



(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 BIOLOGICAL CHEMISTS,
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 spore 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,

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

Область техники, к которой относится изобретение

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

Предпосылки создания изобретения

Глутаминилциклаза (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 бычьей 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 время установлено, что не рекомбинантная человеческая QC, а обладающие QC-активностью экстракты, 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-Aβ, 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 EP 02011349.4 описаны полинуклеотиды, кодирующие глутаминилциклазу 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 глутаминилциклазную активность. Такие агенты можно применять в качестве пестицидов.

Ингибиторы QC, которые можно применять также в качестве ингибиторов изоцизмов 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

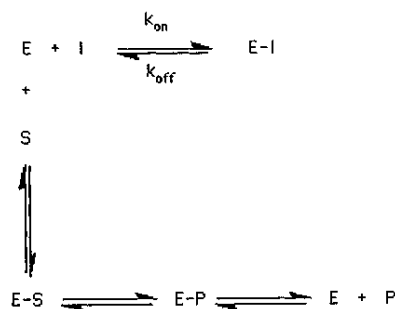
Ингибиторы ферментов

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, P. 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 каталитическую 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,

а) они часто представляют собой аналоги переходного состояния,

б) они обладают эффективностью при концентрации, близкой к концентрации фермента (субнано-молярные 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.

Мульти-субстратные 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.

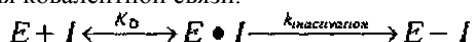
Агенты, действие которых основано на аффинности

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.

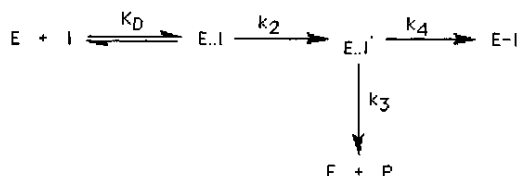
Приведенная ниже реакционная схема описывает взаимодействие реагента, связывающегося с активным сайтом, с ферментом-мишенью, где K_D обозначает константу диссоциации и $k_{\text{инактивации}}$ ($k_{\text{inactivation}}$) обозначает скорость образования ковалентной связи.



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

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

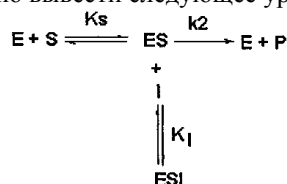
На приведенной ниже реакционной схеме показан механизм действия инактиватора, действие которого основано на механизме, связанном с ферментом, где K_D обозначает комплекс диссоциации, k_2 обозначает скорость активации ингибитора после связывания с ферментом, k_3 обозначает скорость диссоциации активированного 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-комплексом (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 прекращения 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 глутаминилциклазу (QC), синонимом которой является глутаминилпептидциклотрансфераза (QPCT); и QC-подобные ферменты, синонимом которых являются белки, напоминающие глутаминилпептидциклотрансферазу (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 глутаминилциклазы (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 глутаминила или глутамата на N-конце биологически активных пептидов.

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

Схема 1. Циклизация глутамина с помощью QC

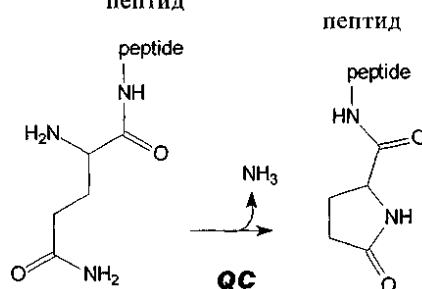
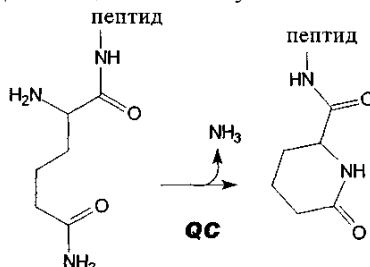


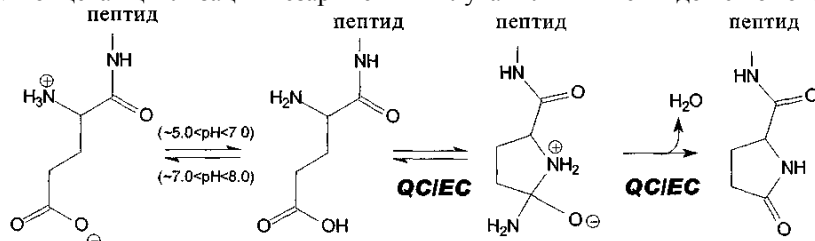
Схема 2. Циклизация L-гомоглутамина с помощью QC



Понятие "ЕС" в контексте настоящего описания относится к побочной активности глутаминилциклазы (QC, QPCT) и QC-подобных ферментов (QPCTL), таких как глутаматциклаза (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 глутаминилциклазы (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 глутаминилциклазы" хорошо известно специалистам в данной области и означает ферментные ингибиторы, которые ингибируют каталитическую активность глутаминилциклазы (QC, QPCT) или QC-подобных ферментов (QPCTL) или их глутаминилциклазную (ЕС) активность, предпочтительно путем непосредственного взаимодействия ингибитора с ферментом.

Понятие "избирательный QC-ингибитор" в контексте настоящего описания обозначает ферментные ингибиторы, которые ингибируют каталитическую активность глутаминилциклазы (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 глутаминилциклазы (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 глутаминилциклазы (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 глутаминилциклазы (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 глутаминилциклазы (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 глутаминилциклазы (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 ингибирование глутаминилциклазы (QC, QPCT). Еще более предпочтительно значение k_i для избирательных QPCTL-ингибиторов, характеризующее ингибирование по меньшей мере одного QC-подобного фермента (QPCTL), на три порядка ниже значения k_i , характеризующего ингибирование глутаминилциклазы (QC, QPCT). Наиболее предпочтительными являются избирательные QPCTL-ингибиторы, которые не ингибируют активность глутаминилциклазы (QC, QPCT).

Эффективность ингибирования QC

С учетом корреляции с ингибированием QC в предпочтительных вариантах осуществления изобретения, заявляемом способе и при медицинском применении используют агент, ингибирование которым QC характеризуется значением K_i 10мкМ или менее, более предпочтительно 1мкМ или менее, еще более предпочтительно 0,1мкМ или менее или 0,01мкМ или менее или наиболее предпочтительно 0,01мкМ 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 острая воспалительная полиневропатия.

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 помещать в больницу для осуществления вспомогательного дыхания, лечения и физиотерапии. Метод, называемый плазмафорез, 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 полирадикулоневропатией (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 неясной. 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 поражения 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 глутаминилциклазной активностью, которые являются новыми представителями семейства белков, родственных глутаминилциклазе, включая полноразмерные белки, формы, полученные в результате альтернативного сплайсинга, субъединицы и мутанты, а также к нуклеотидным последовательностям, кодирующим 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 глутаминилциклазы (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-крабод) (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 глутаминилциклазой. В табл. 2 проиллюстрирована идентичность между новыми белками и известной глутаминилциклазой.

Таблица 1. Подобие белковых последовательностей новых напоминающих глутаминилпептидциклотрансферазу белков и глутаминилциклазы

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 глутаминилпептидциклотрансферазу белков и глутаминилциклазы

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 мышинной глутаминилциклазы (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 глутаминилциклазы 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 гемокинов. 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 глутаминилпептидциклотрансфераз, а также других активных соединений, которые модифицируют функцию(и) этих белков.

Таким образом, изобретение относится к новым белкам или полипептидам, кодирующим 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, предпочтительно 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 ЕС, 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), мышинной QC (mQC) и мышинной 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), мышинной QC (mQC, GenBank NM-027455, SEQ ID NO: 79) и мышинной 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 MH. 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 Pôle Bioinformatique Lyonnais) (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>), с установкой принятых по умолчанию параметров. Транс-мембранный 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-АМС в pGlu-АМС с помощью ингибитора P150/03. Данные оценивали на основе кинетической модели Михаэлиса-Ментена, рассматривая линейное конкурентное ингибирование. Применяли следующие концентрации ингибиторов:

—▽—	0мкМ
—▲—	0,3125мкМ
—△—	0,625мкМ
—■—	1,25мкМ
—□—	2,5мкМ
—●—	5мкМ

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 $324 \pm 28 \text{ мкМ}$ и $7,4 \pm 0,2 \text{ нМ/мин}$ 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, заменяли 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 YSShisoQCI55NC351A C-His, из среды, в которой выращивали трансгенный штамм *P. pastoris*. QC очищали путем комбинации IMAC (аффинная хроматография на иммобилизованном металле, полоса 3), HIC (хроматография, основанная на гидрофобном взаимодействии, полоса 4) и обессоливания (полоса 5). Гликозилирование фермента подтверждали 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-заместителей (суррогатов), дипептидов и олигопептидов с помощью человеческой isoQC (YSShisoQCI55NC351A C-His; ср. фиг. 17), GST-hisoQC и человеческой QC. Специфичность GST-hisoQC оказалась наименьшей, далее в порядке повышения специфичности следовала YSShisoQCI55NC351A 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 мышины QC (mQC, SEQ ID NO: 79) и ее изоформа 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 рсДНК 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 мкмоль / 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 (рсДНК), изученная с помощью анализа методом Вестерн-блоттинга с использованием специфических антител либо к FLAG эпитопу (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 мышинной 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, трансмембранная спираль окрашена черным цветом, а находящая 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 QPCT 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	мышьяная 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	мышьяная 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 А
50	вещество Р
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 мышинной isoQC
69	«обратный» праймер, применяемый для клонирования кДНК мышинной isoQC
70	«прямой» праймер, применяемый для клонирования кДНК мышинной isoQC
71	«прямой» праймер для анализа мышинной QC с помощью ПЦР в реальном времени
72	«обратный» праймер для анализа мышинной QC с помощью ПЦР в реальном времени
73	«прямой» праймер для анализа мышинной QC с помощью ПЦР в реальном времени
74	«обратный» праймер для анализа мышинной QC с помощью ПЦР в реальном времени
75	«прямой» праймер для сайт-направленного мутагенеза hisoQC I55N
76	«обратный» праймер для сайт-направленного мутагенеза hisoQC I55N
77	«прямой» праймер для сайт-направленного мутагенеза hisoQC C351A
78	«обратный» праймер для сайт-направленного мутагенеза hisoQC C351A
79	белок мышинной глутаминилциклазы
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 подобию 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.expsy.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 MH позволил установить, что белок человеческой QPCTL гомологичен на уровне всей последовательности и структуры с человеческой и мышинной 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 (Hep-G2, печеночно-клеточная карцинома), кожи (HaCaT, кератиноциты) и нервной 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 20мкМ 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 не кодирующую (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 не кодирующую последовательность, например, интроны или не кодирующую последовательность на 5'- и/или 3'-конце кодирующей последовательности зрелого белка.

Таким образом, следует понимать, что понятие "полинуклеотид, кодирующий полипептид" или "нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид" относится к полинуклеотиду или нуклеиновой кислоте, который/которая включает только кодирующую последовательность зрелого белка, а также который/которая включает дополнительную кодирующую и/или не кодирующую последовательность. Понятие полинуклеотиды и нуклеиновые кислоты используют взаимозаменяемо.

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 пребелок и препребелок, 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 эпитопу, выведенному из белка гемагглютинина гриппа (Wilson I. и др., Cell, 37, 1984, с. 767), а с-мус-метка может представлять собой эпитоп 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 неконсервативных 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. Меченые олигонуклеотиды, имеющие последовательность, комплементарную последовательности гена, предлагаемого в настоящем изобретении, применяют для скрининга библиотеки 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 пиримидиновых оснований в представляющей интерес нуклеиновой 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-прайма. 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 нуклеиновой 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, который 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 сплайсинга вариант QPCTL. Примеры различных полученных в результате альтернативного сплайсинга 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 предпоч-

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 плазмиды, 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 плазмиды; фаговые ДНК; бакуловирусы; плазмиды на основе дрожжей; векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговых ДНК, вирусные ДНК, такие как вирус кори, аденовирус, вирус оспы птиц и вирус псевдобешенства. 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 последовательность(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 селективируемых 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 Боуэса; аденовирусы; 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, pNH18A, pNH46A (фирма Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (фирма Pharmacia); и эукариотические: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI, 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 селективируемые 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 мышинного металлониона-I. Выбор соответствующего вектора и промотора находится в компетенции обычного специалиста в данной области.

Компоненты экспрессионного вектора могут, как правило, представлять собой: 1) ген неомизин-фосфотрансферазы (G418) или фосфотрансферазы гигромицина В (hug) 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 I., 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 аденовирусов.

Как правило, рекомбинантные экспрессионные векторы должны включать сайты инициации репликации и селективируемые 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 направ-

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 фосфатаза 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. Необязательно 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 селективируемых 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) селективируемый 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 клеток 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 ВНК. Экспрессионные векторы млекопитающих должны содержать, как правило, сайт инициации репликации, приемлемый промотор и энхансер, а также любые необходимые сайты связывания рибосом, сайт полиаденилирования, донор и акцептор сплайсинга, последовательности терминаторов транскрипции и 5'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности. Последовательности ДНК, выведенные из сайта сплайсинга SV40, и сайты полиаденилирования можно применять для получения требуемых нетранскрибируемых 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 гидроксилпатите и хроматография на лектине. Выделение может облегчаться, если полипептид экспрессируется на поверхности клеток, но это не является необходимым условием. Может потребоваться 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 переменных 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 переменной 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 адъюванта, такого как квасцы (гидроксид алюминия) или полного или неполного адъюванта Фрейнда, или поверхностно-активных веществ, таких как лизолецитин, плурионовые полиолы, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, KLN или динитрофенол. Среди адъювантов, 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 (KLN), бычий сывороточный альбумин (БСА) или токсин 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, сс. 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 KLN, 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 субстратами 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 препаративную 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 бессмысленными относительно мРНК-транскриптов полинуклеотидов, представленных в SEQ ID NO: 2-9. Введение молекул антисмыслового полинуклеотида может блокировать производство белка, кодируемого генами QPCTL, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 2-9. Методы получения молекул антисмысловых полинуклеотидов и введение таких молекул известно в данной области. Например, молекулы антисмысловых 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 доминантных 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 экстракты, взятые у здоровых млекопитающих, предпочтительно 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, предпочтительно 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-белок.

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 QS и которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки. Другим вариантом применения этих QPCTL, который следует отметить, является скрининг ингибиторов QS, 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 экстракты 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.

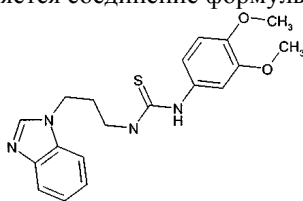
Изобретение относится также к способу скрининга избирательных QPCTL-ингибиторов, т.е. соединений, обладающих способностью ингибировать ферментативную активность по меньшей мере одного белка QPCTL, который предпочтительно выбирают из белков, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11-18; 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

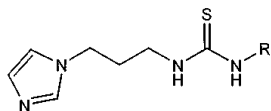
Потенциальные QPCTL-ингибиторы, которые пригодны для применения, и способы, предлагаемые в настоящем изобретении, описаны в WO 2005/075436, которая полностью включена в настоящее описание касательно структуры, синтеза и методов применения QC-ингибиторов.

В частности, приемлемым является соединение формулы 1*:



формула 1*

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

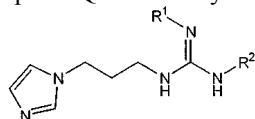


(1a)

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

Пример	R	ESI-МС (M+H)
1	метил	199,3
2	<i>трет</i> -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[b]тиофен-2-ил	392,6
33	2-(метоксикарбонил)-4- (метил)тиофен-3-ил	339,5
34	бензо[с][1,2,5]тиазол-4-ил	319,5
35	бензо[с][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,

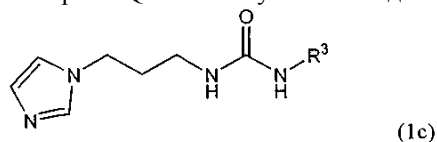


(1b)

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-(триметокси)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>трет</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-(1H-пиразол-1-ил)фенил
92	H	3,4-(диметокси)фенил
93	метил	3,4-(диметокси)фенил
94	циан	2,3,4-(триметокси)фенил
95	циан	циклогептил

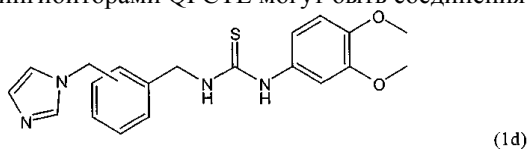
Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения формулы 1c,



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

Пример	R³	ESI-MC (M+H)
96	этил	197,3
97	6-фтор-4H-бензо[d][1,3]диоксин-8-ил	321,4
98	3-(циклопентилокси)-4-(метокси)фенил	359,4
99	4-(гептилокси)фенил	359,5
100	3,4-дигидро-2H-бензо[b][1,4]диоксипин-7-ил	317,4
101	4-(бутоксифенил	317,4
102	3,4-(диметокси)фенил	305,4

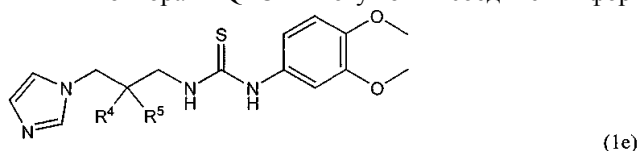
Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения формулы 1d,



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

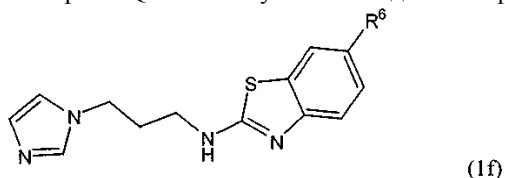
Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения формулы 1e,



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

Пример	R⁴	R⁵	ESI-MC (M+H)
106(S)	H	метил	335,5
107(R)	метил	H	335,5
108	метил	метил	349,5
109	-CH₂-CH₂-		347,5

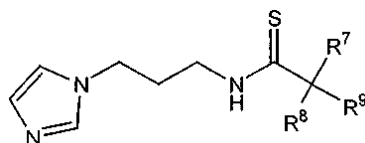
Другими приемлемыми ингибиторами QPCTL могут быть соединения формулы 1f,



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

Пример	R⁶	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,

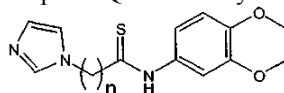


(1g)

в которой R^7 , R^8 и R^9 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	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$		334,9
122	4-(хлор)фенил	$-\text{CH}_2-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}_2-$		349,0
123	4-(метокси)фенил	$-\text{CH}_2-\text{C}_3\text{H}_6-\text{CH}_2-$		358,6
124	4-(метокси)фенил	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$		316,5
125	3,4-(диметокси)фенил	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$		346,5
126	3,4,5-(триметокси)фенил	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$		376,6
127	2,3,4-(триметокси)фенил	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$		376,6
128	2-(метокси)фенил	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$		316,5
129	3-(метокси)фенил	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$		316,5
130	2,3-(диметокси)фенил	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$		346,5
131	3,5-(диметокси)фенил	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$		346,5
132	2,5-(диметокси)фенил	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$		346,5

Другими приемлемыми ингибиторами QRCTL могут быть соединения формулы 1h,

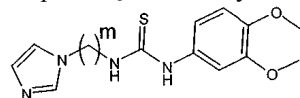


(1h)

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 QRCTL могут быть соединения формулы 1i,

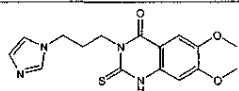
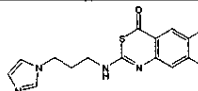
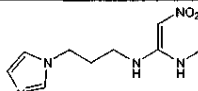
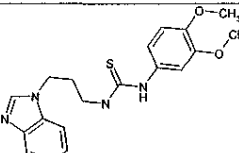


(1i)

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 QRCTL могут быть соединения, формулы которых представлены в примерах 138-141.

Пример	Структура	ESI-МС (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 РСТ 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 исследуемым соединением 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 рGlu-Абета-пептиды, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 29-32, являются существенно более гидрофобными по сравнению с 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-ABri (SEQ ID NO: 33), Glu¹-ADan (SEQ ID NO: 34) и Gln¹-гастрины (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 pylori*, 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, родственная 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 фертильности спермы.
TRH Swiss-Prot: P20396	QHP (амид)	TRH функционирует в качестве регулятора биосинтеза TSH в передней доле гипофиза и в 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 VNTPTCCLK YYEKVLPRL VVGYRKALNC HLPANFVTK RNREVCTNPN DDWVQEYIKD PNLPLLPTRN LSTVKHTAK NGQPQLLSQ	Обладает хемотаксической активностью для лимфоцитов и моноцитов, но не для нейтрофилов. Проявляет также высокую миелосупрессорную активность, подавляет пролиферацию миелоидных клеток-предшественников. Рекомбинантный SCYA16 обладает хемотаксической активностью для моноцитов и THP-1-моноцитов, но не для покоящихся лимфоцитов и нейтрофилов. Индуцирует поток кальция в THP-1-клетках, которые предварительно десенсибилизированы посредством предыдущей экспрессии RANTES.
CCL8 (малый индуцибельный цитокин A8) Swiss-Prot: P80075	QPDSVSI PITCCFNVIN RKIPQRLES YTRITNIQCP KEAVIFKTKR GKEVCADPKE RWVRDSMKHL DQIFQNLKP	Хемотаксический фактор, привлекающий моноциты, лимфоциты, базофилы и эозинофилы. Может играть роль в неоплазии и воспалительных реакциях хозяина. Этот белок может связывать гепарин.
CCL2 (малый индуцибельный цитокин A2) Swiss-Prot: P13500	QPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTKR AKEICADPKQ KWVQDSMDHL DKQTQTPKT	Хемотаксический фактор, привлекающий моноциты и базофилы, но не нейтрофилы или эозинофилы. Повышает противоопухолевую активность моноцитов. Участвует в патогенезе заболеваний, характеризующихся инфильтрацией моноцитов, таких как псориаз, ревматоидный артрит или атеросклероз. Может участвовать в рекрутменте моноцитов в стенке артерий в процессе развития атеросклероза. Связывается с CCR2 и CCR4.
CCL18 (малый индуцибельный цитокин A18) Swiss-Prot: P55774	QVGTKELC CLVYTSWQIP QKFIVDYSET SPQCPKPGVI LLTKRGRQIC ADPNKKWVQK YISDLKLNA	Хемотаксический фактор, привлекающий лимфоциты, но не моноциты 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 лимфатических узлах, обладает хемотаксической активностью для нестимулированных Т-клеток, CD4+ и CD8+ Т-клеток и поэтому может играть роль, как в гуморальных, так и в клеточно-опосредуемых иммунных ответах.

фракталкин (нейротактин) Swiss-Prot: P78423	QHNGVT KCNITCSKMT SKIPVALLIH YQQNQASCGK RAIILETRQH RLFCADPKEQ WVKDAMQHLD RQAAALTRNG GTFEKQIGEV KPRITPAAGG MDESVVLEPE ATGESSLEP TPSSQEAQRA LGTSPCLPTG VTGSSGTRLP PTPKAQDGGP VGTELFRVPP VSTAATWQSS APHQPGPSLW AEAKTSEAPS TQDPSTQAST ASSPAPEENA PSEGQRVWGQ GQSPRPENSL EREEMGPVPA HTDAFQDWGP GSMHVSVP VSSEGTPSRE PVASGSWTPK AEEPIHATMD PQLGLVLT VPDAQAATRR QAVGLLAFLG LLFCLGVAMF TYQSLQGCP KMAGEMAEGE RYIPRSCGSN SYVLVPV	Растворимая форма является хемотаксической для Т-клеток и моноцитов, 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 индуцибельный цитокин A7) Swiss-Prot: P80098	QPVGIN TSTCCYRFIN KKIPKQRLS YRRTTSSHCP REAVIFKTKL DKEICADPTQ KWVQDFMKHL DKKTQTPKL	Хемотаксический фактор, привлекающий моноциты и эозинофилы, но не нейтрофилы. Усиливает противоопухолевую активность моноцитов. Индуцирует также высвобождение желатиназы В. 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. Орехсин-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-гастрины), возможно, представляют собой факторы роста; их продукты, амидированные гастрины, регулируют пролиферацию эпителиальных клеток, дифференцировку продуцирующих кислоту париетальных клеток и секретирующих гистамин энтерохромаффиноцит-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, сс. 315-324).

Известно, что пептидный гормон гастрин, который выделяется из антральных G-клеток, стимулирует синтез и высвобождение гистамина из ECL-клеток в кислородпродуцирующую слизистую через CCK-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 процессированных форм (прогастрин и удлиненный глицином гастрин), также является фактором роста в желудочно-кишечном тракте. Было установлено, что основное трофическое действие амидированного гастрин связано с кислородпродуцирующей 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 процессированного гастрин (например, удлиненного глицином гастрин), вероятно, является слизистая оболочка ободочной кишки (Koh T.J. и Chen D., Regul Pept 93, 2000, сс. 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 секретирующих гистамин энтерохромаффиноцит-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 поддержания или повышения концентрации активного pGlu¹-гастрин (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-гастрин (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 антипсихотических лекарственных средств. Известны также данные, которые подтверждают роль НТ-систем в механизме действия антипсихотических лекарственных средств. Поведенческие и биохимические реакции при введении НТ в центральную нервную систему очень сходны с реакциями на системное введение антипсихотических лекарственных средств, и антипсихотические лекарственные средства повышают нейротрансмиссию НТ. Совокупность этих данных привела к гипотезе о том, что НТ функционирует в качестве эндогенного антипсихотического агента. Кроме того, обычные и атипичные антипсихотические лекарственные средства по-разному изменяют нейротрансмиссию НТ в области черного тела и в мезолимбических допаминсодержащих конечных областях, и эти эффекты обуславливают способность вызывать побочные действия и эффективность соответственно (Binder E. B. и др., Biol Psychiatry, 50, 2001, сс. 856-872).

Таким образом, настоящее изобретение относится к применению повышающих активность эффекторов QPCTL для приготовления антипсихотических 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 фертильности спермы. В частности, FPP прежде всего стимулирует "включение" неспособных к оплодотворению (неактивных) сперматозоидов и существенно быстрее делает их фертильными, 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 транскрипции сигнала аденилил-циклазы (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 фертильность путем стимуляции и затем поддержания способности к оплодотворению. Любое уменьшение доступности FPP, аденозина, кальцитонина и ангиотензина II или дефекты в их рецепторах приводят к развиту мужского бесплодия (Fraser L.R. и Adeoya-Osiguwa S. A., Vitam Horm 63, 2001, сс. 1-28).

Следующим вариантом осуществления настоящего изобретения является применение ингибиторов QPCTL для предотвращения препятствующих оплодотворению лекарственных средств и/или для снижения фертильности 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 фертильность 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 миелоидных 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 аминокислотная и гамма-карбоксильная группа глутаминовых кислот, а также аминокислотная 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 экспонированного 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 меланоме происходит также сверхэкспрессия глутаминилциклазы (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 А (SEQ ID NO: 49) был идентифицирован в качестве физиологического субстрата QPCTL. Орехсин А представляет собой нейропептид, который играет важную роль в регуляции всасывания пищи и нарушении сна, вероятно, в результате координирования 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 полиглутаминина 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: эндолитическое расщепление связи глутаминил-глутаминил с последующим образованием пироглутамата может принимать участие в патогенезе в результате повышения катаболической стабильности, гидрофобности, амилоидогенности и нейротоксичности полиглутаминильных 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 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 печеночноклеточной карциномы Hep-G2 культивировали в соответствующих средах для клеточных культур (DMEM, 10% ФБС для Cos-7, SH-SY5Y, LN405, HaCaT), (RPMI 1640, 10% ФБС для Hep-G2), в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂ (HaCaT, Hep-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 Hep-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 Herculanase Enhanced (фирма Stratagene), используя праймеры isoQCh-1 (смысловый, SEQ ID NO: 53) и isoQCh-2 (антисмысловый, SEQ ID NO: 54). ПЦР-продукт Hep-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 Hep-G2 (фиг. 6, полоса 4). ПЦР-

продукт подтверждали секвенированием.

Выделение человеческой isoQC

Полноразмерную кДНК человеческой isoQC выделяли из клеток линии Hep-G2 с помощью ОТ-ПЦР. В целом, метод состоял в следующем: общую РНК клеток Hep-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 Herculanase Enhanced (фирма Stratagene), используя праймеры isoQChu-1 (смысловый, SEQ ID NO: 55) и isoQChu-2 (антисмысловый, SEQ ID NO: 56). Образовавшийся ПЦР-продукт субклонировали в вектор pPCRScript CAM SK (+) (фирма Stratagene) и подтверждали 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 подтверждали 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 (смысловый) (SEQ ID NO: 85) и EGFP-2 (антисмысловый) (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 (смысловый, SEQ ID NO: 57) и hisoQC SS EGFP pcDNA (антисмысловый) (SEQ ID NO: 87) для N-концевого фрагмента hisoQC, начинающегося с метионина I, и isoQC EGFP-2 Met II (смысловый, SEQ ID NO: 58) и hisoQC SS EGFP pcDNA (антисмысловый) (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 (смысловый) (SEQ ID NO: 82) и hQC-2 (антисмысловый) (SEQ ID NO: 83) для hQC, isoQC EGFP-1 Met I (смысловый) (SEQ ID NO: 57) и hisoQC pcDNA (антисмысловый) (SEQ ID NO: 84) для белка hisoQC, начинающегося с метионина I, и isoQC EGFP-2 Met II (смысловый) (SEQ ID NO: 58) и hisoQC pcDNA (антисмысловый) (SEQ ID NO: 84) для белка hisoQC, начинающегося с метионина II.

Процедура клонирования меченных с помощью FLAG hisoQC и hQC

Человеческую QC клонировали с C-концевой FLAG-меткой после амплификации с использованием праймеров hQC-1 (смысловый) (SEQ ID NO: 82) и hQC C-FLAG pcDNA (антисмысловый) (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 (смысловый) (SEQ ID NO: 57) и hisoQC C-FLAG pcDNA (антисмысловый) (SEQ ID NO: 89) для белка hisoQC, начинающегося с метионина I, и праймеров isoQC EGFP-2 Met II (смысловый) (SEQ ID NO: 58) и hisoQC C-FLAG pcDNA (антисмысловый) (SEQ ID NO: 89) для белка hisoQC, начинающегося с метионина II.

Пример 3. Иммуногистохимическое 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 липофектаминосом 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-3ФР (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-3ФР 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-3ФР, в течение 3 ч. Для окрашивания митохондрий в клетках COS-7 и LN405 клетки инкубировали с мышинным моноклональным антителом к человеческим митохондриям (фирма Chemicon), используя антитело в разведении 1:100 в D-3ФР, в течение 3 ч при комнатной температуре. Затем клетки отмывали трижды в D-3ФР в течение 10 мин. Клетки с окрашенной зоной комплекса Гольджи инкубировали с используемым в качестве вторичного антитела козым антикроличьим IgG, конъюгированным 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 козым антимышиным IgG, конъюгированным с красителем Rhodamin-RedX (фирма Dianova), в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте. Затем клетки отмывали трижды D-3ФР в течение 5 мин при комнатной температуре и в завершение наносили на покровные стекла, которые помещали на предметные стекла для микроскопа, используя заливочную среду CitiFluor. 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: человеческого 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: человеческого isoQC-EGFP, начинающегося с метионина I и метионина II, в клетках линии LN405, экспрессия слитого белка: человеческого 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: человеческого 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: человеческого 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: человеческого 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: человеческого 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)). Среда, необходимая для *E. coli*, т.е. среду Лурия-Бертани (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 C-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 Брэдфорда. 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 глутаминилциклазной 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 глутаминилциклазу. Активность QC определяли из стандартной кривой для β-нафтиламина 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 глутаминилциклазу. 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 ингибирования

При анализе ингибирования состав образца соответствовал описанному выше, за исключением того, что в него добавляли предполагаемый ингибитор. Для быстрой оценки ингибирования QC использовали образцы, содержащие 4мМ соответствующий ингибитор и субстрат в концентрации, соответствующей 1 K_M. Для более детального исследования ингибирования 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 ингибирование QC. Константу ингибирования определяли путем аппроксимации набора характеризующих процесс кривых с помощью общего уравнения для конкурентного ингибирования 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 глутаминильным 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 ингибировалась 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 значениях 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 (hisoQCdt) или *P. pastoris* (YSShisoQC). Субстраты обозначены с помощью однобуквенного кода аминокислот

Субстрат	K_M (мМ) hisoQCdt	K_M (мМ) YSShisoQC	k_{cat} (c^{-1}) hisoQCdt	k_{cat} (c^{-1}) YSShisoQC	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} \times c^{-1}$) hisoQCdt	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} \times c^{-1}$) 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' \rightarrow 3'	Применение
isoQCh-1 (SEQ ID NO: 53)	GGTCTACACCATTTGGAGCGGCTGGC	Скрининг клеточных линий
isoQCh-2 (SEQ ID NO: 54)	GGGTTGGAAGTACATCACTTCCTGGGG	Скрининг клеточных линий

isoQChu-1 (SEQ ID NO: 55)	ACCATGCGTTCCGGGGGCCGCGGG	Выделение hisoQC
isoQChu-2 (SEQ ID NO: 56)	ACGCTAGAGCCCCAGGTATTCAGCCAG	Выделение hisoQC
isoQC EGFP-1 Met I (SEQ ID NO: 57)	ATATATGAATTCATGCGTTCCGGGGGCCG	Клонирование человеческой isoQC (Met I) в векторе pEGFP-N3
isoQC EGFP-2 Met II (SEQ ID NO: 58)	ATATATGAATTCATGGAGCCACTCTTGCCGCCG	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 GACAAGTTCTACACCATTTGGAGCG	Клонирование человеческой isoQC в векторе pET41a
hisoQC pET41a-2 (SEQ ID NO: 61)	TATAGAATTCCTAGTGATGGT 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 pPICZαA
hisoQC HIS N- Term pPICZAA-1 (SEQ ID NO: 63)	ATA TGA ATT CCA TCA CCA TCA CCA TTT CTA CAC CAT TTG GAG CGG C	Клонирование человеческой isoQC в векторе pPICZαA
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 pPICZαA
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 pPICZαA
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 мышинной isoQC
isoQcm MetI as (SEQ ID NO: 69)	CTA GAG TCC CAG GTA CTC	Клонирование кДНК мышинной isoQC
isoQcm kurz s (SEQ ID NO: 70)	AGT TCC TGC CCC TGC TGC TG	Клонирование кДНК мышинной 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 GGC CAA GTT GTG TAC CGT	Сайтнаправленный мутагенез hisoQC C351A
hQC-1 (SEQ ID NO: 82)	ATATATAAGCTTATGGCAGGCGGAAGACAC	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)	ATATATGCGGCCGCTAGAGCCCCAGGTATTCAGC	Амплификация hisoQC, включая стоп-кодон для инсерции в pcDNA 3.1
EGFP-1 (SEQ ID NO: 85)	ATATCTCGAGTCCATCGCCACCATGGTGAGC	Амплификация EGFP
EGFP-2 (SEQ ID NO: 86)	ATATCTCGAGTTACTTGTACA GCTCGTCCAT	Амплификация EGFP
hisoQC SS EGFP pcDNA as (SEQ ID NO: 87)	ATATGCGGCCGCGATGTCGACGCTCCAAATGGTGTAGAACGC	Амплификация N-концевой последовательности hisoQC
hQC C-FLAG pcDNA as (SEQ ID NO: 88)	ATATGCGGCCGCTTACTTGTATCGTCATCCTTGTAAATC CAAATGAAGATATTCCAA	Амплификация hQC C-FLAG
hisoQC C-FLAG pcDNA as (SEQ ID NO: 89)	ATATGCGGCCGCTTACTTGTATCGTCATCCTTGTAAATCGAGCCCCAGGTATTCAGC	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)	TCACCTGCTGCTTTAACGTG ATCCCTGACCCATCTCTCCT	qПЦР CCL8
CCL13-F (SEQ ID NO: 96) CCL13-R (SEQ ID NO: 97)	ATCTCCTTGACAGAGGCTGAA AGAAGAGGAGGCCAGAGGAG	qПЦР CCL13
HIF1 α -F (SEQ ID NO: 98) HIF1 α -R (SEQ ID NO: 99)	CACAGAAATGGCCTTGTGAA CCAAGCAGGTCATAGGTGGT	qПЦР HIF1 α
AIM1-F (SEQ ID NO:100) AIM1-R (SEQ ID NO:101)	TCCTTTCATCCTGGAACCTG CGCCTCTTCTGTTTCACCTC	qПЦР AIM1
AIM2-F (SEQ ID NO:102) AIM2-R (SEQ ID NO:103)	AAGCGCTGTTTGCCAGTTAT CACACGTGAGGCGCTATTTA	qПЦР AIM2
MAGEA1-F (SEQ ID NO:104) MAGEA1-R (SEQ ID NO:105)	GTCAACAGATCCTCCCCAGA CAGCATTTCTGCCTTTGTGA	qПЦР MAGEA1
MAGEA2-F (SEQ ID NO:106) MAGEA2-R (SEQ ID NO:107)	AGGTGGAGAGCCTGAGGAAT CTCGGGTCCTACTTGTGAGC	qПЦР MAGEA2
MAGEA10-F (SEQ ID NO:108) MAGEA10-R (SEQ ID NO:109)	AAGCGAGGTTCTCGTTCTGA TGACCTCTTGCTCTCCCTGT	qПЦР MAGEA10
MAGEB2-F (SEQ ID NO:110) MAGEB2-R (SEQ ID NO:111)	CTTCAAGCTCTCCTGCTGCT CGACCTGACTTCCTGGTTA	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)	ATGCTTCGGAAACTGGACAT ATGGTTCGATGCAGCTTTCT	qПЦР MCL1
TYR-F (SEQ ID NO:116) TYR-R (SEQ ID NO:117)	TACGGCGTAATCCTGGAAAC ATTGTGCATGCTGCTTTGAG	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)	GGTTCCTTTCTCCCTCCAG AACCAAAGCCACCACTGTTTC	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 (EBA)	GST-метка AC	GF (обессоливание)	IEX (UNO S)
Тип колонки (фирма Amersham Biosciences AB, Швеция)	хелатирующая сефароза Fast Flow	глутатион сефароза 4 Fast Flow	сефадекс 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	3ФР	3ФР	25мМ Mes	25мМ Mes
pH	7,3	7,3	6,0	6,0
Объем	10CV	10CV	10CV	10CV
Промежуточный буфер (буфер для отмывки)	3ФР, 0,5мМ гистидин	3ФР	-	25мМ Mes
pH	7,3	7,3	-	6,0
Объем	10CV	10CV	-	10CV
Буфер для элюции	3ФР, 100мМ гистидин	50мМ Трис, 10мМ глутатион (восстановленный)	25мМ Mes	25мМ Mes, элюция в градиенте NaCl
pH	7,3	8,0	6,0	6,0
Объем	1,5 CV	«обратный» поток	1 CV	CV

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

Ингибитор	K _i (мкМ) hisQCdt	K _i (мкМ) YSShisQC	K _i (мкМ) 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-метиylimидазол	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)). Среда, необходимые для *E. coli*, т.е. среду Лурия-Бертани (LB) получали согласно рекомендациям производителя. Среда, 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 hisQC HIS C-Term pPICZAA-1 (SEQ ID NO: 62) или hisQC HIS N-Term pPICZAA-1 (SEQ ID NO: 63) в качестве смысловых праймеров и hisQC HIS N-Term pPICZAA-2 (SEQ ID NO: 64) и hisQC 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 ВМГУ. После этого дрожжи центрифугировали и ресуспендировали в 2 мл среды ВММУ, 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 (YSSHisoQCN55IC351A 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 сефароза Fast Flow	бутил-сефароза 4Fast Flow	сефадекс 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	50мМ NaH ₂ PO ₄	30мМ NaH ₂ PO ₄ 1М (NH ₄) ₂ SO ₄	50мМ бис-Трис 100мМ NaCl
pH	7,0	7,0	6,8
Объем	10CV	10CV	10CV
Промежуточный буфер (для отмывки)	50мМ NaH ₂ PO ₄ 0,5мМ гистидин	30мМ NaH ₂ PO ₄ 1М (NH ₄) ₂ SO ₄	-
pH	7,0	7,0	
Объем	10CV	6CV	
Буфер для элюции	50мМ NaH ₂ PO ₄ 100мМ гистидин	30мМ NaH ₂ PO ₄	50мМ бис-Трис 100мМ NaCl
pH	7,0	7,0	6,8
Объем	1,5 CV	5 CV	1CV

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 YSSHisoQCN55IC351A C-His и YSSHisoQCN55I C-His. Поскольку конструкция YSSHisoQCN55IC351A 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 фермента.

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 7мкМ, 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 зависимость от значения pH (измеренный) кинетический параметр, $k_{cat}/K_M(\text{предел})$ обозначает независимое 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 диссоциирующие группы, позволил получить 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 вызваны структурными изменениями, имеющими место при катализе с помощью isoQC (вызванные подгонкой), которые влияют на зависимость от pH.

Пример 8. Изучение глутамилциклазной 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 $\beta(3-11)$ [pGlu- $\text{A}\beta(3-11)$] из $\text{A}\beta(3-11)$. Реакционные смеси содержали 20 мкл субстрата ($\text{A}\beta(3-11)$), 2,5 мМ маточный раствор в 50 мМ 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 мМ 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-масс-спектрометрии. 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 (YSShisoQCI55NC351A 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 глутаминильных субстратов, обнаружены также при использовании глутаминильных 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 мышинной isoQC.

Оценивали распределение в тканях мышинной QC и мышинной isoQC с использованием количественной ПЦР в реальном времени. Перед анализом кДНК из нескольких различных органов и тканей открытую рамку считывания мышинной 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 мышинной 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 характеристики 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 термоячейки "Light Cycler" (фирма Corbett research), используя набор "QuantiTect SYBR Green PCR" (фирма Qiagen). Для количественной оценки применяли ДНК-стандарт (клонированная кДНК мышинной isoQC). Количество копий рассчитывали согласно следующему уравнению: $(X^T/\text{мкл ДНК})/(\text{длина плазмиды в парах нуклеотидов} \times 660) \times 6,022 \times 10^{23} = Y^{\text{молекул}}/\text{мкл}$. ДНК-стандарт применяли в 4 концентрациях в диапазоне 10^7 - 10^1 молекул/мкл и предельной концентрации (10^0). Протокол реакции приведен в табл. 8. Результаты представлены на фиг. 24.

Для амплификации мышинной 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-циклы		
Стадия	Т в °C	t в с
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, мышьяная QC и мышьяная isoQC экспрессировались во всех изученных органах. По сравнению с мышьяной QC различия в экспрессии мышьяной 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 дипиколоиновая кислота (6,9). Аналогично этому hisoQC также ингибировалась в зависимости от времени гетероциклическими хелаторами 1,10-фенантролином (фиг. 25) и дипиколоиновой 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 мышьяная 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 НЕК293-клетки, в которых проходила экспрессия, отмывали D-3ФР и собирали центрифугированием при 500×g в течение 5 мин при 4°C. Затем D-3ФР 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 мембраны тяжелой фракции (НМ) 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 мкл буфера для расщепления и обозначили его как мембраны легкой фракции (LM). Супернатант обозначили как растворимая фракция (S). Дебрис, тяжелую мембранную и легкую мембранную 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 НЕК293-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 мембранах тяжелой фракции (MetI: 40 ± 2 мкмоль/мин/г; MetII: 36 ± 1,5 мкмоль/мин/г) и в среде (MetI: 30 ± 2 мкмоль/мин/г; MetII: 54 ± 3 мкмоль/мин/г). В отличие от этого, при оценке hQC ус-

тановлено, что наиболее высокая удельная QC-активность присутствует в среде (1339 ± 76 мкмоль/мин/г), далее в порядке убывания следуют мембраны 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 мембранах 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; мембраны 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 С-концевую FLAG-метку (фиг. 26В). Анализ методом Вестерн-блоттинга образовавшихся меченных 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 мембранах тяжелой фракции, в то время как наиболее высокое содержание hQC обнаружено в среде, но также этот фермент обнаружен в дебрисе и мембранах тяжелой фракции. Визуализация маркерных белков комплекса Гольджи (ST1GAL3) и митохондрий показала присутствие этих компартментов в дебрисе и мембранах 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 трансмембранная спираль ответственна за сохранение hisoQC в комплексе Гольджи, сигнальные пептиды, начинающиеся на MetI и MetII, включая трансмембранную 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 мембраны эндоплазматического ретикула (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 трансмембранная 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 трансмембранном 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 трансмембранному белку типа II, для которого 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 (2,5mM 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:

$$(X^{\frac{1}{n}}_{\text{ДНК}})/(\text{длина плазмиды в парах нуклеотидов} \times 660) \times 6,022 \times 10^{23} = Y^{\text{молекул}}_{\text{мкл}}$$

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 А и В), MART1 (антиген меланом, распознаваемый Т-клетками), TYR (тирозидаза), TYRP1 и TYRP2 (родственный тирозиназе 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 РНК). 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 опухолевых 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 суспензии. 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 суспензионных 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
липополисахарид (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 \pm 18928	3206 \pm 855
FTC-133 (8 образцов)	24790 \pm 7605	10262 \pm 1899
THP-1 (8 образцов)	3588 \pm 853	6725 \pm 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. Количества 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, возникал 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.

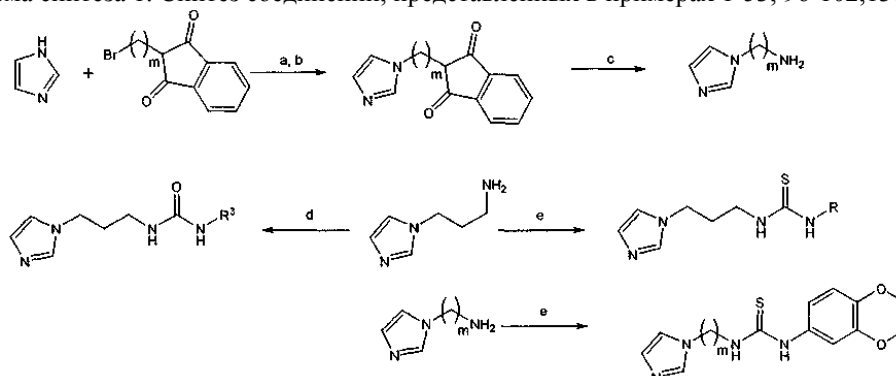
Обработка LPS и TNF- α приводила к заметной индукции всех изученных хемокинов и QPCT в клетках THP-1. TGF- β оказался менее эффективным в качестве стимула и индуцировал экспрессию QPCT, CCL2, CCL7 и CCL8 максимум в 2 раза. CCL13 подавлялся при стимуляции TGF-P (фиг. 38).

Стимуляция экспрессии QPCT и ОРСТL 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 1 α (HIF1 α) подавлялся на 15% (фиг. 39A) и 45% (фиг. 39B). Эти данные позволяют предположить связь QPCTL с гипоксией.

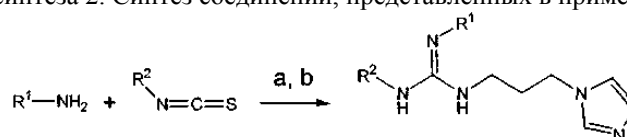
Синтез ингибиторов

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



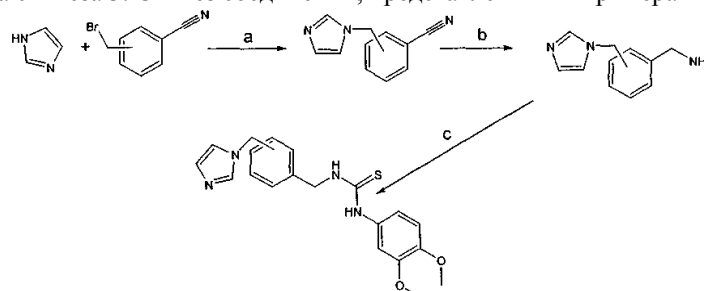
Реагенты и условия: (а) NaH, ДМФ, 4 ч, КТ.; (б), 8 ч, 100°C; (в) H₂N-NH₂, EtOH, 8 ч, кипячение с обратным холодильником, затем 4н. HCl, 6 ч, кипячение с обратным холодильником; (г) R³-NCO, EtOH, 6 ч, кипячение с обратным холодильником; (д) 3,4 диметоксифенилизотиоцианат.

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



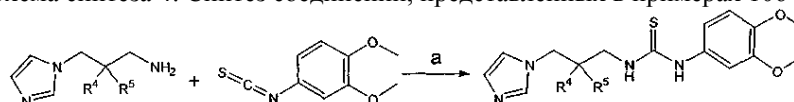
Реагенты и условия: (а) R-NCS, EtOH, 6 ч, кипячение с обратным холодильником; (б) водорастворимый карбодиимид (ВРКД), 1Н-имидазол-1-пропанамин, ДМФ, 2 ч, КТ.

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



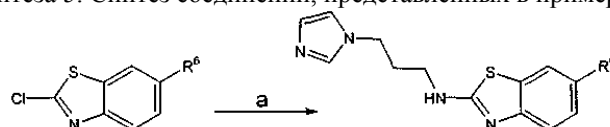
Реагенты и условия: (а) NaH, ДМФ, КТ., 3 ч; (б) LiAlH₄, диоксан, кипячение с обратным холодильником, 1 ч; (в) R-NCS, EtOH, кипячение с обратным холодильником 6 ч.

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



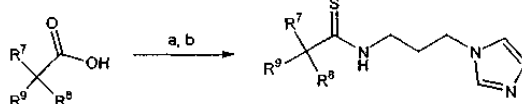
Реагенты и условия: (а) EtOH, 2 ч, кипячение с обратным холодильником.

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



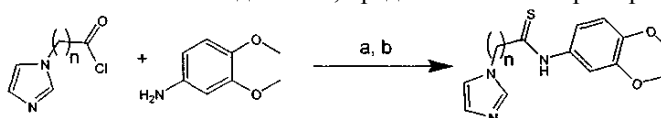
Реагенты и условия: (а) 1Н-имидазол-1-пропанамин, триэтиламин, толуол, 12 ч, кипячение с обратным холодильником.

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



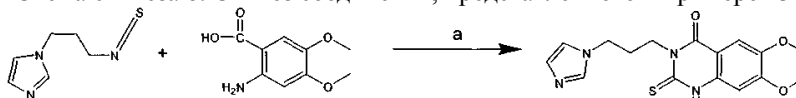
Реагенты и условия: (а) CAIBE, 1H-имидазол-1-пропанамин, диоксан, 0°C, 12 ч; (б) реагент Лавессона, EtOH, кипячение с обратным холодильником, 8 ч.

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



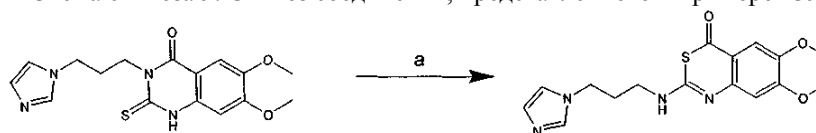
Реагенты и условия: (а) хлорангидрид 1H-имидазол-1-пропана, CH₂Cl₂, -10°C, 1 ч; (б) реагент Лавессона, диоксан, кипячение с обратным холодильником, 8 ч.

Схема синтеза 8. Синтез соединения, представленного в примере 138



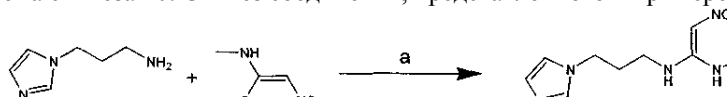
Реагенты и условия: (а) EtOH, кипячение с обратным холодильником, 8 ч.

Схема синтеза 9. Синтез соединения, представленного в примере 139



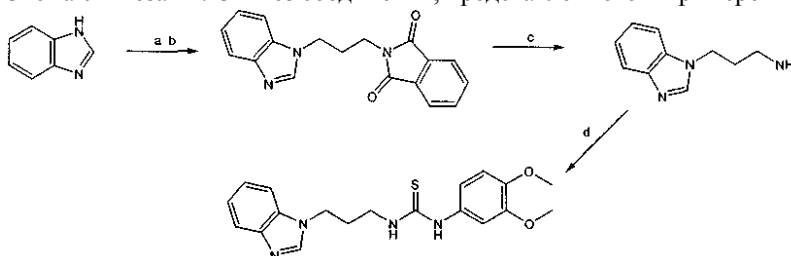
Реагенты и условия: (а) 75% конц. H₂SO₄, 4 ч.

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) NaN, 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) 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 ДМСО-D₆ в качестве растворителя. Химические сдвиги выражали в частях на миллион (част./млн) относительно обработки тетраметилсианом. 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.

1H-Имидазол-1-пропанамин подвергали взаимодействию с соответствующим изотиоцианатом в этаноле при температуре дефлегмации в течение 8 ч. Затем растворитель удаляли и оставшееся масло растворяли в метилхлориде. Органический слой промывали дважды насыщенным раствором NaHCO₃, а затем NaHSO₄ и соляным раствором, сушили и упаривали.

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

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

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

Выход: 0,66 г (51,3%); $t_{пл}$: 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.

1H-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 мочевины, выход 85-90%.

Примеры 136, 137.

1H-Имидазол-1-алкиламины получали с помощью известных из литературы методов из ω-бромалкилфталимидов 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 1H-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 брометилфенилцианидом в ДМФ, используя 1 эквивалент NaNH, в течение 3 ч при КТ, получая 1H-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.

1H-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.

1H-Имидазол-1-пропанамин подвергали взаимодействию с соответствующей 2-фенилуксусной кислотой в безводном диоксане путем добавления эквивалента CAIBE и N-метилморфолина 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-(1H-Имидазол-1-ил)пропил)-2-(3,4-диметоксифенил)этанттиоамид.

Смесь, содержащую 4,0 ммоль триэтиламина и 4,0 ммоль 3-(1H-имидазол-1-ил)алкил-1-амин 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 Harrison 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); МС m/z 320,2 (M+H), 252,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 125. N-(3-(1H-Имидазол-1-ил)пропил)-1-(3,4-диметоксифенил)циклопропанкарботиоамид.

11,06 ммоль 3,4-диметоксифенилацетонитрила, 34,8 ммоль 2-бром-1-хлорэтанола и 1,16 ммоль гидрхлорида триэтилбензиламмония растворяли в 10 мл водного раствора КОН (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)циклопропанкарбонитрила. 3,9 ммоль 1-(3,4-диметоксифенил)циклопропанкарбонитрила и 11,2 ммоль КОН 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 эфиром. После доведения значения pH до 4-5 с помощью HCl (1н.) водный слой экстрагировали трижды простым эфиром, затем объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄ и растворитель удаляли, получая 0,81 г (93,5%) 1-(3,4-диметоксифенил)циклопропанкарбоновой кислоты.

3,44 ммоль 1-(3,4-диметоксифенил)циклопропанкарбоновой кислоты, 3,5 ммоль N-метилморфолина и 3,5 ммоль изобутилхлормиата растворяли в безводном тетрагидрофуране перемешивали в течение 15 мин при -15°C. Затем добавляли 3,5 ммоль 3-(1H-имидазол-1-ил)алкил-1-амин 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-(1H-имидазол-1-ил)пропил)-1-(3,4-диметоксифенил)циклопропанкарбоксамид.

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); МС 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-(1H-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); МС m/z 199,1 (M+H), 221,3 (M+Na), 131,0 (M-C₃H₃N₂•)

Пример 2. 1-(3-(1H-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); МС m/z 241,1 (M+H), 173,1 (M-C₃H₃N₂).

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

$t_{пл}$: 127,0-128,0°C.

1H -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); МС m/z 275,3 (M+H), 207,1 (M-C₃H₃N₂•).

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

$t_{пл}$: 166,5-167,0°C.

1H -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); МС m/z 261,1 (M+H), 193,2 (M-C₃H₃N₂•).

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

$t_{пл}$: 147,0-148,0°C.

1H -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); МС m/z 279,3 (M+H), 211,2 (M-C₃H₃N₂•).

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

$t_{пл}$: 100,0- 100,5°C.

1H -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); МС m/z 289,3 (M+H), 221,1 (M-C₃H₃N₂•).

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

$t_{пл}$: 154,5-155,0°C.

1H -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); МС m/z 329,3 (M+H), 261,2 (M-C₃H₃N₂•).

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

$t_{пл}$: 170,0-171,0°C.

1H -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); МС m/z 303,2 (M+H), 235,1 (M-C₃H₃N₂•).

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

$t_{пл}$: 125,0-125,5°C.

1H -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); МС m/z 291,1 (M+H), 223,2 (M-C₃H₃N₂).

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

$t_{пл}$: 120,0-120,5°C.

1H -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); МС m/z 321,2 (M+H), 253,3 (M-C₃H₃N₂•).

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

$t_{пл}$: 142,0 -143,0°C.

1H -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); МС m/z 321,2 (M+H), 253,3 (M-C₃H₃N₂•).

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

$t_{пл}$: 103,0-103,5°C.

1H -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); МС m/z 319,3 (M+H), 251,3 (M-C₃H₃N₂•).

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

$t_{пл}$: 115,0-115,6°C.

1H -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); МС m/z 305,2 (M+H), 237,2 (M-C₃H₃N₂•).

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

$t_{пл}$: 124,5-125,5°C.

1H -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); МС m/z 351,3 (M+H), 283,2 (M-C₃H₃N₂•).

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

$t_{пл}$: 89,5-90,0°C.

1H -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); МС m/z 291,1 (M+H), 223,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 27. 1-(3-(1H-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); МС m/z 305,2 (M+H), 237,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 33. 1-(3-(1H-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); МС m/z 307,2 (M+H), 239,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 42. 1-(3-(1H-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); МС m/z 306,2 (M+H), 237,9 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 50. 1-(3-(1H-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); МС m/z 304,2 (M+H), 236,0 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 102. 1-(3-(1H-Имидазол-1-ил)пропил)-3-(3,4-диметоксифенил)мочевина.

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); МС m/z 321,2 (M+H), 253,3 (M-C₃H₃N₂).

Пример 106. 1-((S)-3-(1H-Имидазол-1-ил)-2-метилпропил)-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); МС m/z 335,6 (M+H), 267,1 (M-C₃H₃N₂).

Пример 107. 1-((R)-3-(1H-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); МС m/z 335,4 (M+H), 267,2 (M-C₃H₃N₂).

Пример 109. 1-((1-((1H-Имидазол-1-ил)метил)циклопропил)метил)-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); МС m/z 347,2 (M+H), 279,2 (M-C₃H₃N₂), 137,5 (M-C₉H₁₃N₄S).

Пример 110. N-(3-(1H-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); МС m/z 259,4 (M+H), 191,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 111. N-(3-(1H-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); МС m/z 293,3 (M+H), 225,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 112. N-(3-(1H-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); МС m/z 289,1 (M+H), 221,4 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 115. (R)-N-(3-(1H-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); МС m/z 274,4 (M+H), 206,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 116. (S)-N-(3-(1H-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); МС m/z 274,4 (M+H), 206,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 121. N-(3-(1H-Имидазол-1-ил)пропил)-1-(4-хлорфенил)циклобутанкарботиоамид.

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); МС m/z

334,3 (M+H), 266,1 (M-C₃H₃N₂).

Пример 122. N-(3-(1H-Имидазол-1-ил)пропил)-1-(4-хлорфенил)циклопентанкарботиоамид.

*t*_{пл}: 140,0-141,0°C.

¹H-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); МС m/z 348,2 (M+H), 280,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 123. N-(3-(1H-Имидазол-1-ил)пропил)-1-(4-метоксифенил)циклогексанкарботиоамид.

*t*_{пл}: 162,5-164,0°C.

¹H-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); МС m/z 358,3 (M+H), 290,3 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 124. N-(3-(1H-Имидазол-1-ил)пропил)-1-(4-метоксифенил)циклопропанкарботиоамид.

*t*_{пл}: 129,0-129,5°C.

¹H-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); МС m/z 316,0 (M+H), 248,4 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 134. 5-(1H-Имидазол-1-ил)-N-(3,4-диметоксифенил)пентантиоамид.

*t*_{пл}: 128,0-128,5°C.

¹H-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); МС m/z 320,2 (M+H), 252,2 (M-C₃H₃N₂•).

Пример 136. 1-(2-(1H-Имидазол-1-ил)этил)-3-(3,4-диметоксифенил)тиомочевина.

*t*_{пл}: 157,5-159,0°C.

¹H-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); МС m/z 307,2 (M+H), 239,1 (M-C₃H₃N₂•).

Сокращения

°C - градус Цельсия;

А, Ala - аланин;

Аβ - амилоидный-β-пептид;

ABg1 - амилоидный пептид, обнаруженный при семейной британской деменции;

АС - аденилилциклаза;

ADan - амилоидный пептид, обнаруженный при семейной датской деменции;

AIM - отсутствует в меланоме;

АМС - аминотетилкумарин;

as - антисмысловый;

Asp - аспарат;

βNA - бета-нафтиламин;

ВА - масляная кислота;

bp - пара оснований;

БСА - бычий сывороточный альбумин;

С - цистеин;

САТ - хлорамфениколацетилтрансфераза;

цАМФ - циклический аденозинмонофосфат;

ССL2 - МСР-1, миноцитарный хемоаттрактантный белок 1;

ССL7 - МСР-3, миноцитарный хемоаттрактантный белок 3;

ССL8 - МСР-2, миноцитарный хемоаттрактантный белок 2;

ССL13 - МСР-4, миноцитарный хемоаттрактантный белок 4;

кДНК - комплементарная ДНК;

С-His - С-концевая гистидиновая 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;

Е - фермент;

EBV - вирус Эпштейна-Барра;

ECL - энтерохромаффиноцит-подобный;
 E. coli - Escherichia coli;
 EC - глутамилциклаза;
 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;
 HIF1 α - индуцирующий гипоксию фактор 1 α ;
 His - гистидин;
 ЖХВР - жидкостная хроматография высокого разрешения;
 I - ингибитор, изолейцин;
 ID - идентификация;
 IMAC - аффинная хроматография на иммобилизованном металле;
 ИПТГ - изопропил- β -D-тиогалактопиранозид;
 K - калий;
 k - константа;
 кДа - килодальтон;
 k_i - константа ингибирования;
 KLN - гемоцианин лимфы улитки;
 l - длина;
 LB - Лурия-Бертани;
 LD - смертельная доза;
 LPS - липополисахарид;
 M - 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 T-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;
 НАДН - никотинамидадениндинуклеотид;
 нм - нанометр;
 NO - номер;
 НТ - нейротензин;
 N-конец - аминоконец;
 O - кислород;
 ОП - оптическая плотность;
 P - продукт, фосфор;
 ЗФР - забуференный фосфатом физиологический раствор;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;
pGlu - приоглутаминовая кислота;
pH - водородный показатель;
Pro - пролин;
PTC - папиллярный рак щитовидной железы;
Pyr - пироглутамат;
QC - глутаминилциклаза (глутаминилпептидциклотрансфераза);
qПЦР - количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени;
QPCTL - напоминающий глутаминилпептидциклотрансферазу белок;
PHK - 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 глутаминилциклазы

<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 gaagacaccg gcgcgtcgtg ggcaccctcc acctgctgct gctgggtggcc      60
gccctgcccc gggcatccag gggggtcagt ccgagtgcct cagcctggcc agaggagaag      120
aattaccacc agccagccat tttgaattca tcggctcttc ggcaaattgc agaaggcacc      180
agtatctctg aaatgtggca aaatgactta cagccattgc tgatagagcg ataccgggga      240
tcccctggaa gctatgctgc tcgtcagcac atcatgcagc gaattcagag gcttcaggct      300
gactgggtct tggaaataga caccctcttg agtcagacac cctatgggta ccggtctttc      360
tcaaatatca tcagcacct caatccact gctaaacgac atttggctct cgctgccac      420
tatgactcca agtatttttc ccactggaac aacagagtgt ttgtaggagc cactgattca      480
gcggtgccat gtgcaatgat gttggaactt gctcgtgcct tagacaagaa actcctttcc      540
ttaagactg tttcagactc caagccagat ttgtcactcc agctgatctt ctttgatggt      600
gaagaggctt ttcttctactg gtctctcaa gattctctct atgggtctcg acacttagct      660
gcaaagatgg catcgacccc gcaccacct ggagcgagag gcaccagcca actgcatggc      720
atggatttat tggctctatt ggatttgatt ggagctccaa acccaacggt tcccaatttt      780
tttccaaact cagccagggt gttegaaaga cttcaagcaa ttgaacatga acttcatgaa      840

```

ttggggtttgc tcaaggatca ctctttggag gggcgggtatt tccagaatta cagttatgga 900
 ggtgtgattc aggatgacca tattccattt ttaagaagag gtgttccagt tctgcatctg 960
 ataccgtctc ctttccctga agtctggcac accatggatg acaatgaaga aaatttggat 1020
 gaatcaacca ttgacaatct aaacaaaatc ctacaagtct ttgtgttgga atatcttcat 1080
 ttgtaa 1086

<210> 2

<211> 1149

<212> ДНК

<213> человек

<400> 2

atgogttccg ggggcgcgcg gcgaccccg ctgcggctgg gggaacgtgg cctcatggag 60
 ccactcttgc cgcgaagcg ccgcctgcta ccgcgggttc ggctcttgc tctgttctg 120
 gcgctggcgc tgggctcggc gttctacacc atttggagcg gctggcaccg caggactgag 180
 gagctgcgc tgggcggga gctgcgggtc ccattgatcg gaagcctccc cgaagcccg 240
 ctgcggaggg tgggtggaca actggatcca cagcgtctct ggagcactta tctgcgccc 300
 ctgctggttg tgcgaacccc gggcagcccg ggaaatctcc aagtcagaaa gttcctggag 360
 gccacgctgc ggtccctgac agcaggttgg cagctggagc tggatccctt cacagcctca 420
 acacccctgg ggccagtggc ctttggaat gtggtggcca cactggaccc aagggctgcc 480
 cgtcacctca cccttgccg ccattatgac tcgaagctct tcccaccgg atcgacccc 540
 tttgtagggg ccacggattc ggctgtgccc tgtgcccctg tctggagct ggcccaagca 600
 cttgacctgg agctgagcag ggccaaaaa caggcagccc cggtgacctt gcaactgctc 660
 ttcttgatg gtgaagaggc gctgaaggag tggggaccca aggactccct ttacggttcc 720
 cggcacctgg ccagctcat ggagtctata cctcacagcc ccggccccc caggatccag 780
 gctattgagc tctttatgct tcttgatctc ctgggagccc ccaatccac cttctacagc 840
 cacttccctc gcacggctcg ctgggtccat cggctgagga gcattgagaa gcgtctgcac 900
 cgtttgaacc tgetgcagtc tcatccccag gaagtgatgt acttccaacc cggggagccc 960
 tttggctctg tggagacga ccacatcccc ttccctcgca gagggtacc cgtgctccat 1020
 ctcacttcca cgccttccc tgetgtctgg cacaccctg cggacacga ggtcaatctc 1080

cacccaccca cggtagacaa cttgtgccgc attctcgtcg tgttctctggc tgaataacctg 1140
 gggtctctag 1149

<210> 3
 <211> 1145
 <212> ДНК
 <213> человек

<400> 3
 atgcgttccg ggggccgcgg gcgaccccg ctcgggctgg gggaaactgg atggagccac 60
 tcttgccgcc gaagcgcgcg ctgtaccgcg gggttcggct cttgcctctg ttgctggcgc 120
 tggecgctggg ctgcgcgttc tacaccattt ggagcggctg gcaccgcagg actgaggagc 180
 tgccgctggg cggggagctg cgggtcccat tgatcggaag cctccccgaa gcccggtgc 240
 ggagggctgg gggacaactg gatccacagc gtctctggag cacttatctg cgcacctgc 300
 tggttgtgcg aaccccgggc agcccgaggaa atctccaagt cagaaagttc ctggaggcca 360
 cgctgcggtc cctgacagca ggttggcacg tggagctgga tcccttcaca gctcaaac 420
 ccctggggcc agtggacttt ggcaatgtgg tggccacact ggaccaagg gctgcccgtc 480
 acctcacctt tgcttgcct tatgactcga agctcttccc acccggtatg accccctttg 540
 taggggccac ggattcggct gtgcctgtg cctgtctgct ggagctggcc caagcaactg 600
 acctggagct gagcagggcc aaaaaacagg cagccccgtt gacctgcaa ctgctcttct 660
 tggatggtga agaggcgtg aaggagtggg gacccaagga ctccctttac ggttcccgcc 720
 acctggccca gctcatggag tctatacttc acagccccgg cccaccagg atccaggcta 780
 ttgagctctt tatgtctctt gatctctctg gagccccaa tccaccttc tacagccact 840
 tccctcgac ggtccgctgg ttccatcggc tgaggagcat tgagaagcgt ctgcaccgtt 900
 tgaacctgct gcagtctcat cccaggaag tgatgtactt ccaaccggg gagccctttg 960
 gctctgtgga agacgaccac atcccccttc tccgcagagg ggtaccctgt ctccatctca 1020
 tctccacgcc cttccctgct gtctggcaca ccctgaggga caccgaggtc aatctccacc 1080
 caccacgggt acacaacttg tgccgcattc tcgtgtgtt cctggctgaa tacctggggc 1140
 tctag 1145

<210> 4

<211> 1149

<212> ДНК

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 4

```

atgcgttccg ggggccgcgg gcggccccgc ctgcggctag gggaacgtgg cgttatggag      60
ccactctttgc ccccggaagcg ccgcctgcta ccgcgggttc ggtctcttgc cctgttgctg      120
gcgctggccg tgggctcggc gttctacacc atttgagcgc gctggcaccg caggactgag      180
gagctgccgc tgggcgggga gctgcgggtc ccgttgatcg gaagccttcc cgaagccccg      240
ctgcggaggg tgggaggaca actggacca cagcgtctct ggggcaacta tetgcgcgcc      300
ctgctgggtg tgcgaacccc aggcagcccg ggaaatctcc aagtcagaaa gttcctggag      360
gccacgctgc ggtccctgac agcaggttgg cacgtggagc tggatccctt cacagcctcg      420
acgccccctg ggccagtgga ctttggaat gtggtggcca cgtggaccc gggggctgcc      480
cgtcacctca ccttgctg ccattatgac tcgaagctct tcccacccgg atcgaccccg      540
tttgtagggg ccacggactc ggctgtgccc tgtgccctgc tgetggagct ggcccaggca      600
cttgacctgg agctgagcag ggccaaagaa caggcagccc cggtgacct gcaactgctc      660
ttcctggatg gtgaagaggc gctgaaggag tggggaacca aggaactcct ttacggttcc      720
cggcacctgg ccagctcat ggagtctata cctcatagcc ccggccccac caggatccag      780
gctattgagc tctttatgct tcttgatctc ctgggagccc ccaatccac cttctacagc      840
cacttccttc gcaaggctcg ctgggtccat cggctgagaa gcattgagaa gcgtctgcac      900
cgtttgaaac tgetgcagtc tcatccccag gaagtgatgt acttccaacc cggggagccc      960
ttcggctctg tggaagaaga ccacatcccc ttcctccgca gaggggtccc cgtgctccat     1020
ctcatctcta cgccttccc tgetgtctgg cacaccctg cggacacaga ggccaatctc     1080
caccgcacca cggtaacaaa cttaagccgc attctggccg tgttcttggc tgaatacctg     1140
gggctctag                                     1149

```

<210> 5

<211> 1149

<212> ДНК

<213> *Macaca mulatta*

<400> 5

```

atgcgttccg ggggccgcgg gcggccccgc ctgcggctag gggaacgtgg cgttatggag      60
ccactottgc ccccgaaagcg ccgcctgcta ccgcgggttc ggctcttgcc cctggtgctg      120
gcgctggccg tgggctcggc gttctacacc atttggagcg gctggcaccg caggactgag      180
gagctgccgc tgggccggga gctgcgggtc ccgttgatcg gaagccttc cgaagcccgg      240
ctgcggaggg tgggtggaca actggaccca cagcgtctct ggggcactta tctgcgccc      300
ctgctgggtg tgcgaacccc aggcagcccg ggaaatctcc aagtcagaaa gttcctggag      360
gccacgctgc ggtccctgac agcaggttgg cacgtggagc tggatccctt cacagcctcg      420
acgcccctgg gccagtgga ctttggaat gtggtggcca cgctggaccc gggggctgcc      480
cgtcacctca cccttgctg ccattatgac tcgaagctct tcccaccgg atcgaccccg      540
tttgtagggg ccacagactc ggctgtgcc tgtgcctgc tgcaggagct ggcccaggca      600
cttgacctgg agctgagcag ggccaaagaa caggcagccc cggtgacctt gcaactgctc      660
ttcctggatg gtgaagaggc gctgaaggag tggggaccca aggactccct ttaagggttc      720
cggcacctgg ccagctcat ggagtctata cctcatagcc ccggccccac caggatccag      780
gctattgagc tctttatgct tcttgatctc ctgggagccc ccaatcccac cttctacagc      840
cacttccctc gcacggtccg ctggttccat cggctgagaa gcattgagaa gcgtctgcac      900
cgtttgaacc tgctgcagtc tcatcccag gaagtgatgt acttccaacc cggggagccc      960
tttggctctg tggaagacga ccacatcccc ttcctccgca gaggggtccc cgtgctccat      1020
ctcatctcta cgccttccc tgctgtctgg cacacccctg cggacacaga ggccaatctc      1080
caccgcccc cggtaacaaa cttaaagcgc attctggccg tgttcttggc tgaatacctg      1140
gggctctag                                     1149

```

<210> 6

<211> 1152

<212> ДНК

<213> *Canis familiaris*

<400> 6

```

atgccttccg ggggccgcgg gcggtcccg ctacggctcg gggaacgtgg cctcttggag      60
ccgcctccc cggccaagcg ccgcctgctc ccgcgggcgc acttcttgcc tctgcttctg      120

```

ctggcccttg ccttggtctt ggcgacctac accatctgga ggggctggca ccaccagact 180
 gaggagctgc cgcggggccg ggagctgcgg ggcgcttga tcggaagcct ctccgaagcc 240
 cggctgcggc ggggtggtgg gcaactggac ccacaccgtc tctggaacac ttatctgcgc 300
 cccctgctgg ttgtgcggac cccgggcagc cccggcaatc tocaagtcag aaagttcctg 360
 gaggctacac tacggacctt gacagcaggc tggcatgtgg aactggaccc ctccacagcc 420
 ttgacacccc tggggccact ggactttggc aatgtggtgg ccacgctgga cccaggggct 480
 gcccgtcacc tcacccttgc ctgccattat gactccaagc tcttcgcacg tgagtcgggt 540
 ccccttctgg gggcaacaga ttccgctgta ccttgcgccc tgcctgctgga gctggctcag 600
 gccctcgaca gggagttgag tagggccaag gagcaggaag ccccggtgac tctgcagctg 660
 ctcttttttg atggtgaaga agcactgaag gagtggggac ccacagactc cctctatggc 720
 tcccggcacc tggcccagct catggagtct gcaccccaca gcccgggccc caccaggatc 780
 caggctatcg agctcttcat gctccttgat ctccctgggtg ccccgaaatc aaacttctac 840
 agtcacttcc ctcatacagc ccgctggttc catcggtgga ggagcatcga gaagcgctt 900
 caccgcatga acctgctgca gtctcatccc caggaagtga tgtacttcca gcccggggag 960
 cccctggtt ctgtggaaga tgaccacatc cccttcctcc gccgaggggt cctgtgctc 1020
 cactcatct ccattgccctt cccctccgtc tggcacaccc ccgatgactc tgaggccaac 1080
 ctgcacccac ccaccgtaca caatctgagc cgcattcctg ccgtgttccct gcccgaaatc 1140
 ctggggctct ag 1152

<210> 7

<211> 1152

<212> ДНК

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

atgagtcgg ccagccgagg gcggtctcgg cagcggctcg gggatcgagg cctcatgaaa 60
 ccaccctcac ttccaagcg ccgtcttctg ccgcggtgac agctcctgcc cctgtgctg 120
 ctggcgctgg ccttggtctt ggctttttat atcgtctgga atagctggca cctgggggtt 180
 gaggaggtat cagggagccg ggatctcgg gtcccgtgga tcggaagcct ttcagaagcc 240

```

aagctgcggc ttgtggtagg gcagctggat ccacagcgtc tctggggaac tttctgcgt 300
cccttgttga ttgtacgacc cccaggtagt cctggcaatc tccaagtgaag aaagttcctg 360
gaggctacgt tgcagtcctt atcggcagga tggcacgtgg aactggaccc attcacagcc 420
tcaacccctt tggggccact ggacttcggg aacgtggtgg ccacccttga cccaggagct 480
gcccgtcacc tcaccctcgc ctgccattat gactctaagt tcttccctcc tgggttacc 540
ccctttgtgg gggccacaga ttcagccgtg cctgtgccc tgccttctga gttagtccag 600
gcccttgatg tcatgctgag cagaatcaag cagcaggcag caccagtga cctgcagctg 660
ctcttcttgg acggggagga ggcactgaag gagtggggac caaaggactc cctctatggt 720
tcccggcacc tagctcagat catggagtct ataccgcaca gccctggccc caccaggatc 780
caggctattg agctctttgt ccttcttgac cttctgggag cggccagtc aatcttcttc 840
agtcacttcc cccgcacagc ccgctggttc caacgactgc ggagcatoga gaagcgctt 900
cacgctctga acctactgca gtctacccc caggaagtga tgtacttcca acccggggag 960
ccccctggcc ctgtggaaga tgaccacatc ccttcttcc gcagaggggt cccggtgctc 1020
cacctcattg cgatgccctt cctgcccgtg tggcacacac ctgctgacac tgaggctaac 1080
ctccaccgac ccacggtgca caacctgagc cgcacccctg ccgtgttctt ggtgagtagc 1140
ctgggtctct ag 1152

```

<210> 8

<211> 1152

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 8

```

atgagtcctg ggagccgagg ggggccccgg cagcggctcg aggatcgtgg cctcatgaaa 60
ccaccctcac tttccaaggc cgtctctctg ccgcgagtgc agttcctgcc cctgctgctg 120
ctggcgctgg ctatgggctt ggctttctat atcgtctgga acagctggca cctgggggtt 180
gaggagatgt caccgagccg gcatctgagg gtcccgtga tcggaagcct ttcagaagcc 240
aagctgcggc tgggtggtagg gcagctggat ccgcagcgtc tctggggaac tttctgcgt 300
cccttattga ttgtgcgacc cccgggtagt tctggcaatc tccaagtga aaagttcctg 360
gaggctacgt tgcagtcctt gtcggcagga tggcatgttg aactggaccc attcacggcc 420

```

```

tcaacccccct tggggccact ggacttcggg aacgtggtgg ccacacttga ccaggagct 480
gcccgtcacc tcacctcgc ctgccattat gactctaagt tcttccctcc ggggttgccc 540
ccctttgttg ggccacaga ttcagctgtg cctgtgccc tgcttctgga gttggtccag 600
gcccttgatg ccattgtgag cagaatcaag cagcaggcag caccggtgac cctgcagctg 660
cttttcttg atggggagga ggcactgaag gagtggggac caaaggactc cctctatggc 720
tcccggcacc tagctcagat catggagtct ataccacaca gccctggccc caccaggatc 780
caggctattg agctctttgt cctcctcgac cttctgggag catccagtc gatcttcttc 840
agtcacttcc ctgcacagc ccgtggttc cagcgactga ggagcattga gaagcgctt 900
caccggtga acctactgca gtctacccc caggaagtga tgtacttcca acccggggag 960
cccccgccc ctgtggaaga tgaccacatc ccttccttc gcagaggggt cccggtgctc 1020
cacctcattg ccacgccctt cctgtgtgtg tggcacacac ctgctgacac cgaggccaac 1080
ctccaccac ccactgtgca taacctgagc cgcaccttg ctgtgttcct ggccgagtac 1140
ctgggactct ag 1152

```

<210> 9

<211> 1152

<212> ДНК

<213> Bos taurus

<400> 9

```

atgccttcg ggggcccgg gggccccg ctcaggctg gggaaagcag ccttttgag 60
cgacctcac cgccaagcg ccgctgata ccgcgggcac agctgttgcc ccagctgctg 120
ctggtcttga cggtagctc ggtgttctat accatttga ggatctggca tagccagact 180
gaagagctac cgtggggcg ggagctgagg ggcctttga tcggaagcct cccgaagct 240
cgggtgaggga gggtagtgg gcaactggac cctcacgct tctggaacac tttcctgcgc 300
cctctgctgg ttgtacggac tccgggcagc ccgggcaatc tccaagtga aaagtctctg 360
gaggctacgc tgggacact ttcagcaggc tggcatatag aactcgactc cttcactgcc 420
tccacacccg tggggccatt ggacttcagg aatgtggtgg ccacgtgga cccaggggct 480
gcccgccacc ttaccttgc ctgccattat gactccaagc tcttcccatc tgactcagcc 540

```

```

ccctttgtgg gggccacgga ttggcagtg ccttgctccc tgctactgga gctggcccaa 600
gcccttgacc aggagctggg caaagccaag gagagggcag cgccaatgac cttgcagctg 660
atcttctctg atggtgaaga ggcactgaag cagtggggac ccaaggactc gctttatggc 720
tcccggcacc tggcccagct catggagtct acaccccacg gctggggctc caccaggatc 780
caggctattg agctctttat gcttcttgat ctctggggag cccccaaccc gaccttctac 840
agtcacttcc ctgcacggc cgcgtggttc catcggtcca ggagcattga gaagcgctg 900
caccgtctga acctctgca gtctcatctc tgggaagtga tgtacttcca gaccggggag 960
ccccccggct ccgtggaaga cgaccacatc ccgttctctc gccgaggagt tcccgctgctc 1020
cacctcatcg ccacaccctt cccctctgtc tggcacacgt ccgatgactc cgaggccaac 1080
ctgcaccac ccacggtaca caacctgagc cgcactctgg ccgtgttctt ggctgagtac 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

```

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

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 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

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

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 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

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

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 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
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

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

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

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 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

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

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

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

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

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			

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

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 caaagcggcc atgcgttcgg ggggcggcgg ggcacccggc 60
ctgcggctgg gggaacgtgg cctcatggag ccactcttgc cgcgaagcg ccgcctgcta 120
ccgcgggttc ggctcttgcc tctgttgctg gcgtggcggc tgggctcggc gttctacacc 180
atctggagcg gctggcaccg caggactgag gagctgccgc tgggcgggga gctgcgggtc 240
ccattgatcg gaagcctccc cgaagcccggt ctgcggaggg tgggtgggaca actggatcca 300
cagcgtctct ggagcactta tctgcgcccc ctgctggttg tgcaacccc gggcagcccg 360
ggaaatctcc aagtcagaaa gttcctggag gccacgctgc ggtccctgac agcaggttgg 420
cacgtggagc tggatccctt cacagcctca acacccctgg ggcagtgga ctttggaat 480
gtggtggcca cactggaccc aagggtgccc cgtcacctca ccttgccctg ccattatgac 540
tcgaagctct tcccaccccg atcgaccccc tttgtagggg ccacggatcc ggctgtgccc 600
tgtgccctgc tgctggagct ggcccaagca cttgacctgg agctgagcag ggccaaaaaa 660
caggcagccc cggtgacctt gcaactgctc ttcttggtat gtgaagaggg gctgaaggag 720
tggggaccca aggactccct ttacgggttc cggcacctgg ccagctcat ggagtctata 780
cctcacagcc ccggccccac caggatccag gctattgagc tctttatgct tcttgatctc 840
ctgggagccc ccaatccccc cttctacagc cacttccttc gcacggtcgg ctggttccat 900
cggctgagga gcattgagaa gcgtctgcac cgtttgaacc tgctgcagtc tcatccccag 960
gaagtgatgt acttccaacc cggggagccc tttggctctg tggaagacga ccacatcccc 1020
ttcttcgca gaggggtacc cgtgctccat ctcctctcca cgccttccc tgctgtctgg 1080
cacaccctg cggacaccca ggtcaatctc caccaccca cggtaacaaa cttgtgccgc 1140
attctcgtg tgttcctggc tgaatactg gggctctagc gtgcttgccc aatgaactgtg 1200

```

gagaggactg tgagagagaa ggtcccagcg ggggccagtg aagctcaggc aggatctgcc 1260
 taggggtgtgc tggtttgtcc ttttcatacc tttgtctcct aattgtgcta caattggaag 1320
 acctctcttcc ttttgattgt ctcaagctgc cacccttcaa ggacagggaa gagaccactg 1380
 tgggatgaca gccagaggaa taagaacttg ctccctcccc agaggtaaac acttggtcca 1440
 aaggtttgca gggacca 1457

<210> 20

<211> 1088

<212> ДНК

<213> человек

<400> 20

agcggccatg cgttcgggg gccgcggcg accccgctg cggctggggg aacgtggcct 60
 catggagcca ctcttgccgc cgaagcgccg cctgctaccg cgggttcggc tcttgctctc 120
 gttgctggcg ctggccgtgg gctcggcggt ctacaccatt tggagcggct ggcaccgcag 180
 gactgaggag ctgccgttgg gccgggagct gcgggtccca ttgatcggaa gcctccccga 240
 agccccgctg cggaggggtgg tgggacaact ggatccacag cgtctctgga gcaattatct 300
 gcgccccctg ctggttgtgc gaacccccgg cagccccgga aatctccaag tcagaaaggc 360
 agccccggtg acctgcaac tgetcttctt ggatggtgaa gaggcgtga aggagtgggg 420
 acccaaggac tccctttacg gttccccgca cctggcccag ctcatggagt ctatacctca 480
 cagccccggc cccaccagga tccaggctat tgagctcttt atgcttcttg atctcctggg 540
 agcccccaat cccaccttct acagccactt cctcgcacg gtccgctggg tccatcggtc 600
 gaggagcatt gagaagcgtc tgcaccgttt gaacctgctg cagtctcacc cccaggaagt 660
 gatgtacttc caaccgggg agcccttttg ctctgtggaa gacgaccaca tcccttctc 720
 ccgcagaggg gtaccctgct tccatctcat ctccacgcc ttcctgctg tctggcacac 780
 cctgcggaac accgaggtca atctccacc acccacggt cacaacttgt gccgcattct 840
 cgctgtgttc ctggctgaat acctggggct ctagcgtgct tggccaatga ctgtggagag 900
 gactgtgaga gagaagggtc cagcgggggc cagtgaagct caggcaggat ctgctaggg 960
 tgtgctgggt tgtccttttc atacctttgt ctctaattg tgctacaatt ggaagacctt 1020
 ctttcttttg attgtctcaa gctgccacc ttcaaggaca gggaagagac cactgtggga 1080

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

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
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
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		

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

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

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

```

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 5 10 15

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 20 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 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> 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 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> 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 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 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 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 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

<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

<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

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

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
 ggtctacacc atttgagcg gctggc 26

<210> 54
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический нуклеотид

<400> 54
 ggggttggaag tacatcactt cctgggg 27

<210> 55
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетический нуклеотид

<400> 55
 accatgcggtt ccggggggccg cggg 24

<210> 56
 <211> 27
 <212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический нуклеотид

<400> 56

acgctagagc cccaggtatt cagccag

27

<210> 57

<211> 30

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический нуклеотид

<400> 57

atatatgaat tcatgcgttc cgggggcccgc

30

<210> 58

<211> 33

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический нуклеотид

<400> 58

atatatgaat tcatggagcc actcttgccg ccg

33

<210> 59

<211> 33

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический нуклеотид

<400> 59

atatatgtcg acgagcccca 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 ctagtgatgg tgatgggtgat ggagccccag gtattcagc 49

<210> 62
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 62
 atatgaattc ttctacacca ttggagc 28

<210> 63
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 63
 atatgaattc catcaccatc accatcactt ctacaccatt tggagcggc 49

<210> 64
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 64
 atatatgcgg ccgcctagag ccccagggtat 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 atgggtgatgg tgatggagcc ccagggtattc agccag 56

 <210> 67
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 67
 ttccacaggg ccgggggggc 19

 <210> 68
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПРЦ праймер

 <400> 68
 atgagtcccg ggagccgc 18

 <210> 69
 <211> 18
 <212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 69

ctagagtccc aggtacttc

18

<210> 70

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 70

agttcctgcc cctgctgctg

20

<210> 71

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 71

atcaagaggc ассаассаас

20

<210> 72

<211> 19

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 72

ctggataata ttcccatag

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	
gagcagaata	gcttccgggc 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 atgggacccg cag	33
<210>	77	
<211>	33	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная последовательность	
<220>		
<223>	ПЦР-праймер	
<400>	77	
acgggtacaca	acttggcccg cattctcgct gtg	33

<210> 78
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 78
 cacagcgaga atgcggggcca 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

```

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

```

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 Thr Ser Gly Ala Gln Ala Ser Asp Trp
 35 40 45

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 Gly 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

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
 atatataagc ttatggcagg cggaagacac 30

<210> 83
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер для клонирования

<400> 83
 atatgcgggc gcttacaaat gaagatattc c 31

<210> 84
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 84
 atatatgcgg cgcctagag ccccaggtat tcagc 35

<210> 85
 <211> 31

<212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 85
 atatctcgag tccatcgcca ccacggtgag c 31

 <210> 86
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 86
 atatctcgag ttacttgtag agctcgcca t 31

 <210> 87
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 87
 atatgctggc gcatgtagac gctccaaatg gtgtagaacg c 41

 <210> 88
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 88
 atatgctggc gcttacttgt catcgtagc cttgtaatcc aaatgaagat attccaa 57

 <210> 89
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 89

atatgcggcc gcctacttgt catcgtcac cttgtaatcg agccccaggt attcagc

57

<210> 90

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 90

gcctccagca tgaagtcctc

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

atgaaagcct 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
 tcacctgctg ctttaacgtg 20

 <210> 95
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 95
 atccctgacc catctctcct 20

 <210> 96
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 96
 atctccttgc 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
 tccttttcac tcggaacctg 20

 <210> 101
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 101
 cgcctcttct gtttcacctc 20

 <210> 102
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 102

aagcgctggt tgccagttat

20

<210> 103

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 103

cacacgtgag gcgctattta

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

cagcattttct 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
 ctcgggtcct acttgtcagc 20

<210> 108
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 108
 aagcgagggt ctcgttctga 20

<210> 109
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 109
 tgaacctcttg ctctccctgt 20

<210> 110
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР-праймер

<400> 110
 cttcaagctc tctgtctgct 20

<210> 111
 <211> 20

<212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 111
 cgaccctgac ttccctggta 20

 <210> 112
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 112
 gctcatcggc tggtaggtatt 20

 <210> 113
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 113
 ataagcaggt ggagcattgg 20

 <210> 114
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР-праймер

 <400> 114
 atgcttcgga aactggacat 20

 <210> 115
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 115

atggttcgat gcagctttct

20

<210> 116

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 116

tacggcgtaa tcttggaac

20

<210> 117

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 117

attgtgcatg ctgctttgag

20

<210> 118

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер

<400> 118

ccgaaacaca gtggaagggt

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
ggttcctttc ttcctccag                20

<210> 121
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> ПЦР-праймер

<400> 121
aaccaagcc 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 нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, указанные в (а) или (б), или которая является комплементарной любой из вышеуказанных нуклеиновых 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. Антисмысловый 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 нуклеиновой кислотой по п.6 или 7.

9. Выделенная нуклеиновая 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 нуклеиновая 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 нуклеиновая кислота по п.1, которая кодирует полипептид, идентичный по меньшей мере на 50% одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-18.

12. Нуклеиновая кислота-зонд по п.1, содержащая по меньшей мере 14 смежных нуклеотидов одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2-9.

13. Нуклеиновая кислота-зонд по п.12, соответствующая одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 53-61.

14. Выделенная рекомбинантная полинуклеотидная молекула, содержащая нуклеиновую кислоту по п.1 плюс контролирующие экспрессию элементы, функционально связанные с нуклеиновой кислотой для обеспечения ее экспрессии.

15. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую 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(я) или соединения, которое(ые) снижает(ют) ферментативную активность.

26. Способ скрининга избирательного ингибитора глутамилциклазы, 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 глутамилциклазы или их солей, оценивают ферментативную активность зрелого белка, сравнивают активность с соответствующей активностью, определенной в отсутствие ингибитора глутамилциклазы, и отбирают соединение, которое не снижает ферментативную активность зрелого белка.

27. Способ скрининга избирательного ингибитора белка глутаминилпептидциклотрансферазы, который не ингибирует ферментативную активность глутамилциклазы, заключающийся в том, что инкубируют глутамилциклазы в присутствии одного или нескольких ингибиторов белка глутаминилпептидциклотрансферазы или их солей, оценивают ферментативную активность глутамилциклазы, сравнивают активность с соответствующей активностью, определенной в отсутствие ингибитора белка глутаминилпептидциклотрансферазы, и отбирают соединение, которое не снижает ферментативную активность белка глутаминилпептидциклотрансферазы.

28. Антагонист белка глутаминилпептидциклотрансферазы, который ингибирует биологическую функцию одного из зрелых белков по одному из пп.19-22.

29. Антагонист белка глутаминилпептидциклотрансферазы 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 глутамилциклазы, 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 глутаминилпептидциклотрансферазы 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 глутаминилпептидциклотрансферазы 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 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, 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 глутаминилпептидциклотрансферазы представляет собой конкурентный ингибитор.

36. Применение по одному из пп.33-35, где ингибитор белка глутаминилпептидциклотрансферазы связывается с активным сайтом белка глутаминилпептидциклотрансферазы, связанным с ионом металла.

37. Применение по одному из пп.33-36, где последовательность белка глутаминилпептидциклотрансферазы выбрана из одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-18, 21 и 22.

38. Применение по п.37, где последовательность белка глутаминилпептидциклотрансферазы 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 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, 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 глутаминилпептидциклотрансферазы 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 глутаминилпептидциклотрансферазе, и средства измерения.

```

hQC      -----MAGGRHRRVVGTLHLL----LLVAALPWASRG--VSPSASAWPE--
hisoQC   MRS GGRGRPRRLRGLGERGLMEPLLPKRRLLPRVRLLP-LLLALAVGSAFYTTWSGWHRRRT
mQC      -----MAGSEDKLVVGTLHLL----LLQATVLSLTAGN-LSLVSAAWTQ--
misoQC   MSPGSRGRPRQRLEDRGLMKPPSLSKRRLLPRVQFLPLLLLALAMGLAFYIVWNSWHPGV
          * . . . : ** : * : : * . . . *

hQC      ----EKNYHQPAI--LNSSALRQIAEGTISEMWQNDLQPLLIERYPGSPGSYAARQHI
hisoQC   EELPLGRELRVPLIGSLPEARLRRVVGQLDPQRLWSTYLRPLLVVRTPGSPGNLQVRKFL
mouse    ----EKNHHQPAH--LNSSSLQQAEGTISEMWQNDLRPLLIERYPGSPGSYSARQHI
misoQC   EEMSRSDLRVPLIGSLSEAKRLRVVGQLDPQRLWGTFLRPLLIVRPPGSSGNLQVRKFL
          : : : * * . : * : . . . * . * : ** : * * * . * . * : :

hQC      MQRIQRLQADWVLEIDTFLSQTPTYGYRSFSNIISTLNPTAKRHLVLACHYDSKYFSHWN
hisoQC   EATLRSLTAGWHVELDPFTASTPLGPFVDFGNVVATLDPRAARHLTLACHYDSKLFPPG-S
mouse    MQRIQRLQAEWVVEVDTFLSRTPTYGYRSFSNIISTLNPEAKRHLVLACHYDSKYFPWRDS
misoQC   EATLQSLSAGWHVELDPFTASTPLGPLDFGNVVATLDPGAARHLTLACHYDSKFFPPG-L
          : : * * * : * . * : * * * . * . : ** : * * * . * * * . * * * . *

hQC      RVFVGATDSAVPCAMMLELALALDKKLLSLKTVSDSKPDLSQLIFFDGEEAFHWS PQD
hisoQC   TPFVGATDSAVPCALLLELAQALDLELSRAK--KQAAP-VTLQLFLDGEEALKEWGPKD
mouse    RVFVGATDSAVPCAMMLELALALDKKLLSLKDVSGSKPDLSQLIFFDGEEAFHWS PQD
misoQC   PPFVGATDSAVPCALLLELVQALDAMLSRIK--QQAAP-VTLQLFL-GEEALKEWGPKD
          * * * * * : * * * . * * . : : * : * : * : * : * : * : * : * : *

hQC      SLYGSRHLAAKMASTPHPPGARGTSQLHGMDLLVLLDLIGAPNPTFPNFFPNSARWFERL
hisoQC   SLYGSRHLAQLMESIPHSPG--PTRIQAIELFMLLDLLGAPNPTFYSHFPRTVRWFHRL
mouse    TLYGSRHLAQKMASSPHPPGSRGTNQLDGMDDLVLVLLDLIGAPNPTFPNFFPKTTRWFNRL
misoQC   SLYGSRHLAQIMESIPHSPG--PTRIQAIELFVLLDLLGASSPIFFSHFPRTARWFQRL
          : * * * * * * * * * * . . . : : * : * : * : * : * . * . * . * . * . *

hQC      QAIEHELHELGLLKDHSLERGFQNYSYGGVIQDDHIPFLRRGVPVLHLIPSPFEVWHT
hisoQC   RSIEKRLHRLNLLQSHPQEVMYFQPGEPGSGVEDDHIPFLRRGVPVLHLISTPFPVWHT
mouse    QAIEKELYELGLLKDHSLERKGFQNYGYGNIQDDHIPFLRKGVPVLHLIASPSEVWHT
misoQC   RSIEKRLHRLNLLQSHPQEVMYFQPGEPGPEVEDDHIPFLRRGVPVLHLIATPFPVWHT
          : * * . * . * . * . * . * * * . : * * * * * : * * * * * : * * * *

hQC      MDDNEENLDESTIDNLNKILQVFVLEYLHL
hisoQC   PADTEVNLHPTVHNLCRILAVFLAEYLGL
mouse    MDDNEENLHASTIDNLNKIIQVFVLEYLHL
misoQC   PADTEANLHPTVHNL SRILAVFLAEYLGL
          * . * * . . : . * * : * : * * : * * *

```

Идентичность: 38,97%
 Подobie: 65,64%

Фиг. 1

```

hisoQC      MRSGGRGRPRRLRGLGERGLMEPLLPKRRLLPRVRLLP-LLLALAVGSAFYTIWSGWHRRRT
M_fascicularis MRSGGRGRPRRLRGLGERGVMEPLLPKRRLLPRVRLLP-LLLALAVGSAFYTIWSGWHRRRT
M_mulatta    MRSGGRGRPRRLRGLGERGVMEPLLPKRRLLPRVRLLP-LLLALAVGSAFYTIWSGWHRRRT
C_familiaris MPSSGRGRSRRLRGLGERGLLEPPSPKRRLLPRAHFLPLLLLALALASATYTIWSGWHHQT
R_norvegicus MSPASRGSRQRQLGDRGLMKPPSLSKRRLLPRVQLPLLLLALALGLAFYIVWNSWHPGV
M_musculus   MSPGSRGRPRQRLEDRGLMKPPSLSKRRLLPRVQLPLLLLALAMGLAFYIVWNSWHPGV
B_taurus     MPSSGRGRPRQLQVGSRLLERPSPPKRRLLPRAQLLPQLLLALTVASVFYTIWRHHSQT
*...****.* :: :*: :: :* ****:*::** *****:.. * :* ** .

hisoQC      EELPLGRELRVPLIGSLPEARLRVVGQLDPQRLWSTYLRPLLVRTPGSPGNLQVRKFL
M_fascicularis EELPLGRELRVPLIGSLPEARLRVVGQLDPQRLWSTYLRPLLVRTPGSPGNLQVRKFL
M_mulatta    EELPLGRELRVPLIGSLPEARLRVVGQLDPQRLWSTYLRPLLVRTPGSPGNLQVRKFL
C_familiaris EELPRGRELRGLIGSLSEARLRVVGQLDPHRLWNTYLRPLLVRTPGSPGNLQVRKFL
R_norvegicus EEVSRSRDLRVPLIGSLSEAKLRVVGQLDPQRLWSTYLRPLLVRTPGSPGNLQVRKFL
M_musculus   EEMSRSRDLRVPLIGSLSEAKLRVVGQLDPQRLWSTYLRPLLVRTPGSPGNLQVRKFL
B_taurus     EELPLGRELRGLIGSLPEARVRVVGQLDPHRLWNTYLRPLLVRTPGSPGNLQVRKFL
**:. :*:** *****:*:* *****:*::** *****:*::** *****:

hisoQC      EATLRSLTAGWHVELDPFTASTPLGPVDFGNVVATLDPGAARHLTLACHYDSKLFPPGST
M_fascicularis EATLRSLTAGWHVELDPFTASTPLGPVDFGNVVATLDPGAARHLTLACHYDSKLFPPGST
M_mulatta    EATLRSLTAGWHVELDPFTASTPLGPVDFGNVVATLDPGAARHLTLACHYDSKLFPPGST
C_familiaris EATLRSLTAGWHVELDPFTALTPLGPLDFGNVVATLDPGAARHLTLACHYDSKLFPPGST
R_norvegicus EATLQSLTAGWHVELDPFTASTPLGPLDFGNVVATLDPGAARHLTLACHYDSKLFPPGST
M_musculus   EATLQSLTAGWHVELDPFTASTPLGPLDFGNVVATLDPGAARHLTLACHYDSKLFPPGST
B_taurus     EATLRSLTAGWHVELDPFTASTPLGPLDFGNVVATLDPGAARHLTLACHYDSKLFPPGST
****:. :*:** *****:*:* *****:*::** *****:*::** *****:

hisoQC      PFVGATDSAVPCALLLELAQALDLELSRAKQQAAPVTLQLLFLDGEALKEWGPKDSLYG
M_fascicularis PFVGATDSAVPCALLLELAQALDLELSRAKQQAAPVTLQLLFLDGEALKEWGPKDSLYG
M_mulatta    PFVGATDSAVPCALLLELAQALDLELSRAKQQAAPVTLQLLFLDGEALKEWGPKDSLYG
C_familiaris PFVGATDSAVPCALLLELAQALDLELSRAKQQAAPVTLQLLFLDGEALKEWGPKDSLYG
R_norvegicus PFVGATDSAVPCALLLELVQALDMLSRKQQAAPVTLQLLFLDGEALKEWGPKDSLYG
M_musculus   PFVGATDSAVPCALLLELVQALDMLSRKQQAAPVTLQLLFLDGEALKEWGPKDSLYG
B_taurus     PFVGATDSAVPCALLLELAQALDLELSRAKQQAAPVTLQLLFLDGEALKEWGPKDSLYG
*****:*****:*****.*:: :*:** *****:*::** *****:

hisoQC      SRHLAQLMESIPHSPGPTRIQAIELFMLLDLLGAPNPTFYSHFPRTVRWFHRLRSIEKRL
M_fascicularis SRHLAQLMESIPHSPGPTRIQAIELFMLLDLLGAPNPTFYSHFPRTVRWFHRLRSIEKRL
M_mulatta    SRHLAQLMESIPHSPGPTRIQAIELFMLLDLLGAPNPTFYSHFPRTVRWFHRLRSIEKRL
C_familiaris SRHLAQLMESIPHSPGPTRIQAIELFMLLDLLGAPNPTFYSHFPRTVRWFHRLRSIEKRL
R_norvegicus SRHLAQLMESIPHSPGPTRIQAIELFVLLDLLGAPSPIFFSHFPRTVRWFHRLRSIEKRL
M_musculus   SRHLAQLMESIPHSPGPTRIQAIELFVLLDLLGAPSPIFFSHFPRTVRWFHRLRSIEKRL
B_taurus     SRHLAQLMESIPHSPGPTRIQAIELFMLLDLLGAPNPTFYSHFPRTVRWFHRLRSIEKRL
*****:*** **,* *****:*****.*:: :*:** *****:*::** *****:

hisoQC      HRLNLLQSHQPQEVMYFQPGEPGSGVEDDHIPLRRGVVPLHLISTPFPVAVHTPADTEVN
M_fascicularis HRLNLLQSHQPQEVMYFQPGEPGSGVEDDHIPLRRGVVPLHLISTPFPVAVHTPADTEVN
M_mulatta    HRLNLLQSHQPQEVMYFQPGEPGSGVEDDHIPLRRGVVPLHLISTPFPVAVHTPADTEVN
C_familiaris HRMNLLQSHQPQEVMYFQPGEPGSGVEDDHIPLRRGVVPLHLISMFPVAVHTPADTEVN
R_norvegicus HRLNLLQSHQPQEVMYFQPGEPGSGVEDDHIPLRRGVVPLHLIAMFPVAVHTPADTEVN
M_musculus   HRLNLLQSHQPQEVMYFQPGEPGSGVEDDHIPLRRGVVPLHLIAMFPVAVHTPADTEVN
B_taurus     HRLNLLQSHQPQEVMYFQPGEPGSGVEDDHIPLRRGVVPLHLIAMFPVAVHTPADTEVN
**:* *****:*****.*:: :*:** *****:*::** *****:

hisoQC      LHPPTVHNLCSILAVFLAEYLGL
M_fascicularis LHPPTVHNLCSILAVFLAEYLGL
M_mulatta    LHPPTVHNLCSILAVFLAEYLGL
C_familiaris LHPPTVHNLCSILAVFLAEYLGL
R_norvegicus LHPPTVHNLCSILAVFLAEYLGL
M_musculus   LHPPTVHNLCSILAVFLAEYLGL
B_taurus     LHPPTVHNLCSILAVFLAEYLGL
*****:*****:*****.*:: :*:** *****:*::** *****:

```

Идентичность: 71,28% Подобие: 90,86%

Фиг. 2

```

hQC      --MAGGRHRRVVGTLHLLLLVAALP-----WASRGVSPSASAWPEEKNYHQPAILNS
hisoQC   MEPLLPKRRLLPRVRLPLLLALAVGSFYTIWSGWHRRTEELPLGRELRVPLIGSLPE
SGAP      -----APDIPL
VpAP      ----MPPITQQATVTAWLPQVDASQITGT-----IS

hQC      SALRQIAEGTISEMWQNDLQPLLIERYPGSPGSYAARQHIMQR---IQRLQADWVLEID
hisoQC   ARLRRVVGQLDPQRLWSTYLRPLLVVTRPGSPGNLQVRKFLEAT---LRSLTAGWHVLELD
SGAP      ANVKAHLTQL-----STIAANNNGNRAHGRPGYKASVDYVKAK---LDA--AGYTTTLQ
VpAP      -----SLESFTNRFTTTTSGAQASDWIASEWQALSA--SLPNASVK
          *      . .      :      :      :      :

hQC      TFLSQTPYGYRSFSNIIISTLNPT-AKRHLVLACHYDSKYFSHWNRR-VFVGATDSAVPCA
hisoQC   PFTASTPLGPVDFGNVVATLDPR-AARHLTLACHYDSKLFPP-GST-PFVGATDSAVPCA
SGAP      QFTSGGATGYNLIAN---WPGGD-PNKVLMAGAHLDVS-----SGAGINDNGSGSA
VpAP      QVSHSGYNQ---KSVVMTITGSEAPDEWIVIGGHLDTIGSHTNEQSVAPGADDDASGIA
          .      .      .      .      :      *      *      *      *

hQC      MMLELARALDKKLLSLKTVSDSKPDLISLQLIFFDGEAEFLHWSPODSLYGSRHLAAKMAS
hisoQC   LLELAQALD---LELSRAKKQAAPVTQLQLFLDGEAEALKEWGPKDSLYGSRHLAQLMES
SGAP      AVLETALAVSR-----AGYQDPKHLEFANWGAEL-----GLIGSKFYVNNLPS
VpAP      AVTEVIRVLSE-----NNFQPKRSTAFMAYAAEEV-----GLRGSQDLANQYKS
          :      *      . .      .      :      :      *      *      :      *

hQC      TPHPPGARGTSQLHGMDDLVLVLLDI---GAPNPTFPNFFPNSARWFERLQAEHELHELQ
hisoQC   IPHSP---GPTRIQAIELFMLLDL---GAPNPTFYSHFPRTVRFHRLRSIEKRLHRLN
SGAP      ADRS-----KLAGYLNFDMI---GSPNPGYFYVDDDPV-----IEKTFKNYF
VpAP      EGKN-----VVSALQDMTNYKGSADQVVFITDYTDS-----NFTQYLTQ-
          :      :      :      :      :      *      :      :

hQC      LLKDSHLEGRYFQNY---SYGGVIQDDHIPFLRRGVPVLHLIP-----
hisoQC   LLQSHPQEVMYFQPG---EFSGSVEDDHIPFLRRGVPVLHLIS-----
SGAP      AGLNVPTETI-----ETBGDRSDHAPFKNVGVPVGGFLTGAGYTKSAAQAQKWGG
VpAP      -----LMDEYLPSTYGFDTGCGYACSDHASWHNAGYPAAMPFE-----
          .      *      . .      . .      .      *      :

hQC      ---SPF---PEVWHTMDNEENLDESTIDNLNKILQVVFLEYLHL-----
hisoQC   ---TPF---PAVWHTPADTEVNLHPTVHNLCRILAVFLAEYLGL-----
SGAP      TAGQAF---DRCYHSSCDSLNNINDTALDR-NSDAAAHAIWTLSS---GTGEPPT---
VpAP      ---SKFNDYNPRI-HTTQDTLANSDFPTGSHA-KKFTQLGLAYAIEMGSATGDTPTFGNQ
          *      *      :      *      .      .      :

```

Фиг. 3

```

hisoQC   MRSGGRGRPRRLRGLGERGLMEPLLPKRRLLPRVRLPLLLALAVGSFYTIWSGWHRRTE
hQC      MAGG-----R-----HRRVVGTLHLLLLVAALPWAS--R---GVSPSAS
          *      .      *      :      :      :      :      :      :      :

hisoQC   BLPLGRELRVPLIGSLPEARLRRVVGQLDPQRLWSTYLRPLLVVTRPGSPGNLQVRKFLE
hQC      AWPEEKNYHQPAL--LNSSALRQIAEGTISEMWQNDLQPLLIERYPGSPGSYAARQHIM
          *      :      :      *      *      *      :      :      :      :      :      :      :

hisoQC   ATLRSLTAGWHVLEDPFTASTPLGPVDFGNVVATLDPRARHLTLACHYDSKLFPPGS-T
hQC      QRIQLQADWVLEIDTFLSQTPYGYRSFSNIIISTLNPTAKRHLVLACHYDSKYFSHWNRR
          :      :      *      *      :      :      *      *      *      *      *      *      *

hisoQC   PFVGATDSAVPCALLLELAQALDLELSRAKKQAAP---VTQLQLFLDGEAEALKEWGPKDS
hQC      VFVGATDSAVPCAMMLELARALDKKLLSLKTVSDSKPDLISLQLIFFDGEAEFLHWSPODS
          *      *      *      *      :      :      :      :      :      :      :

hisoQC   LYGSRHLAQLMESIPHSP---GPTRIQAIELFMLLDLLGAPNPTFYSHFPRTVRFHRLR
hQC      LYGSRHLAAKMASTPHPPGARGTSQLHGMDDLVLVLLDIGAPNPTFPNFFPNSARWFERLQ
          *      *      *      *      *      :      :      :      :      :      :      :

hisoQC   SIEKRLHRLNLLQSHPQEVMYFQPGEPGSGVEDDHIPFLRRGVPVLHLISTPFAVWHTP
hQC      AIEHELHELGLLKDHSLEGRYFQNYSYGGVIQDDHIPFLRRGVPVLHLIPSPFPEVWHTM
          :      :      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

hisoQC   ADTEVNLHPTVHNLCRILAVFLAEYLGL
hQC      DDNEENLDESTIDNLNKILQVVFLEYLHL
          *      *      *      .      :      :      :      :      *      *

```

Идентичность: 45,24%

Подобие: 71,98%

Фиг. 4

hQC ---MAGGRHRRVVGTLHLLLVAALP-----WASRGVSPSASAWPEEKNYHQPAILNS
hisoQC MEPLLPKRRLLPRVRLPLLLALAVGSAPYTIWSGWHRRTEELPLGRELRVPLIGSLPE
: :*: : **: * : : : * : : : *

hQC SALRQIAEGTSISEMWQNDLQPLLIERYPGSPGSAARQHIMQRIQRLQADWVLEIDTFL
hisoQC ARLRRVVGQDPQRLWSTYLRPLLVVRTPGSPGNLQVRKFLEATLESITAGWHVELDPFT
: **: : : : : : **: : * : : : : : : : : * : * : *

hQC SQTPTYGRSFSNIISTLNPTAKRHLVLACHYDSKYFSHWNNRVFVGATDSAVPCAMMLEL
hisoQC ASTPLGPVDFGNVVATLDPRAARHLTLACHYDSKLFPPGS-TPFVGATDSAVPCALLLEL
: * : * : * : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

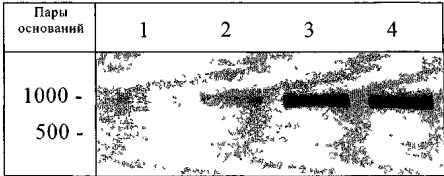
hQC ARALDKLLSLKTVSDSKPDLSQLIFFDGE~~E~~AFIHWSPQDSLYGSRHLAAKMASTPHPP
hisoQC AQALDLELSRAKKQAAP--VTLQLFLDGE~~E~~ALKEWGPKDSLYGSRHLAQLMBSIPHSP
* : * : * : * : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

hQC GARGTSQLHGMDLLVLDLIGAPNPTFFNFFPNSARWFERLQAIHELHELGLLKDHSLE
hisoQC ---GPTRIQAIELFMLDLLGAPNPTFYSHFPRTVRWFHRLRSIEKRLHRLNLLQSHPQE
* : : : : : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

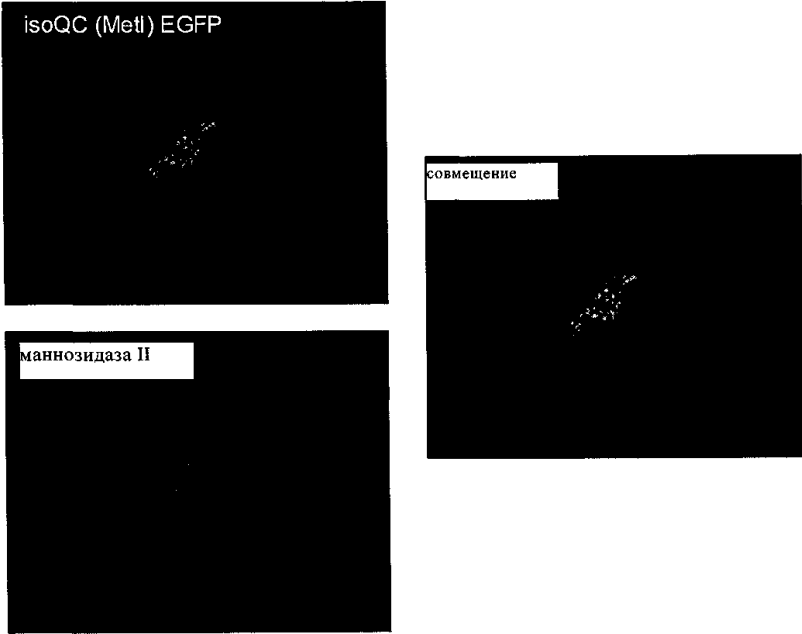
hQC GRYFQNYSGGVIQDDHIPFLRRGVFVLHLIPSPFPEVWHTMDDNEENLDESTIDNLNKI
hisoQC VMYFQFGEPSGVEDDHIPFLRRGVFVLHLISTPFPVWHTPADTEVNLHPPTVHNLCRI
* * : : : : : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : *

hQC LQVFVLEYLHL
hisoQC LAVFLAEYLGL
* * : * : *

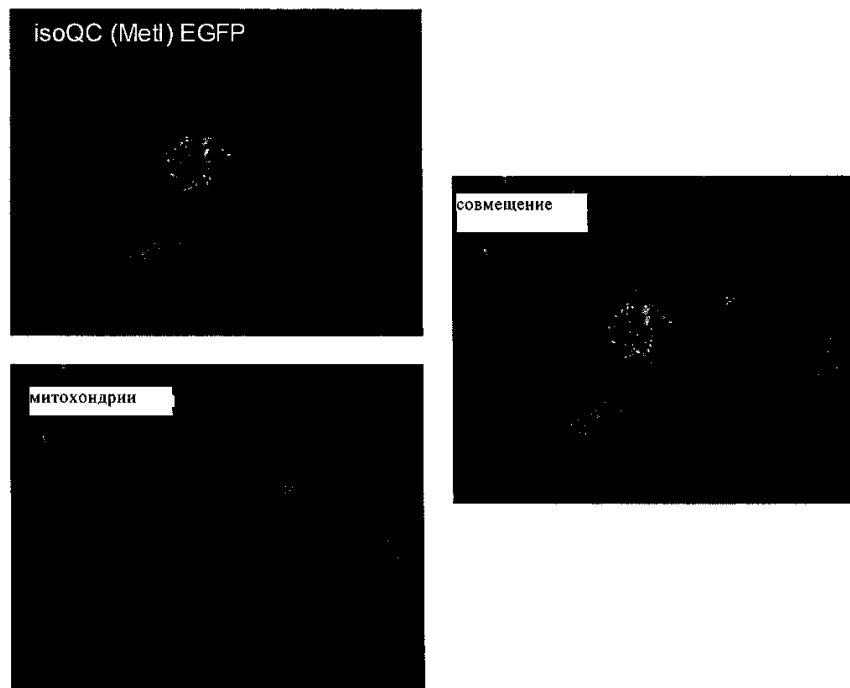
Фиг. 5



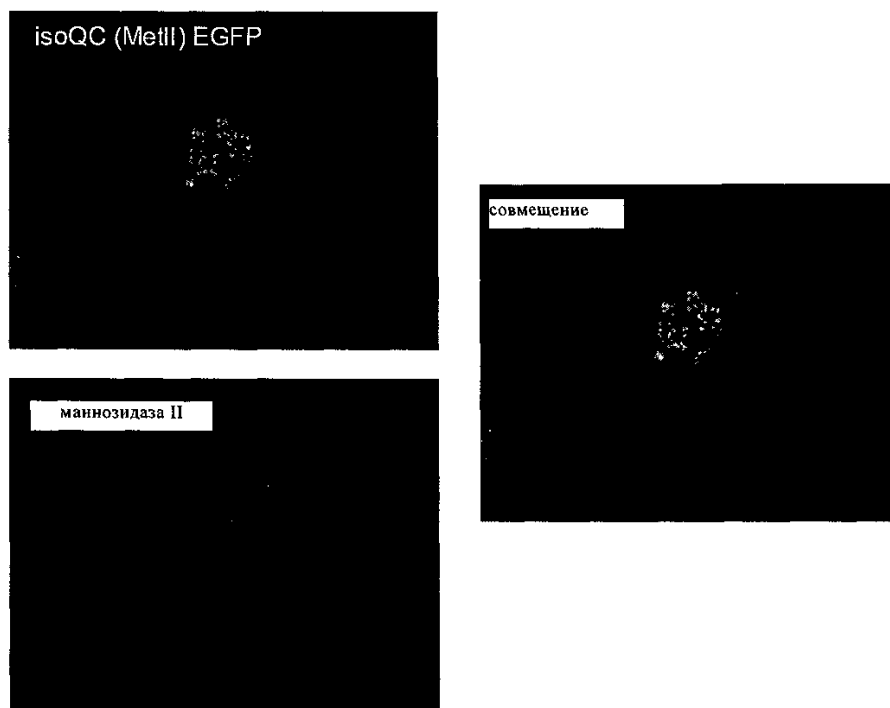
Фиг. 6



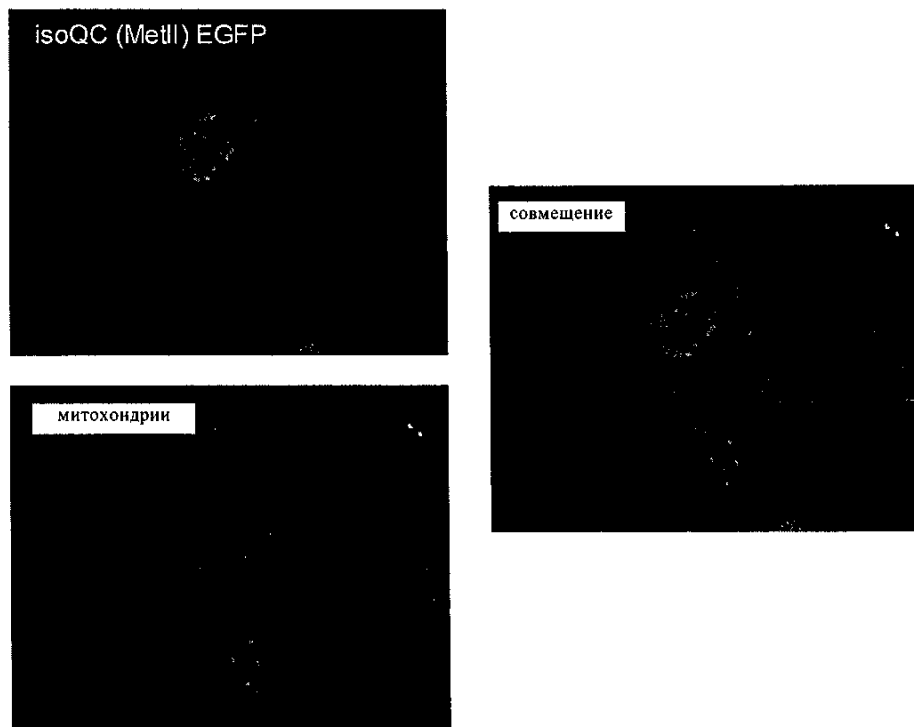
Фиг. 7



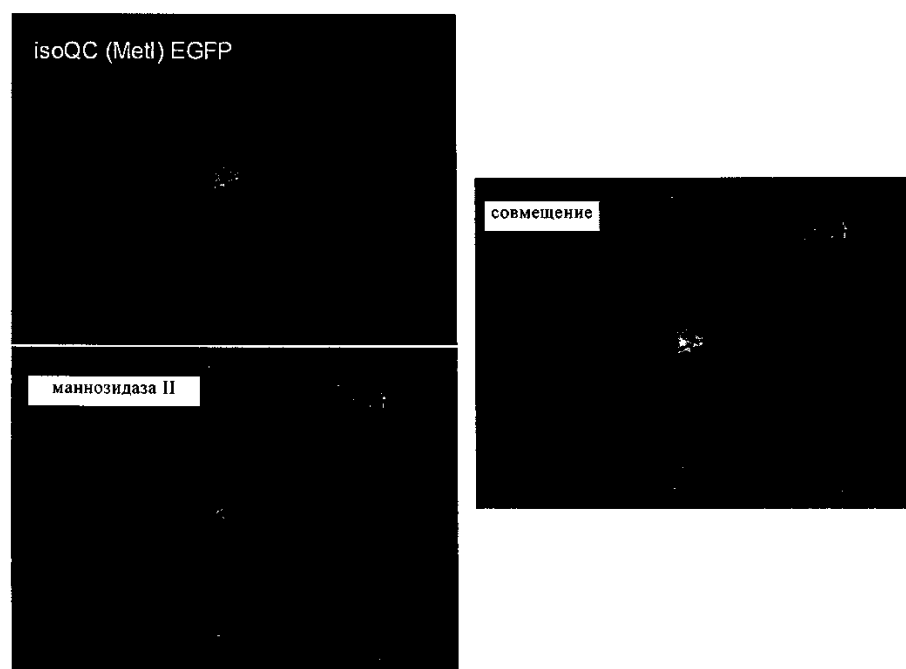
Фиг. 8



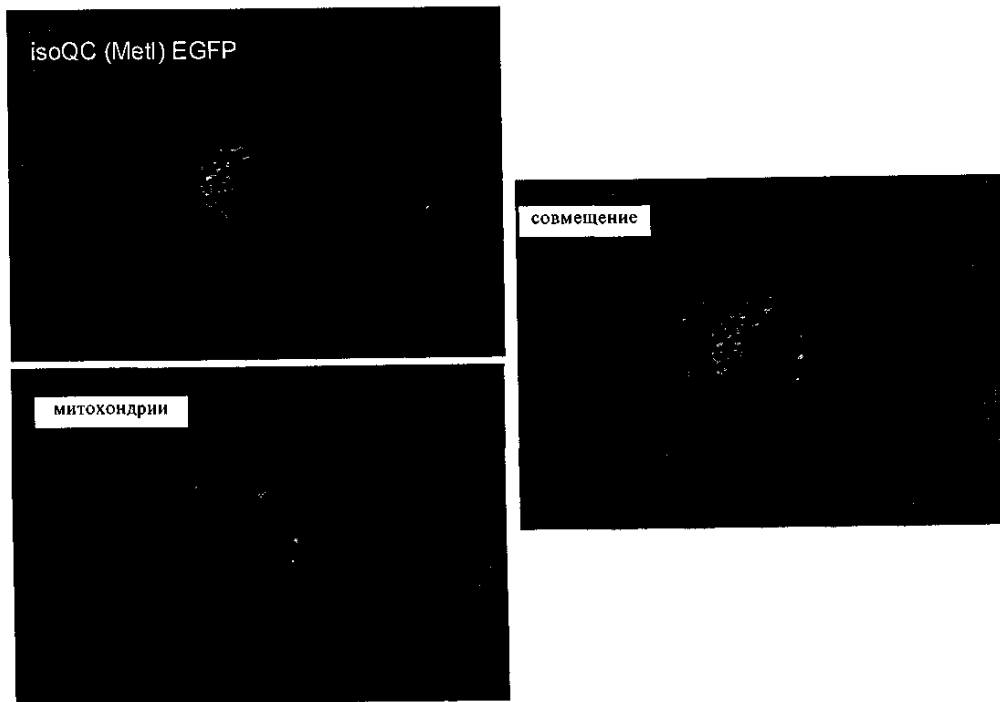
Фиг. 9



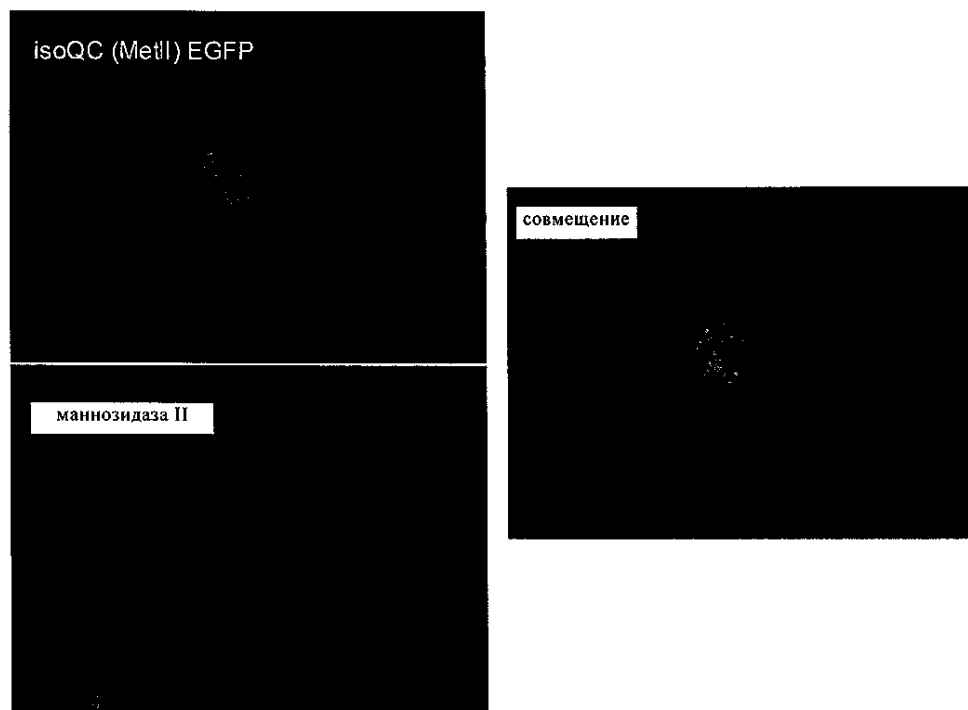
Фиг. 10



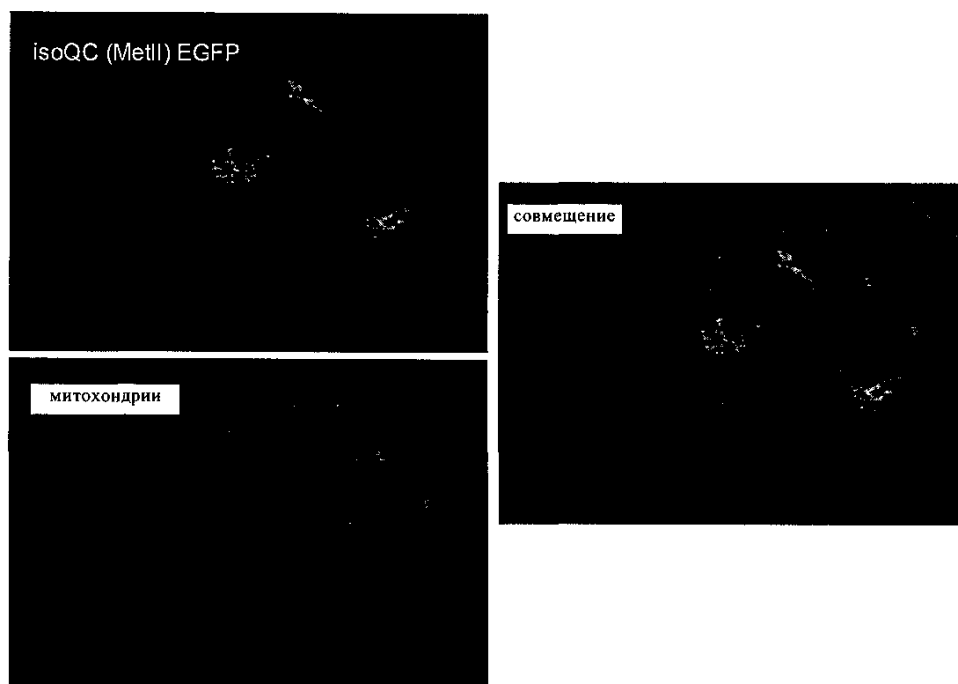
Фиг. 11



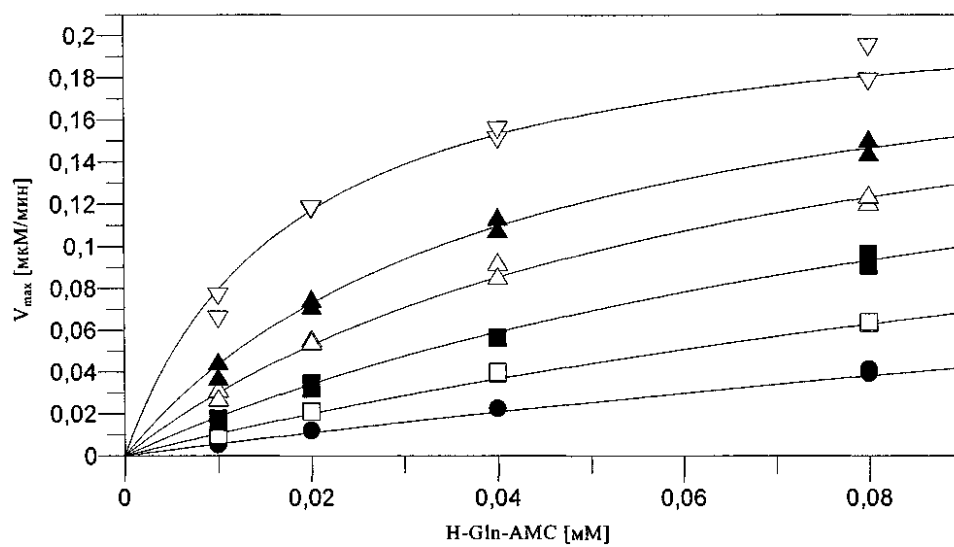
Фиг. 12



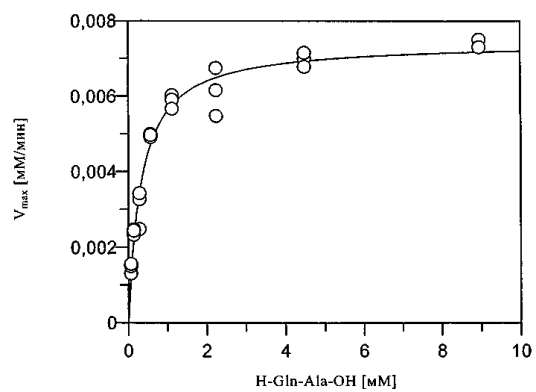
Фиг. 13



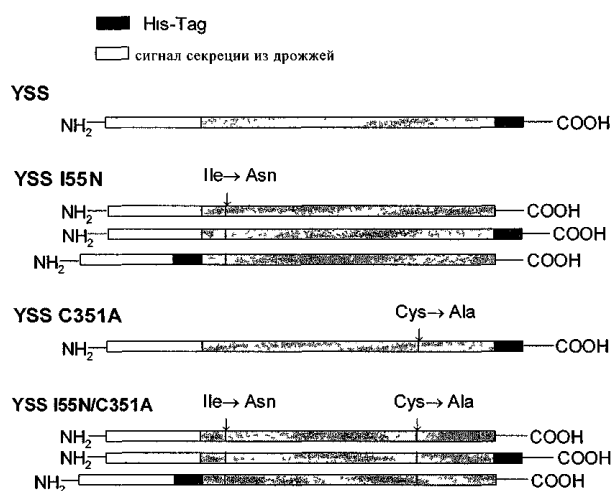
Фиг. 14



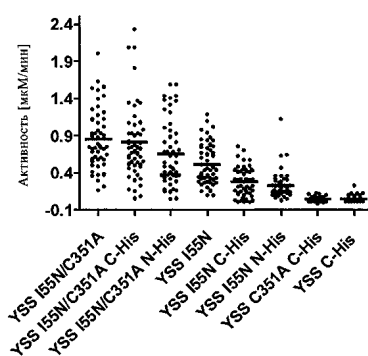
Фиг. 15



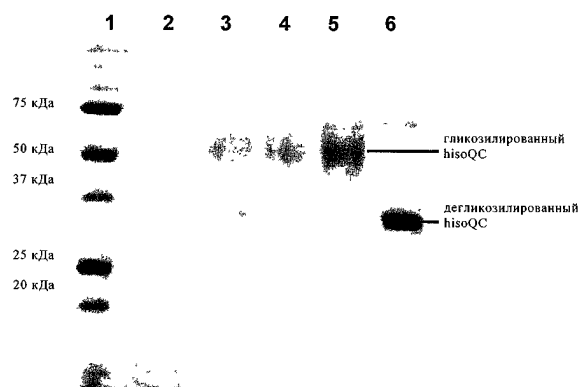
Фиг. 16



Фиг. 17

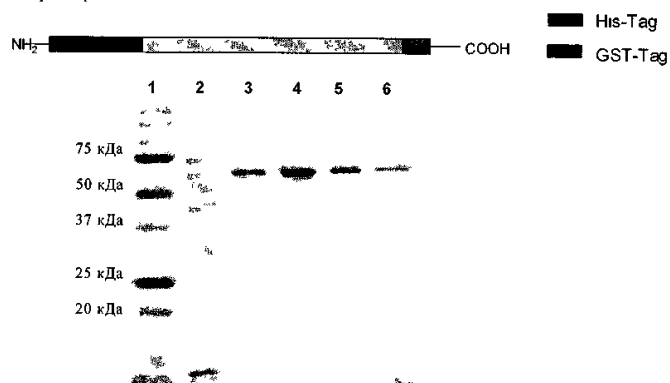


Фиг. 18

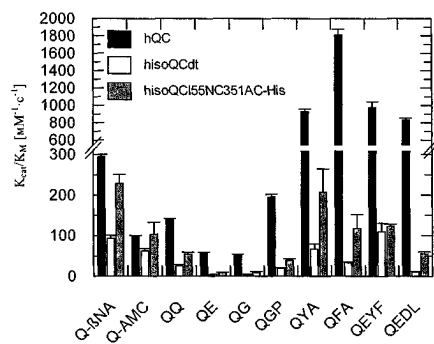


Фиг. 19

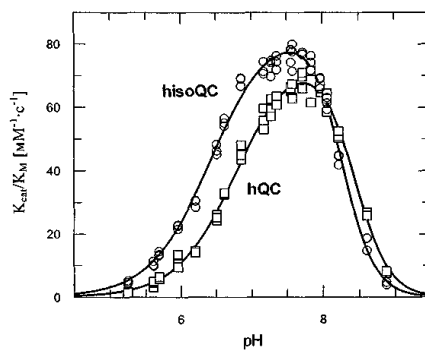
Экспрессированный слитый белок



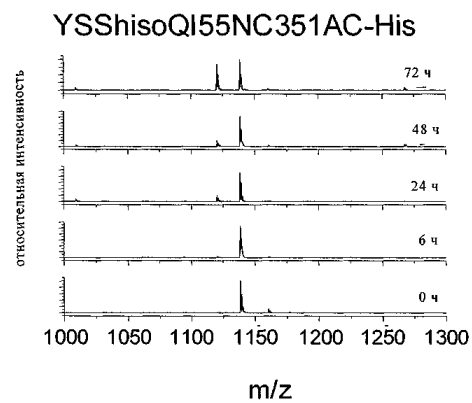
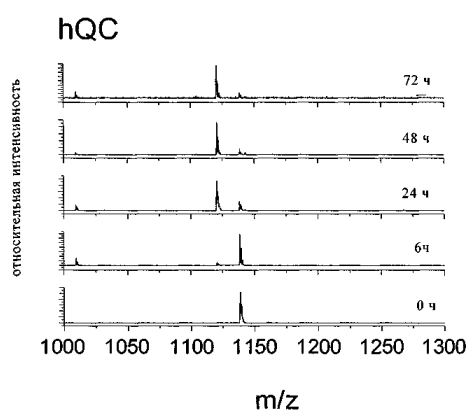
Фиг. 20



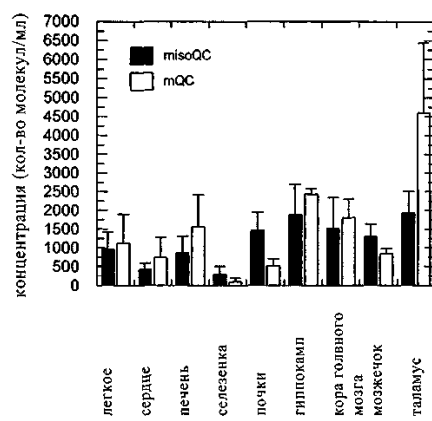
Фиг. 21



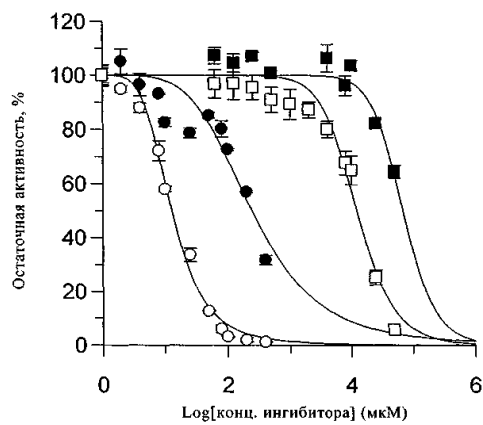
Фиг. 22



Фиг. 23

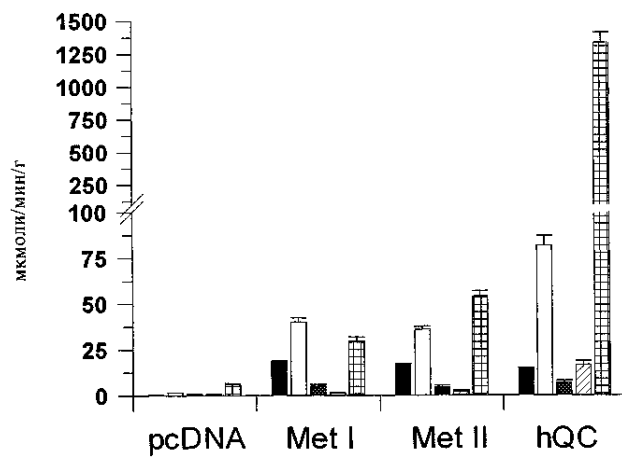


Фиг. 24

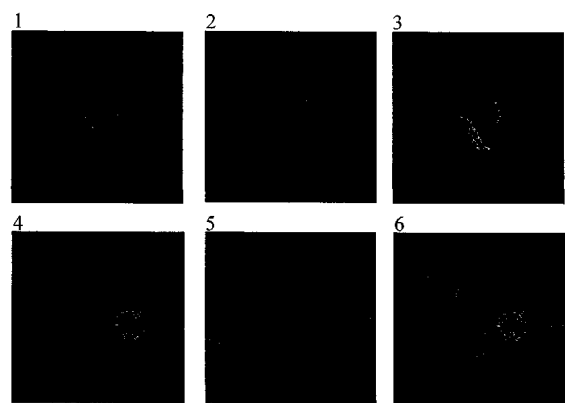
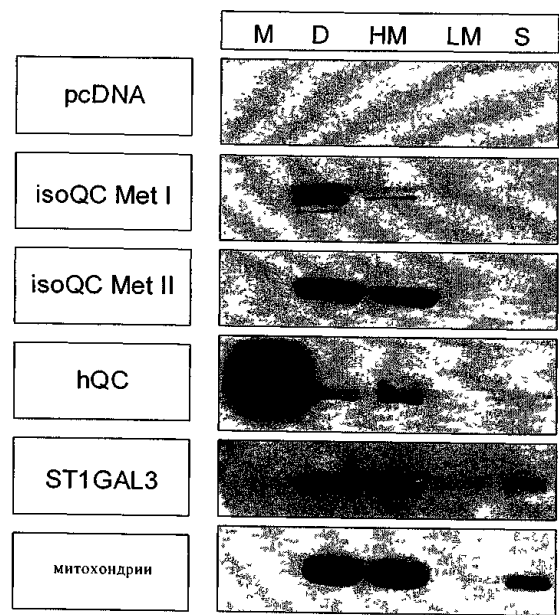
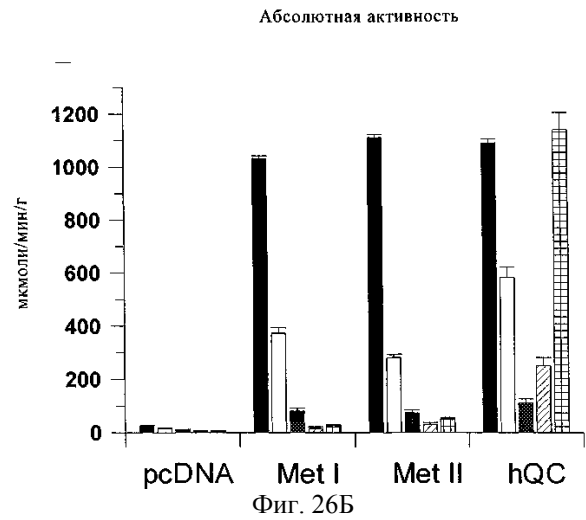


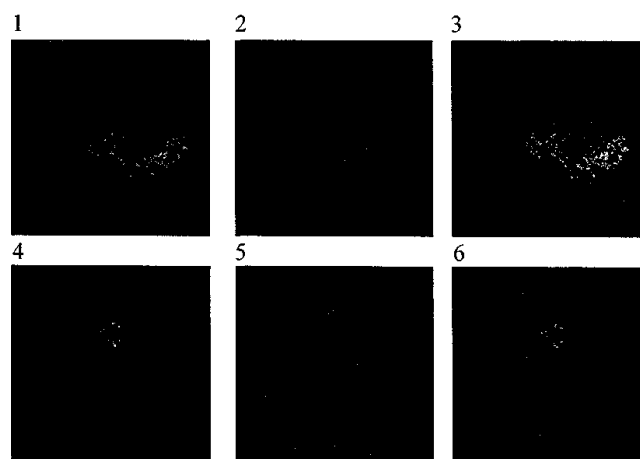
Фиг. 25

Удельная активность

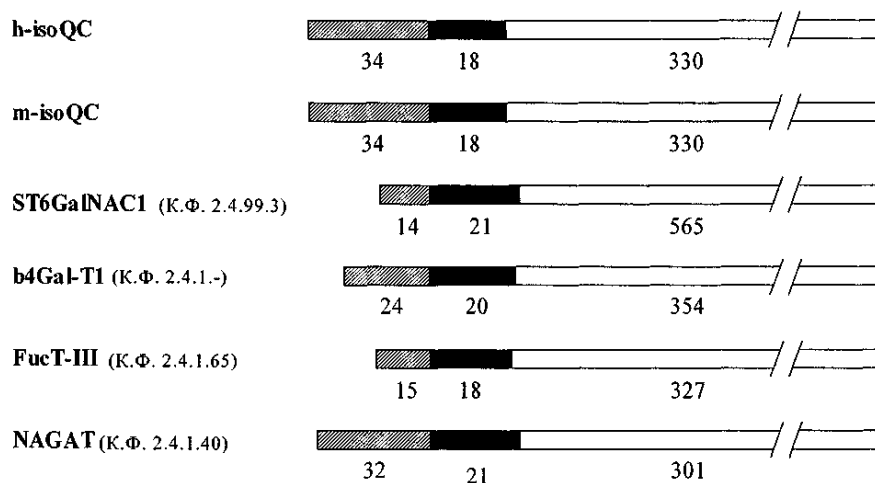


Фиг. 26A

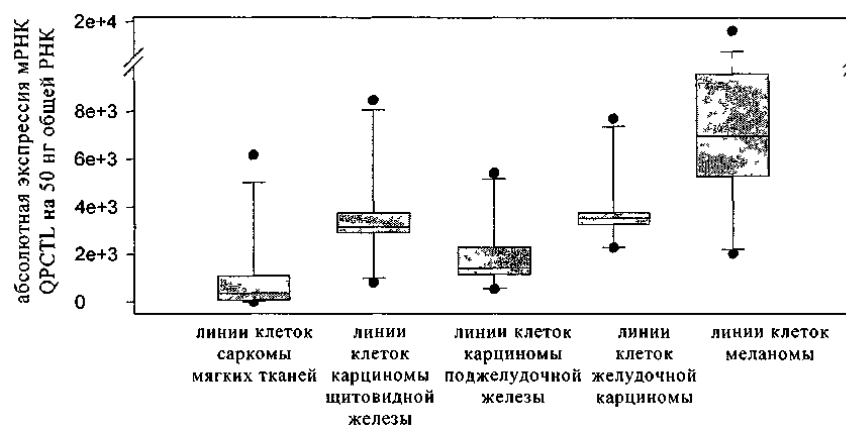




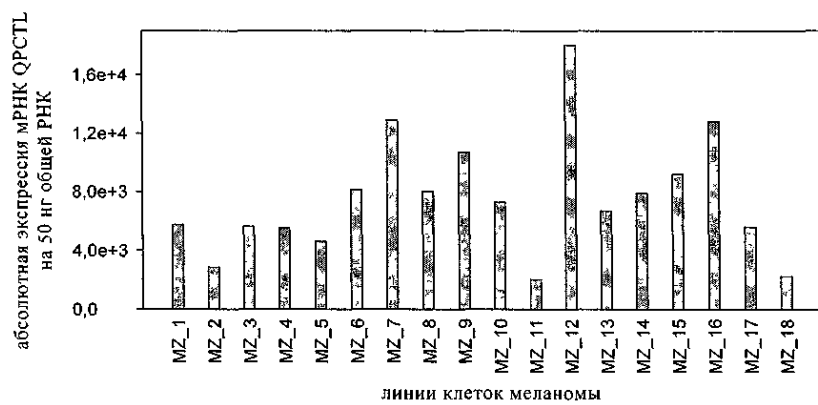
Фиг. 27Б



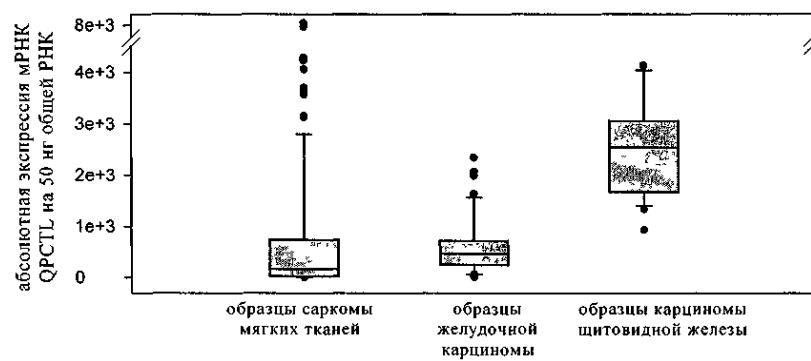
Фиг. 28



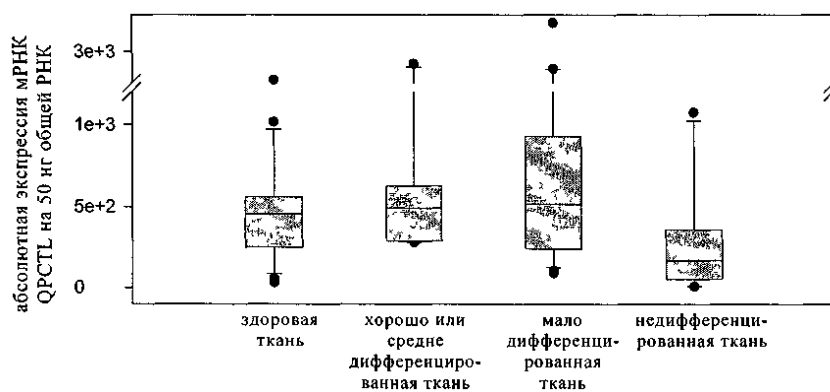
Фиг. 29



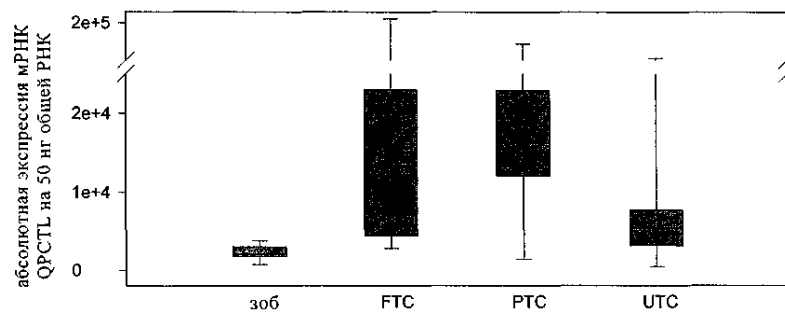
Фиг. 30



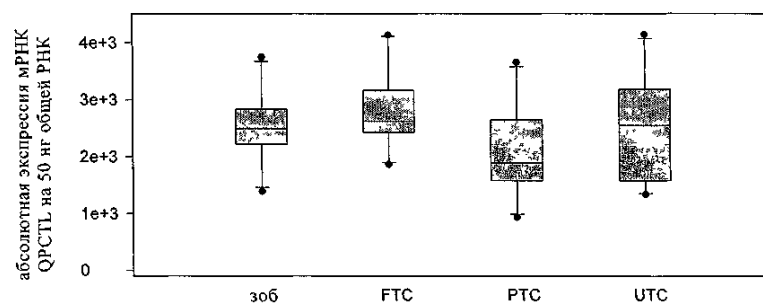
Фиг. 31



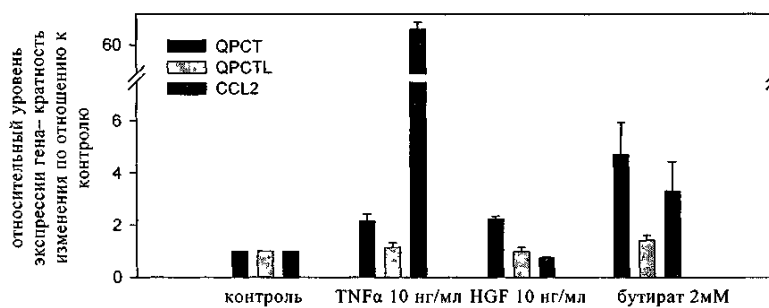
Фиг. 32



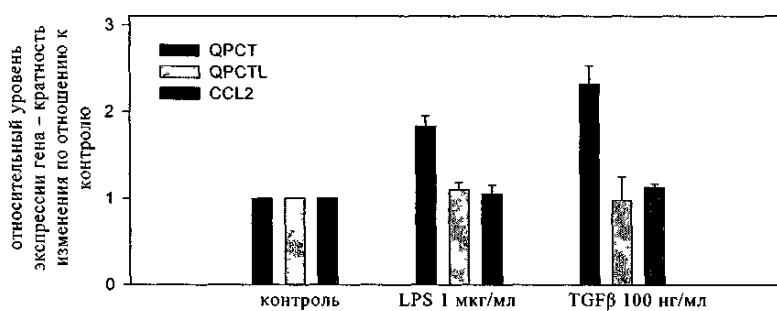
Фиг. 33



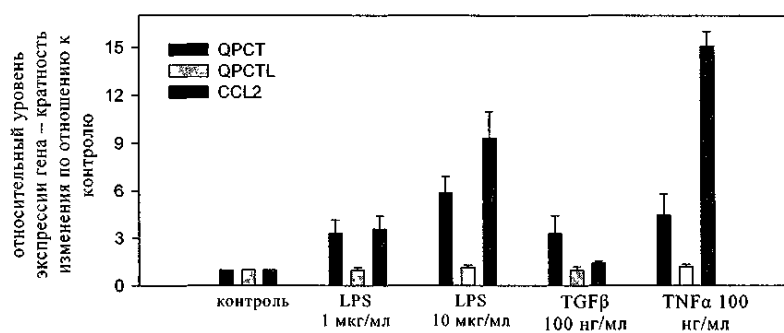
Фиг. 34



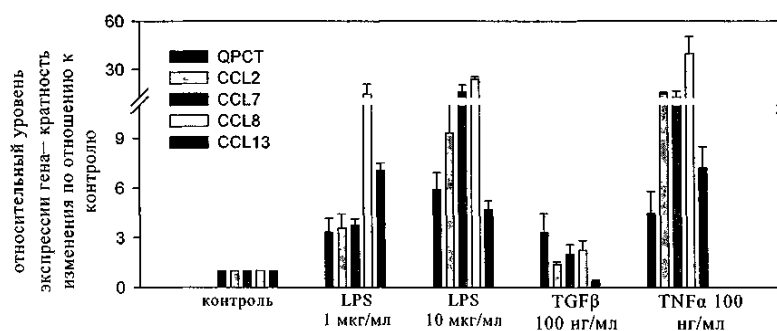
Фиг. 35



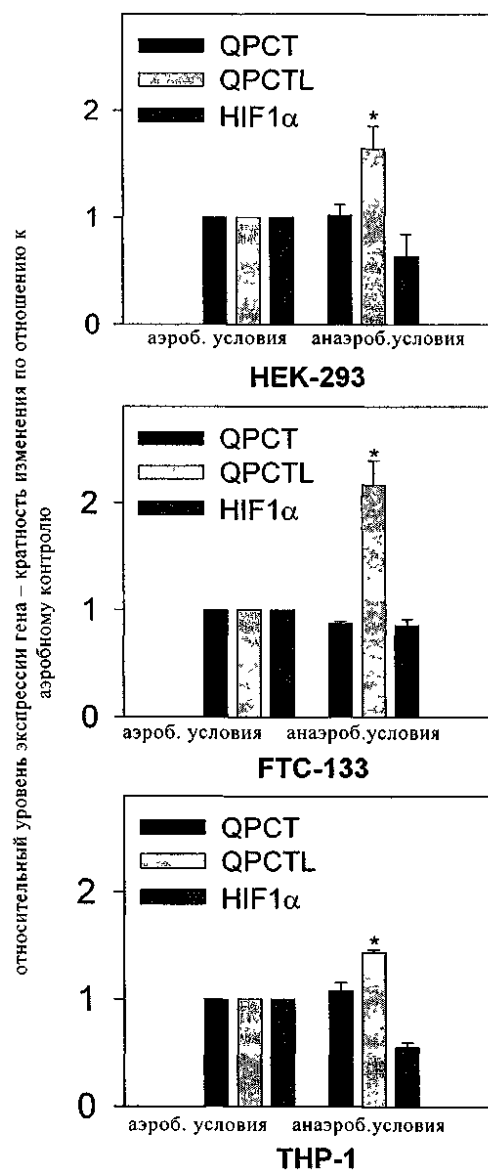
Фиг. 36



Фиг. 37



Фиг. 38



Фиг. 39

