 15



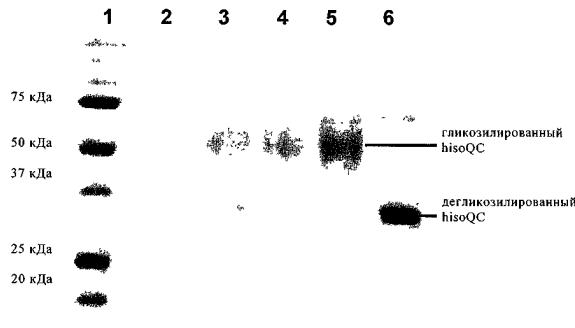
Фиг. 16



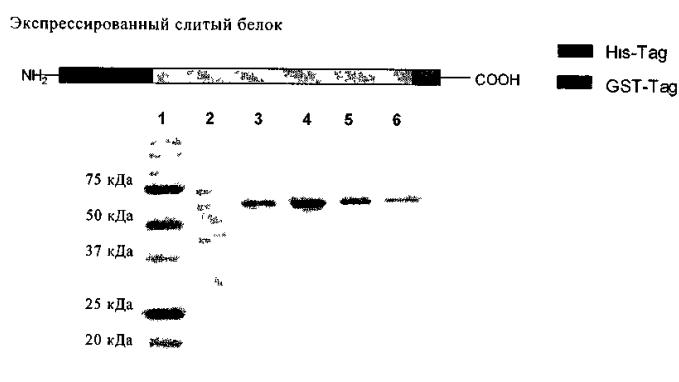
Фиг. 17



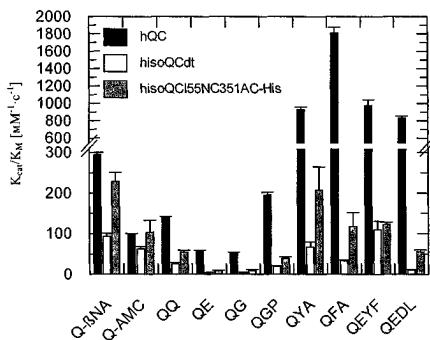
Фиг. 18



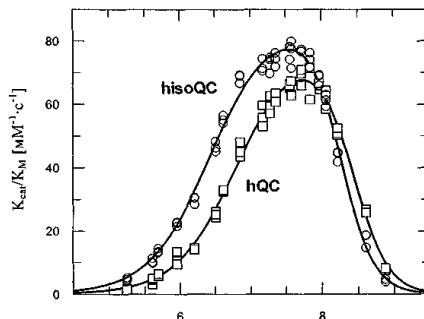
Фиг. 19



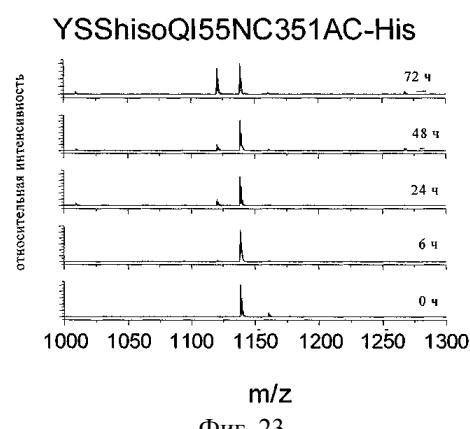
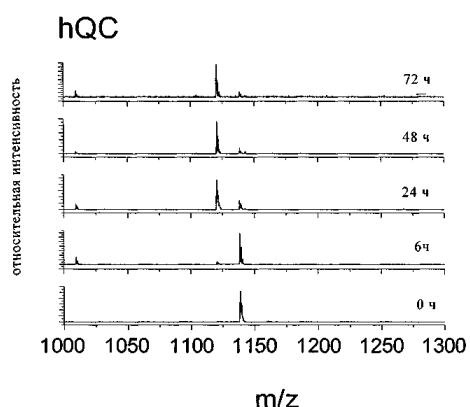
Фиг. 20



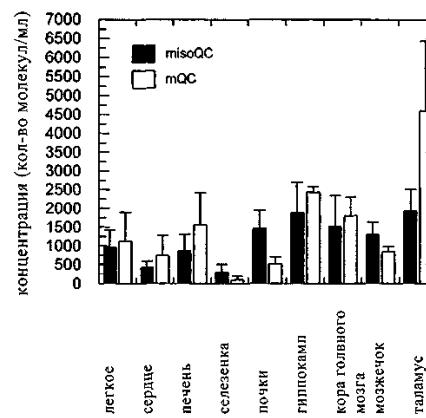
Фиг. 21



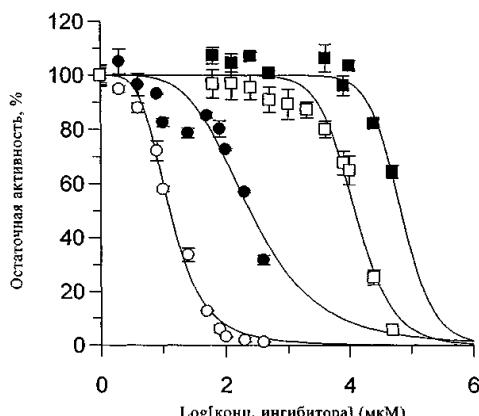
Фиг. 22



Фиг. 23

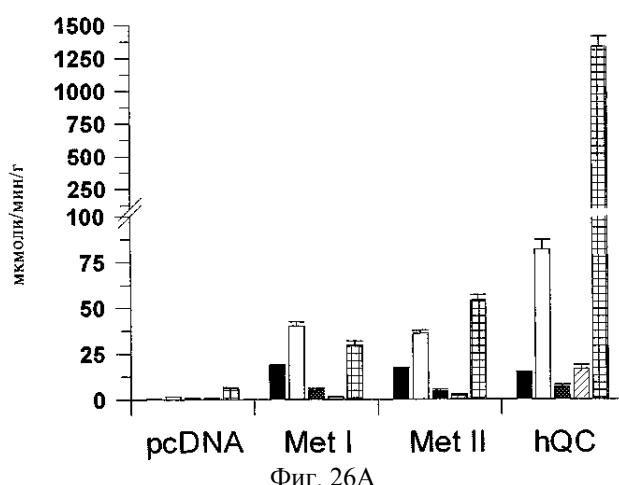


Фиг. 24



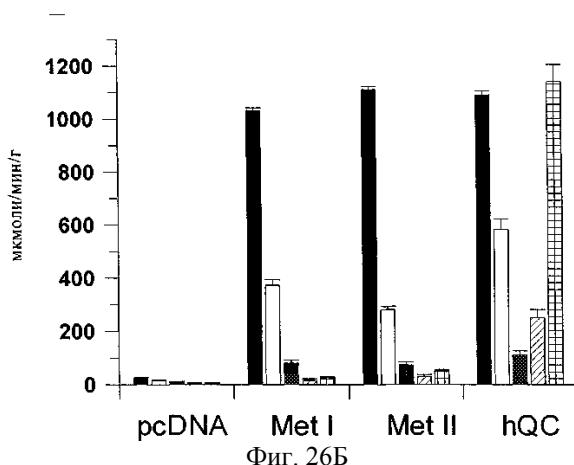
Фиг. 25

Удельная активность

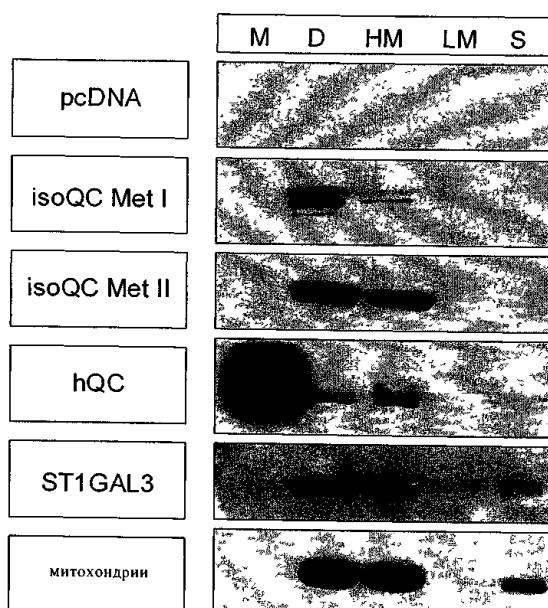


Фиг. 26А

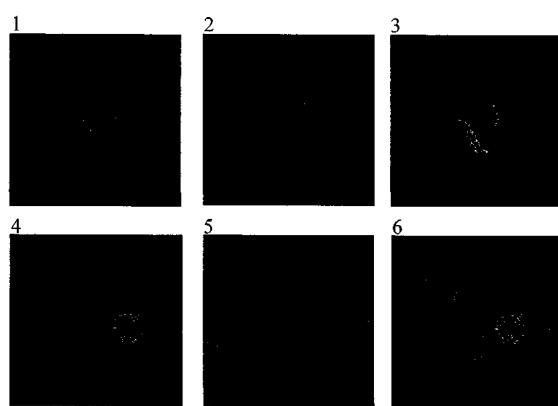
Абсолютная активность



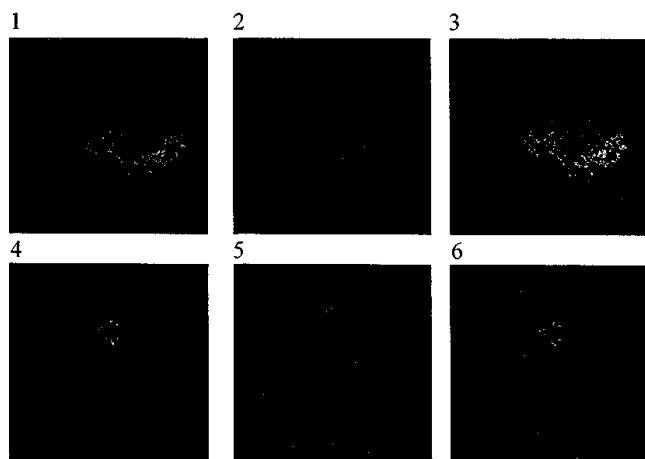
Фиг. 26Б



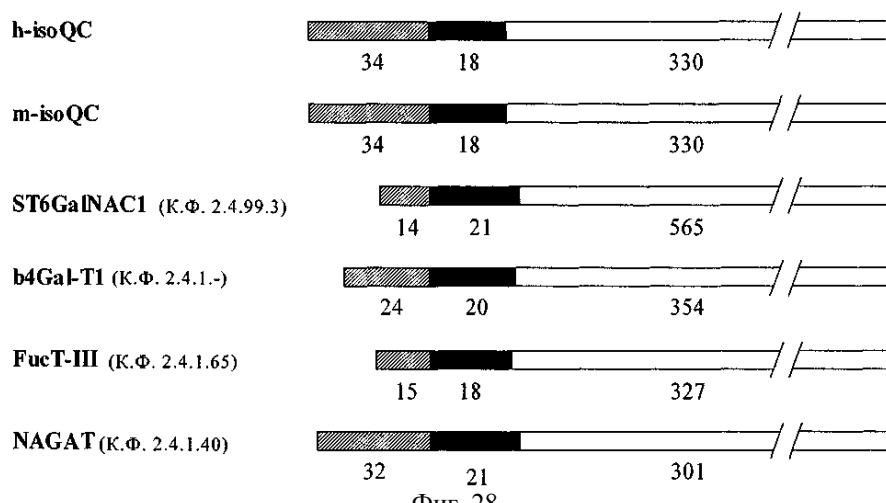
Фиг. 26В



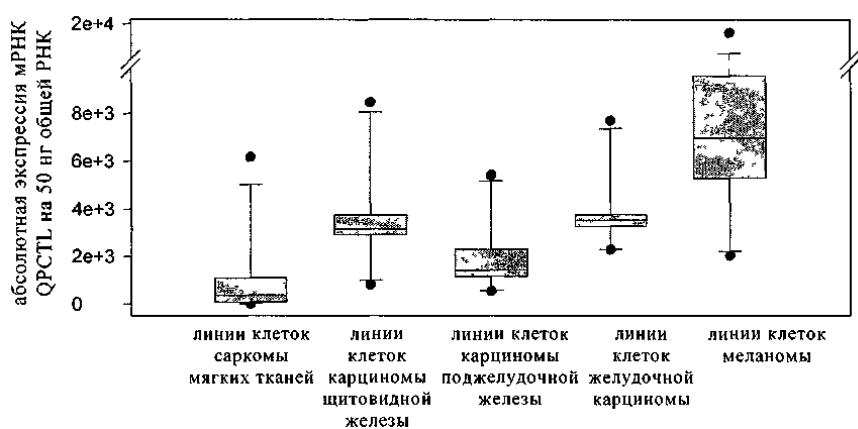
Фиг. 27А



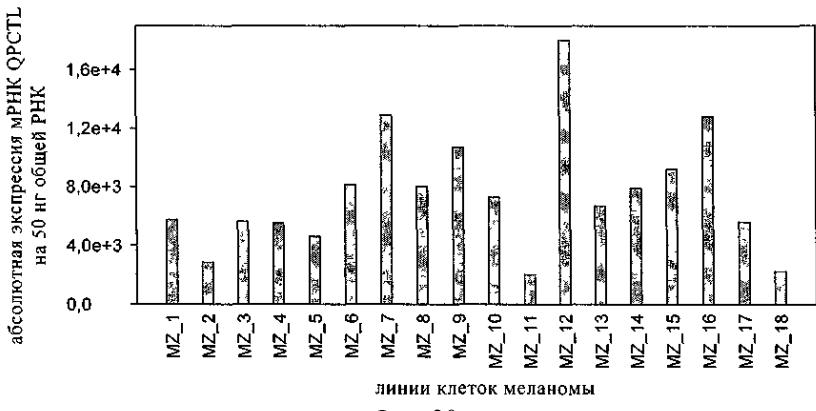
Фиг. 27Б



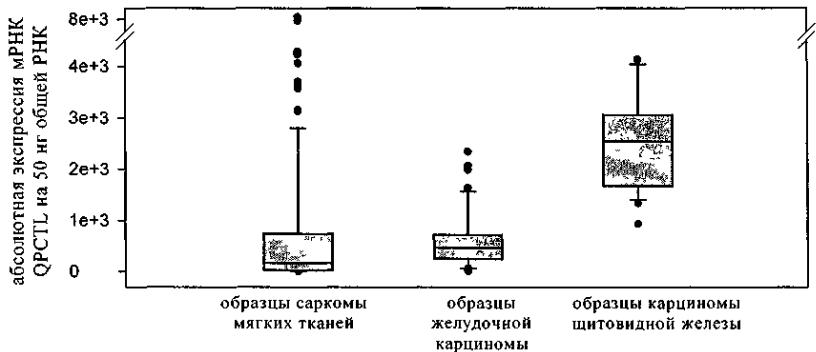
Фиг. 28



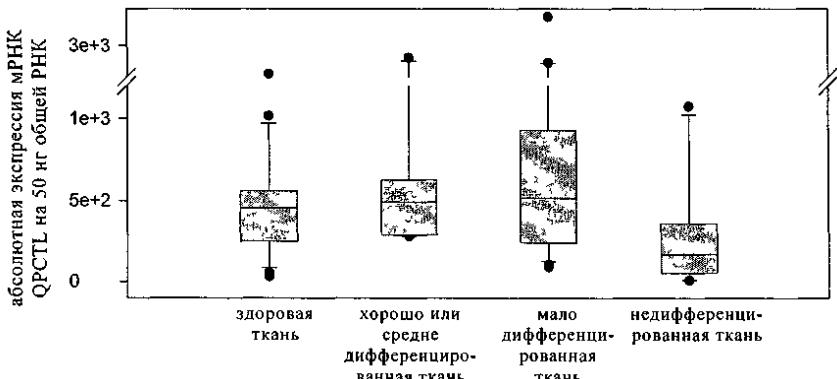
Фиг. 29



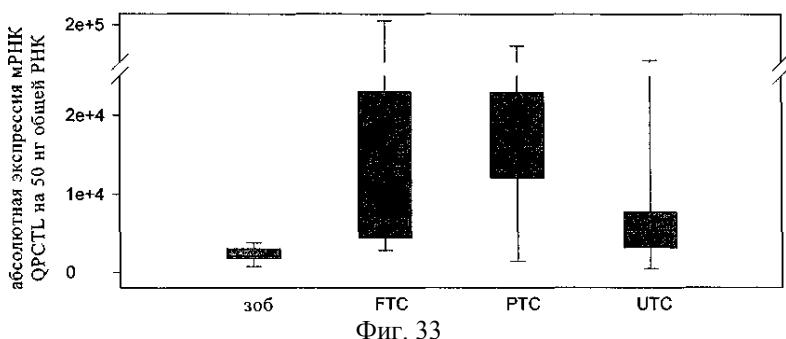
Фиг. 30



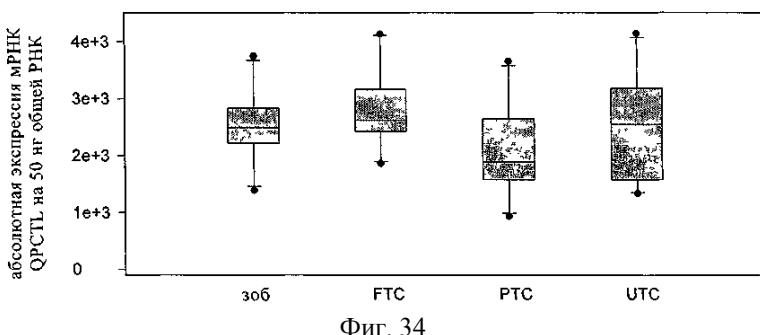
Фиг. 31



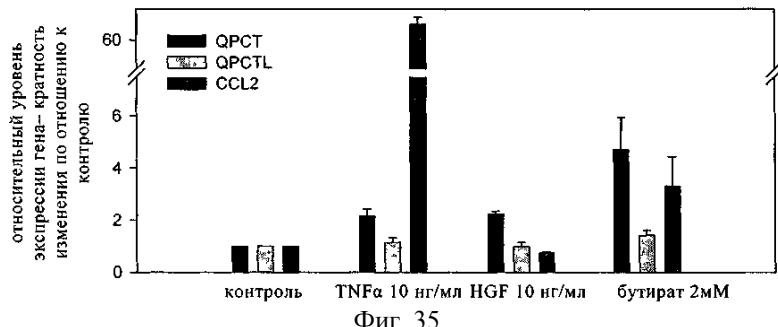
Фиг. 32



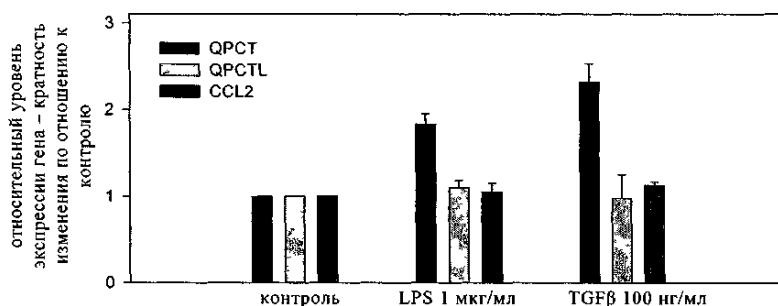
Фиг. 33



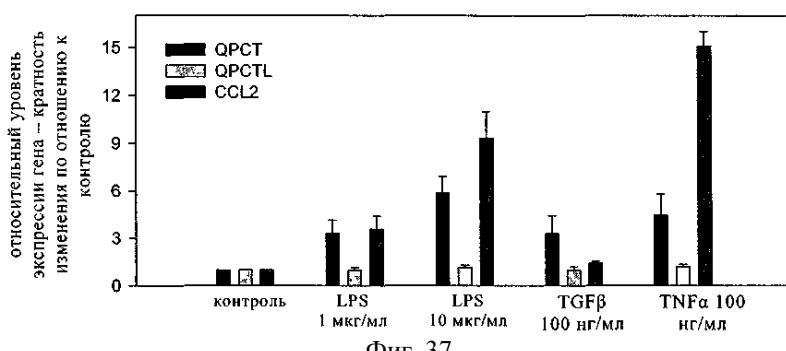
Фиг. 34



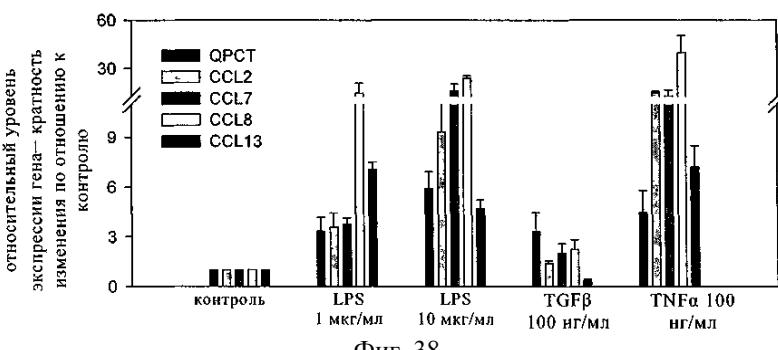
Фиг. 35



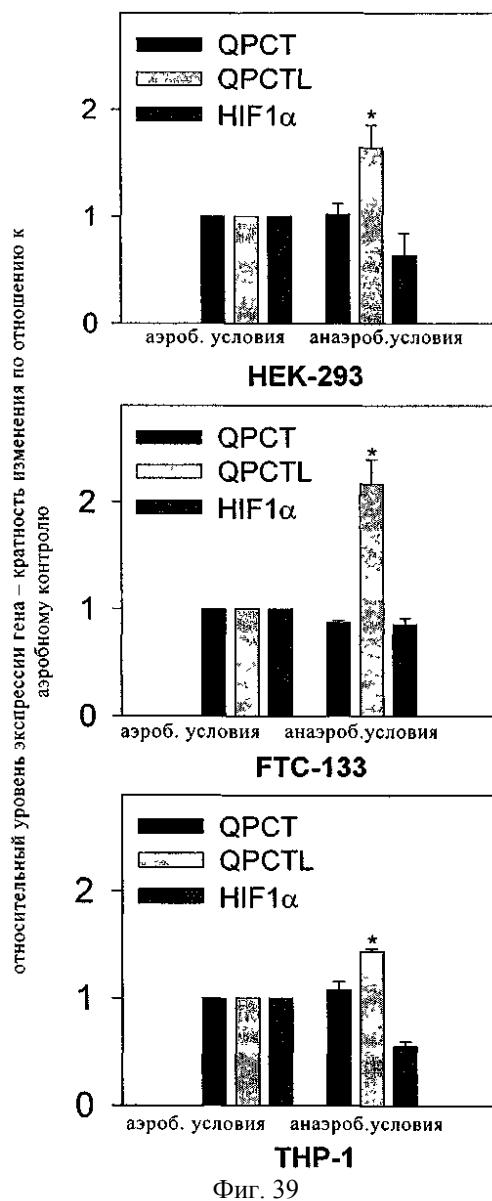
Фиг. 36



Фиг. 37



Фиг. 38



Фиг. 39

