

Настоящее изобретение относится к новым белкам (обозначенным здесь INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144), идентифицированным как рецептороподобные белки сибирской язвы, содержащие домен фактора А фон Виллебранда (vWFA) и внеклеточный домен рецептора сибирской язвы (ANT_IG), и к использованию этих белков и последовательностей нуклеиновых кислот кодирующих генов в целях диагностики, предупреждения и лечения заболевания.

Все цитированные здесь публикации, патенты и патентные заявки во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники

В настоящее время в области разработки лекарственных средств произошел крутой перелом, который положил начало новой эре функциональной геномики, пришедшей на смену старым методам. Термин "функциональная геномика" применяется к способам использования средств биоинформатики для приписывания функций последовательностям белков, представляющих интерес для специалистов. Такие средства становятся все более необходимыми, и это связано с тем, что оснащение научно-исследовательских лабораторий, занимающихся определением функций последовательностей этих белков, пока не дает возможности быстро обрабатывать все нарастающий поток данных о последовательностях этих белков.

Поскольку эффективность и точность методов биоинформатики возрастают, эти методы быстро вытесняют стандартные методы биохимической характеристики. Действительно, современные средства биоинформатики, используемые для идентификации белков согласно изобретению, позволяют получать окончательные результаты с достаточно высокой степенью достоверности.

Различные институты и коммерческие организации занимаются обработкой непрерывно поступающих данных о последовательностях, и на основе полученных результатов они приходят к важным открытиям. Однако необходимость в идентификации и характеристике других генов и полипептидов, кодируемых этими генами, в целях их дальнейшего исследования и поиска новых лекарственных средств все еще остается актуальной.

Введение

Рецептор токсина сибирской язвы.

Сибирская язва главным образом поражает домашних и диких животных, в частности травоядных животных, таких как крупный рогатый скот, овцы, лошади, мулы и козы. Человек поражается этим заболеванием случайно посредством контакта с заболевшими животными, например через мясо, кости, шкуру, шерсть и экскременты.

Один из компонентов токсина сибирской язвы обладает действием, которое может привести к летальному исходу и которое пока еще не изучено. Смерть наступает из-за недостатка кислорода, вторичного шока, возрастающей проницаемости сосудов и нарушения дыхания. Смерть человека и животных от сибирской язвы часто наступает внезапно и неожиданно. На самой последней стадии заболевания уровень летального токсина в кровотоке быстро возрастает, и его концентрация прямо пропорциональна концентрации микроорганизмов в крови.

Трехкомпонентный токсин сибирской язвы продуцируется бактерией *Bacillus anthracis*, которая является возбудителем сибирской язвы. Этот токсин способствует проникновению бактерии в иммунную систему и вызывает гибель хозяина в результате системной инфекции. Указанный токсин состоит из трех белков: протективного антигена (РА) (одной связывающейся с рецептором молекулы) и двух ферментных молекул, называемых фактором отека (ЕF) и летальным фактором (LF). После высвобождения указанных белков из бактерии в качестве нетоксичных молекул они попадают на поверхность клеток млекопитающих и образуют токсические комплексы, связывающиеся с клетками (Mourez M. et al., *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 958-961).

Два компонента указанного токсина ферментативно модифицируют субстраты в цитозоле клеток млекопитающих, где фактор отека (ЕF) представляет собой аденилатциклазу, которая нарушает защитную функцию организма посредством различных механизмов, включая супрессию функции нейтрофилов и подавление резистентности хозяина. Летальный фактор (LF) представляет собой цинкзависимую протеазу, которая расщепляет активированную митогеном киназу протеинкиназы и вызывает лизис макрофагов. Протективный антиген (РА), т.е. третий компонент токсина, связывается с клеточным рецептором и опосредует доставку ферментных компонентов в цитозоль (Leppla S.H. *Anthrax toxin*, In Aktories K., Just I., editors. *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer; 2000, p. 447-72).

Рецептор токсина сибирской язвы (АТR) кодируется геном эндотелиального маркера опухоли 8 (TEM8). Для осуществления первой стадии интоксикации токсином сибирской язвы используют белковый продукт гена TEM8. Истинные физиологические функции АТR пока неизвестны, однако очевидно, что TEM8 стимулирует развитие рака ободочной кишки (St Croix B. et al. (2000), *Science*, Aug. 18; 289 (5482): 1197-1202). Транскрипция TEM8 также стимулируется в процессе ангиогенеза. Исследования, проводимые на мышином гене опухолевого эндотелиального маркера 8 (mTEM8), дают основание предположить, что mTEM8 может участвовать в неоваскуляризации опухоли (Carson-Walter E. et al. (2001), *Cancer Res.* Sep. 15; 61 (18): 6649-55).

Белок 2 капиллярного морфогенеза человека (CMG2) имеет доменную структуру, аналогичную ATR, и последовательности этих двух белков по всей их длине имеют 40%-ную идентичность. Было экспериментально показано, что CMG2 может связываться с субъединицами токсина сибирской язвы (РА), что дает основание предположить, что механизм действия CMG2 может быть аналогичен механизму ATR (Scobie H.M. et al. (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Apr. 29; 100 (9): 5170-4). Истинные физиологические функции CMG2 неизвестны, однако было показано, что рекомбинантная форма CMG2 способна связываться с коллагеном типа IV и ламинином (Bell S. et al. (2001), *J. Cell Sci.* Aug; 114 (Pt. 15): 2755-73).

Внеклеточный домен рецептора сибирской язвы (ANT_IG) расположен предположительно во внеклеточной N-концевой половине рецептора токсина сибирской язвы. Другой домен рецептора токсина сибирской язвы был найден во внеклеточной части и был назван ANT_C. Эта часть, вероятно, принадлежит молекуле суперсемейства IgG и обнаруживает наиболее близкое сходство с доменом IPT/TIG. Семейство IPT/TIG состоит из доменов, которые имеют такую же пространственную упаковку, что и иммуноглобулин. Эти домены были обнаружены в рецепторах клеточной поверхности, таких как Met и Ron, а также в факторах транскрипции, где они участвуют в связывании ДНК. Рецептор тирозинкиназы Ron имеет общие, присущие всем членам этого подсемейства (Met и Sea), уникальные функциональные свойства: способность к регуляции диссоциации клеток; подвижность и способность к инвазии внеклеточного матрикса (разрушению).

Одним из типичных признаков ATR является внеклеточный домен фактора фон Виллебранда (vWFA), известный также как домен интегрина (I). Домен vWFA был обнаружен во многих внеклеточных белках. Примерами таких белков являются фактор В белков комплемента (FB), C2, CR3 и CR4, интегрины и коллаген типов VI, VII, XII, XIV (Perkins S.J. et al., (1994), *J. Mol. Biol.* Apr. 22; 238 (1): 104-19), а также рецепторы токсина сибирской язвы (Bradley K. et al. (2003), *Biochem Pharmacol.* Feb. 1; 65 (3): 309-14). Функциями, ассоциированными с белками, содержащими домен vWFA, являются их действие в качестве компонентов внеклеточного матрикса, гемостаз, клеточная адгезия и действие по механизмам иммунной защиты (Colombatti A. et al. (1993), *Matrix*. Jul.; 13 (4): 297-306).

Домен vWFA, обнаруженный в белках класса интегринов, был обозначен как домен интегрина I (Roland A. et al. (2003), *J. Biol. Chem.* Apr. 25; 278 (17), 15035-15039). Было показано, что субъединица РА токсина сибирской язвы связывается непосредственно с доменом vWFA ATR по механизму, который, очевидно, имитирует механизм связывания интегринов с их природными субстратами. Было показано, что растворимая форма этого домена действует в клеточной культуре как эффективный внеклеточный антитоксин сибирской язвы (Bradley K. et al. (2003), *Biochem. Pharmacol.* Feb. 1; 65 (3): 309-14).

Общим мотивом для большинства белков, содержащих домен vWFA, является зависимый от ионов металла сайт адгезии (MIDAS). Мотив MIDAS участвует в координации катионов (например, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} и Ca^{2+}) и состоит из пяти остатков, Asp-x-Ser-x-Ser, Thr и Asp (Scobie H.M. et al. (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Apr. 29; 100 (9): 5170-4). Мотив MIDAS расположен во внеклеточном домене vWFA хелатных комплексов ATR/TEM8, образуемых двухвалентным катионом, который играет решающую роль в связывании РА.

Было показано, что растворимый домен vWFA ATR (sATR) блокирует интоксикацию сибирской язой клеток китайского хомячка (CHO) в клеточной культуре (Bradley et al. *Nature* 2001; 414: 225-9; см. также WO 04/052277 и WO 02/46228).

Bradley et al. также сообщали об участии комплекса ATR/TEM8/CMG2 в патогенезе рака, а именно опухолей эндотелия, рака ободочной кишки, рака мочевого пузыря, рака легких и меланомы (Bradley et al. *Biochemical Pharmacology*, 2003. Vol. 65, p. 309-314).

Было высказано предположение, что лечение инфекций, вызываемых возбудителем сибирской язвы, а также рака может быть осуществлено с использованием нуклеиновой кислоты, которая является бессмысловой по отношению к ATR/TEM8 (WO 04/013313 и WO 04/052277).

Было также высказано предположение, что природный ATR/TEM8/CMG2 играет определенную роль в ангиогенезе (см. Nanda and St.Croix, *Current Opinion in Oncology*, 2004. Vol. 16, p. 44-49). Было показано, что внеклеточный домен TEM8 связывается с субъединицей $\alpha 3$ коллагена VI посредством COOH-концевого домена C5 (Nanda et al. *Cancer Research*, 2004. Vol. 64, p. 817-820). РА может конкурировать с субъединицей коллагена за связывание с ATR. Nanda et al. было высказано предположение, что взаимодействие с TEM8/C5 может играть важную роль в опухолевом ангиогенезе.

Мутации в гене CMG2 (в частности, в домене vWFA) вызывают два связанных с аллелями расстройства: ювенильный гиалиновый фиброматоз (ЮГФ) и системный гиалиноз у детей (ISH; Lacy et al., *PNAS* 2004. Vol. 101. № 17, p. 6367-6372).

Кроме того, миссенс-мутации в доменах vWFA различных белков приводят к заболеваниям человека. Мутации предшественника фактора фон Виллебранда (vWF) ассоциируются с заболеванием фон Виллебранда (OMIM Acc. № 193400). Мутации предшественника коллагеновой цепи $\alpha 3$ (VI) ассоциируются с миопатией Бетлема (OMIM Acc. № 120250 и 158810). Мутации предшественника коллагеновой цепи $\alpha 1$ (VII) (длинноцепочечный коллаген) (LC-коллаген) ассоциируются с буллезным дистрофическим эпидермолизом (доминантный ген, OMIM Acc. № 120120; рецессивный ген, OMIM Acc. № 131750; претибиаль-

ный, доминантный и рецессивный OMIM Acc. № 226600 и OMIM Acc. № 131850).

Некоторые белки, которые содержат одну или несколько копий домена типа A, участвуют в механизмах защиты хозяина, таких как иммунный ответ и воспаление (см., например, Celikel et al., *Nature Structural Biology*, 5: 189 (1998)).

В WO 92/17192 приведена терапевтическая композиция, эффективная для лечения или ингибирования тромбоза и содержащая мономерный полипептид, расположенный во фрагменте зрелой субъединицы фактора фон Виллебранда (vWF) дикого типа. WO 04/062551 относится к полипептидам, которые содержат, по меньшей мере, однодоменное антитело против vWF, домена vWF A1, домена A1 активированного vWF, домена vWF A3, gblb и/или коллагена, или к гомологам и/или функциональным частям этих полипептидов, где указанные полипептиды могут быть использованы в диагностике и/или лечении состояний, требующих модуляции опосредованной тромбоцитами агрегации.

Поэтому получение еще большей информации о белках, содержащих домен vWFA и домен ANT_IG, в частности об ATR-подобных белках, имеет исключительно важное значение в понимании процессов, лежащих в основе вышеупомянутых патологических состояний, а следовательно, и в разработке более эффективной генной и/или лекарственной терапии указанных расстройств.

Описание изобретения

Настоящее изобретение основано на обнаружении того факта, что белки, обозначенные здесь INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144, представляют собой варианты сплайсинга одной и той же последовательности, которые гомологичны рецептору токсина сибирской язвы. В частности, настоящее изобретение основано на неожиданном обнаружении того факта, что полипептиды, описанные в настоящем документе, предпочтительно INSP142, обнаруживают ограниченную экспрессию, о чем ранее не высказывалось каких-либо предположений, и эта экспрессия наблюдается в биоптатах ободочной кишки и подвздошной кишки, пораженных IBD, а также в биоптатах кожи, пораженной псориазом. Результаты TaqMan-анализа экспрессии указывали на специфическую картину экспрессии, которая показала, что INSP142 стимулирует воспалительный процесс в кишечнике и способствует развитию воспалительных заболеваний кишечника, а также болезней и воспалений кожи.

Эти неожиданно обнаруженные свойства являются характерными свойствами полипептидов согласно изобретению и кодирующих их полинуклеотидов и позволяют использовать указанные полипептиды для приготовления лекарственных средств или фармацевтических композиций.

Все INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 предположительно содержат домен фактора A фон Виллебранда (vWFA) и внеклеточный домен рецептора токсина сибирской язвы (ANT_IG). Эти два внеклеточных домена сообщают ATR-подобным белкам токсина сибирской язвы рецепторные связывающие свойства. На фиг. 8 и 9 проиллюстрированы консервативные свойства белков INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144, присущие ATR-подобным белкам на структурном и аминокислотном уровне. Домен vWFA идентичен доменам INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144. Домен ANT_IG в белке INSP141 слегка отличается от домена ANT_IG в INSP142, INSP143 и INSP144.

Предполагается, что INSP141 и INSP142 секретируют белки, которые не содержат трансмембранные области.

Предполагается, что INSP143 и INSP144 содержат сигнальный пептид и трансмембранные области. Что касается INSP143 и INSP144, то предполагается, что их N-конец является внеклеточным, а C-конец является внутриклеточным.

В одном из вариантов своего первого аспекта настоящее изобретение относится к полипептиду, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:148;

(ii) представляет собой фрагмент, который действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно как ATR-подобный белок, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидами (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii).

Предпочтительно полипептид согласно первому аспекту изобретения:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:128 и/или SEQ ID NO:132;

(ii) представляет собой фрагмент, который действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно как ATR-подобный белок, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидами (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii).

В соответствии с этим аспектом полипептид согласно изобретению может состоять из одной из вышеуказанных последовательностей, таких как SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132,

SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:148.

Полипептид согласно первому аспекту изобретения может, кроме того, содержать гистидиновую метку. Предпочтительно, если такая гистидиновая метка находится на С-конце указанного полипептида. Предпочтительная гистидиновая метка содержит 1-10 гистидиновых остатков (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков). Более предпочтительно если гистидиновая метка содержит 6 гистидиновых остатков.

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, будет далее называться "полипептидом экзона 1 INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, будет далее называться "полипептидом экзона 2 INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:6, будет далее называться "полипептидом экзона 3 INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:8, будет далее называться "полипептидом экзона 4 INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:10, будет далее называться "полипептидом экзона 5 INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:12, будет далее называться "полипептидом экзона 6 INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:14, будет далее называться "полипептидом экзона 7 INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:16, будет далее называться "полипептидом экзона 8 INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:18, будет далее называться "полипептидом экзона 9 INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:20, будет далее называться "полипептидом экзона 10 INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:22, будет далее называться "полипептидом экзона 11 INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:24, будет далее называться "полипептидом INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:128, будет далее называться "клонированным полипептидом INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:130, будет далее называться "клонированным полипептидом INSP141 с гистидиновой меткой".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:132, будет далее называться "клонированным зрелым полипептидом INSP141".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:134, будет далее называться "клонированным зрелым полипептидом INSP141 с гистидиновой меткой".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:146, будет далее называться "пептидной последовательностью домена vWFA INSP141-INSP142-INSP143-INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:148, будет далее называться "пептидной последовательностью домена ANT_IG INSP141".

Используемый здесь термин "полипептиды INSP141" включает в себя полипептиды, содержащие полипептид экзона 1 INSP141, полипептид экзона 2 INSP141, полипептид экзона 3 INSP141, полипептид экзона 4 INSP141, полипептид экзона 5 INSP141, полипептид экзона 6 INSP141, полипептид экзона 7 INSP141, полипептид экзона 8 INSP141, полипептид экзона 9 INSP141, полипептид экзона 10 INSP141, полипептид экзона 11 INSP141, полипептид INSP141, клонированный полипептид INSP141, клонированный полипептид INSP141 с гистидиновой меткой, клонированный зрелый полипептид INSP141, клонированный зрелый полипептид INSP141 с гистидиновой меткой, пептидную последовательность домена vWFA INSP141-INSP142-INSP143-INSP144, пептидную последовательность домена ANT_IG INSP141.

Предпочтительно полипептид согласно этому аспекту изобретения действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно как ATR-подобный белок. Под термином "действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG", авторы настоящего изобретения подразумевают, что полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность или структурные признаки, которые могут быть идентифицированы, например, с помощью стандартных методов биотехнологии как консервативные признаки, присущие полипептидам белков, относящихся к семействам белков, содержащих домены vWFA и/или ANT_IG, функционируют так, что взаимодействие этих полипептидов с лигандом или рецептором не оказывает какого-либо значительного негативного действия по сравнению с функцией полноразмерного полипептида дикого типа. Так, например, домен ANT_IG определяют по конкретной сигнатуре (данные о конструировании HMMER) в базах данных по выравниванию семейств белков и HMM (PFAM, The Pfam Protein Families Database. Alex et al. Nucleic Acids Research 2004. Database Issue 32: D138-D141). Определение функциональных свойств не должно быть ограничено конкретным биоин-

формативным средством, таким как PFAM, поскольку для детекции консервативных доменов или мотивов существуют и другие средства, имеющие свои собственные конкретные сигнатуры. Кроме того, консервативные остатки в домене ANT_IG и в домене vWFA, которые, очевидно, имеют важное значение для их правильного функционирования, показаны на фиг. 9 (например, 13 идентичных остатков присутствуют в домене ANT_IG во всех членах этого семейства). Более того, специалист в данной области, исходя из выравнивания, показанного на фиг. 9, может создать конкретные сигнатуры для домена vWFA и/или домена ANT_IG с применением подходящих средств (например, Psi-blast).

Под термином "функции, аналогичные функции ATR-подобного белка", авторы настоящего изобретения подразумевают, что полипептиды содержат домены vWFA и ANT_IG, которые имеют свойства, аналогичные белку ATR. Так, например, полипептиды согласно изобретению предпочтительно обладают способностью связываться с токсином, более конкретно - с бактериальным токсином и/или обладают способностью к предупреждению и/или лечению рака.

Во втором варианте своего первого аспекта настоящее изобретение относится к полипептиду, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:150;

(ii) представляет собой фрагмент, который действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно как ATR-подобный белок, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидами (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii).

Предпочтительно полипептид согласно первому аспекту изобретения:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:52 и/или SEQ ID NO:136;

(ii) представляет собой фрагмент, который действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно как ATR-подобный белок, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидами (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii).

В соответствии с этим аспектом изобретения полипептид согласно изобретению может состоять из одной из вышеуказанных последовательностей, таких как SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:150.

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:26, будет далее называться "полипептидом экзона 1 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:28, будет далее называться "полипептидом экзона 2 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:30, будет далее называться "полипептидом экзона 3 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:32, будет далее называться "полипептидом экзона 4 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:34, будет далее называться "полипептидом экзона 5 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:36, будет далее называться "полипептидом экзона 6 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:38, будет далее называться "полипептидом экзона 7 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:40, будет далее называться "полипептидом экзона 8 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:42, будет далее называться "полипептидом экзона 9 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:44, будет далее называться "полипептидом экзона 10 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:46, будет далее называться "полипептидом экзона 11 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:48, будет далее называться "полипептидом экзона 12 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:50, будет далее называться "полипептидом экзона 13 INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:52, будет далее называться "полипептидом INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:136, будет далее называться "клонированным полипептидом INSP142".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:146, будет далее называться "пептидной последовательностью домена vWFA INSP141-INSP142-INSP143-INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:150, будет далее называться "пептидной последовательностью домена ANT_IG INSP142-INSP143-INSP144".

Используемый здесь термин "полипептиды INSP142" включает в себя полипептиды, содержащие полипептид экзона 1 INSP142, полипептид экзона 2 INSP142, полипептид экзона 3 INSP142, полипептид экзона 4 INSP142, полипептид экзона 5 INSP142, полипептид экзона 6 INSP142, полипептид экзона 7 INSP142, полипептид экзона 8 INSP142, полипептид экзона 9 INSP142, полипептид экзона 10 INSP142, полипептид экзона 11 INSP142, полипептид экзона 12 INSP142, полипептид экзона 13 INSP142, полипептид INSP142, клонированный полипептид INSP142, пептидную последовательность домена vWFA INSP141-INSP142-INSP143-INSP144, пептидную последовательность домена ANT_IG INSP142-INSP143-INSP144.

Предпочтительно полипептид согласно этому аспекту изобретения действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно как ATR-подобный белок.

В третьем варианте своего первого аспекта настоящее изобретение относится к полипептиду, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:150;

(ii) представляет собой фрагмент, который действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно как ATR-подобный белок, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидами (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii).

Предпочтительно полипептид согласно первому аспекту изобретения:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:138 и/или SEQ ID NO:141;

(ii) представляет собой фрагмент, который действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно как ATR-подобный белок, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидами (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii).

В соответствии с этим аспектом полипептид согласно изобретению может состоять из одной из вышеуказанных последовательностей, таких как SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:150.

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:54, будет далее называться "полипептидом экзона 1 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:56, будет далее называться "полипептидом экзона 2 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:58, будет далее называться "полипептидом экзона 3 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:60, будет далее называться "полипептидом экзона 4 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:62, будет далее называться "полипептидом экзона 5 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:64, будет далее называться "полипептидом экзона 6 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:66, будет далее называться "полипептидом экзона 7 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:68, будет далее называться "полипептидом экзона 8 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:70, будет далее называться "полипептидом экзона 9 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:72, будет далее называться "полипептидом экзона 10 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:74, будет далее называться "полипептидом экзона 11 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:76, будет далее называться "полипептидом экзона 12 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:78, будет далее называться "полипептидом экзона 13 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:80, будет далее называться "полипептидом экзона 14 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:82, будет далее называться "полипептидом экзона 15 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:84, будет далее называться "полипептидом экзона 16 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:86, будет далее называться "полипептидом экзона 17 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:88, будет далее называться "полипептидом экзона 18 INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:90, будет далее называться "полипептидом INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, будет далее называться "клонированным полипептидом INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:140, будет далее называться "клонированным полипептидом INSP143 с гистиридиновой меткой".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:142, будет далее называться "клонированным зрелым полипептидом INSP143".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:144, будет далее называться "клонированным зрелым полипептидом INSP143 с гистиридиновой меткой".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:146, будет далее называться "пептидной последовательностью домена vWFA INSP141-INSP142-INSP143-INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:150, будет далее называться "пептидной последовательностью домена ANT_IG INSP142-INSP143-INSP144".

Используемый здесь термин "полипептиды INSP143" включает в себя полипептиды, содержащие полипептид экзона 1 INSP143, полипептид экзона 2 INSP143, полипептид экзона 3 INSP143, полипептид экзона 4 INSP143, полипептид экзона 5 INSP143, полипептид экзона 6 INSP143, полипептид экзона 7 INSP143, полипептид экзона 8 INSP143, полипептид экзона 9 INSP143, полипептид экзона 10 INSP143, полипептид экзона 11 INSP143, полипептид экзона 12 INSP143, полипептид экзона 13 INSP143, полипептид экзона 14 INSP143, полипептид экзона 15 INSP143, полипептид экзона 16 INSP143, полипептид экзона 17 INSP143, полипептид экзона 18 INSP143, полипептид INSP143, клонированный полипептид INSP143, клонированный полипептид INSP143 с гистиридиновой меткой, клонированный зрелый полипептид INSP143, клонированный зрелый полипептид INSP143 с гистиридиновой меткой, пептидную последовательность домена vWFA INSP141-INSP142-INSP143-INSP144, пептидную последовательность домена ANT_IG INSP142-INSP143-INSP144.

Предпочтительно полипептид согласно этому аспекту изобретения действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно как ATR-подобный белок.

В четвертом варианте своего первого аспекта настоящее изобретение относится к полипептиду, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:150;

(ii) представляет собой фрагмент, который действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно как ATR-подобный белок, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидами (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii).

Предпочтительно полипептид согласно первому аспекту изобретения:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:126;

(ii) представляет собой фрагмент, который действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно как ATR-подобный белок, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидами (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii).

В соответствии с этим аспектом полипептид согласно изобретению может состоять из одной из вышеуказанных последовательностей, таких как SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:150.

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:92, будет далее называться "полипептидом экзона 1 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:94, будет далее называться "полипептидом экзона 2 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:96, будет далее называться "полипептидом экзона 3 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:98, будет далее называться "полипептидом экзона 4 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:100, будет далее называться "полипептидом экзона 5 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:102, будет далее называться "полипептидом экзона 6 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:104, будет далее называться "полипептидом экзона 7 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:106, будет далее называться "полипептидом экзона 8 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:108, будет далее называться "полипептидом экзона 9 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:110, будет далее называться "полипептидом экзона 10 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:112, будет далее называться "полипептидом экзона 11 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:114, будет далее называться "полипептидом экзона 12 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:116, будет далее называться "полипептидом экзона 13 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:118, будет далее называться "полипептидом экзона 14 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:120, будет далее называться "полипептидом экзона 15 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:122, будет далее называться "полипептидом экзона 16 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:124, будет далее называться "полипептидом экзона 17 INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:126, будет далее называться "полипептидом INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:146, будет далее называться "пептидной последовательностью домена vWFA INSP141-INSP142-INSP143-INSP144".

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:150, будет далее называться "пептидной последовательностью домена ANT_IG INSP142-INSP143-INSP144".

Используемый здесь термин "полипептиды INSP144" включает в себя полипептиды, содержащие полипептид экзона 1 INSP144, полипептид экзона 2 INSP144, полипептид экзона 3 INSP144, полипептид экзона 4 INSP144, полипептид экзона 5 INSP144, полипептид экзона 6 INSP144, полипептид экзона 7 INSP144, полипептид экзона 8 INSP144, полипептид экзона 9 INSP144, полипептид экзона 10 INSP144, полипептид экзона 11 INSP144, полипептид экзона 12 INSP144, полипептид экзона 13 INSP144, полипептид экзона 14 INSP144, полипептид экзона 15 INSP144, полипептид экзона 16 INSP144, полипептид экзона 17 INSP144, полипептид INSP144, пептидную последовательность домена vWFA INSP141-INSP142-INSP143-INSP144, пептидную последовательность домена ANT_IG INSP142-INSP143-INSP144.

Предпочтительно "белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG", может означать молекулу, содержащую домен vWFA и/или ANT_IG, детектируемые с величиной ошибки, составляющей менее чем 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,0002, 0,00001, 0,000001 или 0,0000001.

Предпочтительно полипептид согласно этому аспекту изобретения действует как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно как ATR-подобный белок.

Предпочтительно активность полипептида настоящего изобретения может быть подтверждена по меньшей мере в одном из следующих анализов:

a) в анализах на мышиных моделях воспалительного заболевания кишечника, индуцированного декстрансульфатом натрия (DSS), описанных Okayasu et al. (A novel method in the induction of reliable experimental acute и chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990. Vol. 98, p. 694-702), или

b) in vitro и in vivo-анализах, а также в анализах на животных-моделях воспалительного заболевания кишечника, описанных Borm и Gouma (*Drug Discovery Today: Disease Models*; Vol. 1, № 4, 2004, p. 437-443), или

c) на моделях рака, описанных Kamb и Lassota (*Drug Discovery Today: Disease Models*; Vol. 1, № 1, 2004, p. 31-36), или на моделях рака кожи, описанных Odashiro et al. (*Drug Discovery Today: Disease Models*, 2005; в печати),

d) на моделях контактного дерматита или атопической экземы, описанных Gutermuth et al. (*Drug Discovery Today: Disease Models*, 2005, в печати), или

e) в анализах на модуляцию пролиферации или выживания нормальных и раковых клеток, или

f) в анализах, описанных в примере 9, или

g) в анализах на модуляцию ангиогенеза или неоваскуляризации, или

h) в анализах на блокаду бактериальной интоксикации, например интоксикации токсином сибирской язвы, или

i) в анализах на способность связываться с токсином, например с бактериальным токсином.

"Антигенная детерминанта" согласно изобретению может представлять собой часть полипептида согласно изобретению, которая связывается с антигенсвязывающим сайтом антитела или с Т-клеточным рецептором (TCR). Альтернативно, "антигенная детерминанта" может представлять собой сайт на поверхности полипептида согласно изобретению, с которым связывается одна молекула антитела. Вообще говоря, антиген имеет несколько или множество различных антигенных детерминант и реагирует с антителами, обладающими множеством различных специфичностей. Такое антитело предпочтительно является иммуноспецифичным в отношении полипептида согласно изобретению. Предпочтительно указанное антитело является иммуноспецифичным в отношении полипептида согласно изобретению, который не составляет часть гибридного белка. Предпочтительно указанное антитело является иммуноспецифичным в отношении INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 или их фрагментов. Антигенные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахаров, и могут иметь специфические трехмерные структуры, а также определенный заряд. Предпочтительно термин "антигенная детерминанта" означает конкретную химическую группу на полипептиде согласно изобретению, которая является антигенной, т.е. вызывает выработку специфического иммунного ответа.

Полипептиды ADU02541 (SEQ ID NO:168) и IPI00480015.1/ENSP00000346942 (SEQ ID NO:169) и кодирующие их нуклеиново-кислотные последовательности не входят в объем настоящего изобретения.

Во втором своем аспекте настоящее изобретение относится к очищенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид согласно первому аспекту изобретения.

Термин "очищенная молекула нуклеиновой кислоты" предпочтительно означает молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению, которая (1) отделена по меньшей мере примерно на 50% от белков, липидов, углеводов или других соединений, с которыми ассоциируется природная полноразмерная нуклеиновая кислота при ее выделении из клеток-источников; (2) не связана со всеми полинуклеотидами или с их частью, с которыми указанная "очищенная молекула нуклеиновой кислоты" ассоциируется в природе; (3) функционально присоединена к полинуклеотиду, с которым она не ассоциируется в природе; или (4) не встречается в природе как часть более крупной полинуклеотидной последовательности. Предпочтительно выделенная молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению, по существу, не содержит любой(ых) другой(их) примесной(ых) молекулы (молекул) нуклеиновой кислоты или других примесей, которые присутствуют в ее природном окружении и могут препятствовать использованию этой нуклеиновой кислоты для продуцирования полипептидов или ее терапевтическому, диагностическому или профилактическому применению или применению в целях исследования. В предпочтительном варианте изобретения геномные ДНК не входят в объем настоящего изобретения. Предпочтительно геномная ДНК, в частности ДНК, имеющая размер более чем 10 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов), 50 т.п.н., 100 т.п.н., 150 т.п.н., 200 т.п.н., 250 т.п.н. или 300 т.п.н., не входит в объем изобретения. При этом предпочтительно если такая "очищенная молекула нуклеиновой кислоты" состоит только из кДНК.

Предпочтительно очищенная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в

SEQ ID NO:1 (кодирующей полипептид экзона 1 INSP141),
 SEQ ID NO:3 (кодирующей полипептид экзона 2 INSP141),
 SEQ ID NO:5 (кодирующей полипептид экзона 3 INSP141),
 SEQ ID NO:7 (кодирующей полипептид экзона 4 INSP141),
 SEQ ID NO:9 (кодирующей полипептид экзона 5 INSP141),
 SEQ ID NO:11 (кодирующей полипептид экзона 6 INSP141),
 SEQ ID NO:13 (кодирующей полипептид экзона 7 INSP141),
 SEQ ID NO:15 (кодирующей полипептид экзона 8 INSP141),
 SEQ ID NO:17 (кодирующей полипептид экзона 9 INSP141),
 SEQ ID NO:19 (кодирующей полипептид экзона 10 INSP141),
 SEQ ID NO:21 (кодирующей полипептид экзона 11 INSP141),
 SEQ ID NO:23 (кодирующей полипептид INSP141),
 SEQ ID NO:25 (кодирующей полипептид экзона 1 INSP142),
 SEQ ID NO:27 (кодирующей полипептид экзона 2 INSP142),
 SEQ ID NO:29 (кодирующей полипептид экзона 3 INSP142),
 SEQ ID NO:31 (кодирующей полипептид экзона 4 INSP142),
 SEQ ID NO:33 (кодирующей полипептид экзона 5 INSP142),
 SEQ ID NO:35 (кодирующей полипептид экзона 6 INSP142),
 SEQ ID NO:37 (кодирующей полипептид экзона 7 INSP142),
 SEQ ID NO:39 (кодирующей полипептид экзона 8 INSP142),
 SEQ ID NO:41 (кодирующей полипептид экзона 9 INSP142),
 SEQ ID NO:43 (кодирующей полипептид экзона 10 INSP142),
 SEQ ID NO:45 (кодирующей полипептид экзона 11 INSP142),
 SEQ ID NO:47 (кодирующей полипептид экзона 12 INSP142),
 SEQ ID NO:49 (кодирующей полипептид экзона 13 INSP142),
 SEQ ID NO:51 (кодирующей полипептид INSP142),
 SEQ ID NO:53 (кодирующей полипептид экзона 1 INSP143),
 SEQ ID NO:55 (кодирующей полипептид экзона 2 INSP143),
 SEQ ID NO:57 (кодирующей полипептид экзона 3 INSP143),
 SEQ ID NO:59 (кодирующей полипептид экзона 4 INSP143),
 SEQ ID NO:61 (кодирующей полипептид экзона 5 INSP143),
 SEQ ID NO:63 (кодирующей полипептид экзона 6 INSP143),
 SEQ ID NO:65 (кодирующей полипептид экзона 7 INSP143),
 SEQ ID NO:67 (кодирующей полипептид экзона 8 INSP143),
 SEQ ID NO:69 (кодирующей полипептид экзона 9 INSP143),
 SEQ ID NO:71 (кодирующей полипептид экзона 10 INSP143),
 SEQ ID NO:73 (кодирующей полипептид экзона 11 INSP143),
 SEQ ID NO:75 (кодирующей полипептид экзона 12 INSP143),
 SEQ ID NO:77 (кодирующей полипептид экзона 13 INSP143),
 SEQ ID NO:79 (кодирующей полипептид экзона 14 INSP143),
 SEQ ID NO:81 (кодирующей полипептид экзона 15 INSP143),
 SEQ ID NO:83 (кодирующей полипептид экзона 16 INSP143),
 SEQ ID NO:85 (кодирующей полипептид экзона 17 INSP143),
 SEQ ID NO: 87 (кодирующей полипептид экзона 18 INSP143),
 SEQ ID NO:89 (кодирующей полипептид INSP143),
 SEQ ID NO:91 (кодирующей полипептид экзона 1 INSP144),
 SEQ ID NO:93 (кодирующей полипептид экзона 2 INSP144),
 SEQ ID NO:95 (кодирующей полипептид экзона 3 INSP144),
 SEQ ID NO:97 (кодирующей полипептид экзона 4 INSP144),
 SEQ ID NO:99 (кодирующей полипептид экзона 5 INSP144),
 SEQ ID NO:101 (кодирующей полипептид экзона 6 INSP144),
 SEQ ID NO:103 (кодирующей полипептид экзона 7 INSP144),
 SEQ ID NO:105 (кодирующей полипептид экзона 8 INSP144),
 SEQ ID NO:107 (кодирующей полипептид экзона 9 INSP144),
 SEQ ID NO:109 (кодирующей полипептид экзона 10 INSP144),
 SEQ ID NO:111 (кодирующей полипептид экзона 11 INSP144),
 SEQ ID NO:113 (кодирующей полипептид экзона 12 INSP144),
 SEQ ID NO:115 (кодирующей полипептид экзона 13 INSP144),
 SEQ ID NO:117 (кодирующей полипептид экзона 14 INSP144),
 SEQ ID NO:119 (кодирующей полипептид экзона 15 INSP144),

SEQ ID NO:121 (кодирующей полипептид экзона 16 INSP144),
 SEQ ID NO:123 (кодирующей полипептид экзона 17 INSP144),
 SEQ ID NO:125 (кодирующей полипептид INSP144),
 SEQ ID NO:127 (кодирующей клонированный полипептид INSP141),
 SEQ ID NO:129 (кодирующей клонированный полипептид INSP141 с гистидиновой меткой),
 SEQ ID NO:131 (кодирующей клонированный зрелый полипептид INSP141),
 SEQ ID NO:133 (кодирующей клонированный зрелый полипептид INSP141 с гистидиновой меткой),
 SEQ ID NO:135 (кодирующей клонированный полипептид INSP142),
 SEQ ID NO:137 (кодирующей клонированный полипептид INSP143),
 SEQ ID NO:139 (кодирующей клонированный полипептид INSP143 с гистидиновой меткой),
 SEQ ID NO:141 (кодирующей клонированный зрелый полипептид INSP143),
 SEQ ID NO:143 (кодирующей клонированный зрелый полипептид INSP143 с гистидиновой меткой),
 SEQ ID NO:145 (кодирующей пептидную последовательность домена vWFA INSP141-INSP142-INSP143-INSP144),

SEQ ID NO:147 (кодирующей пептидную последовательность домена ANT_IG-INSP141),

SEQ ID NO:149 (кодирующей пептидную последовательность домена ANT_IG-INSP142-INSP143-INSP144)

или представляет собой избыточный эквивалент или фрагмент любой одной из указанных последовательностей.

Настоящее изобретение относится также к очищенной молекуле нуклеиновой кислоты, состоящей из любой одной из вышеуказанных последовательностей нуклеиновой кислоты.

В своем третьем аспекте настоящее изобретение относится к очищенной молекуле нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в условиях высокой жесткости с молекулой нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту изобретения. Условия гибридизации высокой жесткости определяют как условия инкубирования в течение ночи при 42°C в растворе, содержащем 50% формамид, 5X SSC (150 mM NaCl, 15 mM тринатрийцитрат), 50 mM фосфат натрия (pH 1,6), 5X раствор Денхардта, 10% декстрансульфата и 20 мкг/мл денатурированной фрагментированной ДНК спермы лосося, с последующей промывкой фильтров в 0,1X SSC приблизительно при 65°C.

В своем четвертом аспекте настоящее изобретение относится к вектору, такому как экспрессирующий вектор, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты согласно второму или третьему аспекту настоящего изобретения.

В своем пятом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, трансформированной вектором согласно четвертому аспекту настоящего изобретения.

В своем шестом аспекте настоящее изобретение относится к лиганду, который специфически связывается с белками, содержащими домен vWFA и/или ANT_IG согласно первому аспекту изобретения. Предпочтительно такой лиганд ингибирует функцию белков, содержащих домен vWFA и/или ANT_IG согласно первому аспекту изобретения. Лиганды для полипептида согласно изобретению могут иметь различные формы, включая природные или модифицированные субстраты, ферменты, рецепторы, небольшие органические молекулы, такие как небольшие природные или синтетические органические молекулы размером до 2000 Да, предпочтительно 800 Да или менее, пептидомиметики, неорганические молекулы, пептиды, полипептиды, антитела и их структурные или функциональные миметики. Белки, содержащие домен vWFA и/или ANT_IG согласно изобретению, могут связываться с бактериальными токсинами, например с токсинами сибирской язвы и с ботулиническим токсином C2 клостридий. Настоящее изобретение относится также к полипептиду согласно первому аспекту изобретения, образующему комплекс с бактериальным токсином.

В своем седьмом аспекте настоящее изобретение относится к соединению, которое является эффективным с точки зрения изменения экспрессии природного гена, кодирующего полипептид согласно первому аспекту изобретения, или с точки зрения регуляции активности полипептида согласно первому аспекту изобретения.

Такие соединения могут быть идентифицированы с применением описанных здесь методов анализа и скрининга.

Соединение согласно седьмому аспекту изобретения может либо повышать (служить агонистом), либо снижать (служить антагонистом) уровень экспрессии гена или активности полипептида.

Важно отметить, что идентификация функции полипептидов экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 дает возможность разработать способы скрининга, позволяющие идентифицировать соединения, эффективные для лечения и/или диагностики заболеваний. Лиганды и соединения согласно шестому и седьмому аспектам изобретения могут быть идентифицированы такими способами. Эти способы также являются аспектами настоящего изобретения.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к применению гена или полипептида INSP141, INSP142, INSP143 или INSP144 в качестве мишени для скрининга кандидатов на лекарственные средства-модуляторы, в частности на лекарственные средства-кандидаты, обладающие активностью,

направленной против расстройств, ассоциированных с белком, содержащим домен vWFA и/или ANT_IG.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способам скрининга соединений на возможность их применения для лечения расстройств, ассоциированных с белком, содержащим домен vWFA и/или ANT_IG, где указанные способы включают в себя выявление способности указанного соединения связываться с геном или полипептидом INSP141, INSP142, INSP143 или INSP144 или с их фрагментами.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способам скрининга соединений на возможность их применения для лечения расстройств, ассоциированных с белком, содержащим домен vWFA и/или ANT_IG, где указанные способы включают в себя тестирование на модуляцию активности гена или полипептида INSP141, INSP142, INSP143 или INSP144 или их фрагментов.

В своем восьмом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду согласно первому аспекту настоящего изобретения, или к молекуле нуклеиновой кислоты согласно второму или третьему аспекту настоящего изобретения, или к вектору согласно четвертому аспекту настоящего изобретения, или к клетке-хозяину согласно пятому аспекту настоящего изобретения, или к лиганду согласно шестому аспекту настоящего изобретения, или к соединению согласно седьмому аспекту настоящего изобретения, которые могут быть использованы для лечения или диагностики заболеваний, в патогенезе которых участвуют белки, содержащие домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно ATR-подобные белки.

Полипептиды согласно изобретению или их фрагменты (например, фрагменты, содержащие домен фактора Виллебранда (vWF) типа A (vWFA) и/или домен ANT_IG) предпочтительно используются для диагностики и/или лечения заболеваний, которые восприимчивы к терапевтической активности других рецептороподобных белков токсина сибирской язвы (например, TEM8 или CMG2).

В частности, полипептиды согласно изобретению могут быть использованы для блокирования бактериальных токсинов. Растворимый домен vWFA (весь мотив MIDAS; остатки, имеющие важное значение, показаны на фиг. 9) и/или растворимый домен ANT_IG полипептидов согласно изобретению могут быть использованы для блокирования бактериальных токсинов (например, токсинов сибирской язвы, ботулинического токсина C2 клостридий (*Clostridium botulinum*)) и тем самым для предупреждения или лечения бактериальных инфекций.

Растворимый домен vWFA и/или домен ANT_IG полипептидов согласно изобретению могут быть присоединены к липидному хвосту, например к гликозилфосфатидилинозиту (GPI-хвосту), который действует как рецептор для субъединицы PA блокируемого бактериального токсина. Liu & Herpla. В *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, Vol. 278, № 7, p. 5227-5234 описано присоединение внеклеточного домена TEM8 к GPI-заякоривающей последовательности uPAR.

Полипептиды согласно изобретению, в частности растворимый домен vWFA (по всему мотиву MIDAS, остатки, играющие важную роль, показаны на фиг. 9) и/или домен ANT_IG полипептидов согласно изобретению, могут быть использованы также для лечения рака.

Антагонисты полипептидов согласно изобретению, в частности мембрано-связанные изоформы INSP143 и INSP144, могут быть использованы также для удаления бактериальных токсинов и для лечения рака. Предпочтительно такими антагонистами являются моноклональные антитела или антисмысловые нуклеиновые кислоты. Предпочтительно указанные антагонисты направлены против домена vWFA, более предпочтительно против мотива MIDAS и/или домена ANT_IG.

Другими заболеваниями, которые могут быть подвергнуты лечению, являются клеточно-пролиферативные расстройства, включая новообразование, меланому, опухоли легких, ободочной кишки, молочной железы, поджелудочной железы, головы и шеи и другие солидные опухоли; миелолифферативные расстройства, такие как лейкоз, неходжкинская лимфома, лейкопения, тромбоцитопения, нарушение ангиогенеза, саркома Капоши; аутоиммунные/воспалительные заболевания, включая аллергию, воспалительные заболевания кишечника, артрит, псориаз, воспаление дыхательных путей, астму и отторжение трансплантированных органов; сердечно-сосудистые заболевания, включая гипертензию, отеки, стенокардию, атеросклероз, тромбоз, сепсис, инсульт, реперфузионное поражение и ишемию; неврологические расстройства, включая расстройства центральной нервной системы, болезнь Альцгеймера, повреждения головного мозга, амиотрофический боковой склероз и боли; нарушения развития; метаболические расстройства, включая сахарный диабет, остеопороз и ожирение; СПИД и почечные заболевания; инфекции, включая вирусные инфекции, бактериальные инфекции, грибковые инфекции и паразитарные инфекции, и другие патологические состояния. Такими заболеваниями предпочтительно являются заболевания, в патогенезе которых участвуют белки, содержащие домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно ATR-подобные белки. Примерами заболеваний, в патогенезе которых участвуют белки, содержащие домен vWFA и/или ANT_IG, являются бактериальные инфекции, бактериальные интоксикации, сибирская язва, заболевания, ассоциированные с блокадой токсинов (например, бактериальных токсинов), рак, опухоль эндотелия, рак ободочной кишки, рак мочевого пузыря, рак пищевода, рак легких, меланома, ювенильный гиалиновый фиброматоз (ЮГФ), детский системный гиалиноз (ДСГ), болезнь фон Виллебранда, миопатия Бетлема, дистрофический буллезный эпидермолиз, тромбоз, модуляция агрегации, опосредуемой тромбоцитами, аутоиммунные заболевания и воспаления. Эти молекулы могут быть использованы также в целях приготовления лекарственного средства для лечения указанных забо-

лений. Такие молекулы могут быть использованы также для контрацепции или для лечения репродуктивных расстройств, включая бесплодие.

Результаты экспрессии, полученные авторами настоящего изобретения и описанные в настоящем документе, неожиданно выявили ограниченную экспрессию INSP142 в биоптатах, взятых из ободочной кишки и подвздошной кишки, пораженных ВЗК, а также биоптата кожи, пораженной псориазом. Такой специфический характер экспрессии позволяет сделать вывод о роли INSP142 в развитии воспалительных заболеваний кишечника, кожных болезней или воспалений.

Эти неожиданно выявленные свойства, характеризующие полинуклеотиды или соответствующие полипептиды согласно изобретению, делают их особенно подходящими для получения лекарственного средства или фармацевтической композиции.

Особенно предпочтительными заболеваниями являются воспалительные заболевания кишечника, заболевания, ассоциированные с токсинами, рак, кожные болезни, воспаления, болезнь Крона, язвенный колит, псориаз, контактный дерматит, атопическая экзема, рак кровеносной и лимфатической систем, рак кожи, рак пищеварительной системы, рак мочевыделительной системы, рак молочной железы, рак яичника, рак женских половых органов, хориокарцинома, рак легких, опухоли головного мозга, опухоли кости, карциноидная опухоль, рак ободочной кишки, рак носоглотки, ретроперитонеальные саркомы, опухоли мягких тканей, рак щитовидной железы, рак яичек или рак печени. Предпочтительно заболевание, ассоциированное с токсинами, выбрано из заболевания, ассоциированного с бактериальными токсинами, заболевания, ассоциированные с сибирской язвой или с ботулиническим токсином С2 клостридий. Предпочтительно воспалительное заболевание выбрано из болезни Крона или язвенного колита. Предпочтительным кожным заболеванием является псориаз. Предпочтительно "раковое заболевание" выбрано из рака кровеносной и лимфатической систем, рака кожи, рака пищеварительной системы, рака мочевыделительной системы, рака молочной железы, рака яичника, рака женских половых органов, хориокарциномы, рака легких, опухоли головного мозга, опухоли кости, карциноидной опухоли, рак носоглотки, ретроперитонеальной саркомы, опухолей мягких тканей, рака щитовидной железы, рака яичек или рака печени.

Предпочтительно воспалительное заболевание выбрано из болезни Крона или язвенного колита.

Предпочтительно кожными заболеваниями являются псориаз, контактный дерматит или атопическая экзема.

Указанные молекулы согласно первому, второму, третьему, четвертому, пятому, шестому или седьмому аспектам согласно изобретению могут быть, в частности, использованы в целях приготовления лекарственного средства для лечения указанных заболеваний.

В своем девятом аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики заболеваний у пациента, включающему оценку уровня экспрессии природного гена, кодирующего полипептид согласно первому аспекту изобретения, или оценку активности полипептида согласно первому аспекту изобретения в ткани указанного пациента и сравнение указанного уровня экспрессии или активности с контрольным уровнем, где уровень, который отличается от указанного контрольного уровня, является показателем заболевания. Такой способ предпочтительно осуществляют *in vitro*. Аналогичные способы могут быть использованы для мониторинга терапевтического лечения заболевания у пациента, где изменение уровня экспрессии или активности молекулы полипептида или нуклеиновой кислоты в течение определенного периода времени по сравнению с контрольным уровнем служит показателем рецидива заболевания.

Предпочтительный способ детекции полипептидов согласно первому аспекту изобретения включает стадии:

- (a) контактирования лиганда согласно шестому аспекту изобретения, такого как антитело, с биологическим образцом в условиях, подходящих для образования комплекса лиганд-полипептид; и
- (b) детекции указанного комплекса.

Что касается девятого аспекта изобретения, то в этой связи следует отметить, что для детекции аномальных уровней белка существуют различные методы, известные специалисту, такие как методы гибридизации нуклеиновой кислоты с короткими зондами, методы анализа на точковую мутацию, метод амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и методы с использованием антител. Подобные методы могут быть использованы в короткий или продолжительный период времени, что позволяет проводить мониторинг терапевтического лечения заболевания у пациента. Настоящее изобретение относится также к наборам, которые могут быть использованы в указанных методах диагностики заболевания.

Заболеванием, диагностируемым способом согласно девятому аспекту изобретения, предпочтительно является заболевание, в патогенезе которого участвуют белки, содержащие домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно ATR-подобные белки.

В своем десятом аспекте настоящее изобретение относится к использованию полипептида согласно первому аспекту изобретения, такому как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно ATR-подобный белок. Подходящим применением полипептидов согласно изобретению, таких как белок, содержащий домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно ATR-подобный белок, является их

использование в качестве регуляторов клеточного роста, метаболизма или дифференцировки клеток; в качестве части пары рецептор/лиганд и в качестве диагностического маркера для детекции физиологического или патологического состояния, выбранного из вышеуказанного списка. Другими подходящими применениями являются методы скрининга, осуществляемые для идентификации лигандов и других молекул-агонистов или молекул-антагонистов, которые могут быть использованы в целях терапии и диагностики заболеваний и состояний, для лечения которых применим белок указанной категории.

В своем одиннадцатом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей полипептид согласно первому аспекту изобретения или молекулу нуклеиновой кислоты согласно второму или третьему аспекту изобретения, или вектор согласно четвертому аспекту изобретения, или клетку-хозяина согласно пятому аспекту изобретения, или лиганд согласно шестому аспекту изобретения, или соединение согласно седьмому аспекту настоящего изобретения, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

В своем двенадцатом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду согласно первому аспекту изобретения, или к молекуле нуклеиновой кислоты согласно второму или третьему аспекту изобретения, или к вектору согласно четвертому аспекту изобретения, или к клетке-хозяину согласно пятому аспекту изобретения, или к лиганду согласно шестому аспекту изобретения, или к соединению согласно седьмому аспекту изобретения, которые могут быть использованы в целях приготовления лекарственного средства для диагностики или лечения заболеваний, включая, без ограничения ими, клеточно-пролиферативные расстройства, включая новообразования, меланому, опухоли легких, ободочной кишки, молочной железы, поджелудочной железы, головы и шеи и другие солидные опухоли; миелолифферативные расстройства, такие как лейкоз, неходжкинская лимфома, лейкопения, тромбоцитопения, нарушение ангиогенеза, саркома Капоши; аутоиммунные/воспалительные заболевания, включая аллергию, воспалительные заболевания кишечника, артрит, псориаз, воспаление дыхательных путей, астму и отторжение трансплантированных органов; сердечно-сосудистые заболевания, включая гипертензию, отеки, стенокардию, атеросклероз, тромбоз, сепсис, инсульт, реперфузионное поражение и ишемию; неврологические расстройства, включая заболевание центральной нервной системы, болезнь Альцгеймера, повреждения головного мозга, амиотрофический боковой склероз и боли; нарушения развития; метаболические расстройства, включая сахарный диабет, остеопороз и ожирение; СПИД и почечные заболевания; инфекции, включая вирусные инфекции, бактериальные инфекции, грибковые инфекции и паразитарные инфекции, и другие патологические состояния. Такими заболеваниями предпочтительно является одно из заболеваний, в патогенезе которого участвуют белки, содержащие домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно ATR-подобные белки.

Примерами заболеваний, в патогенезе которых участвуют белки, содержащие домен vWFA и/или ANT_IG, являются бактериальные инфекции, бактериальные интоксикации, сибирская язва, заболевания, ассоциированные с блокадой токсинов (например, бактериальных токсинов), рак, опухоль эндотелия, рак ободочной кишки, рак мочевого пузыря, рак пищевода, рак легких, меланома, ювенильный гиалиновый фиброматоз (ЮГФ), детский системный гиалиноз (ДСГ), болезнь фон Виллебранда, миопатия Бетлема, дистрофический буллезный эпидермолиз, тромбоз, модуляция агрегации, опосредуемой тромбоцитами, аутоиммунные заболевания и воспаления.

В своем тринадцатом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания у пациента, предусматривающему введение указанному пациенту полипептида согласно первому аспекту изобретения, или молекулы нуклеиновой кислоты согласно второму или третьему аспекту изобретения, или вектора согласно четвертому аспекту изобретения, или клетки-хозяина согласно пятому аспекту изобретения, или лиганда согласно шестому аспекту изобретения, или соединения согласно седьмому аспекту изобретения.

В случае если пациент страдает заболеванием, при котором у данного пациента уровень экспрессии природного гена, кодирующего полипептид согласно первому аспекту изобретения, или уровень активности полипептида согласно первому аспекту изобретения ниже, чем соответствующий уровень экспрессии или активности у здорового пациента, то полипептид, молекула нуклеиновой кислоты, лиганд или соединение, вводимые указанному пациенту, должны обладать агонистическими свойствами. И, наоборот, в случае если пациент страдает заболеванием, при котором у данного пациента уровень экспрессии природного гена, кодирующего полипептид согласно первому аспекту изобретения, или уровень активности полипептида согласно первому аспекту изобретения выше, чем соответствующий уровень экспрессии или активности у здорового пациента, то полипептид, молекула нуклеиновой кислоты, лиганд или соединения, вводимые указанному пациенту, должны обладать антагонистическими свойствами. Примерами таких антагонистов являются молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты, рибозимы и антитела.

Полипептиды INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 представляют собой белки, содержащие домен vWFA и/или ANT_IG, поэтому они играют определенную роль в развитии многих патологических состояний. Антагонисты полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 представляют особый интерес, поскольку они позволяют благоприятно воздействовать на механизм модуляции патологических состояний.

В своем четырнадцатом аспекте настоящее изобретение относится к трансгенным животным или к животным, которые являются дефицитными по полипептиду первого аспекта настоящего изобретения и не являются человеком и которые были трансформированы так, что они экспрессируют более высокие или более низкие уровни указанного полипептида или вообще не экспрессируют такого полипептида. Указанные трансгенные животные являются наиболее подходящими моделями для исследования заболеваний, и могут быть использованы также в способах скрининга в целях идентификации соединений, которые являются эффективными для лечения или диагностики данного заболевания.

Используемый здесь термин "функциональный эквивалент" означает молекулу белка или нуклеиновой кислоты, обладающую функциональными или структурными свойствами, в основном аналогичными свойствам молекулы полипептида или нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Функциональный эквивалент белка может содержать модификации, если такие модификации необходимы для осуществления конкретной функции. Термин "функциональный эквивалент" включает фрагменты, мутанты, гибриды, варианты, аналоги или химические производные молекулы.

Предпочтительно "функциональным эквивалентом" может быть молекула белка или нуклеиновой кислоты, обладающая любой одной или несколькими функциональными активностями полипептидов согласно изобретению.

Предпочтительно "функциональным эквивалентом" может быть молекула белка или нуклеиновой кислоты, обладающая активностью, которая, по существу, аналогична активности INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 или их фрагментов, и измеренная в соответствующем анализе на биологическую активность или функцию. Предпочтительно "функциональным эквивалентом" может быть молекула белка или нуклеиновой кислоты, обладающая активностью, которая идентична активности или превышает активность INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 или их фрагментов, измеренную в соответствующем анализе на биологическую активность или функцию. Предпочтительно "функциональным эквивалентом" может быть молекула белка или нуклеиновой кислоты, обладающая активностью, которая составляет 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99, 100% или более от активности INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 или их фрагментов, измеренной в соответствующем анализе на биологическую активность или функцию.

Предпочтительно "функциональным эквивалентом" может быть белок или полипептид, обладающий *in vivo* или *in vitro* активностью, которая, по существу, аналогична активности полипептидов согласно изобретению. Предпочтительно "функциональным эквивалентом" может быть белок или полипептид, способный взаимодействовать с другими клеточными или внеклеточными молекулами по механизму, который, по существу, аналогичен механизму взаимодействия соответствующей части полипептидов согласно изобретению. Так, например, в иммуноанализе "функциональный эквивалент" может способствовать снижению способности к связыванию антитела с соответствующим пептидом (т.е. пептидом, имеющим модифицированную аминокислотную последовательность, а поэтому являющимся "функциональным эквивалентом") полипептида согласно изобретению или с самим полипептидом согласно изобретению, где указанное антитело вырабатывается против соответствующего пептида полипептида согласно изобретению. Эквивалентная концентрация указанного функционального эквивалента будет снижать уровень вышеупомянутого связывания соответствующего пептида по меньшей мере примерно на 5%, предпочтительно примерно на 5-10%, более предпочтительно примерно на 10-25%, еще более предпочтительно примерно на 25-30% и наиболее предпочтительно примерно на 40-50%.

Так, например, функциональные эквиваленты могут быть полностью функциональными либо у них может отсутствовать одна или несколько активностей. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением модификации могут влиять на функцию, например на активности полипептида, которые подтверждают наличие у них домена vWFA и/или ANT_IG.

Различные стандартные методы и процедуры, которые могут применяться для осуществления изобретения, систематизированы ниже. При этом следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивается описанными конкретными методами, протоколами, клеточными линиями, векторами и реагентами. Следует также отметить, что используемая здесь терминология применяется только для описания конкретных вариантов изобретения, и эта терминология не должна рассматриваться как ограничение объема настоящего изобретения. Объем изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

В настоящем описании используются стандартные сокращения, принятые для обозначения нуклеотидов и аминокислот.

Если это не оговорено особо, то для осуществления настоящего изобретения используются стандартные методы молекулярной биологии и микробиологии, методы рекомбинантных ДНК и методы иммунологии, которые хорошо известны специалистам в данной области.

Более полное описание указанных методов можно найти в литературе. Так, например, наиболее подходящие описания, которые могут быть использованы в качестве консультации, приводятся в следующих работах: Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989), *DNA Cloning*, Volumes I и II (D.N. Glover, ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. 1984); *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986);

B. Perbal, A. Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the Methods in Enzymology series (Academic Press, Inc.), especially volumes 154 & 155; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller и M.P. Calos, eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods in Cell и Molecular Biology (Mayer и Walker, eds. 1987, Academic Press, London); Scopes (1987) Protein Purification: Principles и Practice, Second Edition (Springer Verlag, N.Y.) и Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir & C.C. Blackwell eds. 1986).

Используемый здесь термин "полипептид" включает в себя любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислоты, связанные друг с другом пептидными связями или модифицированные пептидными связями, т.е. пептидными изостерами. Этот термин относится как к коротким цепям (пептидам или полипептидам), так и к более длинным цепям (белкам).

Полипептид настоящего изобретения может присутствовать в форме зрелого белка либо он может присутствовать в виде пре-, про- или препробелка, который может быть активирован путем отщепления пре-, про- или препрочасти этого белка с продуцированием активного зрелого полипептида. В таких полипептидах, пре-, про- или препропоследовательность может представлять собой лидерную или секреторную последовательность либо она может представлять собой последовательность, используемую для очистки зрелой полипептидной последовательности.

Полипептид согласно первому аспекту изобретения может образовывать часть гибридного белка. Так, например, часто оказывается предпочтительным, чтобы данный полипептид включал одну или несколько дополнительных аминокислотных последовательностей, которые могут содержать секреторную или лидерную последовательности, пропоследовательности, последовательности, облегчающие очистку, или последовательности, сообщающие белку более высокую стабильность, например, во время рекомбинантного продуцирования. Альтернативно или дополнительно, зрелый полипептид может быть присоединен к другому соединению, такому как соединение, увеличивающее время полужизни указанного полипептида (например, полиэтиленгликоль).

В другом предпочтительном варианте изобретения полипептидом согласно изобретению, который может включать последовательность, имеющую 85%-ную гомологию с последовательностями INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144, является гибридный белок.

Указанные гибридные белки могут быть получены путем клонирования полипептида, кодирующего полипептид, содержащий последовательность, имеющую 85%-ную гомологию с последовательностями INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144, с сохранением рамки считывания последовательностей, кодирующих последовательности гетерологичных белков.

Используемый здесь термин "гетерологичный" означает любой полипептид, отличающийся от полипептида человека INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144. Примерами гетерологичных последовательностей, которые могут присутствовать в гибридных белках у N- или С-конца, являются внеклеточные домены мембрано-связанного белка, константные области иммуноглобулина (Fc-области), домены мультимеризации, домены внеклеточных белков, сигнальные последовательности, "экспортные" последовательности и последовательности, пригодные для очистки методами аффинной хроматографии.

Многие из этих гетерологичных последовательностей являются коммерчески доступными и применяются для экспрессии в плазмидах, поскольку эти последовательности обычно вводят в гибридные белки, которые сообщают им дополнительные свойства, но не нарушают специфическую биологическую активность белка, входящего в состав данного гибридного белка (Terpe K., 2003, Appl. Microbiol. Biotechnol., 60: 523-33). Примерами таких дополнительных свойств являются их более продолжительное время полужизни в физиологических жидкостях, внеклеточная локализация или более легкая очистка, осуществляемая с помощью гистидинового фрагмента, так называемой "гистидиновой метки" (Gentz et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 821-4) или метки "НА" эпитопа, полученного из белка гемагглютинаина [вируса] гриппа (Wilson et al. 1994, Cell, 37: 767-78). Если необходимо, то гетерологичные последовательности могут быть элиминированы путем протеолитического расщепления, например путем встраивания протеолитического сайта расщепления между белком и гетерологичной последовательностью и обработки очищенного гибридного белка соответствующей протеазой. Эти свойства являются особенно ценными для гибридных белков, поскольку они облегчают их продуцирование и использование в целях приготовления фармацевтических композиций. Так, например, полипептид INSP141, INSP142, INSP143 или INSP144 может быть очищен с помощью гексагистидинового пептида, присоединенного к С-концу INSP141, INSP142, INSP143 или INSP144. Если данный гибридный белок содержит иммуноглобулиновую область, то указанный гибрид может быть получен путем прямого присоединения компонентов или путем их присоединения посредством короткого линкерного пептида, длина которого может составлять по меньшей мере 1-3 аминокислотных остатка или более, например 13 аминокислотных остатков. Указанным линкером может быть, например, трипептид с последовательностью E-F-M (Glu-Phe-Met) или линкерная последовательность, состоящая из 13 аминокислот и содержащая последовательность Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met (SEQ ID NO:151), встроенную между полипептидом согласно изобретению и последовательностью иммуноглобулина. Полученный гибридный белок обладает улучшенными свойствами, такими как более длительное время присутствия в физиологических жидкостях (т.е. повышенное время полужизни), повышенная удельная активность, повышенный

уровень экспрессии или его способность легко подвергаться очистке.

В предпочтительном варианте изобретения полипептид присоединяют к константной области молекулы Ig. Предпочтительно такой полипептид присоединяют к областям тяжелой цепи, таким как домены CH2 и CH3 человеческого IgG1. Для генерирования гибридных белков согласно изобретению подходящими также являются и другие изоформы Ig, такие как изоформы IgG2 или IgG4 или Ig других классов, например IgM или IgA. Гибридные белки могут быть мономерными или мультимерными, а также гетеро- или гомомультимерными.

INSP141, INSP142 или внеклеточные части INSP141 или INSP144 могут быть использованы как таковые или как компоненты гибридных белков, таких как Fc-гибриды и/или в комбинации с другими агентами.

В другом варианте изобретения функциональное производное содержит по меньшей мере одну молекулу, присоединенную к одной или нескольким функциональным группам, которые присутствуют в виде одной или нескольких боковых цепей на аминокислотных остатках. Одной из таких молекул предпочтительно является полиэтиленовая (ПЭГ) молекула. ПЭГилирование может быть осуществлено различными известными методами, такими как методы, описанные, например, в WO 99/55377.

Полипептиды могут содержать аминокислоты, которые отличаются от 20 аминокислот, кодируемых генами, и которые являются модифицированными либо в результате природных процессов, таких как посттрансляционный процессинг, либо в результате применения химических методов модификации, хорошо известных специалистам. Примерами известных модификаций, которые могут быть осуществлены в полипептидах настоящего изобретения, являются гликозилирование, присоединение липида, сульфирование, гамма-карбоксилирование, например остатков глутаминовой кислоты, гидроксилирование и ADP-рибозилирование. Другими возможными модификациями являются ацетилирование, ацилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение молекулы гема, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозита, перекрестное связывание, циклизация, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных перекрестных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, образование GPI-якоря, иодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизация, селеноилирование, присоединение аминокислот к белкам, опосредуемое переносом РНК, такое как аргинилирование, и убихитинизация.

Модификации могут присутствовать в любой области полипептида, включая пептидный остов, аминокислотные боковые цепи и амино- или карбоксиконцы. Действительно, блокирование амино- или карбоксиконца в полипептиде либо того и другого посредством ковалентной модификации является обычным процессом, происходящим в природных и синтетических полипептидах, и такие модификации могут присутствовать в полипептидах настоящего изобретения.

Модификации, которые присутствуют в полипептиде, в большинстве случаев будут зависеть от способа получения данного полипептида. Для полипептидов, полученных рекомбинантным методом, природа и степень модификации по большей части будут определяться способностью к посттрансляционной модификации конкретной клетки-хозяина и присутствием сигналов модификации в аминокислотной последовательности рассматриваемого полипептида. Так, например, характер гликозилирования может варьироваться у клеток-хозяев различного типа.

Полипептиды настоящего изобретения могут быть получены любым подходящим способом. Таковыми полипептидами являются выделенные природные полипептиды (например, выделенные из клеточной культуры), полипептиды, продуцированные рекомбинантным методом (включая гибридные белки), синтетические полипептиды или полипептиды, продуцированные с использованием комбинации этих методов.

Функционально-эквивалентные полипептиды согласно первому аспекту настоящего изобретения могут представлять собой полипептиды, гомологичные полипептидам экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидам INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144. Два полипептида могут быть определены используемым здесь термином "гомологичные", если последовательность одного из этих полипептидов имеет достаточно высокую степень идентичности или сходства с последовательностью другого полипептида.

Термин "идентичность" означает, что в любом конкретном положении сопоставляемых последовательностей эти две последовательности имеют идентичные аминокислотные остатки.

Термин "сходство" означает, что в любом конкретном положении сопоставляемых последовательностей эти две последовательности имеют аминокислотные остатки аналогичного типа. Степень идентичности и сходства может быть легко вычислена (Computational Molecular Biology, Lesk A.M. ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing Informatics и Genome Projects, Smith D.W. ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin A.M. & Griffin H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G. Academic Press, 1987 и Sequence Analysis Primer, Gribskov M. & Devereux J. eds, M.Stockton Press, New York, 1991).

Поэтому гомологичными полипептидами являются природные биологические варианты (например, аллельные варианты или варианты полипептидов, образовавшиеся в результате географических изменений видов, от которых эти полипептиды происходят) и мутанты (такие как мутанты, содержащие аминокислотные замены, инсерции или делеции) полипептидов экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144. Такими мутантами могут быть полипептиды, в которых один или несколько аминокислотных остатков заменены консервативным или неконсервативным аминокислотным остатком (предпочтительно консервативным аминокислотным остатком), и такой замененный аминокислотный остаток может быть, а может и не быть, остатком, кодируемым генетическим кодом. Обычно такие замены происходят между Ala, Val, Leu и Ile; между Ser и Thr; между кислотными остатками Asp и Glu; между Asp и Gln; между основными остатками Lys и Arg или между ароматическими остатками Phe и Tyr. Особенно предпочтительными являются варианты, в которых несколько, т.е. от 5 до 10, от 1 до 5, от 1 до 3, от 1 до 2 аминокислот или только одна аминокислота являются замененными, делетированными или добавленными в любой комбинации. Особенно предпочтительными являются "молчащие" замены, добавления и делеции, которые не влияют на свойства и активность указанного белка. Также предпочтительными являются консервативные замены. Такими мутантами также являются полипептиды, в которых один или несколько аминокислотных остатков имеют группозаместитель.

В соответствии с настоящим изобретением любая замена должна быть предпочтительно "консервативной" или "допустимой" заменой, которую обычно определяют как замену, вводящую аминокислоты, имеющие аналогичные химические свойства (например, основная положительно заряженная аминокислота должна быть заменена другой основной, положительно заряженной аминокислотой), которые являются достаточными для сохранения структуры и биологической функции данной молекулы.

В литературе описано множество моделей, с помощью которых может быть осуществлен отбор консервативных аминокислотных замен исходя из статистических и физико-химических исследований последовательности и/или структуры белков (Rogov S.I. и Nekrasov A.N., 2001). Эксперименты по конструированию белков показали, что использование специфических подпоследовательностей аминокислот позволяет продуцировать белки с соответствующей пространственной упаковкой и активные белки и классифицировать аминокислотные "синонимичные" замены, которые могут легко адаптироваться к белковой структуре и которые могут быть использованы для детекции функциональных и структурных гомологов и паралогов (Murphy L.R. et al., 2000). Группы синонимичных аминокислот и группы более предпочтительных синонимичных аминокислот представлены в табл. 1.

В полипептиды согласно изобретению могут быть также введены в различных целях специфические неконсервативные мутации. Мутации, снижающие аффинность гликопротеина клеточной поверхности, допускают возможность повторного использования этих полипептидов, а также их применения в других целях, что потенциально повышает их терапевтическую эффективность. (Robinson C.R., 2002). Иммуногенные эпитопы, фактически присутствующие в полипептидах согласно изобретению, могут быть использованы для разработки вакцин (Stevanovic S., 2002) либо они могут быть удалены путем модификации их последовательности известными методами отбора мутаций, для повышения стабильности белка и коррекции этих эпитопов (van den Burg B. & Eijssink V, 2002; WO 02/05146, WO 00/34317 и WO 98/52976).

Предпочтительной альтернативой синонимичным группам для аминокислотных производных, включенных в пептидомиметики, являются группы, определенные в табл. 2. Неисчерпывающий список аминокислотных производных также включает аминокислотную кислоту (Aib), гидроксипролин (Hyp), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-СООН, индолин-2-карбоновую кислоту, 4-дифторпролин, L-тиазолидин-4-карбоновую кислоту, L-гомопролин, 3,4-дегидропролин, 3,4-дигидроксифенилаланин, циклогексилглицин и фенилглицин.

Термин "аминокислотное производное" означает аминокислоту, не входящую в 20 кодируемых генетическим кодом природных аминокислот, или химическую молекулу, подобную такой аминокислоте. В частности, такое аминокислотное производное может содержать замещенные или незамещенные молекулы, молекулы с прямой цепью, молекулы с разветвленной цепью или циклоалкильные молекулы, а также оно может включать один или несколько гетероатомов. Указанные аминокислотные производные могут быть получены *de novo* либо они могут быть взяты из коммерчески доступных источников (Calbiochem-Novabiochem A.G., Switzerland; Bachem, USA).

Различные методы включения неприродных аминокислотных производных в белки с использованием *in vitro* и *in vivo* систем трансляции для зондирования и/или улучшения структуры и функции белков описаны в литературе (Dougherty D.A., 2000). Методы синтеза и получения пептидомиметиков, а также непептидомиметиков также хорошо известны специалистам (Golebiowski A. et al., 2001; Hruby V.J. & Balse P.M., 2000; Sawyer T.K. "Structure Based Drug Design", edited by Veerapandian P., Marcel Dekker Inc., p. 557-663, 1997).

Обычно, считается, что два полипептида, имеющие более чем 30%-ную идентичность, являются функционально эквивалентными. Предпочтительно, чтобы последовательности функционально эквивалентных полипептидов согласно первому аспекту изобретения были более чем на 80% идентичны после-

довательностям полипептидам экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидам INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 или их активных фрагментов. Более предпочтительными являются полипептиды, имеющие степень идентичности более чем 85, 90, 95, 98 или 99% соответственно.

Функционально-эквивалентными полипептидами согласно первому аспекту изобретения могут быть также полипептиды, которые были идентифицированы с применением одного или нескольких методов структурного сопоставления первичных последовательностей путем их выравнивания. Так, например, технология информационной обработки потока геномных данных (Inpharmatica Genome Threader™), которая составляет один из аспектов способа поиска, используемых для генерирования базы данных поиска Biopendium™, может быть применена (см. заявку PCT WO 01/69507) в целях идентификации полипептидов с неизвестными функциями, в отношении которых, несмотря на их низкую степень идентичности по сравнению с полипептидами экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидами INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144, высказывается предположение, что они представляют собой белки, содержащие vWFA и/или ANT_IG, где указанное предположение основано на их значительной структурной гомологии с последовательностью полипептидов экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144. Термин "значительная структурная гомология" означает структурную гомологию двух белков, которая может быть предсказана с помощью технологии Inpharmatica Genome Threader™ с достоверностью по меньшей мере 10% и выше.

Полипептиды согласно первому аспекту изобретения также включают фрагменты полипептидов экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и фрагменты функциональных эквивалентов полипептидов экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 при условии, что эти фрагменты представляют собой белки, содержащие домены vWFA и/или ANT_IG, или имеют общую антигенную детерминанту с белками, содержащими домен vWFA и/или ANT_IG.

Используемый здесь термин "фрагмент" означает полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая является идентичной части, но не всей, аминокислотной последовательности полипептидов экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 либо одному из его функциональных эквивалентов. Эти фрагменты должны содержать по меньшей мере n смежных аминокислот данной последовательности, и в зависимости от конкретной последовательности указанное число n предпочтительно равно 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 или более). Небольшие фрагменты могут образовывать антигенную детерминанту.

Нуклеиновые кислоты согласно изобретению имеют длину, которая предпочтительно составляет 10-2000, более предпочтительно 10-1750 нуклеотидов, еще более предпочтительно 500-1500, наиболее предпочтительно 600-1200, еще наиболее предпочтительно 750-1000 нуклеотидов. Полипептиды согласно изобретению имеют длину, которая предпочтительно составляет 10-700 аминокислот, более предпочтительно 50-600, еще более предпочтительно 100-500, наиболее предпочтительно 200-400, еще наиболее предпочтительно 300-375 аминокислот.

Фрагменты полноразмерных полипептидов экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 могут состоять из комбинаций 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 последовательностей смежных экзонов в полипептидах INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144, соответственно.

Указанные фрагменты могут присутствовать в "свободной форме", т.е. они не являются частью другого полипептида или не присоединены к другим аминокислотам или полипептидам либо они могут быть включены в состав более крупного полипептида, часть или область которого они образуют. Если фрагмент настоящего изобретения входит в состав более крупного полипептида, то наиболее предпочтительно, чтобы такой фрагмент образовывал одну непрерывную область. Так, например, некоторые предпочтительные варианты настоящего изобретения относятся к фрагменту, имеющему пре- и/или прополипептидную область, присоединенную к аминоконцу указанного фрагмента, и/или дополнительную область, присоединенную к карбоксильному концу этого фрагмента. Однако в состав одного более крупного полипептида могут входить несколько фрагментов.

Полипептиды настоящего изобретения или их иммуногенные фрагменты (содержащие по меньшей мере одну антигенную детерминанту) могут быть использованы для генерирования лигандов, таких как поликлональные или моноклональные антитела, которые обладают иммуноспецифичностью к таким полипептидам. Указанные антитела могут быть использованы для выделения или для идентификации клонов, экспрессирующих полипептиды настоящего изобретения, или для очистки данных полипептидов аффинной хроматографией. Как совершенно очевидно для любого специалиста, такие антитела, помимо других применений, могут быть использованы также в качестве диагностических или терапевтических средств.

Термин "иммуноспецифический" означает, что данные антитела имеют в основном более высокую аффинность к полипептидам настоящего изобретения, чем к другим родственным полипептидам, описанным ранее. Используемый здесь термин "антитело" означает интактные молекулы, а также их фрагменты, такие как Fab, F(ab')₂ и Fv, которые способны связываться с рассматриваемой антигенной детер-

минантой. Такие антитела связываются с полипептидами первого аспекта настоящего изобретения.

Под понятием "значительно более высокая аффинность" авторы подразумевают заметно более высокую аффинность полипептида согласно изобретению по сравнению с аффинностью известных белков, содержащих домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно ATR-подобных белков.

При этом предпочтительно, чтобы аффинность по отношению к полипептиду согласно изобретению по меньшей мере в $1,5$, 2 , 5 , 10 , 100 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 раз или более превышала аффинность по отношению к известным белкам, содержащим домен vWFA и/или ANT_IG.

При этом предпочтительно, чтобы аффинность по отношению к полипептиду согласно изобретению значительно превышала аффинность по отношению к известным белкам, содержащим домен vWFA и/или ANT_IG.

Если предпочтительными являются поликлональные антитела, то выбранное млекопитающее, такое как мышь, кролик, коза или лошадь, может быть иммунизовано полипептидом согласно первому аспекту изобретения. Полипептид, используемый для иммунизации животного, может быть получен методами рекомбинантных ДНК либо он может быть синтезирован методом химического синтеза. Если необходимо, то данный полипептид может быть конъюгирован с белком-носителем. Обычно используемыми носителями, к которым могут быть химически присоединены данные полипептиды, являются альбумин бычьей сыворотки, тироглобулин и гемоцианин лимфы улитки. Такой связанный полипептид может быть затем использован для иммунизации животного. Сыворотку, взятую у иммунизованного животного, собирают и обрабатывают известными методами, например иммуноаффинной хроматографией.

Моноклональные антитела против полипептидов согласно первому аспекту изобретения могут быть легко получены специалистом в данной области. Общая методика получения моноклональных антител с использованием гибридомной технологии хорошо известна специалистам (см. например, Kohler G. & Milstein, C. *Nature*, 256: 495-497 (1975); Kozbor et al., *Immunology Today*, 4: 72(1983); Cole et al., 77-96, *Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985)).

Панели моноклональных антител, продуцированных против полипептидов согласно первому аспекту изобретения, могут быть скринированы на различные свойства, т.е. на изотип, эпитоп, аффинность и т.п. Моноклональные антитела являются особенно подходящими для очистки отдельных полипептидов, против которых они направлены. Альтернативно, гены, кодирующие нужные моноклональные антитела, могут быть выделены из гибридом, например, методами ПЦР, известными специалистам, а также они могут быть клонированы и экспрессированы в соответствующих векторах.

Могут быть использованы также и химерные антитела, в которых нечеловеческие переменные области соединены или лигированы с человеческими константными областями (см. например, Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3439 (1987)).

Эти антитела могут быть модифицированы так, чтобы они были менее иммуногенными для индивидуума, например путем их "гуманизации" (см., Jones et al., *Nature*, 321, 522 (1986); Verhoeven et al., *Science*, 239, 1534 (1988); Rabat et al., *J. Immunol.*, 147, 1709 (1991); Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 10029 (1989); Gorman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 34181 (1991) и Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9, 421 (1991)). Используемый здесь термин "гуманизованное антитело" означает молекулы антитела, в которых аминокислоты CDR и другие выбранные аминокислоты в переменных доменах тяжелой и/или легкой цепей нечеловеческого донорного антитела были заменены эквивалентными аминокислотами человеческого антитела. Таким образом, гуманизованное антитело имеет близкое сходство с человеческим антителом, но при этом оно обладает способностью связываться с донорным антителом.

В другом альтернативном варианте изобретения таким антителом может быть "биспецифическое" антитело, т.е. антитело, имеющее два различных антигенсвязывающих домена, каждый из которых обладает специфичностью к различным эпитопам.

Для отбора генов, кодирующих антитела, обладающие способностью связываться с полипептидами согласно изобретению, либо из набора ПЦР-амплифицированных V-генов лимфоцитов человека, скринированных на способность вырабатывать соответствующие антитела, либо из библиотеки "необученных" лимфоцитов может быть использована техника фагового представления (McCafferty J. et al. (1990), *Nature* 348, 552-554; Marks J. et al. (1992) *Biotechnology* 10, 779-783). Аффинность этих антител может быть также повышена путем перестановки цепей (Clackson T. et al. (1991), *Nature*, 352, 624-628).

Антитела, генерированные вышеописанными методами, независимо от того, являются ли они поликлональными или моноклональными, обладают и другими ценными свойствами, т.е. они могут быть использованы в качестве реагентов в иммуноанализах, радиоиммуноанализах (РИА) или твердофазных иммуноферментных анализах (ELISA). Для использования в этих целях антитела могут быть помечены аналитически детектируемым реагентом, таким как радиоизотоп, флуоресцентная молекула или фермент.

Предпочтительными молекулами нуклеиновых кислот второго и третьего аспектов настоящего изобретения являются молекулы, кодирующие полипептидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148 или SEQ ID NO:150, и их функционально эквивалентные полипептиды.

Молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению предпочтительно содержат по меньшей мере n смежных нуклеотидов описанных здесь последовательностей, где n в зависимости от конкретной последовательности составляет 10 или более (например, 12, 14, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40 или более).

Молекулами нуклеиновой кислоты согласно изобретению также являются последовательности, комплементарные последовательностям молекул нуклеиновой кислоты, описанных выше (например, используемых в качестве антисмысловых последовательностей или в качестве зондов).

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут присутствовать в форме РНК, такой как мРНК, или в форме ДНК, включая, например, кДНК, синтетическую ДНК или геномную ДНК. Такие молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены методами клонирования, химического синтеза или их комбинацией. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены, например, методом химического синтеза, таким как твердофазный фосфорамидитный химический синтез, выделение из геномных или кДНК-библиотек или выделение из соответствующего организма. РНК-молекулы могут быть в основном генерированы путем *in vitro*- или *in vivo*-транскрипции ДНК-последовательностей.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть двухцепочечными или одноцепочечными. Одноцепочечной ДНК может быть кодирующая цепь, известная также как смысловая цепь, либо не кодирующая цепь, также называемая антисмысловой цепью.

Термин "молекула нуклеиновой кислоты" также охватывает аналоги ДНК и РНК, такие как аналоги, содержащие модифицированные остовы и связанные с пептидом нуклеиновые кислоты (PNA). Используемый здесь термин "PNA" означает антисмысловую молекулу или антиген, который содержит олигонуклеотид, состоящий по меньшей мере из пяти нуклеотидов и присоединенный к пептидному остову из аминокислотных остатков, которые предпочтительно заканчиваются лизином. Этот концевой лизин сообщает данной композиции растворимость. PNA могут быть ПЭГилированы для продления их времени жизни в клетке, где они предпочтительно связываются с комплементарной одноцепочечной ДНК и РНК и прекращают элонгацию транскрипта (Nielsen P.E. et al. (1993), *Anticancer Drug Des.* 8: 53-63).

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид согласно изобретению, может быть идентична кодирующей последовательности одной или нескольких описанных здесь молекул нуклеиновой кислоты.

Эти молекулы могут также иметь различные последовательности, которые вследствие вырожденности генетического кода кодируют полипептид, представленный в любой из последовательностей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148 или SEQ ID NO:150.

Таковыми молекулами нуклеиновой кислоты могут быть, без ограничения ими, последовательность, кодирующая только зрелый полипептид; кодирующая последовательность зрелого полипептида и дополнительные кодирующие последовательности, такие как последовательности, кодирующие лидерную или секреторную последовательность, такую как про-, пре- или препрополипептидную последовательность; кодирующая последовательность зрелого полипептида с вышеупомянутыми дополнительными коди-

рующими последовательностями или без них, либо вместе с другими дополнительными некодирующими последовательностями, включая некодирующие 5'- и 3'-последовательности, такие как транскрибированные нетранслируемые последовательности, которые играют определенную роль в транскрипции (включая сигналы терминации), в связывании с рибосомой и в обеспечении стабильности мРНК. Молекулами нуклеиновой кислоты могут быть также вспомогательные последовательности, кодирующие дополнительные аминокислоты, такие как аминокислоты, обладающие дополнительными функциональными свойствами.

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно второму и третьему аспектам изобретения могут также кодировать фрагменты или функциональные эквиваленты полипептидов и фрагментов согласно первому аспекту изобретения. Указанная молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой природный вариант, такой как природный аллельный вариант, либо такая молекула может представлять собой вариант, не встречающийся в природе. Указанные неприродные варианты молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены методами мутагенеза, включая методы, применяемые к молекулам нуклеиновой кислоты, к клеткам или к целым организмам.

Среди рассматриваемых вариантов имеются варианты, которые отличаются от вышеупомянутых молекул нуклеиновой кислоты тем, что они имеют нуклеотидные замены, делеции или инсерции. Такие замены, делеции или инсерции могут быть сделаны в одном или нескольких нуклеотидах. Указанные варианты могут быть модифицированы в кодирующей или в некодирующей области либо в той и другой областях. Альтерации в кодирующих областях могут приводить к консервативным или неконсервативным аминокислотным заменам, делециям или инсерциям.

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут быть также сконструированы методами, в основном известными специалистам, включая в зависимости от целей применения модификацию клонирования, процессинг и/или экспрессию генного продукта (полипептида). Перестановка ДНК путем рандомизированной фрагментации и повторной сборки генных фрагментов и синтетических олигонуклеотидов с помощью ПЦР представляет собой технологию, которая может быть использована для конструирования нуклеотидных последовательностей. Сайт-направленный мутагенез может быть использован для введения новых рестрикционных сайтов, изменения характера гликозилирования, изменения предпочтительности кодонов, продуцирования вариантов сплайсинга, введения мутаций и т.п.

Молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид согласно первому аспекту изобретения, могут быть лигированы с гетерологичной последовательностью так, чтобы полученная комбинированная молекула нуклеиновой кислоты кодировала гибридный белок. Такие комбинированные молекулы нуклеиновой кислоты входят во второй или третий аспект настоящего изобретения. Так, например, для скрининга пептидных библиотек на ингибиторы активности указанного полипептида с использованием такой комбинированной молекулы нуклеиновой кислоты может оказаться полезным осуществление экспрессии гибридного белка, который может распознаваться коммерчески доступным антителом. Гибридный белок может быть также сконструирован так, чтобы он содержал сайт расщепления, локализованный между последовательностью полипептида согласно изобретению и последовательностью гетерологичного белка и чтобы такой полипептид мог быть отщеплен и выделен из указанного гетерологичного белка.

Молекулами нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут быть также антисмысловые молекулы, которые частично комплементарны молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим полипептиды согласно изобретению, поэтому они гибридизуются с кодирующими молекулами нуклеиновой кислоты (гибридизация). В соответствии с методами, известными среднему специалисту в данной области, такие антисмысловые молекулы, например олигонуклеотиды, могут быть сконструированы так, чтобы они распознавали нужную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид согласно изобретению, специфически связывались с этой нуклеиновой кислотой и тем самым предотвращали ее транскрипцию (см. например, Cohen J.S., *Trends in Pharm. Sci.*, 10, 435 (1989), Okano, J. *Neurochem.* 56, 560 (1991); O'Connor, J. *Neurochem.* 56, 560 (1991); Lee et al., *Nucleic Acids Res.* 6, 3073 (1979); Cooney et al., *Science*, 241, 456 (1988); Dervan et al., *Science*, 251, 1360 (1991)).

Используемый здесь термин "гибридизация" означает присоединение двух молекул нуклеиновой кислоты друг к другу посредством водородных связей. Обычно одна молекула может быть фиксирована на твердом носителе, а другая молекула может находиться в растворе в свободном состоянии. Затем эти две молекулы могут быть подвергнуты контакту друг с другом в условиях, благоприятствующих образованию водородной связи. Факторами, влияющими на образование таких связей, являются тип и объем растворителя; температура реакции; время гибридизации; перемешивание; присутствие агентов, блокирующих неспецифическое связывание молекулы в жидкой фазе с твердым носителем (реагент Денхардта или BLOTTO); концентрация молекул; использование соединений, повышающих скорость ассоциации молекул (декстрансульфата или полиэтиленгликоля); и жесткость условий промывки после гибридизации (Sambrook et al. [см. выше]).

Ингибирование гибридизации полностью комплементарной молекулы с молекулой-мишенью может быть оценено с использованием гибридизационного анализа, известного специалистам (Sambrook et al. [см. выше]). По существу, гомологичная молекула будет конкурировать с полностью гомологичной

молекулой за связывание с молекулой-мишенью и ингибировать это связывание в различных условиях жесткости, как описано у Wahl G.M. и S.L. Berger (1987; *Methods Enzymol.* 152: 399-407) и Kimmel A.R. (1987; *Methods Enzymol.* 152: 507-511).

Термин "жесткость" означает условия реакции гибридизации, которые благоприятствуют ассоциации молекул с большим сходством, но не способствуют ассоциации отличающихся молекул. Условия гибридизации высокой жесткости определяют как условия инкубирования в течение ночи при 42°C в растворе, содержащем 50% формамид, 5X SSC (150 mM NaCl, 15 mM тринатрийцитрат), 50 mM фосфат натрия (pH 7,6), 5× раствор Денхардта, 10% декстрансульфата и 20 мкг/мл денатурированной фрагментированной ДНК спермы лосося, с последующей промывкой фильтров в 0,1X SSC приблизительно при 65°C. Условия низкой жесткости предусматривают реакцию гибридизации, осуществляемую при 35°C (Sambrook et al. [см. выше]). Предпочтительными условиями гибридизации являются условия гибридизации высокой жесткости.

В предпочтительных вариантах этого аспекта настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые по всей своей длине по меньшей мере на 70% идентичны молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды экзона INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептиды INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144, и молекулам нуклеиновой кислоты, которые в основном комплементарны указанным молекулам нуклеиновой кислоты. В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты содержала область, которая по всей своей длине по меньшей мере на 80% идентична такой кодирующей последовательности, либо молекула нуклеиновой кислоты была комплементарна указанной молекуле. При этом особенно предпочтительно, чтобы молекулы нуклеиновой кислоты по всей своей длине были по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, а особенно предпочтительно по меньшей мере на 98, 99% или более идентичны указанным последовательностям. Предпочтительными вариантами этого аспекта являются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды, которые обладают в основном такой же биологической функцией или активностью, как и полипептиды экзона INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептиды INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144.

Настоящее изобретение относится к способу детекции молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению, включающему в себя стадии:

- (а) контактирования нуклеинового зонда согласно изобретению с биологическим образцом в условиях гибридизации, способствующих образованию дуплексов; и
- (б) детекции любого из таких образованных дуплексов.

Как будет дополнительно обсуждаться ниже в связи с анализами, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, молекула нуклеиновой кислоты, описанная выше, может быть использована в качестве гибридизационного зонда для РНК, кДНК или геномной ДНК в целях выделения полноразмерных кДНК и геномных клонов, кодирующих полипептиды INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144, и в целях выделения кДНК и геномных клонов гомологичных и ортологичных генов, имеющих высокую степень сходства с генами, кодирующими этот полипептид.

В этой связи, наряду с другими известными методами, могут быть использованы методы, описанные и обсуждаемые ниже в качестве иллюстрации. Методы секвенирования и анализа ДНК хорошо известны и в основном доступны специалистам и могут быть реально использованы для осуществления многих вариантов согласно изобретению, обсуждаемых в настоящем изобретении. В указанных методах могут использоваться ферменты, такие как фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, секвенза (US Biochemical Corp., Cleveland, OH), полимеразы Taq (Perkin Elmer), термостабильная полимеразы T7 (Amersham, Chicago, IL) или комбинация таких полимераз и, корректирующие экзонуклеазы, такие как экзонуклеазы, присутствующие в ELONGASE Amplification System и поставляемые Gibco/BRL (Gaithersburg, MD). Способ секвенирования может быть предпочтительно автоматизирован с использованием устройств, таких как аппарат Hamilton Micro Lab 2200 (Hamilton, Reno, NV), термоячейка Peltier Thermal Cycler (PTC200; MJ Research, Watertown, MA), катализатор ABI и ДНК-секвенаторы 373 и 377 (Perkin Elmer).

Одним из методов выделения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с функцией, эквивалентной функции полипептида INSP141, INSP142, INSP143 или INSP144, является зондирование библиотеки геномных ДНК или кДНК природным или искусственно сконструированным зондом в соответствии со стандартными процедурами, известными специалистам (см., например, "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al. (eds). Greene Publishing Associates и Wiley Interscience, New York, 1989, 1992). Особенно подходящими являются зонды, содержащие по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 30, более предпочтительно по меньшей мере 50 непрерывно следующих друг за другом оснований, которые соответствуют или комплементарны последовательностям нуклеиновой кислоты, происходящей от соответствующего кодирующего гена SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41,

SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:111, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:147 и/или SEQ ID NO:149.

Для облегчения идентификации такие зонды могут быть помечены аналитически детектируемым реагентом. Подходящими реагентами являются, без ограничения ими, радиоизотопы, флуоресцентные красители и ферменты, способные катализировать образование детектируемого продукта. С использованием этих зондов средний специалист в данной области может самостоятельно выделить комплементарные копии полинуклеотидов геномной ДНК, кДНК или РНК, кодирующих представляющие интерес белки, происходящие от различных источников, например человека, млекопитающего или других животных, и скринировать эти источники на присутствие родственных последовательностей, например отдельных членов семейства, типа и/или подтипа.

Во многих случаях выделенные кДНК-последовательности будут неполными, т.е. в этих последовательностях область, кодирующая полипептид, будет сильно обрезана, обычно у 5'-конца. Для получения полноразмерных кДНК или для удлинения коротких кДНК существует несколько методов. Такие последовательности можно удлинить с использованием неполной нуклеотидной последовательности и с применением различных известных методов детекции выше расположенных последовательностей, таких как промоторы и регуляторные элементы. Так, например, одним из методов, который может быть использован в данном случае, является метод быстрой амплификации кДНК-концов (RACE; см., например, Frohman et al., PNAS USA, 85, 8998-9002, 1998). Недавно разработанные модификации этой технологии, проиллюстрированные Marathon™ (Clontech Laboratories Inc.), значительно упростили поиск более длинных кДНК. Для поиска неизвестной последовательности нуклеиновой кислоты, которая является смежной с известным локусом, может быть использован слегка модифицированный метод, который называется "сайт-рестрикционной" ПЦР и предусматривает использование универсальных праймеров (Sarkar G. (1993), PCR Methods Applic. 2: 318-322). Для амплификации или для удлинения последовательностей с использованием различных праймеров, полученных на основе известной области, может быть использована также обратная ПЦР (Triglia T. et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 8186). Другим методом, который может быть использован в данном случае, является ПЦР "с захватом", которая представляет собой ПЦР-амплификацию ДНК-фрагментов, смежных с известной последовательностью в искусственной хромосомной ДНК человека и дрожжей (Lagerstrom M. et al. , (1991), PCR Methods Applic. 1, 111-119). Другим методом, который может быть использован для поиска неизвестных последовательностей, является метод Parker J.D. et al. (1991); Nucleic Acids Res. 19: 3055-3060. Кроме того, можно использовать ПЦР, "гнездовые" праймеры и библиотеки PromoterFinder™ для "прогулки" по геномной ДНК (Clontech, Palo Alto, CA). Этот способ позволяет избежать необходимости скрининга библиотек и может быть использован для обнаружения участков стыка интрон/экзон.

При скрининге на полноразмерные кДНК предпочтительно использовать библиотеки, которые были отобраны по размерам и содержат более крупные кДНК. Предпочтительными также являются библиотеки рандомизированных праймеров, которые могут включать дополнительные последовательности, содержащие 5'-области генов. Использование библиотеки рандомизированных праймеров может оказаться особенно предпочтительным в том случае, если библиотека oligo-d(T) не дает полноразмерной кДНК. Геномные библиотеки могут быть использованы для удлинения последовательности с получением 5'-нетранскрибируемых регуляторных областей.

В одном из вариантов осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут быть использованы для определения локализации в хромосоме. В этом методе молекула нуклеиновой кислоты может быть нацелена на конкретный участок, либо она может быть гибридизована с конкретным участком на отдельной хромосоме человека. В соответствии с настоящим изобретением картирование релевантных последовательностей в хромосомах является важной стадией в подтверждении корреляции этих последовательностей с геноассоциированным заболеванием. После картирования последовательности и определения ее точной хромосомной локализации физическое положение последовательности на хромосоме может быть сопоставлено с данными генетической карты. Эти данные можно найти, например, в работе V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (имеющейся в настоящее время в библиотеке Уэллского медицинского университета Джона Хопкинса) (John Hopkins University Welch Medical Library). Взаимосвязь между генами, которые могут быть картированы на одной и той же области хромосомы, и заболеваниями, ассоциированными с ними, затем идентифицируют с помощью анализа на сцепление генов (совместное наследование физически смежных генов). Это позволяет исследователям получить ценную информацию, которая может быть использована для поиска генов, ассоциированных с данным заболеванием, с применением метода позиционного клонирования или других методов обнару-

жения генов. После предварительного определения локализации генов, ассоциированных с данным заболеванием или синдромом, путем анализа на сцепление генов с конкретной областью генома любое картирование последовательностей на данном участке может дать информацию об ассоциированных или регуляторных генах, которая может быть использована для последующих исследований. Молекула нуклеиновой кислоты может быть использована также для детекции различий в хромосомной локализации, обусловленных транслокацией, инверсией и т.п. у нормальных индивидуумов, индивидуумов-носителей и у индивидуумов, страдающих заболеванием.

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению также являются ценным материалом для определения локализации в тканях. Такие методы позволяют определять характер экспрессии полипептида в тканях путем детекции мРНК, которая их кодирует. Такими методами являются методы гибридизации *in situ* и методы амплификации нуклеотидов, такие как ПЦР. Результаты этих исследований позволяют получить определенные сведения относительно нормальных функций данного полипептида в организме. Кроме того, в этих исследованиях сравнение нормального характера экспрессии мРНК с экспрессией мРНК, кодируемой мутантным геном, позволяет получить важную информацию о роли мутантных полипептидов в данном заболевании. Такая аномальная экспрессия может иметь кратковременную, протрансгенную или количественную природу.

Для ингибирования эндогенной экспрессии гена, кодирующего полипептид согласно изобретению, могут быть использованы также методы "отключения" гена. Одним из методов, который может быть использован для "отключения" последовательность-специфического посттрансляционного гена, является интерференция РНК (RNAi) (Elbashir S.M. et al., *Nature*, 2001, 411, 494-498). Короткие дцРНК-олигонуклеотиды синтезируют *in vitro* и вводят в клетку. Последовательность-специфическое связывание этих дцРНК-олигонуклеотидов запускает процесс деградации мРНК-мишени, что приводит к снижению уровня или к отмене экспрессии белка-мишени.

Эффективность методов "отключения" гена, описанных выше, может быть оценена путем определения уровня экспрессии полипептидов (например, с помощью Вестерн-блоттинга), а на РНК-уровне она может быть оценена с помощью методики, основанной на TaqMan.

Векторы согласно изобретению содержат молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению и могут представлять собой клонирующие или экспрессирующие векторы. Клетки-хозяева согласно изобретению, которые могут быть трансформированы, трансфецированы или трансдуцированы векторами согласно изобретению, могут представлять собой прокариотические или эукариотические клетки-хозяева.

Полипептиды согласно изобретению могут быть получены в рекомбинантной форме посредством экспрессии кодирующих эти полипептиды молекул нуклеиновой кислоты в векторах, содержащихся в клетке-хозяине. Такие методы экспрессии хорошо известны специалистам и многие из них подробно описаны у Sambrook et al. (см. выше) и Fernandez & Hoeffler (1998, eds. "Gene expression systems. Using nature for the art of expression". Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto).

Для продуцирования полипептида в нужном хозяине могут быть использованы в основном любые системы или любые векторы, подходящие для поддержания, амплификации или экспрессии молекул нуклеиновой кислоты. Подходящая нуклеотидная последовательность может быть встроена в экспрессирующую систему любым из хорошо известных и рутинных методов, таких как методы, описанные у Sambrook et al. (см. выше). В общих чертах кодирующий ген может быть помещен под контроль регуляторного элемента, такого как промотор, сайт связывания с рибосомой (для экспрессии в бактериях), и необязательно, оператор, так, чтобы ДНК-последовательность, кодирующая нужный полипептид, транскрибировалась в РНК в трансформированной клетке-хозяине.

Примерами подходящих систем экспрессии являются, например, хромосомная, эписомная и вирусная системы, включая, например, векторы, происходящие от бактериальных плазмид, бактериофага, транспозонов, дрожжевых эписом, инсерционных элементов, дрожжевых хромосомных элементов, вирусов, таких как бакуловирус, паповавирусы, такие как SV40, вирусы коровьей оспы, аденовирусы, вирусы оспы домашней птицы, вирусы псевдобешенства и ретровирусы, или их комбинации, а также векторы, происходящие от плазмидных и бактериофаговых генетических элементов, включая космиды и фагмиды. Для доставки более крупных фрагментов ДНК, чем те, которые могут содержаться и экспрессироваться в плазмиде, могут быть использованы также искусственные человеческие хромосомы (НАС). Предпочтительными примерами векторов, которые могут быть использованы в соответствии с аспектами настоящего изобретения, относящимися к INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144, являются векторы pCR4-TOPO-INSP142, pCR4-TOPO-INSP141, pCR4-TOPO-INSP143-EC, pDEST12.2_INSP141-6HIS-V1, pEAK12d_INSP141-6HIS-V1, pENTR_INSP141-6HIS-V1, pEAK12d_INSP143-EC-6HIS-V1, pDEST12d_INSP143-EC-6HIS-V1, pDONR-Zeo_INSP143-EC-6HIS-V1 и pEAK12d-INSP142-6HIS.

Особенно подходящими экспрессирующими системами являются микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные рекомбинантным бактериофагом, плазмидными или космидными ДНК-экспрессирующими векторами; дрожжи, трансформированные векторами для экспрессии в дрожжах; клеточные системы насекомых, инфицированные вирусными экспрессирующими векторами (например,

бакуловирусом); клеточные системы растений, трансформированные вирусными экспрессирующими векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом мозаики табака, TMV) или векторами для экспрессии в бактериях (например, плазмидами T1 или pBR322) или клеточные системы животных. Для продуцирования полипептидов согласно изобретению могут быть использованы также бесклеточные системы трансляции.

Введение молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид согласно изобретению, в клетки-хозяева может быть осуществлено методами, описанными во многих известных лабораторных руководствах, таких как руководство Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) и Sambrook et al. [см. выше]. Особенно подходящими методами являются трансфекция с использованием фосфата кальция; трансфекция, опосредованная DEAE-декстраном; трансфекция; микроинжекция; трансфекция, опосредованная катионным липидом; электропорация; трансдукция; загрузка путем соскоба; введение методом биобаллистики или инфицирование (см. Sambrook et al., 1989, [см. выше], Ausubel et al., 1991 [см. выше], Spector, Goldman & Leinwald, 1998). В эукариотических клетках экспрессирующие системы, в зависимости от целей их использования, могут быть либо временными (например, эпизомными), либо перманентными (хромосомная интеграция).

Кодирующая молекула нуклеиновой кислоты может включать, а может и не включать последовательность, кодирующую регуляторную последовательность, такую как сигнальный пептид или лидерная последовательность, если это необходимо, например, для секреции транслируемого полипептида в просвет эндоплазматического ретикулума, в периплазматическое пространство или во внеклеточное пространство. Эти сигналы могут быть эндогенными по отношению к полипептиду либо они могут быть гетерологичными. Лидерные последовательности могут быть удалены бактериальным хозяином при посттрансляционном процессинге.

Помимо регуляторных последовательностей может оказаться желательным введение регуляторных последовательностей, которые обеспечивают регуляцию экспрессии полипептида в зависимости от роста клетки-хозяина. Примерами регуляторных последовательностей являются последовательности, которые обеспечивают увеличение или снижение уровня экспрессии гена в ответ на химическую или физическую стимуляцию, включая присутствие регуляторного соединения, или в ответ на различные температурные или метаболические условия. Регуляторными последовательностями являются нетранслируемые области вектора, такие как энхансеры, промоторы и 5'- и 3'-нетранслируемые области. Эти последовательности взаимодействуют с клеточными белками хозяина, в результате чего осуществляется транскрипция и трансляция. Такие регуляторные последовательности могут варьироваться по своей длине и специфичности. В зависимости от выбранной векторной системы и выбранного хозяина могут быть использованы любые подходящие транскрипционные и трансляционные элементы, включая конститутивные и индуцибельные промоторы. Так, например, для клонирования в бактериальных системах могут быть использованы индуцибельные промоторы, такие как гибридный промотор lacZ фагмиды BlueScript (Stratagene, LaJolla, CA) или плазмиды pSport1™ (Gibco BRL) и т.п. В клетках насекомых может использоваться бакуловирусный промотор полиэдрина. Промоторы или энхансеры, происходящие от геномов растительных клеток (например, гена белка теплового шока, RUBISCO и гена запасных белков) или от вирусов растений (например, вирусных промоторов или лидерных последовательностей), могут быть клонированы в указанный вектор. В клеточных системах млекопитающих предпочтительными являются промоторы, происходящие от генов млекопитающих или от вирусов млекопитающих. Если необходимо генерировать клеточную линию, содержащую множество копий данной последовательности, то могут быть использованы векторы на основе SV40 или EBV с соответствующим селективным маркером.

Экспрессирующий вектор конструируют так, чтобы конкретная кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты присутствовала в векторе вместе с соответствующими регуляторными последовательностями и чтобы положение и ориентация кодирующей последовательности по отношению к регуляторным последовательностям позволяли такой кодирующей последовательности транскрибироваться под "контролем" регуляторных последовательностей, т.е. так, чтобы РНК-полимераза, которая связывается с ДНК-молекулой у регуляторных последовательностей, осуществляла транскрипцию кодирующей последовательности. В некоторых случаях может оказаться необходимым модифицировать указанную последовательность так, чтобы она могла присоединяться к регуляторным последовательностям в соответствующей ориентации, т.е. с сохранением рамки считывания.

Указанные регуляторные последовательности и другие регуляторные последовательности могут быть лигированы с кодирующей последовательностью нуклеиновой кислоты перед встраиванием в вектор. Альтернативно, такая кодирующая последовательность может быть клонирована непосредственно в экспрессирующий вектор, который уже содержит регуляторные последовательности и соответствующий рестрикционный сайт.

Для длительного высокоэффективного продуцирования рекомбинантного полипептида предпочтительной является стабильная экспрессия. Так, например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют нужный полипептид, могут быть трансформированы с использованием экспрессирующих векторов, которые могут содержать вирусные сайты инициации репликации и/или эндогенные экспрессирующие элементы и выбранный маркерный ген, присутствующий на том же самом или на отдельном векто-

ре. После введения этого вектора клетки можно оставить на 1-2 дня для роста в обогащенной среде, которую затем заменяют селективной средой. Селективный маркер необходим для сообщения резистентности, используемой в целях отбора, и его присутствие позволяет культивировать и выделять клетки, успешно экспрессирующие введенные последовательности. Резистентные клоны стабильно трансформированных клеток могут быть подвергнуты пролиферации методами культивирования ткани, подходящими для клеток такого типа.

Клеточные линии млекопитающих, подходящие в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны специалистам, и такими клеточными линиями являются многие иммортализованные клеточные линии, имеющиеся в Американской коллекции типовых культур (ATCC), включая, без ограничения ими, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почек детенышей хомячка (BHK), клетки почек обезьяны (COS), клетки C127, клетки 3T3, клетки BHK, клетки HEK 293, клетки меланомы Боуэса, клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2) и ряд других клеточных линий.

В бакуловирусной системе материалы для получения экспрессирующих систем бакуловирус/клетка насекомого являются коммерчески доступными и поставляются в наборах, *inter alia*, от Invitrogen, San Diego CA (набор "MaxBac"). В общих чертах эти методы известны специалистам и подробно описаны у Summers & Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin № 1555 (1987). Клетками-хозяевами, особенно подходящими для использования в данной системе, являются клетки насекомых, такие как клетки *Drosophila* S2 и клетки *Spodoptera* Sf9.

Специалистам известно множество систем экспрессии генов в клеточных культурах растений и в целых растениях. Примерами подходящих систем экспрессии генов в клетках растений являются системы, описанные в патентах США 5693506, 5659122 и 5608143. Другие примеры экспрессии генов в клеточных культурах растений описаны Zenk, *Phytochemistry* 30, 3861-3863 (1991).

В частности, можно использовать любые растения, из которых могут быть выделены и культивированы протопласты с последующим продуцированием из них целых регенерированных растений, которые содержат перенесенный ген. В частности, из культивируемых клеток или тканей могут быть регенерированы все растения, включая, без ограничения ими, все основные виды сахарного тростника, сахарной свеклы, хлопчатника, плодовых и других деревьев, а также бобовых и овощных растений.

Примерами особенно предпочтительных бактериальных клеток-хозяев являются клетки стрептококков, стафилококков, *E.coli*, *Streptomyces* и *Bacillus subtilis*.

Примерами особенно подходящих клеток-хозяев для экспрессии в грибах являются дрожжевые клетки (например, *S.cerevisiae*) и клетки *Aspergillus*.

Любые системы отбора, которые могут быть использованы для выделения трансформированных клеточных линий, известны специалистам. Примерами являются гены тимидинкиназы (Wigler M. et al. (1977), *Cell*, 11: 223-32) и аденин-фосфорибозилтрансферазы вируса простого герпеса (Lowy I. et al. (1980), *Cell*, 22: 817-23), которые могут быть использованы в *tk⁻* или *aprt⁺*-клетках соответственно.

Кроме того, в качестве основы для отбора могут быть использованы гены резистентности к антиметаболиту, антибиотику или к гербициду, например ген дигидрофолат-редуктазы (DHFR), который сообщает резистентность к метотрексату (Wigler M. et al. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 3567-70); ген *npt*, который сообщает резистентность к аминогликозидам, неомицину и к G-418 (Colbere-Garapin F. et al. (1981), *J. Mol. Biol.* 150: 1-14), и гены *als* или *pat*, которые сообщают резистентность к хлорсульфурон- и фосфинотрицин-ацетилтрансферазе соответственно. Были описаны и другие селективные гены, примеры которых хорошо известны специалистам.

Хотя присутствие или отсутствие экспрессии маркерного гена позволяет предположить, что присутствует также и нужный ген, однако его присутствие и экспрессия еще нуждаются в подтверждении. Так, например, если соответствующая последовательность была встроена в последовательность маркерного гена, то трансформированные клетки, содержащие соответствующие последовательности, могут быть идентифицированы по отсутствию функции маркерного гена. Альтернативно, маркерный ген может находиться в тандеме с последовательностью, кодирующей полипептид согласно изобретению, находящийся под контролем одного промотора. Экспрессия маркерного гена в ответ на индуцирование или отбор обычно указывает также на экспрессию тандемного гена.

Альтернативно, клетки-хозяева, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид согласно изобретению, и которые экспрессируют указанный полипептид, могут быть идентифицированы различными методами, известными специалистам. Такими методами являются, но не ограничиваются ими, ДНК-ДНК или ДНК-РНК-гибридизация и биоанализы на присутствие белка, например сортировка клеток по интенсивности флуоресценции (FACS) или иммуноанализы (такие как твердофазный иммуноферментный анализ [ELISA] и радиоиммуноанализ [РИА]), которые предусматривают использование мембран, растворов или чипов для детекции и/или количественной оценки нуклеиновой кислоты или белка (см. Hampton R. et al. (1990), *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St. Paul, MN) и Maddox D.E. et al. (1983), *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216).

Существует широкий ряд методов мечения и конъюгирования, известных специалистам, и эти методы могут быть использованы в различных анализах на присутствие нуклеиновых кислот и аминокислот. Методами, используемыми в целях продуцирования меченных зондов для гибридизации или ПЦР-зондов для детекции последовательностей, родственных молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим полипептиды согласно изобретению, являются мечение олигонуклеотидами, ник-трансляция, мечение по концам или ПЦР-амплификация с использованием меченного полинуклеотида. Альтернативно, последовательности, кодирующие полипептид согласно изобретению, могут быть клонированы в вектор для продуцирования мРНК-зонда. Такие векторы известны специалистам, являются коммерчески доступными и могут быть использованы для синтеза РНК-зондов *in vitro* путем добавления соответствующей РНК-полимеразы, такой как T7, T3 или SP6, и меченных нуклеотидов. Эти процедуры могут быть проведены с использованием различных коммерчески доступных наборов (Pharmacia & Upjohn (Kalamazoo, MI); Promega (Madison WI) и U.S. Biochemical Corp., Cleveland, OH)).

Подходящими репортерными молекулами или метками, которые могут быть использованы для облегчения детекции, являются радионуклиды, ферменты и флуоресцентные, хемилюминисцентные или хромогенные агенты, а также субстраты, кофакторы, ингибиторы, магнитные частицы и т.п.

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут быть использованы также для генерирования трансгенных животных, в частности грызунов. Такие трансгенные животные входят в дополнительный аспект согласно изобретению. Это генерирование может быть осуществлено путем локальной модификации соматических клеток или манипуляций с зародышевыми линиями для введения наследуемых модификаций. Такие трансгенные животные могут быть, в частности, использованы для создания животных-моделей в целях поиска молекул лекарственных средств, которые являются эффективными в качестве модуляторов полипептидов согласно изобретению.

Полипептид может быть выделен и очищен из рекомбинантных клеточных культур хорошо известными методами, включая преципитацию сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, анионообменную или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксиапатитах и хроматографию на лектине. Для очистки наиболее подходящей является высокоэффективная жидкостная хроматография. В случае если данный полипептид был денатурирован в процессе выделения и/или очистки, то для восстановления активной конформации может быть использована хорошо известная техника рефолдинга белков.

Если необходимо, то для облегчения очистки белков могут быть использованы также специальные векторные конструкции, полученные путем присоединения последовательностей, кодирующих полипептиды согласно изобретению, к нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидный домен, который облегчает очистку растворимых белков. Примерами таких доменов, облегчающих очистку белков, являются пептиды, образующие хелатные комплексы с металлами, такие как гистидин-триптофановые модули, которые позволяют проводить очистку на иммобилизованных металлах; домены белка А, которые позволяют проводить очистку на иммобилизованном иммуноглобулине; и домен, используемый в системе удлинения/очистки FLAGS (Immunex Corp., Seattle, WA). Для облегчения очистки между доменом для очистки и полипептидом согласно изобретению могут быть включены расщепляемые линкерные последовательности, такие как последовательности, специфичные к фактору XA или энтерокиназе (Invitrogen, San Diego, CA). Один из таких экспрессирующих векторов обеспечивает экспрессию гибридного белка, содержащего полипептид согласно изобретению, присоединенный к нескольким гистидиновым остаткам, за которыми следуют тиоредоксин или рестрикционный сайт энтерокиназы. Гистидиновые остатки облегчают проведение очистки с помощью IMAC (аффинной хроматографии на иммобилизованном ионе металла, описанной Porath J. et al. (1992), Prot. Exp. Purif. 3: 263-281), тогда как тиоредоксин или рестрикционный сайт энтерокиназы позволяют выделять полипептид из гибридного белка. Обсуждение векторов, содержащих гибридные белки, можно найти у Kroll D.J. et al., 1993; DNA Cell Biol. 12: 441-453.

Если экспрессируемый полипептид используется в аналитическом скрининге, то обычно предпочтительно, чтобы он был продуцирован на поверхности клетки-хозяина, в которой он экспрессируется. В этом случае клетки-хозяева могут быть собраны до их использования в скрининг-анализе, например, таким методом, как сортировка клеток с возбуждением флуоресценции (FACS), или иммуноаффинным методом. Если полипептид секретируется в среду, то такая среда может быть собрана для выделения и очистки экспрессированного полипептида. Если полипептид продуцируется внутри клетки, то перед выделением полипептида эти клетки должны быть сначала подвергнуты лизису.

Полипептид согласно изобретению может быть использован для скрининга библиотек соединений в любом из известных методов скрининга, применяемых для поиска лекарственных средств. Такие соединения могут стимулировать (служить агонистами) или ингибировать (служить антагонистами) экспрессию гена или активность полипептида согласно изобретению, а поэтому они составляют дополнительный аспект настоящего изобретения. Предпочтительными соединениями являются соединения, способные влиять на экспрессию природного гена, кодирующего полипептид согласно первому аспекту изобретения, или регулировать активность полипептида согласно первому аспекту изобретения.

Соединения-агонисты или соединения-антагонисты могут быть выделены, например, из клеток, бесклеточных препаратов, химических библиотек или смесей природных продуктов. Такими агонистами или антагонистами могут быть природные или модифицированные субстраты, лиганды, ферменты, рецепторы либо структурные или функциональные миметики. Подходящее описание таких методов скрининга можно найти в работе Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, 1 (2): Chapter 5 (1991).

Соединения, которые могут рассматриваться как наиболее вероятные кандидаты на хорошие антагонисты, представляют собой молекулы, которые связываются с полипептидом согласно изобретению, но не индуцируют каких-либо биологических эффектов полипептида после связывания с ним. Потенциальными антагонистами являются небольшие органические молекулы, пептиды, полипептиды и антитела, которые связываются с полипептидом согласно изобретению и тем самым ингибируют или подавляют его активность. Таким образом, связывание полипептида с нормальными связывающимися клеточными молекулами может быть подвергнуто ингибированию, что будет приводить к подавлению нормальной биологической активности такого полипептида.

Полипептид согласно изобретению, который используется в таком методе скрининга, может находиться в растворе в свободном состоянии, может быть иммобилизован на твердом носителе или может присутствовать на клеточной поверхности либо он может быть локализован внутри клетки. Вообще говоря, в таких процедурах скрининга могут быть использованы соответствующие клетки или клеточные мембраны, экспрессирующие полипептид, который контактирует с тестируемым соединением, что приводит к связыванию либо к стимуляции или ингибированию функционального ответа. Затем функциональный ответ клеток, контактируемых с тестируемым соединением, сравнивают с ответом контрольных клеток, которые не контактировали с тестируемым соединением. Такой анализ, проводимый с помощью подходящей системы детекции, позволяет определить, может ли тестируемое соединение давать сигнал, генерируемый активацией указанного полипептида. Ингибиторы активации обычно анализируют в присутствии известного агониста и оценивают влияние этого агониста на активацию в присутствии тестируемого соединения.

Методы генерирования детектируемых сигналов в анализах описанного здесь типа хорошо известны специалистам. Конкретным примером является совместное введение конструкции, экспрессирующей полипептид согласно изобретению или его фрагмент, такой как LBD, присутствующий в виде гибрида с ДНК-связывающим доменом GAL4, в клетку вместе с репортерной плазмидой, такой как, например, pFR-Luc (Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands). Эта конкретная плазида содержит синтетический промотор с пятью тандемными повторами GAL4-связывающих сайтов, регулирующих экспрессию гена люциферазы. При введении потенциального лиганда в клетки он будет связываться с гибридом "GAL4-полипептид" и индуцировать транскрипцию гена люциферазы. Мониторинг уровня экспрессии гена люциферазы может быть проведен путем детекции его активности на устройстве для считывания интенсивности люминесценции (см., например, Lehman et al., *JBC* 270, 12953, 1995; Pawar et al., *JBC*, 277, 39243, 2002).

Еще более предпочтительный способ идентификации агониста или антагониста полипептида согласно изобретению включает в себя:

(a) контактирование меченного или немеченного соединения с полипептидом, иммобилизованным на любом твердом носителе (например, на сферах, пластинах, матричном носителе, чипе), и детекцию указанного соединения путем определения присутствия метки или самого соединения;

(b) контактирование клетки, экспрессирующей на своей поверхности полипептид путем его искусственного закоривания на клеточной мембране или путем конструирования химерного рецептора, ассоциированного со вторым компонентом, способным давать детектируемый сигнал в ответ на связывание соединения с указанным полипептидом, где указанное соединение скринируют в условиях, стимулирующих связывание с указанным полипептидом; и

(c) определение события связывания указанного соединения с указанным полипептидом либо его активации или ингибирования путем сравнения уровня сигнала, генерируемого в результате взаимодействия указанного соединения с указанным полипептидом, с уровнем сигнала, вырабатываемого в отсутствие данного соединения.

Так, например, может быть применен такой способ, как FRET-детекция лиганда, связанного с полипептидом в присутствии пептидных коактиваторов (Norris et al., *Science* 285, 744, 1999).

В других предпочтительных вариантах изобретения общие методы, описанные выше, могут, кроме того, включать осуществление идентификации агониста или антагониста в присутствии меченного или немеченного лиганда для полипептида.

В другом варианте изобретения способ идентификации агониста или антагониста полипептида согласно изобретению включает в себя определение факта ингибирования связывания лиганда с полипептидом согласно изобретению на любой твердой или клеточной поверхности в присутствии соединения-кандидата в условиях, стимулирующих связывание с указанным полипептидом, и определение количества лиганда, связанного с указанным полипептидом. При этом считается, что соединение, способствующее снижению уровня связывания с лигандом, является конкурентом, который может действовать как агонист или антагонист. Причем предпочтительно, чтобы указанный лиганд был меченным.

Более конкретно способ скрининга на соединение, являющееся агонистом или антагонистом полипептида, включает стадии:

(а) инкубирования меченного лиганда с полипептидом согласно изобретению, присутствующим на твердом носителе, с клеточной поверхностью или с клеточной мембраной, содержащей полипептид согласно изобретению;

(b) определения количества меченного лиганда, связанного с полипептидом на твердом носителе, с intactой клеткой или с клеточной мембраной;

(с) добавления соединения-кандидата к смеси меченного лиганда и иммобилизованного полипептида на твердом носителе, intactой клетки или клеточной мембраны стадии (а) и доведения этой смеси до состояния равновесия;

(d) определения количества меченного лиганда, связанного с иммобилизованным полипептидом или с целой клеткой или с клеточной мембраной, после проведения стадии (с); и

(е) сравнения различия в количествах связанного меченного лиганда стадий (b) и (d), где соединение, вызывающее снижение уровня связывания в стадии (d), рассматривается как агонист или антагонист.

Было обнаружено, что указанные полипептиды могут модулировать различные физиологические и патологические процессы в зависимости от вводимой дозы в вышеописанных анализах. Таким образом, термин "функциональные эквиваленты" полипептидов согласно изобретению включают полипептиды, которые обладают любой из указанных дозозависимых модулирующих активностей в вышеописанных анализах. Хотя степень дозозависимой активности необязательно должна быть идентична активности указанных полипептидов согласно изобретению, однако предпочтительно, чтобы в данном анализе на активность указанные "функциональные эквиваленты" обладали дозозависимой активностью, по существу, аналогичной активности полипептидов согласно изобретению.

Полипептиды экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептиды INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 согласно изобретению могут модулировать рост и дифференцировку клеток. Таким образом, биологическая активность полипептидов экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 может быть оценена в системах, позволяющих проводить исследование роста и дифференцировки клеток, таких как системы тканевых культур *in vitro*. Стимуляция или ингибирование пролиферации клеток могут быть измерены с помощью различных анализов.

Так, например, для оценки ингибирования роста клеток может быть использована твердая или жидкая среда. В твердой среде клетки, рост которых подвергается ингибированию, могут быть отобраны из группы клеток индивидуума путем сравнения размеров образуемых ими колоний. В жидкой среде ингибирование роста может быть скринировано путем измерения мутности культуральной среды или включения меченного тимидина в ДНК. Обычно включение нуклеозидного аналога в только что синтезированную ДНК может служить основой для измерения пролиферации клеток (т.е. активного роста клеток) в данной популяции. Так, например, в качестве реагента для мечения ДНК может быть использован бромдезоксисуридин (BrdU), а в качестве детектирующего реагента могут быть использованы мышиные моноклональные антитела против BrdU. Это антитело связывается только с клетками, содержащими ДНК, в которую был включен бромдезоксисуридин. В комбинации с этим анализом могут быть использованы различные методы детекции, включая иммунофлуоресцентные, иммуногистохимические, ELISA- и колориметрические методы. Наборы, включающие бромдезоксисуридин (BrdU) и мышиное моноклональное антитело против BrdU, являются коммерчески доступными и поставляются фирмой Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN).

Влияние полипептидов экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 согласно изобретению на дифференцировку клеток может быть оценено посредством контактирования стволовых клеток или эмбриональных клеток с различными количествами указанных полипептидов и оценки такого влияния на дифференцировку стволовых клеток или эмбриональных клеток. Для идентификации полученных клеток могут быть использованы тканеспецифические антитела и методы микроскопии.

Было обнаружено, что в вышеописанном анализе полипептиды экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептиды INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 могут также модулировать пролиферацию и дифференцировку клеток иммунной и/или нервной системы в зависимости от дозы. Таким образом, "функциональные эквиваленты" полипептидов экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 включают полипептиды, которые обладают любой из таких дозозависимых активностей, направленных на регуляцию роста и дифференцировку клеток в вышеописанном анализе. Хотя степень дозозависимой активности необязательно должна быть идентичной активности полипептидов экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144, однако предпочтительно, чтобы указанные "функциональные эквиваленты" обладали, по существу, таким же дозозависимым действием, как и полипептиды экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144.

В некоторых описанных выше вариантах настоящего изобретения могут быть использованы простые анализы на связывание, в которых адгезию тестируемого соединения к поверхности, несущей данный полипептид, детектируют с помощью метки, непосредственно или опосредованно ассоциированной с тестируемым соединением, либо анализы на конкуренцию с меченным соединением-конкурентом. В другом варианте осуществления изобретения могут быть использованы конкурентные анализы на скрининг лекарственных средств, в которых нейтрализующие антитела, способные связываться с данным полипептидом, специфически конкурируют за связывание с тестируемым соединением. Таким образом, указанные антитела могут быть использованы для детекции на присутствие любого тестируемого соединения, обладающего специфической аффинностью связывания с указанным полипептидом.

Могут быть также разработаны анализы для детекции влияния добавленных тестируемых соединений на продуцирование мРНК, кодирующей указанный полипептид в клетках. Так, например, может быть разработан такой анализ ELISA, который позволяет измерять секретируемые или клеточно-ассоциированные уровни полипептида с использованием моноклональных или поликлональных антител стандартными методами, известными специалистам, и такой анализ может быть использован для поиска соединений, которые могут ингибировать или усиливать продуцирование полипептида из соответствующим образом модифицированных клеток или тканей. Затем может быть определен уровень образования связывающих комплексов между полипептидом и тестируемым соединением.

Другой метод, который может быть использован для скрининга лекарственных средств, позволяет осуществлять высокоэффективный скрининг соединений, обладающих подходящей аффинностью связывания с представляющим интерес полипептидом (см. Международную патентную заявку WO 84/03564). В этом методе большое число различных небольших тестируемых соединений синтезируют на твердом субстрате, который затем может быть подвергнут реакции с полипептидом согласно изобретению и промывке. Одним из способов иммобилизации полипептида является использование ненейтрализующих антител. Связанный полипептид может быть затем детектирован методами, хорошо известными специалистам. Очищенный полипептид также может быть непосредственно нанесен на планшеты для последующего использования в вышеупомянутых способах скрининга на лекарственные средства.

Методами анализов, которые также подпадают под определение этих терминов в настоящем изобретении, являются методы, предусматривающие использование генов и полипептидов согласно изобретению в анализе на сверхэкспрессию или элиминацию. Такие анализы включают изменение уровней указанных генов/полипептидов в клетках и оценку влияния этих изменений на физиологию модифицированных клеток. Так, например, такие эксперименты позволяют более детально выявить механизмы передачи сигналов и метаболические пути, в которых участвуют конкретные гены/полипептиды, а также получить информацию об идентичности полипептидов, с которыми взаимодействуют исследуемые полипептиды и решить проблему разработки методов регуляции уровней родственных генов и белков.

Другими методами поиска лекарственных средств, которые могут быть использованы, является высокоэффективный скрининг соединений, имеющих подходящую аффинность связывания с представляющим интерес полипептидом (см. Международную патентную заявку WO 84/03564). В этом методе большое число различных небольших тестируемых соединений синтезируют на твердом субстрате, который затем может быть подвергнут реакции с полипептидом согласно изобретению и промывке. Одним из способов иммобилизации полипептида является использование ненейтрализующих антител. Связанный полипептид может быть затем детектирован методами, хорошо известными специалистам. Очищенный полипептид также может быть непосредственно нанесен на планшеты для последующего использования в вышеупомянутых способах скрининга на лекарственные средства.

Примеры подходящих анализов, проводимых для идентификации агонистов или антагонистов полипептидов согласно изобретению, описаны в работе Rosen et al., *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2003, 6 (2): 224-30.

Полипептид согласно изобретению может быть использован для идентификации мембрано-связанных или растворимых рецепторов с помощью стандартной техники связывания с рецептором, известной специалистам, такой как анализы на связывание и перекрестное связывание с лигандом, в которых данный полипептид метят радиоактивным изотопом, химически модифицируют или присоединяют к пептидной последовательности, которая облегчает его детекцию или очистку, и инкубируют с источником предполагаемого рецептора (например, с композицией клеток, клеточными мембранами, клеточными супернатантами, тканевыми экстрактами или с физиологическими жидкостями). Эффективность связывания может быть определена биофизическими методами, такими как поверхностный плазмонный резонанс и спектроскопия. Анализы на связывание могут быть использованы для очистки и клонирования рецептора, но они могут быть использованы также для идентификации агонистов и антагонистов указанного полипептида, которые конкурируют с указанным полипептидом за связывание с рецептором. Стандартные методы проведения скрининг-анализов хорошо известны специалистам.

В другом своем варианте настоящее изобретение относится к применению полипептида INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 или его фрагмента, где указанным фрагментом предпочтительно является фрагмент, специфичный к гену INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144, в целях выделения или генерирования агониста или стимулятора полипептида INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 для лечения иммуноассоциированного расстройства, где указанный агонист или стимулятор выбран из группы, состоящей из:

- 1) специфического антитела или его фрагмента, включая а) химерное, б) гуманизованное или с) полностью человеческое антитело;
- 2) биспецифического или мультиспецифического антитела;
- 3) одноцепочечного антитела (например, scFv); или
- 4) однодоменного антитела; или
- 5) пептидо- или непептидомиметика, происходящего от указанных антител; или
- 6) антитело-миметика, такого как (а) антикалин или (б) связывающая молекула на основе фибронектина (например, тринектин или аднектин).

Получение пептидо- или непептидомиметиков из антител известно специалистам (Saragovi et al., 1991 & Saragovi et al., 1992).

Антикарины известны также специалистам (Vogt et al., 2004). Связывающие молекулы на основе фибронектина описаны в патенте США № 6818418 и в WO 2004029224.

Кроме того, тестируемыми соединениями могут быть соединения различного происхождения, природы и состава, такие как любые небольшие молекулы, нуклеиновые кислоты, липиды, пептиды, полипептиды, включая антитела, такие как химерное, гуманизованное или полностью человеческое антитело или его фрагмент, происходящие от них пептидо- или непептидомиметики, а также биспецифические или мультиспецифические антитела, одноцепочечные антитела (например, scFv), однодоменные антитела, антитела-миметики, такие как антикалин или связывающая молекула на основе фибронектина (например, тринектин или аднектин) и т.п., в изолированной форме или в виде их смеси или комбинаций.

Настоящее изобретение относится также к набору для скрининга, используемому в методах идентификации агонистов, антагонистов, лигандов, рецепторов, субстратов и ферментов, описанных выше.

Настоящее изобретение относится также к агонистам, антагонистам, лигандам, рецепторам, субстратам, ферментам и к другим соединениям, модулирующим активность или антигенность полипептида согласно изобретению в соответствии с описанными выше механизмами.

Как указывалось выше, предполагается, что различные молекулы согласно изобретению (т.е. полипептиды согласно первому аспекту настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты согласно второму или третьему аспекту настоящего изобретения, вектор согласно четвертому аспекту настоящего изобретения, клетка-хозяин согласно пятому аспекту настоящего изобретения, лиганд согласно шестому аспекту настоящего изобретения, и соединение согласно седьмому аспекту настоящего изобретения) могут быть использованы для лечения или диагностики заболеваний. В целях оценки эффективности указанных молекул согласно изобретению для лечения или диагностики заболевания могут быть проведены один или несколько из описанных ниже анализов. Следует отметить, что хотя некоторые из нижеисследующих анализов описаны для тестируемых соединений, являющихся белком/полипептидом, однако специалист в данной области может легко модифицировать эти анализы для их применения к другим молекулам согласно изобретению, которые также могут быть использованы в качестве "тестируемых соединений".

Настоящее изобретение относится также к фармацевтическим композициям, содержащим полипептид, нуклеиновую кислоту, лиганд или соединение согласно изобретению в комбинации с подходящим фармацевтическим носителем. Эти композиции могут быть использованы в качестве терапевтических или диагностических реагентов, в качестве вакцин или в качестве других иммуногенных композиций, подробно описанных ниже.

В соответствии с используемой здесь терминологией композиция, содержащая полипептид, нуклеиновую кислоту, лиганд или соединение [X], считается "в основном не содержащей" примесей [здесь, Y], если по меньшей мере 85 мас.% от всего количества X+Y в данной композиции составляет X. Предпочтительно X составляет по меньшей мере примерно 90%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 95, 98 или даже 99 мас.% по общей массе X+Y в данной композиции.

Предпочтительно фармацевтические композиции должны содержать терапевтически эффективное количество полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты, лиганда или соединения согласно изобретению. Используемый здесь термин "терапевтически эффективное количество" означает количество терапевтического агента, необходимого для лечения, ослабления или предупреждения рассматриваемого заболевания или состояния или для достижения детектируемого терапевтического или профилактического эффекта. Для каждого соединения терапевтически эффективная доза может быть сначала оценена либо в анализе клеточной культуры, например опухолевых клеток, либо на животных-моделях, обычно на мышах, кроликах, собаках или свиньях. С использованием животного-модели может быть также определен соответствующий интервал концентраций и способ их введения. Полученная информация может быть затем использована для определения подходящих доз и способов их введения человеку.

Точное эффективное количество соединения для введения индивидууму будет зависеть от тяжести патологического состояния, общего состояния здоровья индивидуума, его возраста, веса, пола и режима питания, от времени и частоты введения лекарственного средства, от комбинации(й) лекарственных средств, а также от реактивной чувствительности и толерантности/восприимчивости данного индивидуума к проводимой терапии. Такое количество может быть определено путем рутинного экспериментирования и может быть установлено врачом-клиницистом. В общих чертах эффективная доза может составлять от 0,01 до 50 мг/кг, предпочтительно от 0,05 до 10 мг/кг. Композиции могут быть введены пациенту либо отдельно, либо в комбинации с другими агентами, лекарственными средствами или гормонами.

Фармацевтическая композиция может также содержать фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для введения терапевтического агента. Такими носителями являются антитела и другие полипептиды, гены и другие терапевтические агенты, такие как липосомы, при условии, что данный носитель сам по себе не индуцирует выработку антител, оказывающих негативное воздействие на индивидуума, которому вводят указанную композицию, и не является чрезмерно токсичным. Подходящими носителями могут быть крупные макромолекулы с замедленным метаболизмом, такие как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы.

Используемыми здесь фармацевтически приемлемыми солями могут быть, например, соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и т.п., и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и т.п. Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут, кроме того, содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, в указанных композициях могут присутствовать и вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферизующие вещества и т.п. С помощью таких носителей могут быть получены фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и т.п. для перорального приема пациентом.

Композиции согласно изобретению, после их приготовления, могут быть непосредственно введены индивидууму. Индивидуумами, подвергаемыми лечению, могут быть животные, в частности человек.

Фармацевтические композиции, используемые в настоящем изобретении, могут быть введены различными способами, включая, без ограничения ими, пероральное, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интрамедуллярное, интратекальное, интравентрикулярное, трансдермальное или чрескожное введение (см., например, WO 98/20734), а также подкожное, внутрибрюшинное, интраназальное, внутрикишечное, местное, подязычное, интравагинальное или ректальное введение. Для введения фармацевтических композиций согласно изобретению могут быть использованы также аппараты для "выстреливания" генов или безыгольные шприцы. В основном терапевтические композиции могут быть приготовлены в виде растворов для инъекций, либо жидких растворов, либо суспензий или они могут быть получены в виде твердых форм, подходящих для получения растворов или суспензий в жидких носителях перед их инъекцией.

Указанные композиции могут быть непосредственно доставлены в основном путем подкожной, внутрибрюшинной, внутривенной или внутримышечной инъекции либо они могут быть доставлены в интерстициальное пространство ткани. Эти композиции могут быть также введены в пораженный участок. При этом лечение может быть проведено по схеме введения разовой дозы или дробных доз.

Если активность полипептида согласно изобретению превышает активность, требуемую для лечения конкретного патологического состояния, то в данном случае может быть рассмотрено несколько подходов. Один из таких подходов предусматривает введение индивидууму вышеописанного соединения-ингибитора (антагониста) вместе с фармацевтически приемлемым носителем, где указанный ингибитор вводят в количестве, эффективном для ингибирования функции полипептида, например блокирования связывания с лигандами, субстратами, ферментами или рецепторами, либо для ингибирования вторичного сигнала и тем самым эффективным для ослабления симптомов аномального состояния. Такими антагонистами предпочтительно являются антитела. Для минимизации иммуногенности антител, описанных выше, наиболее предпочтительно, чтобы такие антитела были химерными и/или гуманизованными.

В соответствии с другим подходом могут быть введены растворимые формы полипептидов, которые сохраняют аффинность связывания с рассматриваемым лигандом, субстратом, ферментом или рецептором. В основном такой полипептид может быть введен в виде фрагментов, в которых сохраняются релевантные части.

В альтернативном подходе экспрессия гена, кодирующего данный полипептид, может быть ингибирована методами блокирования экспрессии, такими как использование молекул антисмысловой нуклеиновой кислоты (описанных выше), которые могут быть генерированы эндогенно или введены отдельно. Модификации экспрессии генов могут быть получены путем конструирования комплементарных последовательностей или антисмысловых молекул (ДНК, РНК или PNA) для осуществления регуляции, 5'-областей или регуляторных областей (сигнальной последовательности, промоторов, энхансеров и ин-

тронов) гена, кодирующего данный полипептид. Аналогичным образом, такое ингибирование может быть осуществлено с использованием методики спаривания оснований с образованием "тройной спирали". Спаривание с образованием тройной спирали используется потому, что оно приводит к нарушению способности двойной спирали раскрываться так, чтобы это оказалось достаточным для связывания с полимеразой, факторами транскрипции или регуляторными молекулами. Успехи в клинической терапии, достигнутые за последнее время благодаря использованию ДНК-триплекса, были описаны в литературе (Gee J.E. et al. (1994): Huber B.E. & B.I. Carr, *Molecular и Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY). Комплементарная последовательность или антисмысловая молекула могут быть также сконструированы в целях блокирования трансляции мРНК посредством предотвращения связывания транскрипта с рибосомами. Такие олигонуклеотиды могут быть введены или генерированы *in situ* в результате экспрессии *in vivo*.

Кроме того, экспрессия полипептида согласно изобретению может быть предотвращена с использованием рибозимов, специфичных к мРНК-последовательности, кодирующей этот полипептид. Рибозимы представляют собой каталитически активные РНК, которые могут быть природными или синтетическими (см. например, Usman N. et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* (1996), 6 (4), 527-33). Синтетические рибозимы могут быть сконструированы так, чтобы они специфически расщепляли мРНК в выбранных положениях и тем самым, предотвращали трансляцию мРНК в функциональный полипептид. Рибозимы могут быть синтезированы с использованием природного рибозофосфатного остова и природных оснований, обычно присутствующих в РНК-молекулах. Альтернативно, рибозимы могут быть синтезированы с использованием неприродных остовов, например 2'-О-метил-РНК, в целях защиты от расщепления рибонуклеазой, и эти рибозимы могут содержать модифицированные основания.

Молекулы РНК могут быть модифицированы в целях увеличения внутриклеточной стабильности и времени полужизни. Возможными модификациями являются, но не ограничиваются ими, присоединение фланкирующих последовательностей у 5'- и/или у 3'-концов данной молекулы или использование в указанном остове молекулы фосфориоата или 2'-О-метила вместо фосфодиэстерных связей. Эта концепция может рассматриваться и при продуцировании РНА и может быть применена ко всем указанным молекулам посредством включения нетрадиционных оснований, таких как инозин, квеозин и бутозин, а также ацетил-, метил-, тио- и аналогичные модифицированные формы аденина, цитидина, гуанина, тимина и уридина, которые не могут легко распознаваться эндогенными эндонуклеазами.

Для лечения аномальных состояний, ассоциированных с недостаточной экспрессией полипептида согласно изобретению и его активностью, имеется несколько способов. Один из таких способов предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, которое активирует указанный полипептид, т.е. соединение-агонист, описанный выше, в целях ослабления симптомов патологического состояния. Альтернативно, терапевтическое количество указанного полипептида в комбинации с подходящим фармацевтическим носителем может быть введено в целях сохранения соответствующего физиологического равновесия данного полипептида.

Для осуществления эндогенного продуцирования данного полипептида соответствующими клетками индивидуума может быть применена генотерапия. Генотерапию используют для перманентного лечения заболеваний, связанных с аномальным продуцированием данного полипептида, путем замены дефектного гена "правильным" терапевтическим геном.

Генотерапия согласно изобретению может быть осуществлена *in vivo* или *ex vivo*. Для генотерапии *ex vivo* требуются выделение и очистка клеток, взятых у пациента, введение терапевтического гена и введение генетически модифицированных клеток обратно пациенту. В противоположность этому генотерапия *in vivo* не требует выделения и очистки клеток пациентов.

Для введения пациенту обычно используют "упакованный" терапевтический ген. Носители для доставки генов могут быть невирусными, такими как липосомы, либо они могут представлять собой дефектные по репликации вирусы, такие как аденовирус, описанный Berkner K.L., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158, 39-66 (1992), или векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), описанные Muzyczka N. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158, 97-129 (1992) и в патенте США № 5252479. Так, например, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид согласно изобретению, может быть сконструирована для экспрессии в дефектном по репликации ретровирусном векторе. Затем эта экспрессирующая конструкция может быть выделена и введена в упаковывающую клетку, трансдуцированную ретровирусным плазмидным вектором, содержащим РНК, кодирующую указанный полипептид, так, чтобы указанная упаковывающая клетка продуцировала инфекционные вирусные частицы, содержащие нужный ген. Эти клетки-продуценты могут быть введены индивидууму для конструирования клеток *in vivo* и экспрессии полипептида *in vivo* (см. Chapter 20 *Gene Therapy и other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches* (и цитируемые там ссылки), Human Molecular Genetics (1996), T. Strachan & A.P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd.).

Другим способом является введение "оголенной ДНК", где терапевтический ген непосредственно инъецируют в кровоток или в мышечную ткань.

В случае, когда полипептидами или молекулами нуклеиновой кислоты согласно изобретению являются агенты, вызывающие заболевание, настоящее изобретение относится к способу их использования в целях получения вакцин для вырабатывания антител против указанного агента, вызывающего заболевание.

Вакцины согласно изобретению могут быть либо профилактическими (т.е. предназначенными для предупреждения инфекции), либо терапевтическими (т.е. предназначенными для лечения заболеваний после инфицирования). Такие вакцины содержат иммунизирующий(е) антиген(ы), иммуноген(ы), полипептид(ы), белок(ки) или нуклеиновую кислоту, обычно в комбинации с описанными выше фармацевтически приемлемыми носителями, где указанным носителем может быть любой носитель, который сам по себе не индуцирует вырабатывание антител, оказывающих негативное воздействие на индивидуума, которому вводят указанную композицию. Кроме того, эти носители могут действовать как иммуностимуляторы ("адъюванты"). Более того, антиген или иммуноген может быть конъюгирован с бактериальным токсинном, таким как токсин дифтерии, столбняка, холеры, *H. pylori* и другие патогены.

Поскольку полипептиды могут разлагаться в желудке, то вакцины, содержащие полипептиды, предпочтительно вводят парентерально (например, путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или чрескожной инъекции). Композициями, подходящими для парентерального введения, являются водные и безводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, сообщающие данной композиции изотоничность с кровью реципиента, а также водные и безводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие агенты или загустители.

Вакцинные композиции согласно изобретению могут быть помещены в емкости для разовых лекарственных форм или для многократного применения. Так, например, эти лекарственные формы могут быть помещены в запаянные ампулы и сосуды, которые могут храниться в замороженном виде и в которые непосредственно перед их использованием необходимо добавить лишь стерильный жидкий носитель. Конкретная доза будет зависеть от удельной активности данной вакцины и может быть легко определена путем рутинного экспериментирования.

Генетическая доставка антител, связывающихся с полипептидами согласно изобретению, может быть осуществлена, например, как описано в Международной патентной заявке WO 98/55607.

Для получения вакцинных композиций может быть использована также технология безыгольного впрыскивания (см., например, www.powderject.com).

Ряд подходящих методов вакцинации и систем для доставки вакцин описаны в Международной патентной заявке WO 00/29428.

Настоящее изобретение относится также к использованию молекул нуклеиновой кислоты согласно изобретению в качестве диагностических реагентов. Детекция мутированной формы гена, представляющей собой молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению, которые ассоциируются с дисфункцией, применяется в качестве диагностического средства, которое может облегчать установление диагноза заболевания или восприимчивости к заболеванию, возникающему в результате пониженной экспрессии, сверхэкспрессии или измененной пространственной или временной экспрессии данного гена. Индивидуумы, несущие мутации в данном гене, могут быть идентифицированы на ДНК-уровне различными методами.

Молекулы нуклеиновой кислоты, используемые для диагностики, могут быть получены из клеток данного индивидуума, таких как клетки крови, мочевины, слюны, биоптата ткани или материала, полученного после аутопсии. Геномная ДНК может быть использована непосредственно для детекции либо перед проведением анализа она может быть амплифицирована ферментативным способом с помощью ПЦР, лигазной цепной реакции (ЛЦР), амплификации с замещением цепи (SDA) или другими методами амплификации (см. Saiki et al., *Nature*, 324, 163-166 (1986); Bej et al., *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.*, 26, 301-334 (1991); Birkenmeyer et al., *J. Virol. Meth.*, 35, 117-126 (1991), Van Brunt, *J. Bio/Technology*, 8, 291-294 (1990)).

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания у пациента, включающему оценку экспрессии природного гена, кодирующего полипептид согласно изобретению, и сравнение полученного уровня экспрессии с контрольным уровнем, где уровень, отличающийся от указанного контрольного уровня, является признаком наличия данного заболевания. Этот способ включает в себя следующие стадии:

а) контактирование образца ткани, взятой у пациента, с нуклеиново-кислотным зондом в жестких условиях, в результате чего образуется гибридный комплекс между молекулой нуклеиновой кислоты согласно изобретению и указанным зондом;

б) контактирование контрольного образца с указанным зондом в условиях, аналогичных условиям стадии (а); и

с) детекцию присутствия гибридных комплексов в указанных образцах, где детекция уровней гибридного комплекса в образце, взятого у данного пациента, которые отличаются от уровней гибридного комплекса в контрольном образце, является признаком наличия данного заболевания.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики, включающему в себя следующие стадии:

- а) получение образцов тканей от пациента, исследуемого на наличие заболевания;
- б) выделение молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению из указанного образца ткани;
- с) установление диагноза заболевания у данного пациента путем обнаружения присутствия мутации молекулы нуклеиновой кислоты, которая ассоциируется с данным заболеванием.

Для облегчения детекции молекул нуклеиновой кислоты в описанных выше способах может быть проведена стадия амплификации, например, с помощью ПЦР.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики, включающему в себя следующие стадии:

- а) получение образцов тканей от пациента, исследуемого на наличие заболевания;
- б) выделение молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению из указанного образца ткани;
- с) установление диагноза заболевания у данного пациента путем обнаружения присутствия мутации молекулы нуклеиновой кислоты, которая ассоциируется с данным заболеванием.

Для облегчения детекции молекул нуклеиновой кислоты в описанных выше способах может быть проведена стадия амплификации, например, с помощью ПЦР. Подходящие зонды более подробно обсуждаются ниже.

Делеции и инсерции могут быть детектированы по изменению размера амплифицированного продукта по сравнению с нормальным генотипом. Точковые мутации могут быть идентифицированы путем гибридизации амплифицированной ДНК с меченной РНК согласно изобретению или альтернативно с мечеными антисмысловыми ДНК-последовательностями согласно изобретению. Полностью соответствующие последовательности могут быть дифференцированы от дуплексов с ошибочным спариванием путем гидролиза РНКазой или путем оценки различий в температурах плавления. Присутствие или отсутствие мутации у пациента может быть определено посредством контактирования ДНК с нуклеиново-кислотным зондом, который гибридизуется с ДНК в жестких условиях, в результате чего образуется гибридная двухцепочечная молекула, где указанная гибридная двухцепочечная молекула имеет негибризованную часть цепи нуклеиново-кислотного зонда в любой области, соответствующей мутации, ассоциированной с заболеванием; и установления присутствия или отсутствия негибризованной части цепи нуклеиново-кислотного зонда как показателя наличия или отсутствия ассоциированной с заболеванием мутации в соответствующей части ДНК-цепи.

Такие способы диагностики являются особенно ценными для проведения пренатальных и даже неонатальных тестов.

Точковые мутации и другие отличия последовательностей эталонного гена и "мутантных" генов могут быть идентифицированы другими хорошо известными методами, такими как прямое секвенирование ДНК или определение конформационного полиморфизма одноцепочечных последовательностей (см. Orita et al., *Genomics*, 5, 874-879 (1989)). Так, например, секвенирующий праймер может быть использован вместе с двухцепочечным ПЦР-продуктом или с одноцепочечной матричной молекулой, генерированной с помощью модифицированной ПЦР. Определение последовательности осуществляют в соответствии со стандартными процедурами с использованием радиоактивно меченных нуклеотидов или в соответствии с процедурами автоматического секвенирования с использованием флуоресцентных меток. Клонированные ДНК-сегменты могут быть использованы также в качестве зондов для детекции специфических ДНК-сегментов. Чувствительность этого метода значительно повышается при использовании комбинированной ПЦР. Кроме того, точковые мутации и другие модификации последовательностей, такие как полиморфизм, могут быть детектированы, как описано выше, например, с использованием аллель-специфических олигонуклеотидов для ПЦР-амплификации последовательностей, отличающихся одним нуклеотидом.

Различия в ДНК-последовательностях могут быть также детектированы по изменениям электрофоретической подвижности ДНК-фрагментов в гелях в присутствии или в отсутствии денатурирующих агентов либо путем прямого секвенирования ДНК (например, Myers et al., *Science* (1985), 230: 1242). Изменения в конкретных положениях данных последовательностей могут быть также выявлены либо путем проведения анализов на защиту от нуклеазы, таких как анализ на защиту от РНКазы или S1, либо методом химического расщепления (см. Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985), 85: 4397-4401).

Помимо стандартного гель-электрофореза и секвенирования ДНК, мутации, такие как микроделеции, анеуплоидии, транслокации и инверсии, могут быть также детектированы путем проведения анализа *in situ* (см. например, Keller et al., *DNA Probes*, 2nd Ed., Stockton Press, New York, N.Y., USA (1993)), т.е. ДНК или РНК-последовательности в клетках могут быть проанализированы на мутации, без их выделения и/или иммобилизации на мембране. В настоящее время наиболее широко используемым методом является гибридизация *in situ* с флуоресценцией (FISH), и в литературе уже появилось множество описаний этого метода (см. например, Trachuck et al., *Science* 250, 559-562 (1990) и Trask et al., *Trends, Genet.*, 7, 149-154 (1991)).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения для проведения эффективного скрининга генетических вариантов, мутаций и полиморфизма может быть создан массив олигонуклеотидных зондов, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Технология создания массивов хорошо известна специалистам и находит широкое применение; при этом она может быть использована для решения ряда проблем молекулярной генетики, касающихся экспрессии генов, сцепления генов и генетической изменчивости (см. например, M. Chee et al., *Science* (1996). Vol. 274, p. 610-613).

В одном из вариантов осуществления изобретения такой массив может быть получен и использован в соответствии с методами, описанными в заявке PCT WO 95/11995 (Chee et al.); Lockhart D.J. et al., (1996), *Nat. Biotech.* 14: 1675-1680) и Schena M. et al. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 10614-10619). Олигонуклеотидные пары могут быть использованы в количестве от 2 пар до 1 млн пар. Эти олигомеры синтезируют в соответствующих участках на субстрате с использованием оптически направленного химического синтеза. Таким субстратом может быть бумага, нейлон или мембрана другого типа, фильтр, чип, покровное стекло или любой другой твердый носитель. В другом аспекте согласно изобретению олигонуклеотид может быть синтезирован на поверхности субстрата с использованием процедуры химического связывания и струйного аппарата для нанесения путем разбрызгивания, как описано в заявке PCT WO 95/25116 (Baldeschweiler et al.). В другом своем аспекте для определения порядка расположения кДНК-фрагментов или олигонуклеотидов на поверхности субстрата и связывания этих фрагментов или олигонуклеотидов с поверхностью субстрата могут быть использованы "сетчатые" массивы, аналогичные массивам для дот- (или слот-) блотов, с применением вакуумной системы и процедур термического, УФ, механического или химического связывания. Массив, такой как массивы, описанные выше, может быть создан вручную или с помощью подходящих устройств (слот-блот или дот-блот-аппарата), материалов (любого твердого носителя) и оборудования (включая роботизированную аппаратуру), и этот массив может содержать 8, 24, 96, 384, 1536 или 6144 олигонуклеотидов или любое другое число от 2 до более чем 1 млн, которое является подходящим для эффективного использования коммерчески доступного оборудования.

Помимо методов, описанных выше, заболевания могут быть диагностированы методами, предусматривающими определение в образце, взятом у индивидуума, аномально низкого или аномально высокого уровня полипептида или мРНК. Для количественной оценки полипептидов пониженный или повышенный уровень экспрессии может быть измерен на РНК-уровне любыми методами, хорошо известными специалистам, например путем амплификации нуклеиновых кислот, например, с помощью ПЦР или ОТ-ПЦР, путем проведения анализов на защиту от РНКазы, Нозерн-блот-анализов и других методов гибридизации.

Аналитические методы, которые могут быть использованы для определения уровней полипептида согласно изобретению в образце, взятом у хозяина, хорошо известны специалистам и более подробно обсуждаются выше (включая радиоиммуноанализы, анализы на конкурентное связывание, Вестерн-блот-анализ и ELISA-анализы). В этом аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики, который включает в себя стадии:

(a) контактирования лиганда, описанного выше, с биологическим образцом в условиях, подходящих для образования комплекса лиганд-полипептид; и

(b) детекции указанного комплекса.

Протоколы, такие как ELISA, РИА и FACS, разработанные для измерения уровней полипептидов, могут быть, кроме того, взяты за основу для определения измененных или аномальных уровней экспрессии полипептида. Нормальные или стандартные значения для экспрессии полипептида получают путем объединения физиологических жидкостей или клеточных экстрактов, взятых у нормальных млекопитающих, предпочтительно у человека, с антителом против данного полипептида в условиях, подходящих для образования комплекса. Количество образованного стандартного комплекса может быть оценено различными методами, такими как фотометрические методы.

Антитела, которые специфически связываются с полипептидом согласно изобретению, могут быть использованы для диагностики состояний или заболеваний, характеризующихся экспрессией полипептида, или в анализах для наблюдения за пациентами, которым было проведено лечение полипептидами, молекулами нуклеиновой кислоты, лигандами и другими соединениями согласно изобретению. Антитела, подходящие для использования в диагностических целях, могут быть получены способом, аналогичным способу, описанному выше для терапии. Диагностические анализы на присутствие полипептида осуществляют методами, предусматривающими использование антитела и метки для детекции полипептида в физиологических жидкостях, экстрактах клеток или тканей человека. При этом могут быть использованы модифицированные или немодифицированные антитела, и эти антитела могут быть помечены путем их ковалентного или нековалентного связывания с репортерной молекулой. Кроме того, могут быть использованы репортерные молекулы широкого ряда, известные специалистам, и некоторые из них описаны выше.

Количества полипептида, экспрессируемого у индивидуума, в контрольном образце и образце ткани, взятой при биопсии, сравнивают со стандартными величинами. Отклонение величин, полученных для данного индивидуума, от стандартных величин позволяет определить параметры для диагностики

заболевания. Диагностический анализ может быть проведен для выявления отсутствия, присутствия и избыточной экспрессии полипептида и для мониторинга регуляции уровней полипептида во время терапевтического лечения. Такие анализы могут быть также проведены для оценки эффективности конкретного курса терапевтического лечения при исследовании животных в клинических испытаниях или для наблюдения за процессом лечения отдельного пациента.

Диагностический набор согласно изобретению может содержать:

- (a) молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению;
- (b) полипептид согласно изобретению или
- (c) лиганд согласно изобретению.

В одном из аспектов настоящего изобретения диагностический набор может включать первый контейнер, содержащий нуклеиново-кислотный зонд, который гибридизуется в жестких условиях с молекулой нуклеиновой кислоты согласно изобретению; второй контейнер, содержащий праймеры, подходящие для амплификации молекулы нуклеиновой кислоты; и инструкции по использованию зонда и праймеров для облегчения диагностики заболевания. Этот набор может, кроме того, включать третий контейнер, содержащий агент для гидролиза негибризованной РНК.

В альтернативном аспекте настоящего изобретения диагностический набор может содержать массив молекул нуклеиновой кислоты, по меньшей мере одной из которых может быть молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению.

Для детекции полипептида согласно изобретению диагностический набор может содержать одно или несколько антител, связывающихся с полипептидом согласно изобретению, и реагент, используемый для детекции реакции связывания между антителом и полипептидом.

Указанные наборы могут быть использованы для диагностики заболевания или восприимчивости к заболеванию, в патогенезе которых участвуют белки, содержащие I-домен. Такими заболеваниями могут быть клеточно-пролиферативные расстройства, включая новообразования, меланому, опухоли легких, ободочной кишки, молочной железы, поджелудочной железы, головы и шеи и другие солидные опухоли; миелолифферативные расстройства, такие как лейкоз, неходжкинская лимфома, лейкопения, тромбоцитопения, нарушение ангиогенеза, саркома Капоши; аутоиммунные/воспалительные заболевания, включая аллергию, воспалительные заболевания кишечника, артрит, псориаз, воспаление дыхательных путей, астму и отторжение трансплантированных органов; сердечно-сосудистые заболевания, включая гипертензию, отеки, стенокардию, атеросклероз, тромбоз, сепсис, инсульт, реперфузионное поражение и ишемию; неврологические расстройства, включая заболевание центральной нервной системы, болезнь Альцгеймера, повреждения головного мозга, амиотрофический боковой склероз и боли; нарушения развития; метаболические расстройства, включая сахарный диабет, остеопороз и ожирение; СПИД и почечные заболевания; инфекции, включая вирусные инфекции, бактериальные инфекции, грибковые инфекции и паразитарные инфекции, и другие патологические состояния. Такими заболеваниями предпочтительно являются заболевания, в патогенезе которых участвуют белки, содержащие домен vWFA и/или ANT_IG. Примерами заболеваний, в которых участвуют белки, содержащие домен vWFA и/или ANT_IG, являются бактериальные инфекции, бактериальные интоксикации, сибирская язва, заболевания, ассоциированные с блокадой токсинов (например, бактериальных токсинов), рак, опухоль эндотелия, рак ободочной кишки, рак мочевого пузыря, рак пищевода, рак легких, меланома, ювенильный гиалиновый фиброматоз (ЮГФ), детский системный гиалиноз (ДСГ), болезнь фон Виллебранда, миопатия Бетлема, дистрофический буллезный эпидермолиз, тромбоз, модуляция агрегации, опосредуемой тромбоцитами, аутоиммунные заболевания и воспаления. Указанные наборы могут быть использованы также для диагностики репродуктивных расстройств, включая бесплодие.

Различные аспекты и варианты настоящего изобретения будут более подробно проиллюстрированы, например, в описании, в частности, относящемся к полипептидам экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и полипептидам INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144.

При этом следует отметить, что в настоящее изобретение могут быть внесены конкретные модификации, не выходящие за рамки объема изобретения.

Краткое описание графического материала

Фиг. 1. Десять лучших результатов поиска, полученных с помощью BLAST в неизбыточной базе данных NCBI с использованием последовательности SEQ ID NO:24 (полноразмерной последовательности белка INSP141).

Фиг. 2. Сопоставление путем выравнивания, проводимого с помощью BLAST с использованием последовательности SEQ ID NO:52 (полноразмерной последовательности белка INSP142) и пяти лучших совпадений.

Фиг. 3. Десять лучших результатов поиска, полученных с помощью BLAST в неизбыточной базе данных NCBI с использованием последовательности SEQ ID NO:90 (полноразмерной последовательности белка INSP143).

Фиг. 4. Десять лучших результатов поиска, полученных с помощью BLAST в неизбыточной базе данных NCBI с использованием последовательности SEQ ID NO:126 (полноразмерной последовательности белка INSP144).

Фиг. 5. Выравнивание кодирующих экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144.

Фиг. 6. Выравнивание OPC INSP141, INSP142, INSP143, INSP144; P259A в INSP142 затушеван.

Фиг. 7. Выравнивание нуклеотидов INSP141, INSP142, INSP143, INSP144: прописными буквами обозначена кодирующая последовательность; строчными буквами обозначены нетранслируемые области.

Фиг. 8. Схематическое представление предсказанных и клонированных последовательностей INSP141, INSP142, INSP143, INSP144, TMEM8 и CMG2.

Фиг. 9. Выравнивание аминокислот внеклеточных доменов vWFA и ANT_{IG} в INSP141, INSP142, INSP143, INSP144, TMEM8 и CMG2. Идентичные остатки отмечены звездочкой. Присвоение вторичной структуры может быть осуществлено исходя из данных Lacy et al. PNAS. Vol. 101. № 17. p. 6367-6372. Пять остатков мотива MIDAS каждого белка затушеваны. ATR1_HUMAN: NCBI Acc. № q9h6x2. ATR2_HUMAN: NCBI Acc. № P58335.

Таблица 1

Аминокислота	Синонимичные группы	Более предпочтительные синонимичные группы
Ser	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Arg	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Leu	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Pro	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Pro
Thr	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala, Ser	Gly, Ala
Val	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	Gly, Ala
Ile	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Phe	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys	Cys
His	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Gln	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Asn	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Lys	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Asp	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Glu	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp, Phe, Tyr	Trp

Таблица 2

Аминокислота	Синонимичные группы
Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, алло-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Arg	D-Arg, Lys, D-Lys, гомо-Arg, D-гомо-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Leu	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Pro	D-Pro, L-I-тиазолидин-4-карбоновая кислота, D- или L-1-оксазолидин-4-карбоновая кислота
Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, алло-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Ala	D-Ala, Gly, Aib, B-Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
Val	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG
Gly	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, бета-Ala, Acp
Ile	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Phe	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-допа, His, D-His, Trp, D-Trp, транс-3,4- или 5-фенилпролин, AdaA, AdaG, цис-3,4- или 5-фенилпролин, Бра, D-Бра
Tyr	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-допа, His, D-His
Cys	D-Cys, S--Me--Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Gln	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Asn	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Lys	D-Lys, Arg, D-Arg, гомо-Arg, D-гомо-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Asp	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Glu	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Met	D-Met, S--Me--Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val

Примеры

Пример 1. INSP141.

Полипептидной последовательностью, выведенной в результате объединения последовательностей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, является последовательность SEQ ID NO:24, которая представляет собой продукт трансляции смежных экзонов INSP141. Эта полипептидная последовательность была использована в качестве запрашиваемой последовательности для BLASTp в неизбыточной базе данных NCBI. Десять наилучших соответствий показаны на фиг. 1. Как можно видеть на фиг. 1, INSP141 является гомологичным белку-предшественнику рецептора токсина сибирской язвы.

Пример 2. INSP142.

Полипептидной последовательностью, выведенной в результате объединения последовательностей SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, является последовательность SEQ ID NO:52, которая представляет собой продукт трансляции смежных экзонов INSP142. Эта полипептидная последовательность была использована в качестве запрашиваемой последовательности для BLASTp в неизбыточной базе данных NCBI. Десять наилучших соответствий показаны на фиг. 2. Как можно видеть на фиг. 2, INSP141 является гомологичным белку-предшественнику рецептора токсина сибирской язвы.

Пример 3. INSP143.

Полипептидной последовательностью, выведенной в результате объединения последовательностей SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, является последовательность SEQ ID NO:90, которая представляет собой продукт трансляции смежных экзонов INSP143. Эта полипептидная последовательность была использована в качестве запрашиваемой последовательности для BLASTp из неизбыточной базы данных NCBI. Десять наилучших соответствий показаны на фиг. 3. Как можно видеть на фиг. 3, INSP143 является гомологичным белку-предшественнику рецептора токсина сибирской язвы.

Пример 4. INSP144.

Полипептидной последовательностью, выведенной в результате объединения последовательностей SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, является последовательность SEQ ID NO:126, которая представляет собой продукт трансляции смежных экзонов INSP144. Эта полипептидная последовательность была использована в качестве запрашиваемой последовательности для BLASTp из избыточной базы данных NCBI. Десять наилучших соответствий показаны на фиг. 4. Как можно видеть на фиг. 4, INSP144 является гомологичным белку-предшественнику рецептора токсина сибирской язвы.

Пример 5. Сигнальная последовательность.

Было предсказано, что все INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 имеют сигнальный пептид, расположенный в начале белка. Сигнальная последовательность, как показано на фиг. 6, охватывает аминокислоты 1-27 (т.е. MGSHESLGPYFLVFLLLLLLPPPLFRA (SEQ ID NO:152)) полипептидной последовательности INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144. Сайт отщепления сигнального пептида локализован между остатками 27 и 28 полипептидной последовательности INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144.

Пример 6. Предсказания наличия трансмембранных областей.

Было предсказано, что INSP141 и INSP142 представляют собой секретируемые белки, не содержащие трансмембранных областей (фиг. 6 и 7).

Было предсказано, что INSP143 и INSP144 содержат трансмембранную область (фиг. 6 и 7). В обоих INSP143 и INSP144, N-конец является внеклеточным, а С-конец является внутриклеточным.

INSP141 и INSP142, представляющие собой растворимые изоформы, могут модулировать функцию интегральных изоформ INSP143 и INSP144.

Пример 7. Результаты клонирования INSP141, INSP142 и INSP143-EC.

INSP141, INSP142, INSP143, INSP144 представляют собой семейство вариантов сплайсинга рецептороподобной последовательности токсина сибирской язвы, который, как было предсказано, содержит домен vWF-I/A. Все последовательности являются полноразмерными и содержат предсказанный сигнальный пептид.

INSP141, как было предсказано, имеет OPC для 306 аминокислот (918 п.н.), кодируемых 11 экзонами. INSP142, как было предсказано, имеет OPC для 352 аминокислот (1056 п.н.), кодируемых 13 экзонами. INSP143, как было предсказано, имеет OPC для 608 аминокислот (1824 п.н.), кодируемых 18 экзонами. INSP144, как было предсказано, имеет OPC для 631 аминокислоты (1893 п.н.), кодируемых 17 экзонами.

Было предсказано, что INSP141 и INSP142 представляют собой секретируемые белки. Было предсказано, что INSP143 и INSP144 представляют собой трансмембранные белки типа I. Клонированный внеклеточный домен INSP143 идентичен внеклеточному домену INSP144. Диаграмма выравнивания экзонов различных последовательностей представлена на фиг. 5. Выравнивание аминокислотных последовательностей OPC и клонированных последовательностей проиллюстрировано на фиг. 6. Выравнивание предсказанных нуклеотидных последовательностей проиллюстрировано на фиг. 7.

7.1. Получение человеческих матричных кДНК.

кДНК первой цепи получали из различных РНК-образцов для всех нормальных человеческих тканей (которые могут быть закуплены у фирм Clontech, Stratagene, Ambion, Biochain Institute и получены в лаборатории) с использованием такого фермента, обратная транскриптаза, обладающая активностью РНКазы H⁻, Superscript II (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителей. В 1,5-мл пробирке Эппендорфа получали раствор, содержащий oligo-(dT)₁₅-праймер (1 мкл при 500 мкг/мл) (Promega), 2 мкг человеческой полноразмерной РНК, 1 мкл 10 мМ смеси dNTP (10 мМ каждого из dATP, dGTP, dCTP и dTTP при нейтральном pH), и стерильную дистиллированную воду, добавленную до конечного объема 12 мкл.

Затем раствор нагревали до 65°C в течение 5 мин и охлаждали на льду. Содержимое пробирки собирали путем быстрого центрифугирования и добавляли 4 мкл 5X буфера для первой цепи, 2 мкл 0,1 М DTT и 1 мкл ингибитора рекомбинантной рибонуклеазы RnaseOUT (40 единиц/мкл, Invitrogen). После этого содержимое пробирки осторожно смешивали и инкубировали при 42°C в течение 2 мин, а затем добавляли 1 мкл (200 единиц) фермента Superscript II и смесь осторожно перемешивали путем пипетирования. Смесь инкубировали при 42°C в течение 50 мин, а затем инактивировали путем нагревания при 70°C в течение 15 мин. Для удаления РНК, комплементарной кДНК, добавляли 1 мкл (2 единицы) РНКазы H E.coli (Invitrogen) и реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 20 мин. Конечную реакционную смесь (21 мкл) разводили путем добавления 179 мкл стерильной воды до общего объема 200 мкл. Матричную кДНК, используемую для амплификации INSP141-INSP144, выделяли из РНК-ячечек.

7.2. Библиотеки кДНК.

Библиотеки человеческих кДНК (в векторах бактериофага лямбда (λ)) закупали у фирмы Stratagene или Clontech либо приготавливали в векторах λ ZAP или λ GT10 в Институте Serono Pharmaceutical Research Institute в соответствии с протоколом производителей (Stratagene). ДНК бактериофага λ получали из лабораторных культур инфицированного штамма хозяина E.coli с использованием системы очистки ДНК Wizard Lambda Preps в соответствии с инструкциями производителей (Promega, Corporation, Madison WI). Библиотеки матричных кДНК, используемые для амплификации INSP141-INSP144, представляют собой библиотеки, выделенные из яичек, и смешанную библиотеку, выделенную из головного мозга-легких-яичек.

7.3. Геноспецифические клонирующие праймеры для ПЦР.

Пары ПЦР-праймеров, имеющих длину в 18-25 нуклеотидов, конструировали для амплификации предсказанной кодирующей последовательности фактической кДНК с использованием компьютерной программы для конструирования праймеров Primer Designer Software (Scientific & Educational Software, PO Box 72045, Durham, NC 27722-2045, USA). ПЦР-праймеры были оптимизированы так, чтобы их T_m была близкой к $55 \pm 10^\circ\text{C}$, а содержание GC составляло 40-60%. Были отобраны праймеры, обладающие высокой селективностью к последовательности-мишени (INSP141), при этом неспецифическое праймирование было незначительным или вообще отсутствовало.

7.4. ПЦР-амплификация семейства INSP141-INSP144 из человеческих матричных кДНК.

Геноспецифические клонирующие праймеры (INSP141-CP1 и INSP141-CP2, табл. 3 и фиг. 7) конструировали для амплификации кДНК-фрагмента размером 985 п.н., который охватывал все предсказанные кодирующие последовательности INSP141. Указанную пару праймеров использовали вместе с образцами кДНК человеческих яичек и библиотек кДНК в качестве ПЦР-матриц. ПЦР проводили в конечном объеме 50 мкл, содержащем 1X буфер High Fidelity (HiFi) Platinum® Taq, 2 mM MgSO_4 , 200 мкМ dNTP, 0,2 мкМ каждого клонирующего праймера, 1 единицу ДНК-полимеразы High Fidelity (HiFi) Platinum® Taq (Invitrogen), приблизительно 20 нг матричной кДНК и 0X или 1X раствора для стимуляции ПЦР (Invitrogen).

ПЦР проводили на аппарате MJ Research DNA Engine, запрограммированном в следующем режиме: 94°C , 2 мин; 40 циклов при 94°C , 30 с, 57°C , 30 с и 68°C , 1 мин 30 с, а затем 1 цикл при 68°C в течение 8 мин и цикл выдерживания при 4°C .

30 мкл каждого продукта амплификации визуализировали на 0,8% агарозном геле в 1X TAE-буфере (Invitrogen). В ПЦР-продуктах, амплифицированных из библиотеки матричных кДНК яичек, наблюдались продукты, имеющие приблизительно предполагаемую молекулярную массу. Эти продукты выделяли из геля с использованием системы для очистки ДНК Qiagen, MinElute DNA Purification System (Qiagen), элюировали в 10 мкл EB-буфера (10 mM Трис-HCl, pH 8,5) и сразу субклонировали.

7.5. Субклонирование ПЦР-продуктов.

ПЦР-продукты субклонировали в клонирующий вектор, модифицированный топоизомеразой I (pCR4-TOPO), с использованием набора для клонирования ТА, поставляемого фирмой Invitrogen Corporation, в условиях, рекомендованных производителями. Вкратце, 4 мкл гельочищенного ПЦР-продукта инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре с 1 мкл вектора TOPO и 1 мкл солевого раствора. Затем штамм TOP10 E.coli (Invitrogen) трансформировали реакционной смесью следующим образом: 50-мкл аликвоту однократной дозы клеток TOP10 оттаивали на льду и добавляли 2 мкл реакционной смеси TOPO. После этого смесь инкубировали в течение 15 мин на льду, а затем подвергали тепловому шоку путем инкубирования при 42°C строго в течение 30 с. Образцы возвращали на лед и добавляли 250 мкл теплой (комнатной температуры) среды SOC. Образцы инкубировали при встряхивании (220 об/мин) в течение 1 ч при 37°C . Затем трансформированную смесь высевали на планшеты с L-бульоном (LB), содержащим ампициллин (100 мкг/мл), и инкубировали в течение ночи при 37°C .

7.6. Получение и секвенирование плазмидной ДНК.

Ряд колоний инокулировали в 5 мл L-бульона (LB), содержащего ампициллин (100 мкг/мл), и культивировали в течение ночи при 37°C со встряхиванием при 220 об/мин. Мини-препарат плазмидной ДНК получали из 5 мл культуры с использованием роботизированной системы Biorobot 8000 (Qiagen) или набора Wizard Plus SV Minipreps (Promega cat. № 1460) в соответствии с инструкциями производителя. Плазмидную ДНК элюировали в 80 мкл стерильной воды. Концентрацию ДНК измеряли на фотометре Spectramax 190 (Molecular Devices). Плазмидную ДНК (200-500 нг) подвергали секвенированию с помощью праймера T3 с использованием системы терминации цепи красителем BigDye (BigDye-Terminator) (Applied Biosystems cat. № 4390246) в соответствии с инструкциями производителей. Последовательность праймера представлена в табл. 3. Реакционные смеси для секвенирования очищали на колонках с Dye-Ex (Qiagen) или на планшетах для очистки Montage SEQ 96 (Millipore cat. № LSKS09624), а затем анализировали на секвенаторе Applied Biosystems 3700.

Анализ последовательности выявил клон, который соответствовал ожидаемой последовательности INSP142 в амплифицированной области. Выравнивание нуклеотидных последовательностей INSP141, INSP142 и INSP143 проиллюстрировано на фиг. 7. Указанная последовательность содержала замену P259A, которая, вероятно, является следствием ошибки ПЦР. Эта последовательность (1035 п.н.) не была полноразмерной кодирующей последовательностью INSP142, что обусловлено положениями ПЦР-праймеров. Последовательность клонированного кДНК-фрагмента представлена на фиг. 7. Клонированный ПЦР-продукт находится в плазмиде pCR4-TOPO-INSP142 (усеченной).

7.7. Конструирование кодирующих последовательностей INSP141 и внеклеточного домена INSP143 (EC) с помощью ПЦР.

Пара праймеров для ПЦР-амплификации (INS141-AP1 и INSP141-AP2, табл. 3 и фиг. 7) была сконструирована для повторной амплификации части последовательности INSP142, клонированной в плазмиде pCR4-TOPO-INSP142 (усеченной), которая является общей для кодирующих последовательностей INSP141 и INSP142, и одновременного добавления самых крайних 3'-концевых INSP141-специфических 23 п.н. к 3'-концу данного продукта. Был также сконструирован дополнительный ПЦР-праймер (INSP143-AP1, табл. 3 и фиг. 7) для использования вместе с INSP141-AP1 в целях повторной амплификации части последовательности INSP142, клонированной в плазмиде pCR4-TOPO-INSP142 (усеченной) и являющейся общей для кодирующих последовательностей INSP143 и INSP142, и одновременного добавления самых крайних 3'-концевых INSP143-специфических 21 п.н. к 3'-концу данного продукта. Пары праймеров INSP141-AP1/INSP141-AP2 и INSP141-AP1/INSP143-AP1 использовали вместе с плазмидой pCR4-TOPO-INSP142 (усеченной) в качестве ПЦР-матрицы в конечном объеме 50 мкл, содержащем 1X буфер High Fidelity (HiFi) Platinum® Taq, 2 mM MgSO₄, 200 мкМ dNTP, 0,2 мкМ каждого праймера для амплификации, 1 единицу ДНК-полимеразы High Fidelity (HiFi) Platinum® Taq (Invitrogen), приблизительно 300 нг плазмидной кДНК и 0X, 0,5X, 1X или 2X раствора для стимуляции ПЦР (Invitrogen).

ПЦР проводили на аппарате MJ Research DNA Engine, запрограммированном в следующем режиме: 94°C, 2 мин; 30 циклов - 94°C, 30 с, 68°C, 1 мин 30 с, а затем 1 цикл при 68°C в течение 7 мин и цикл выдерживания при 4°C.

Все 50 мкл каждого продукта для амплификации визуализировали на 0,8% агарозном геле в 1X TAE-буфере (Invitrogen). Продукты, имеющие приблизительно предполагаемую молекулярную массу, выделяли из геля с использованием системы для очистки ДНК Promega Wizard® PCR Preps DNA Purification System, элюировали в 50 мкл воды и сразу субклонировали.

Таблица 3

Клонирующие и секвенирующие праймеры для доменов
INSP141, INSP142 и INSP143-EC

Праймер	Последовательность (5' - 3')
INSP141-CP1	GTC ACA GGG ACA GCC AGA TA (SEQ ID NO: 153)
INSP141-CP2	GCT GGT GAT GCT GAC ATT GC (SEQ ID NO: 154)
INSP141-AP1	ATG GGG AGC CAT GAG TCC CTG GGG CCC TAC TTC CTG (SEQ ID NO: 155)
INSP141-AP2	AGC TGA CTT CAA TAG AGT ACT CCC AAT GAT AGT GCT TTC ATT GAA GA (SEQ ID NO: 156)
INSP143-AP1	GCG GAA AAT GCC ACA TGT GGT GCT GGT GAT GCT GAC ATT GCT CTT G (SEQ ID NO: 157)
21M13	TGT AAA ACG ACG GCC AGT (SEQ ID NO: 158)
M13REV	CAG GAA ACA GCT ATG ACC (SEQ ID NO: 159)
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G (SEQ ID NO: 160)
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG (SEQ ID NO: 161)

7.8. Субклонирование ПЦР-продуктов.

ПЦР-продукты субклонировали в клонирующий вектор, модифицированный топоизомеразой I (pCR4-TOPO), с использованием набора для клонирования TA, поставляемого фирмой Invitrogen Corporation, в условиях, рекомендованных производителями. Вкратце, 4 мкл гельочищенного ПЦР-продукта инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре с 1 мкл вектора TOPO и 1 мкл солевого раствора. Затем штамм TOP10 E.coli (Invitrogen) трансформировали реакционной смесью следующим образом: 50-мкл аликвоту однократной дозы клеток TOP10 оттаивали на льду и добавляли 2 мкл реакционной смеси TOPO. После этого смесь инкубировали в течение 15 мин на льду, а затем подвергали тепловому шоку путем инкубирования при 42°C строго в течение 30 с. Образцы возвращали на лед и добавляли 250 мкл теплой (комнатной температуры) среды SOC. Образцы инкубировали при встряхивании (220 об/мин) в течение 1 ч при 37°C. Затем трансформированную смесь высевали на планшеты с

L-бульоном (LB), содержащим ампициллин (100 мкг/мл), и инкубировали в течение ночи при 37°C.

7.9. ПЦР колоний.

Колонии инокулировали в 50 мкл стерильной воды с помощью стерильной зубочистки. Затем 10-мкл аликвоту инокулята подвергали ПЦР в полном объеме реакционной смеси 20 мкл, содержащем 1X буфер AmpliTaq™, 200 мкМ dNTP, 20 пмоль праймера T7, 20 пмоль праймера T3 и 1 единицу AmpliTaq™ (Applied Biosystems) на аппарате MJ Research DNA Engine.

Циклы ПЦР-реакции осуществляли в следующем режиме: 94°C, 2 мин, 30 циклов при 94°C, 30 с, 48°C, 30 с и 72°C в течение 2 мин. Затем образцы оставляли при 4°C (цикл выдерживания) до проведения последующего анализа.

ПЦР-продукты анализировали на 1% агарозном геле в 1X TAE-буфере. Колонии, которые давали ПЦР-продукты, имеющие приблизительно ожидаемую молекулярную массу (918 п.н. для INSP141 или 1056 п.н. для INSP143 + 105 п.н., т.е. с учетом сайта множественного клонирования (MCS)), культивировали в течение ночи при 37°C в 5 мл L-бульона (LB), содержащего ампициллин (100 мкг/мл), со встряхиванием при 220 об/мин.

7.10. Получение и секвенирование плазмидной ДНК.

Мини-препарат плазмидной ДНК выделяли из 5 мл культуры с использованием роботизированной системы Biorobot 8000 (Qiagen) или набора Wizard Plus SV Minipreps (Promega cat. № 1460) в соответствии с инструкциями производителя. Плазмидную ДНК элюировали в 80 мкл стерильной воды. Концентрацию ДНК измеряли на фотометре Spectramax 190 (Molecular Devices). Плазмидную ДНК (200-500 нг) подвергали секвенированию с помощью праймеров T3 с использованием системы термации цепи красителем BigDye (BigDye-Terminator) (Applied Biosystems cat. № 4390246) в соответствии с инструкциями производителей. Последовательность праймера представлена в табл. 3. Реакционные смеси для секвенирования очищали на колонках с Dye-Ex (Qiagen) или на планшетах для очистки Montage SEQ 96 (Millipore cat. № LSKS09624), а затем анализировали на секвенаторе Applied Biosystems 3700.

Анализ последовательности выявил клон, который соответствовал ожидаемой кодирующей последовательности INSP141. Указанная последовательность содержала замену P259A, которая присутствовала в ПЦР-матрице. Последовательность клонированного кДНК-фрагмента представлена на фиг. 7. Плазмидная карта клонированного ПЦР-продукта представляет собой pCR4-TOPO-INSP141. Был идентифицирован второй клон, который соответствовал ожидаемой кодирующей последовательности домена INSP143-EC. Указанная последовательность также содержала замену P259A, которая присутствовала в ПЦР-матрице. Последовательность клонированного кДНК-фрагмента представлена на фиг. 7. Плазмидная карта клонированного ПЦР-продукта представляет собой pCR4-TOPO-INSP143-EC.

Пример 8. Экспрессия и очистка INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144.

Могут быть проведены дополнительные эксперименты для того, чтобы определить распределение и уровни экспрессии полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 в тканях *in vivo*, исходя из описанных здесь нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Присутствие транскриптов для INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 может быть установлено с помощью ПЦР кДНК различных человеческих тканей. Транскрипты INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 могут присутствовать в тестируемых образцах на очень низких уровнях. Поэтому при разработке экспериментов для детектирования присутствия транскрипта в различных человеческих тканях необходимо соблюдать крайнюю осторожность, поскольку даже небольшое количество геномных примесных включений в РНК-препарате может давать ложноположительный результат. Таким образом, перед проведением реакции обратной транскрипции вся РНК должна быть обработана ДНКазой. Кроме того, для каждой ткани может быть проведена контрольная реакция, в которой указанная ткань не подвергается обратной транскрипции (контроль без ОТ).

Так, например, для генерирования кДНК с использованием обратной транскриптазы Multiscript (ABI) и неспецифических гексамерных праймеров может быть взят 1 мкг полноразмерной РНК от каждой ткани. Для каждой ткани проводили контрольную реакцию, в которую добавляли все компоненты, за исключением обратной транскриптазы (контроль без ОТ). Для каждой ткани проводили ПЦР-реакции на образцах обратно транскрибируемой РНК и контрольные реакции без ОТ. INSP141-, INSP142-, INSP143- и INSP144-специфические праймеры могут быть легко сконструированы исходя из полученных здесь данных о последовательностях. Присутствие продукта с соответствующей молекулярной массой в образце с обратной транскриптазой, а также отсутствие продукта в контрольном образце без ОТ могут свидетельствовать о присутствии транскрипта в этой ткани. Для скрининга на транскрипты INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 могут быть использованы не только вышеописанные библиотеки, но также и любые подходящие библиотеки кДНК.

Характер распределения полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 в ткани дает дополнительную ценную информацию о функции этих полипептидов.

Кроме того, могут быть проведены дополнительные эксперименты с использованием подходящих экспрессирующих векторов. Так, например, Gateway-экспрессирующие клоны pDEST12.2_INSP141-6HIS-V1 и pEAK12d_INSP141-6HIS-V1 были генерированы для INSP141. Последние 23 п.н. клонирую-

шего праймера Rev присоединяли к 3'-концу кодирующих последовательностей INSP141 на предварительно амплифицированной последовательности (которой является альтернативный вариант сплайсинга). Плазмида ENTRY представляет собой pENTR_INSP141-6HIS-V1. Gateway-экспрессирующие клоны pEAK12d_INSP143-EC-6HIS-V1 и pDEST12d_INSP143-EC-6HIS-V1 были генерированы для INSP143-EC. Последние 21 п.н. клонирующего праймера Rev присоединяли к 3'-концу кодирующих последовательностей INSP143 на предварительно амплифицированной последовательности (которой является альтернативный вариант сплайсинга). INSP143 и INSP144 имеют общую клонированную внеклеточную область (INSP153-EC=INSP154-EC). Плазмида Entry представляет собой pDONR-Zeo_INSP143-EC-6HIS-V1.

Трансфекция клеточных линий млекопитающих этими векторами может обеспечивать высокий уровень экспрессии белков INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 и, таким образом, позволяет продолжить исследование функциональных свойств полипептидов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144. Подходящие примеры материалов и методов, применяемых в таких экспериментах, описаны ниже.

Клеточная культура.

Клетки почек человеческого эмбриона 293, экспрессирующие ядерный антиген вируса Эпштейна-Барра (HEK 293-EBNA, Invitrogen), поддерживали в суспензии бессывороточной среды Ex-клеток VPRO (посевной материал, поддерживающая среда, JRH). За 16-20 ч до трансфекции (день 1), клетки высевали в 2× T225-колбы (50 мл на колбу в DMEM/F12 (1:1), содержащей посевную среду с 2% FBS (JRH) при плотности 2×10^5 клеток/мл). На следующий день (день трансфекции 0) проводили трансфекцию с использованием реагента JetPEITM (2 мкл/мкг плазмидной ДНК, PolyPlus-трансфекция). Для каждой колбы плазмидную ДНК трансфецировали вместе с ДНК GFP (флуоресцентного репортерного гена). Затем смесь для трансфекции добавляли в 2× T225-колбы и инкубировали при 37°C (5% CO₂) в течение 6 дней. Подтверждение позитивной трансфекции может быть проведено путем качественной оценки флуоресценции на день 1 и день 6 (Axiovert 10 Zeiss).

На 6-й день (день сбора) супернатанты из двух колб объединяли и центрифугировали (например, при 4°C, 400×g), а затем помещали в сосуд, содержащий уникальный идентификатор. Одну аликвоту (500 мкл) брали для проведения качественной оценки (QC) для 6His-меченного белка (QC внутреннего биопроцессинга).

Крупные партии могут быть продуцированы в соответствии с протоколом, называемым "PEI-трансфекция суспензионных клеток" и обозначенным BP/PEI/HH/02/04, где в качестве агента для трансфекции использовали полиэтиленмин от Polysciences.

Способ очистки.

Образец культуральной среды, содержащий рекомбинантный белок с С-концевой 6His-меткой, развели холодным буфером А (50 мМ NaH₂PO₄; 600 мМ NaCl; 8,7% (мас./об.) глицерина, pH 7,5).

Затем образец фильтровали через стерильный фильтр (Millipore) и выдерживали при 4°C в стерильном сосуде среднего размера (Nalgene).

Очистку осуществляли при 4°C на рабочей станции VISION (Applied Biosystems), подсоединенной к автоматическому устройству для загрузки образцов (Labomatic). Процедура очистки состояла из двух последовательных стадий, т.е. стадии проведения металлоаффинной хроматографии на колонке с Poros 20 MC (Applied Biosystems), загруженной ионами Ni (4,6×50 мм, 0,83 мл), а затем гель-фильтрации на колонке (1,0×10 см) со средой, содержащей сефадекс G-25 (Amersham Pharmacia).

Для проведения первой стадии хроматографии металлоаффинную колонку регенерировали 30 колоночными объемами раствора EDTA (100 мМ EDTA; 1М NaCl; pH 8,0), снова загружали ионы Ni путем промывки 15 колоночными объемами 100 мМ раствора NiSO₄, после чего колонку промывали 10 колоночными объемами буфера А, а затем 7 колоночными объемами буфера В (50 мМ NaH₂PO₄; 600 мМ NaCl; 8,7% (мас./об.) глицерина, 400 мМ имидазола; pH 7,5) и, наконец, уравнивали 15 колоночными объемами буфера А, содержащего 15 мМ имидазола. Образец переносили с помощью устройства для загрузки образцов Labomatic в 200-мл петлю для образца, а затем загружали на аффинную колонку с металлическим Ni при скорости потока 10 мл/мин. После этого колонку промывали 12 колоночными объемами буфера А, а затем 28 колоночными объемами буфера А, содержащего 20 мМ имидазола. Во время промывки 20 мМ имидазолом, непрочно связанные примесные белки элюировались с колонки. И, наконец, рекомбинантный His-меченный белок элюировали 10 колоночными объемами буфера В при скорости потока 2 мл/мин и элюированный белок собирали.

Для проведения второй стадии хроматографии гель-фильтрационную колонку с сефадексом G-25 регенерировали 2 мл буфера D (1,137 М NaCl; 2,7 мМ KCl; 1,5 мМ KH₂PO₄; 8 мМ Na₂HPO₄; pH 7,2), а затем уравнивали 4 колоночными объемами буфера С (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl; 1,5 мМ KH₂PO₄; 8 мМ Na₂HPO₄; 20% (мас./об.) глицерина; pH 7,4). Фракцию пика, элюированную с Ni-колонки, автоматически загружали на колонку с сефадексом G-25 с помощью многофункционального устройства для загрузки образцов, подсоединенного к аппарату VISION, и белок элюировали буфером С при скорости потока 2 мл/мин. Эту фракцию фильтровали через стерильный центрифужный фильтр (Millipore), замораживали и хранили при -80°C. Аликвоту данного образца анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ (в 4-12% геле NuPAGE; Novex) путем проведения Вестерн-блоттинга с использованием ан-

ти-His антител. Гель NuPAGE может быть окрашен в растворе для окрашивания, содержащем 0,1% ку-масси синего R250 (30% метанол, 10% уксусная кислота), при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем обесцвечивали в 20% метаноле, 7,5% уксусной кислоте до тех пор, пока фон не становился прозрачным, а полосы белка не становились видимыми.

После электрофореза белки подвергали электрофоретическому переносу из геля на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану блокировали 5% сухим молоком в буфере E (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 8 mM Na_2HPO_4 ; 0,1% твина 20, pH 7,4) в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем инкубировали со смесью 2 кроличьих поликлональных анти-His антител (G-18 и H-15, 0,2 мкг/мл каждого; Santa Cruz) в 2,5% сухом молоке в буфере E в течение ночи при 4°C. После инкубирования в течение еще 1 ч при комнатной температуре мембрану промывали буфером E (3×10 мин), а затем инкубировали со "вторым" ПХ-конъюгированным антикроличьим антителом (DAKO, HRP 0399), разведенным 1/3000 в буфере E, содержащем 2,5% сухое молоко, в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывки буфером E (3×10 мин) мембрану проявляли в течение 1 мин с помощью ЭХЛ-набора (Amersham, Pharmacia). Затем мембрану экспонировали с пленкой Hyperfilm (Amersham Pharmacia), пленку проявляли и снимок вестерн-блота визуально анализировали.

В образцах, в которых были обнаружены полосы детектируемого белка благодаря окрашиванию кумасси синим, концентрация белка может быть определена с применением набора для анализа белка BCA (Pierce) с использованием сывороточного альбумина в качестве стандарта.

Кроме того, сверхэкспрессия или отсутствие экспрессии полипептидов в клеточных линиях могут быть использованы для определения влияния на активацию транскрипции генома клетки-хозяина. Партнеры по димеризации, коактиваторы и корепрессоры полипептида INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144 могут быть идентифицированы путем иммунопреципитации, проводимой вместе с Вестерн-блоттингом, и иммунопреципитации, проводимой вместе с масс-спектроскопией.

Пример 9. Анализы для оценки Т-лимфоцитарных ответов.

Гибель Т-клеток, индуцированная Fas-лигандом.

Этот анализ позволяет выявить новые модуляторы опосредуемой рецепторами клеточной гибели.

В этом анализе Т-клеточный апоптоз был индуцирован путем стимуляции клеток Jurkat (человеческой Т-клеточной линии) рекомбинантным 6His-меченным Fas-лигандом, объединенным с моноклональным анти-6-his антителом. Гибель клеток количественно оценивали по высвобождению LDH, цитоплазматического фермента, высвобождаемого в культуральную среду при гибели клеток. Результаты считывали с помощью колориметрического анализа при 490 нм. Было показано, что Т-клетки являются патогенными при многих аутоиммунных заболеваниях, а поэтому регуляция антигенспецифической гибели Т-клеток представляет собой терапевтическую стратегию (например, применяемую для лечения пациентов с болезнью Крона с использованием анти-TNF- α антитела).

Реакция человеческих лимфоцитов в смешанной культуре (h-MLR): пролиферация клеток и секреция цитокинов.

В этом клеточном анализе измеряли влияние новых белков на пролиферацию лимфоцитов и секрецию или ингибирование цитокинов после стимуляции МКПК, взятыми от другого донора (аллореактивность). В этих анализах оценивали функции антигенспецифических Т-клеток и антигенпрезентирующих клеток, которые играют важную роль в клеточных ответах при любых аутоиммунных заболеваниях. Секретированные цитокины (IL-2, 4, 5, 10, TNF- α и IFN- γ) количественно оценивали с помощью СВА.

Примечание. Пролиферация клеток и секреция цитокинов представляют собой независимые ответы.

Реакция мышиных лимфоцитов в смешанной культуре (m-MLR): пролиферация клеток.

В этом клеточном анализе оценивали влияние новых белков на пролиферацию лимфоцитов или ингибирование мышиных клеток селезенки после стимуляции клетками селезенки, взятыми от другого донора (мышиного штамма). В этом клеточном анализе оценивали влияние новых белков на Т-лимфоцитарные ответы и антигенпрезентирующие клеточные ответы и полученные данные использовали для подтверждения положительных результатов и идентичных соответствий в h-MLR-анализах. Этот анализ может быть использован для отбора белков, которые тестируют на мышиной модели человеческих заболеваний.

Человеческие МКПК, стимулированные суперантигеном, TSST.

Суперантигены представляют собой сильные модуляторы иммунной системы, влияющие на Т-клетки. Суперантигены влияют на иммунологически опосредуемые расстройства, такие как ВЗК, и воспалительные кожные заболевания, такие как атопический дерматит и псориаз. В этом клеточном анализе исследование, проводимое авторами настоящего изобретения, было конкретно направлено на активацию Т-лимфоцитов посредством TCR, но в других условиях, отличающихся условий продуцирования Т-клеточного ответа на классические антигены, в частности, на костимулирующие молекулы.

Человеческие МКПК, стимулированные conA или РНА.

В этих клеточных анализах оценивали влияние новых белков на секрецию цитокинов, индуцируемую двумя различными раздражителями, действующими на различные клетки, как было определено в анализе, проводимом с использованием массива сфер с цитокинами (СВА) (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-5, IL-4 и IL-10).

Большинство цитокинов могут обладать двойным действием, про- или противовоспалительным действием, в зависимости от повреждения, среды и типа клетки-мишени. Любой белок, обладающий способностью модулировать секрецию цитокинов, может обладать терапевтическим потенциалом (например, снижение уровня IFN- γ и TNF- α может оказаться благоприятным при лечении Th1-опосредуемого аутоиммунного заболевания, тогда как снижение уровня IL-4, IL-5, может оказаться благоприятным при лечении Th2-опосредуемых заболеваний, а индуцирование IL-10 может представлять особый интерес при лечении РС и СКВ).

Анализы для оценки моноцитарного/макрофагального и гранулоцитарного ответов.

Человеческие МКПК, стимулированные ЛПС.

В этом клеточном анализе оценивали влияние новых белков на секрецию цитокинов (IFN- γ , TNF- α), индуцированных действием ЛПС на моноциты/макрофаги и гранулоциты.

Любой белок, обладающий способностью модулировать секрецию IFN- γ и TNF- α , может давать благоприятный эффект при лечении Th1-опосредуемых аутоиммунных заболеваний.

Анализы для оценки нейтрофильных ответов.

Нейтрофилы играют важную роль в патогенезе воспалительных и аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит. Хемоаттрактанты лейкоцитов, такие как IL-8, инициируют каскад реакций адгезивных взаимодействий между клетками и микрососудистым эндотелием, что приводит к активации, адгезии и, в конечном счете, к миграции нейтрофилов. Инфильтрация нейтрофилов в ткань зависит от реорганизации элементов цитоскелета, ассоциированных с конкретными изменениями морфологии этих клеток.

Этот клеточный анализ проводят для измерения влияния новых белков на реорганизацию человеческих нейтрофилов в цитоскелете.

Анализы для оценки В-лимфоцитарных ответов.

Считается, что аутоантитела, а также инфильтрация В-клеток играют важную роль в патогенезе различных аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка (СКВ), ревматоидный артрит (РА), синдром Сьегрена и тяжелая миастения. Полученные уникальные данные показали, что нарушение регуляции гомеостаза В-клеток может негативно влиять на иммунотолерантность, что может приводить тем самым к нежелательному выживанию аутореактивных В-клеток, продуцирующих патогенные антитела и поддерживающих воспалительные процессы. Идентификация новых факторов, которые играют важную роль в регуляции пролиферации, выживании и дифференцировки В-клеток после стимуляции В-клеточного рецептора, имеет важное значение при разработке новых способов лечения.

Пролиферация В-клеток.

В этом клеточном анализе оценивали влияние новых белков на выживание В-клеток.

Костимуляция В-клеток.

В этом клеточном анализе оценивали влияние новых белков на костимуляцию В-клеток.

Анализы для оценки моноцитарных и микроглиальных ответов.

Поток кальция в THP-1.

Поток Ca^{2+} в THP-1-клеточном анализе измеряют для оценки влияния новых белков на их способность стимулировать высвобождение внутриклеточного кальция (общие события продуцирования вторичного мессенджера) из эндоплазматического ретикула.

Пролиферация микроглиальных клеток.

Известно, что в процессе пролиферации предшественников микроглиальных клеток ключевую роль играют различные колониестимулирующие факторы, включая некоторые цитокины. Из них цитокин M-CSF играет важную роль в конечной стадии созревания макрофагов/микроглиальных клеток и не может быть заменен никаким другим фактором. Оценка этого биологического ответа может дать определенную информацию о влиянии микроглиальной активности, а поэтому позволит идентифицировать молекулы, оказывающие благоприятное действие при лечении РС.

Был разработан клеточный анализ для оценки пролиферативного ответа микроглиальной клеточной линии на M-CSF. Этот анализ дал оптимальные результаты с точки зрения целесообразности и надежности его осуществления. Указанный анализ проводили в 96-луночных планшетах с использованием нерадикативного субстрата, и этот анализ может быть легко автоматизирован.

Пример 10. Анализ на уровне экспрессии гена INSP142 с помощью ПЦР в реальном времени (TaqMan).

Полноразмерную РНК от каждого образца подвергали обратной транскрипции с использованием системы синтеза первой цепи для ОТ-ПЦР Superscript III (Invitrogen, Cat. № 18080-051) в конечном реакционном объеме 20 мкл. 2 мкг полноразмерной РНК объединяли с 50 нг рандомизированных гексамерных праймеров, 10 мМ каждого из dATP, dGTP, dCTP и dTTP и с DEPC-обработанной водой в объеме 10 мкл. Смесь инкубировали при 65°C в течение 5 мин, а затем охлаждали на льду в течение 1 мин. В отдельной пробирке получали 10 мкл нижеследующей смеси для синтеза кДНК: 2 мкл 10X RT-буфера, 4 мкл 25 мМ MgCl₂, 2 мкл 0,1 М DTT, 1 мкл РНКазы RnaseOUT™ (40 единиц/мкл) и 1 мкл фермента ОТ Superscript™ III (200 единиц/мкл). Смесь для синтеза кДНК добавляли к смеси РНК/праймер, слегка помешивали и инкубировали при 25°C в течение 10 мин, а затем при 50°C в течение 50 мин. Затем фермент ОТ инактивировали путем инкубирования при 85°C в течение 5 мин. Смесь охлаждали на льду, а затем добавляли 1 мкл РНКазы N. E.coli (2 единицы/мкл) и смесь инкубировали при 37°C в течение 20 мин. Смесь охлаждали на льду, а затем разводили 1/250 стерильной водой. Затем разведения реакционной смеси обратной транскриптазы анализировали с помощью ПЦР в реальном времени на аппарате TaqMan (PE Biosystems 7700). Праймеры для проведения ПЦР человеческого INSP142 и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (контроль: гены "домашнего хозяйства", GAPDH) конструировали с использованием программы для экспрессии праймеров Primer Express (PE Biosystems). Прямой праймер конструировали в экзоне 11. Обратный праймер конструировали в области, охватывающей пограничную область между экзоном 12 и 13. Этот праймер должен идентифицировать INSP142 от INSP141, но не от INSP143 или INSP144.

Последовательности праймеров представлены в табл. 4. Специфичность и оптимальную концентрацию праймеров, используемых в анализе TaqMan, определяли путем тестирования праймеров INSP142 на серии разведений плазмиды pEAK12d-INSP142-6His. Возможные примеси геномной ДНК в кДНК исключали путем проведения ПЦР-реакций с использованием праймеров, специфичных к интронной GAPDH-последовательности. Отсутствие неспецифической амплификации контролировали путем проведения анализа ПЦР-продуктов на 4% агарозном геле для гарантии продуцирования одной полосы с ожидаемой молекулярной массой.

ПЦР в реальном времени с применением соединения SYBR, флуоресцирующего в зеленом диапазоне спектра, осуществляли в объеме 50 мкл реакционной смеси, содержащей 25 мкл ПЦР-смеси Master Mix, включающей SYBR, флуоресцирующий в зеленом диапазоне спектра (PE Biosystems) (к которой было предварительно добавлено 0,5 единиц урацил-N-гликозилазы AmpErase (UNG, PE Biosystems)), 300 нМ каждого праймера для амплификации и 5 мкл ОТ-ПЦР-продукта. ПЦР проводили с использованием системы детекции ABI PRISM 7700 (TaqMan), запрограммированной в следующем режиме: 1 цикл, 50°C, 2 мин; 1 цикл, 95°C, 10 мин; 40 циклов, 95°C, 15 с, 60°C, 1 мин. Каждую реакцию проводили с 2 повторностями и результаты усредняли.

Праймер-специфические области образцов кДНК, подвергнутых обратной транскрипции, амплифицировали и определяли их величины Ct (пороговое число циклов). Величину Ct для каждого образца кДНК нормализовали по величинам, полученным для гена "домашнего хозяйства" GAPDH. Различия уровней экспрессии между геном GAPDH и INSP142 в каждом образце кДНК выражали как разность величин Ct, т.е. дельта (δ) Ct=Ct (GAPDH)-Ct (INSP142). Результаты для каждого образца выражали как кратную разность числа циклов, необходимых для детектируемой экспрессии гена INSP142, по отношению к числу циклов, необходимых для GAPDH, и вычисляли по формуле "кратная разность=2^(- δ Ct)". И, наконец, был определен уровень экспрессии гена INSP142 в каждом образце кДНК по отношению к уровню экспрессии гена GAPDH, где уровень экспрессии GAPDH был принят за 100% путем деления 100 на кратную разность для INSP142.

Результаты.

Праймеры для INSP142 тестировали на панели приблизительно 100 образцов нормальных человеческих тканей и пораженных человеческих тканей, первичных клеток и клеточных линий, а также на 44 биоптатах, взятых из толстой кишки и подвздошной кишки у пациентов с воспалительным заболеванием кишечника, и на 38 биоптатах, взятых у пациентов с псориазом после проведения клинических испытаний для IL18BP. Используемые праймеры позволяли идентифицировать INSP142 от варианта сплайсинга INSP141, но не от вариантов сплайсинга INSP143 или INSP144. Полученные результаты приводятся в табл. 5-11 и представлены графически на фиг. 10-16. INSP142 сначала клонировали из кДНК яиц. Анализ TaqMan нормальных человеческих тканей подтвердил наличие экспрессии INSP142 в яйцах, однако уровень его экспрессии был очень низким (т.е. составлял 0,15 по отношению к уровню экспрессии GAPDH, который был равен 100) (фиг. 10). INSP142 был также детектирован на аналогичных уровнях в коже, легких и в печени. В первичных клетках и в клеточных линиях INSP142 может быть детектирован на аналогичных низких уровнях в клетках костного мозга и в клетках человеческого микрососудистого эндотелия кожи (фиг. 12), а также в нормальных человеческих фибробластах кожи (фиг. 13), в гранулоцитах периферической крови и в происходящих от эозинофилов клеточных линиях EOL-3. Неожиданно

было обнаружено, что экспрессия INSP142 может быть детектирована во всех образцах биоптатов толстой кишки и подвздошной кишки пациентов с ВЗК (фиг. 15) и в биоптатах кожи, пораженной псориазом, что позволяет предположить о наличии активации мРНК в воспалительных патологических процессах. Исходя из данных экспрессии в первичных клетках и в клеточных линиях было обнаружено, что клетки кожи многих типов могут быть ответственны за экспрессию INSP142 при псориазе.

Выводы.

Полученные результаты неожиданно выявили ограниченную экспрессию INSP142 в образцах биоптатов толстой кишки и подвздошной кишки пациентов с ВЗК и в биоптатах кожи, пораженной псориазом.

Этот специфический характер экспрессии позволяет сделать вывод об участии INSP142 в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника, кожных болезней или воспалений.

Воспалительные заболевания предпочтительно выбирают из болезни Крона или язвенного колита.

Кожными болезнями предпочтительно являются псориаз, контактный дерматит или атопическая экзема.

Эти неожиданные свойства, характеризующие полинуклеотиды или соответствующие полипептиды согласно изобретению, делают их особенно подходящими для приготовления лекарственного средства или фармацевтической композиции. Это обусловлено тем, что полинуклеотиды или соответствующие полипептиды согласно изобретению, как было неожиданно обнаружено, имеют ограниченный уровень экспрессии в конкретных тканях.

Таблица 4

Последовательности ПЦР-праймеров TaqMan

Праймер	Последовательность (5' → 3')
INSP142-936F	CCCTGGGCCAAAАCTAGAAAA (SEQ ID NO: 162)
INSP142-1044R	AAGAGAAGGACATGTGGTGCTG (SEQ ID NO: 163)
hGAPDH-F	CCACCCATGGCAAATTC (SEQ ID NO: 164)
hGAPDH-R	GATGGGATTTCCATGATGACA (SEQ ID NO: 165)
интрон-hGAPDH-F	CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT (SEQ ID NO: 166)
интрон-hGAPDH-R	CTGTGCTCCCACTCCTGATTT (SEQ ID NO: 167)

Таблица 5

Экспрессия INSP142 в основных человеческих тканях, измеренная
с помощью ОТ-ПЦР (TaqMan)

Набор основных тканей	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	дельта Ct	Кратная разность	По отношению к GAPDH (=100)
S76 головной мозг	20,56	34,02	-13,46	11268,44	0,01
S77 сердце	21,36	34,10	-12,74	6841,04	0,01
S78 почки	19,93	32,53	-12,60	6186,90	0,02
S79 печень	22,79	33,77	-10,98	2019,80	0,05
S80 легкие	22,92	33,00	-10,09	1086,14	0,09
S81 плацента	21,81	33,82	-12,01	4124,49	0,02
S82 скелетная мышца	17,74	33,86	-16,12	71220,26	0,00
S83 тонкая кишка	21,65	34,50	-12,85	7383,04	0,01
S84 селезенка	21,71	34,74	-13,04	8393,17	0,01
S85 тимус	21,01	32,63	-11,62	3147,52	0,03
S86 матка	21,56	32,58	-11,03	2083,80	0,05
S89 спинной мозг	20,13	34,60	-14,47	22693,63	0,00
S90 шейка матки	24,27	36,00	-11,73	3396,74	0,03
S91 толстая кишка	21,50	33,64	-12,14	4513,40	0,02
S92 яичник	23,24	33,83	-10,59	1541,37	0,06
S93 предстательная железа	20,88	33,33	-12,45	5575,94	0,02
S94 яички	21,88	31,24	-9,36	654,84	0,15
S95 кожа	24,39	34,08	-9,70	828,87	0,12
S113 поджелудочная железа	23,26	33,45	-10,19	1164,10	0,09
S119 молочная железа	21,52	35,58	-14,06	17020,67	0,01
S120 желудок	21,66	32,61	-10,95	1978,24	0,05
S122 глаза	22,16	33,32	-11,16	2280,29	0,04
S147 мочевого пузыря	21,46	34,08	-12,62	6295,04	0,02

Таблица 6

Экспрессия INSP142 в сравнительных человеческих тканях,
измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TaqMan)

Сравнительные ткани	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	дельта Ct	Кратная разность	По отношению к GAPDH (=100)
S76 головной мозг	21,31	33,81	-12,50	5789,68	0,02
S140 головной мозг плода	19,73	32,72	-12,98	8088,64	0,01
S77 сердце	22,60	35,60	-13,00	8181,72	0,01
S143 сердце плода	19,89	34,15	-14,26	19580,66	0,01
S78 почки	20,94	33,37	-12,43	5512,82	0,02
S121 почки плода	20,41	34,04	-13,63	12673,55	0,01
S130 полноразмерная РНК почки, пораженной волчанкой	22,79	33,98	-11,20	2347,74	0,04
S135 опухоль почки	20,57	33,27	-12,70	6667,30	0,01
S79 печень	23,85	32,73	-8,88	470,18	0,21
S142 печень плода	21,08	33,72	-12,64	6374,85	0,02
S127 полноразмерная РНК печени, пораженной волчанкой	24,39	34,07	-9,67	816,10	0,12
S131 печень, пораженная циррозом	22,99	35,29	-12,30	5057,32	0,02
S136 опухоль печени	19,24	34,12	-14,88	30182,81	0,00
S80 легкие	23,65	33,42	-9,76	868,58	0,12
S144 легкие плода	19,29	32,75	-13,45	11203,00	0,01
S128 полноразмерная РНК легких, пораженных волчанкой	21,14	36,92	-15,78	56206,04	0,00
S132 легкие, пораженные циррозом	18,13	33,36	-15,23	38387,17	0,00
S137 опухоль легких	22,72	34,12	-11,50	2894,56	0,03
S84 селезенка	22,24	34,84	-12,60	6229,86	0,02
S141 селезенка плода	22,06	32,99	-10,93	1947,28	0,05
S129 полноразмерная РНК селезенки, пораженной волчанкой	23,62	33,82	-10,20	1174,15	0,09
S133 селезенка, пораженная циррозом	20,99	33,30	-12,32	5104,76	0,03
S117 все нормальные ткани человека	17,56	33,41	-15,85	59095,31	0,00

Таблица 7

Экспрессия INSP142 в секреторных и иммунных тканях,
измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TaqMan)

Образцы секреторных и иммунных тканей	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	дельта Ct	Кратная разность	По отношению к GAPDH (=100)
S87 костный мозг	23,63	33,33	-9,70	831,14	0,12
S88 щитовидная железа	22,77	33,36	-10,59	1536,53	0,07
S115 слюнная железа	22,95	35,11	-12,16	4585,12	0,02
S116 надпочечник	21,94	34,62	-12,68	6546,78	0,02
S123 молочная железа	25,03	36,20	-11,17	2302,46	0,04
S125 гипофиз	23,48	34,11	-10,62	1578,89	0,06
S145 лимфоузел	23,28	35,23	-11,95	3965,59	0,03
S146 жировая ткань	20,35	35,40	-15,05	33879,59	0,00
S148 аппендикс	22,60	33,76	-11,17	2296,39	0,04
S149 кровеносная артерия	22,55	35,87	-13,32	10218,47	0,01
S150 горло	21,03	34,87	-13,85	14750,27	0,01
S75 миндалины	25,36	37,12	-11,76	3466,37	0,03
S54 строма	22,17	34,02	-11,86	3709,47	0,03
S153 клетки HDMEC	24,32	34,27	-9,96	993,65	0,10
S157 стимулированные клетки HDMEC	24,36	34,63	-10,27	1237,64	0,08
S155 клетки HAOEC	21,61	34,44	-12,83	7302,87	0,01
S158 стимулированные клетки HAOEC	20,94	34,05	-13,11	8861,15	0,01
S11 RA2	22,78	34,43	-11,65	3204,93	0,03
S12 RA3	21,45	34,59	-13,15	9058,87	0,01
S13 OA1	26,13	39,39	-13,26	9782,59	0,01
S19 OA4	21,79	34,27	-12,47	5686,33	0,02

Таблица 8

Экспрессия INSP142 в первичных клетках и клеточных линиях,
измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TaqMan)

Первичные клетки и клеточные линии 1	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	дельта Ct	Кратная разность	По отношению к GAPDH (=100)
S1 фибробласт AG1518	21,54	34,72	-13,18	9258,32	0,01
S2 Howard Ab	21,23	33,97	-12,74	6844,32	0,01
S3 Clark N	20,59	35,30	-14,71	26795,20	0,00
S4 NF1	20,69	34,13	-13,44	11132,82	0,01
S5 NF2	22,05	33,96	-11,91	3843,39	0,03
S6 SScN2	19,93	34,16	-14,23	19207,12	0,01
S7 SSCA2	19,11	33,27	-14,16	18280,44	0,01
S15 LN1	20,23	33,88	-13,66	12923,86	0,01
S16 Lab1	17,60	34,36	-16,76	110689,17	0,00
S17 LN14	20,96	34,26	-13,29	10048,88	0,01
S18 LA13	19,11	33,88	-14,77	27965,97	0,00
S9 NHDF2	23,84	34,10	-10,26	1230,13	0,08
S10 NHDF3	24,58	34,75	-10,17	1148,35	0,09
S55 JENC	20,53	34,16	-13,63	12655,39	0,01
S56 HT 1080	19,81	34,96	-15,15	36287,57	0,00
S57 MRC-5	20,31	35,68	-15,37	42276,07	0,00
S152 клетки Mob	21,68	34,18	-12,50	5775,85	0,02
S155 стимулированные клетки Mob	20,44	34,57	-14,13	17932,97	0,01
S156 стимулированные клетки Mob	19,60	34,06	-14,45	22429,61	0,00
S20 кератиноциты кожи K1	22,46	35,57	-13,10	8800,61	0,01
S21 кератиноциты кожи K2	22,98	34,39	-11,41	2728,24	0,04

Таблица 9
Экспрессия INSP142 в первичных клетках и клеточных линиях иммунной системы или ЦНС,
измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TaqMan)

Первичные клетки и клеточные линии 2	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	дельта Ct	Кратная разность	По отношению к GAPDH (=100)
S30 THP-1 моно/мас	19,42	32,52	-13,10	8772,67	0,01
S35 базофил KU812	18,91	32,55	-13,64	12735,76	0,01
S37 KU812/PMA	20,29	36,16	-15,87	59778,10	0,00
S43 Jurkat	19,54	32,78	-13,24	9648,25	0,01
S58 PBMC1	21,68	33,98	-12,30	5052,75	0,02
S59 гранулоциты 1	23,97	33,84	-9,88	940,48	0,11
S61 PBMC2.2	22,12	33,56	-11,44	2787,83	0,04
S97 SK-N-AS	19,94	33,72	-13,78	14049,81	0,01
S98 TE671 субклон 2	19,76	33,76	-14,00	16356,00	0,01
S99 KELLY	18,07	32,83	-14,76	27723,88	0,00
S100 U-373 MG	19,55	32,78	-13,24	9648,51	0,01
S101 U-87 MG	20,86	33,50	-12,64	6365,99	0,02
S102 T98G	18,61	33,69	-15,08	34577,36	0,00
S103 BE(2)-C	19,21	33,21	-14,00	16387,20	0,01
S104 CCF-STGG1	20,19	32,81	-12,62	6274,56	0,02
S105 TE671	20,50	34,11	-13,60	12448,79	0,01
S106 A172	19,71	33,12	-13,42	10928,99	0,01
S107 132N1	19,15	33,29	-14,14	18035,48	0,01
S108 SK-PN-DW	19,97	33,28	-13,31	10145,36	0,01
S38 MOLT-4	24,90	33,77	-8,86	465,96	0,21
S41 EOL-3	23,64	33,13	-9,49	718,73	0,14
S44 EOL-3+IL2	24,08	34,34	-10,27	1232,74	0,08

Таблица 10

Экспрессия INSP142 в биоптатах, взятых из пораженной толстой кишки и подвздошной кишки, измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TaqMan)

Пластина с ВЗК-биоптатом	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	дельта ct	Кратная разность	По отношению к GAPDH (=100)
N1	24,43	33,67	-9,25	607,54	0,16
N2	22,86	32,88	-10,03	1042,30	0,10
N4	22,08	34,05	-11,97	4001,87	0,02
N5	23,15	32,65	-9,50	723,01	0,14
N9	22,73	32,10	-9,37	662,65	0,15
N10	23,38	32,67	-9,29	626,27	0,16
CD2	22,25	33,41	-11,16	2295,06	0,04
CD3	21,30	31,92	-10,62	1575,62	0,06
CD4	21,40	31,66	-10,26	1222,40	0,08
CD5	24,04	32,88	-8,85	460,18	0,22
CD6	23,46	32,31	-8,85	460,46	0,22
CD8	22,12	33,19	-11,07	2148,23	0,05
CD9	24,74	33,33	-8,58	383,93	0,26
CD10	23,18	34,11	-10,93	1950,65	0,05
CD13	24,11	32,82	-8,72	420,26	0,24
CD16	24,35	32,77	-8,42	342,90	0,29
CD17	25,58	33,02	-7,44	174,20	0,57
CD18	22,88	37,35	-14,47	22720,95	0,00
CD19	23,33	33,35	-10,02	1038,70	0,10
CD20	24,12	34,57	-10,45	1399,73	0,07
CD22	22,04	32,10	-10,05	1061,10	0,09
N11	23,60	33,78	-10,18	1160,09	0,09
N14	22,86	33,48	-10,62	1577,89	0,06
N26	23,48	35,52	-12,04	4211,20	0,02
N27	23,86	34,92	-11,06	2133,33	0,05
N29	24,61	35,11	-10,50	1449,35	0,07
N30	22,56	32,01	-9,45	697,17	0,14
CD4 bis	22,91	31,80	-8,89	475,04	0,21
CD6 bis	23,04	32,46	-9,42	683,91	0,15
CD23	25,11	32,42	-7,31	158,27	0,63
CD24	22,72	33,53	-10,81	1792,74	0,06
CD25	23,50	31,90	-8,40	336,65	0,30
CD26	23,18	32,30	-9,12	557,15	0,18
CD27	24,58	32,56	-7,98	252,07	0,40
CD28	23,15	32,50	-9,35	654,35	0,15
UC11	23,39	32,69	-9,30	630,54	0,16
UC12	22,61	33,70	-11,09	2184,24	0,05
UC13	22,96	32,15	-9,19	584,33	0,17
UC14	23,09	31,27	-8,18	290,95	0,34
UC16	23,10	32,85	-9,75	861,54	0,12
UC18	24,78	33,02	-8,24	302,49	0,33
UC19	22,74	32,58	-9,84	918,60	0,11

Таблица 11

Экспрессия INSP142 в биоптатах, взятых из пораженной кожи после проведения клинических испытаний для IL18BP, измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TaqMan)

Псориаз	Ct hGAPDH	Ct hINSP142	дельта Ct	Кратная разность	По отношению к GAPDH (=100)
#11 A2872102-2	21,03	32,84	-11,81	3593,11	0,03
#16 A2872103-1	24,86	33,95	-9,09	544,94	0,18
#28 A2872023-1	22,50	35,02	-12,51	5842,32	0,02
#36 A2872028-1	24,83	33,76	-8,94	490,55	0,20
#39 A2872025-1	24,43	32,88	-8,44	347,88	0,29
#59 E1328972-3	24,60	33,26	-8,66	403,74	0,25
#60 E1328972-2	22,21	32,91	-10,70	1658,02	0,06
#61 E1329004	24,60	33,37	-8,77	435,59	0,23
#63 E1328973-3	22,93	33,91	-10,97	2011,18	0,05
#64 E1329003-2	20,81	31,87	-11,06	2135,78	0,05
#66 E1328974-4	21,77	33,42	-11,65	3224,67	0,03
#68 E1328975-3	24,59	32,55	-7,96	249,05	0,40
#69 E1328975-4	23,59	33,57	-9,97	1005,76	0,10
#70 E1329006-1	22,27	33,00	-10,73	1693,79	0,06
#72 E1328976-4	23,54	32,71	-9,16	573,83	0,17
#73 E1329005-1	23,80	33,50	-9,70	830,24	0,12
#74 E1328977-2	24,17	32,97	-8,79	443,66	0,23
#75 E1328977-3	22,90	32,88	-9,98	1010,36	0,10
#77 E1348411-3	23,53	32,47	-8,95	493,01	0,20
#78 E1348411-2	21,64	34,12	-12,48	5716,81	0,02
#79 E1348411-1	21,83	31,29	-9,45	701,55	0,14
#80 E1348414-2	22,67	32,17	-9,49	720,55	0,14
#81 E1348414-1	22,12	32,54	-10,42	1374,76	0,07
#82 E1348446-1	23,42	31,65	-8,23	299,96	0,33
#83 E1348415-3	20,95	32,19	-11,24	2412,57	0,04
#84 E1348415-2	21,77	32,86	-11,09	2181,45	0,05
#85 E1348442-1	21,00	32,15	-11,15	2265,41	0,04
#86 E1348416-3	25,00	33,31	-8,31	317,58	0,31
#88 E1348445-1	23,70	33,27	-9,57	760,60	0,13
#91 E1317749-2	24,53	31,94	-7,41	170,59	0,59
#95 E1317719-2	24,94	32,12	-7,18	145,45	0,69
#96 E1317719-3	21,69	31,74	-10,05	1059,76	0,09
#97 E1317751-2	23,25	33,13	-9,88	943,38	0,11
#98 E1317723-2	24,09	35,40	-11,32	2550,43	0,04
#99 E1317723-3	22,10	32,31	-10,21	1186,53	0,08
#101 E1317718-2	20,26	32,63	-12,38	5312,87	0,02
#102 E1317718-3	22,52	33,42	-10,89	1899,79	0,05
#103 E1317750-2	23,82	32,43	-8,61	390,29	0,26

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:148; или

(ii) представляет собой ее фрагмент, который связывается с субъединицей токсина сибирской язвы PA, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидом (i); или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii), имеющий активность, определенную в (ii).

2. Полипептид по п.1, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:128 или SEQ ID NO:132;

(ii) представляет собой ее фрагмент, который связывается с субъединицей токсина сибирской язвы PA, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидом (i); или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii), имеющий активность, определенную в (ii).

3. Полипептид по п.1 или 2, который:

(i) состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:148; или

(ii) представляет собой ее фрагмент, который связывается с субъединицей токсина сибирской язвы PA, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидом (i); или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii), имеющий активность, определенную в (ii).

4. Полипептид, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:150;

(ii) представляет собой ее фрагмент, который связывается с субъединицей токсина сибирской язвы PA, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидом (i); или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii), имеющий активность, определенную в (ii).

5. Полипептид по п.4, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:52 или SEQ ID NO:156;

(ii) представляет собой ее фрагмент, который связывается с субъединицей токсина сибирской язвы PA, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидом (i); или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii), имеющий активность, определенную в (ii).

6. Полипептид по п.4 или 5, который:

(i) состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:150;

(ii) представляет собой ее фрагмент, который связывается с субъединицей токсина сибирской язвы PA, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидом (i);

или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii), имеющий активность, определенную в (ii).

7. Полипептид, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:150;

(ii) представляет собой ее фрагмент, который связывается с субъединицей токсина сибирской язвы РА, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидом (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii), имеющий активность, определенную в (ii).

8. Полипептид по п.7, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:137 или SEQ ID NO:141;

(ii) представляет собой ее фрагмент, который связывается с субъединицей токсина сибирской язвы РА, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидом (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii), имеющий активность, определенную в (ii).

9. Полипептид по п.7 или 8, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:150;

(ii) представляет собой ее фрагмент, который связывается с субъединицей токсина сибирской язвы РА, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидом (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii), имеющий активность, определенную в (ii).

10. Полипептид, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:148;

(ii) представляет собой ее фрагмент, который связывается с субъединицей токсина сибирской язвы РА, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидом (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii), имеющий активность, определенную в (ii).

11. Полипептид по п.10, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:126;

(ii) представляет собой ее фрагмент, который связывается с субъединицей токсина сибирской язвы РА, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидом (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii), имеющий активность, определенную в (ii).

12. Полипептид по п.10 или 11, который:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:146 и/или SEQ ID NO:148;

(ii) представляет собой ее фрагмент, который связывается с субъединицей токсина сибирской язвы РА, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы, или имеет общую антигенную детерминанту с полипептидом (i), или

(iii) представляет собой функциональный эквивалент (i) или (ii), имеющий активность, определенную в (ii).

13. Полипептид, являющийся функциональным эквивалентом полипептида согласно части (iii) любого из предшествующих пунктов и отличающийся тем, что он является гомологом аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148 или SEQ ID NO:150, связывается с субъединицей токсина сибирской язвы РА, хелатирует двухвалентный катион, необходимый для связывания токсина сибирской язвы, или блокирует интоксикацию сибирской язвы.

14. Полипептид, который представляет собой фрагмент или функциональный эквивалент по любому из предшествующих пунктов, имеющий последовательность, которая более чем на 50%, предпочтительно более чем на 60, 70, 80, 90, 95, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148 или SEQ ID NO:150, или ее активному фрагменту.

15. Полипептид, который представляет собой функциональный эквивалент по любому из предшествующих пунктов и который обладает значительной структурной гомологией с полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148 или SEQ ID NO:150.

16. Полипептид, который представляет собой фрагмент по пп.1-14, имеющий антигенную детерминанту, общую с полипептидом согласно части (i) любого из пп.1, 4, 7, 10 или 13, и состоящий из 7 или более аминокислотных остатков аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64,

SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148 или SEQ ID NO:150.

17. Гибридный белок, содержащий полипептид по любому из предшествующих пунктов.

18. Гибридный белок по п.17, содержащий INSP141, INSP142, внеклеточную часть INSP143 или внеклеточную часть INSP144.

19. Очищенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из предшествующих пунктов.

20. Очищенная молекула нуклеиновой кислоты по п.19, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:111, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:141 и/или SEQ ID NO:143, или представляет собой ее избыточный эквивалент или фрагмент.

21. Очищенная молекула нуклеиновой кислоты по п.19, которая состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:111, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:147 и/или SEQ ID NO:149, и/или представляет собой ее избыточный эквивалент или фрагмент.

22. Очищенная молекула нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.19-21 в условиях высокой жесткости.

23. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.19-22.

24. Клетка-хозяин, трансформированная вектором по п.23.

25. Лиганд, который специфически связывается с полипептидом по любому из пп.1-18.

26. Лиганд по п.25, который представляет собой антитело.

27. Применение полипептида по любому из пп.1-18 в терапии или в диагностике заболевания.

28. Способ диагностики заболевания у пациента, включающий в себя оценку активности полипептида по любому из пп.1-18 в ткани, полученной у указанного пациента, и сравнение указанного уровня экспрессии или активности с контрольным уровнем, где уровень, отличающийся от указанного контрольного уровня, является признаком наличия заболевания.

29. Способ по п.28, осуществляемый *in vitro*.

30. Способ по п.28 или 29, который включает в себя стадии (а) контактирования лиганда по п.25 или 26 с биологическим образцом в условиях, подходящих для образования комплекса лиганд-полипептид; и (б) детектирования указанного комплекса.

31. Способ по п.28 или 29, включающий в себя:

а) контактирование образца ткани, взятой у пациента, с нуклеиново-кислотным зондом в жестких условиях, способствующих образованию гибридного комплекса между молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.19-22, и указанным зондом;

б) контактирование контрольного образца с указанным зондом в условиях, аналогичных условиям стадии (а); и

с) детектирование присутствия гибридных комплексов в указанных образцах, где детектирование уровней указанного гибридного комплекса в образце, взятом у данного пациента, которые отличаются от уровней гибридного комплекса в контрольном образце, указывает на наличие заболевания.

32. Способ по п.28 или 29, включающий в себя:

а) контактирование образца нуклеиновой кислоты ткани, взятой у пациента, с нуклеиново-кислотным праймером в жестких условиях, способствующих образованию гибридного комплекса между молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.19-22 и указанным праймером;

б) контактирование контрольного образца с указанным праймером в условиях, аналогичных условиям стадии (а);

с) амплификацию указанного образца нуклеиновой кислоты и

д) детектирование уровня амплифицированной нуклеиновой кислоты в образцах, взятых у пациента, и в контрольных образцах, где детектирование уровней амплифицированной нуклеиновой кислоты во взятом у пациента образце, которые значительно отличаются от уровней амплифицированной нуклеиновой кислоты в контрольном образце, указывает на наличие заболевания.

33. Способ по п.28 или 29, включающий в себя:

а) взятие образца ткани у пациента, обследуемого на наличие заболевания;

б) выделение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.19-22 из указанного образца ткани и

с) установление диагноза заболевания у указанного пациента путем детектирования присутствия мутации в молекуле нуклеиновой кислоты, где указанная мутация ассоциируется с указанным заболеванием и где наличие такой мутации указывает на наличие заболевания.

34. Способ по п.33, который дополнительно включает в себя амплификацию указанной молекулы нуклеиновой кислоты, с образованием амплифицированного продукта, и детектирование наличия или отсутствия мутации в указанном амплифицированном продукте.

35. Способ по п.33 или 34, где наличие или отсутствие мутации у пациента определяют путем осуществления контакта указанной молекулы нуклеиновой кислоты с нуклеиново-кислотным зондом, который гибридизуется с указанной молекулой нуклеиновой кислоты в жестких условиях с образованием гибридной двухцепочечной молекулы, где указанная гибридная двухцепочечная молекула имеет негибридизованную часть цепи нуклеиново-кислотного зонда в любой области, соответствующей мутации, ассоциированной с заболеванием; и детектирования наличия или отсутствия негибридизованной части цепи указанного зонда как показателя наличия или отсутствия ассоциированной с заболеванием мутации.

36. Способ по любому из пп.28-35, где указанными заболеваниями являются, без ограничения, клеточно-пролиферативные расстройства, включая новообразования, меланому, опухоли легких, ободочной кишки, молочной железы, поджелудочной железы, головы и шеи и другие солидные опухоли; миелопролиферативные расстройства, такие как лейкоз, неходжкинская лимфома, лейкопения, тромбоцитопения, нарушение ангиогенеза, саркома Капоши; аутоиммунные/воспалительные заболевания, включая аллергию, воспалительное заболевание кишечника, артрит, псориаз, воспаление дыхательных путей, астму и отторжение трансплантированных органов; сердечно-сосудистые заболевания, включая гипертензию, отеки, стенокардию, атеросклероз, тромбоз, сепсис, инсульт, реперфузионное поражение и ишемию; неврологические расстройства, включая заболевание центральной нервной системы, болезнь Альцгеймера, повреждение головного мозга, амиотрофический боковой склероз и боли; нарушения развития; метаболические расстройства, включая сахарный диабет, остеопороз и ожирение; СПИД и почечные заболевания; инфекции, включая вирусные инфекции, грибковые инфекции, паразитарные инфекции, бактериальные инфекции, бактериальные интоксикации; сибирская язва, заболевания, ассоциированные с блокадой токсинов (например, бактериальных токсинов), рак, опухоль эндотелия, рак ободочной кишки, рак мочевого пузыря, рак пищевода, рак легких, меланома, ювенильный гиалиновый фиброматоз (ЮГФ), детский системный гиалиноз (ДСГ), болезнь фон Виллебранда, миопатия Бетлема, дистрофический буллезный эпидермолиз, тромбоз, модуляция опосредуемой тромбоцитами агрегации, аутоиммунные заболевания, воспаления и другие патологические состояния.

37. Способ по любому из пп.28-35, где указанным заболеванием является воспалительное заболевание кишечника, заболевание, ассоциированное с токсинами, рак, кожные болезни, воспаления, болезнь Крона, язвенный колит, псориаз, контактный дерматит, атопическая экзема, рак кровеносной и лимфатической систем, рак кожи, рак пищеварительной системы, рак мочевыделительной системы, рак молочной железы, рак яичника, рак женских половых органов, хориокарцинома, рак легких, опухоли головного мозга, опухоли кости, карциноидная опухоль, рак ободочной кишки, рак носоглотки, ретроперитонеальные саркомы, опухоли мягких тканей, рак щитовидной железы, рак яичек или рак печени, заболевание, ассоциированное с бактериальным токсином, заболевание, ассоциированное с токсином сибирской язвы или ботулиническим токсином С2 клостридий, болезнь Крона или язвенный колит, псориаз, рак кровеносной и лимфатической систем, рак кожи, рак пищеварительной системы, рак мочевыделительной системы, рак молочной железы, рак яичника, рак женских половых органов, хориокарцинома, рак легких, опухоли головного мозга, опухоли кости, карциноидная опухоль, рак носоглотки, ретроперитонеальные саркомы, опухоли мягких тканей, рак щитовидной железы, рак яичек или рак печени.

38. Способ по любому из пп.28-36, где указанным заболеванием является заболевание, в патогенезе которого участвуют белки, содержащие домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно ATR-подобные белки.

39. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-18.

40. Вакцинная композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-18 или молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.19-22.

41. Применение фармацевтической композиции по п.39 для получения лекарственного средства для лечения клеточно-пролиферативных расстройств, включая новообразования, меланому, опухоли легких, ободочной кишки, молочной железы, поджелудочной железы, головы и шеи и другие солидные опухоли; миелолинейных расстройств, таких как лейкоз, неходжкинская лимфома, лейкопения, тромбоцитопения, нарушение ангиогенеза, саркома Капоши; аутоиммунных/воспалительных заболеваний, включая аллергию, воспалительное заболевание кишечника, артрит, псориаз, воспаление дыхательных путей, астму и отторжение трансплантированных органов; сердечно-сосудистых заболеваний, включая гипертензию, отеки, стенокардию, атеросклероз, тромбоз, сепсис, инсульт, реперфузионное поражение и ишемию; неврологических расстройств, включая заболевание центральной нервной системы, болезнь Альцгеймера, повреждение головного мозга, амиотрофический боковой склероз и боли; нарушений развития; метаболических расстройств, включая сахарный диабет, остеопороз и ожирение; СПИДа и почечного заболевания; инфекций, включая вирусные инфекции, грибковые инфекции, паразитарные инфекции, бактериальные инфекции, бактериальные интоксикации, сибирскую язву; заболеваний, ассоциированных с блокадой токсинов (например, бактериальных токсинов), рака, опухоли эндотелия, рака ободочной кишки, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака легких, меланомы, ювенильного гиалинового фиброматоза (ЮГФ), детского системного гиалиноза (ДСГ), болезни фон Виллебранда, миопатии Бетлема, дистрофического буллезного эпидермолиза, тромбоза, модуляции опосредуемой тромбоцитами агрегации, аутоиммунных заболеваний, воспаления и других патологических состояний.

42. Применение фармацевтической композиции по п.39 для получения лекарственного средства для лечения заболевания, в патогенезе которого участвуют белки, содержащие домен vWFA и/или ANT_IG, предпочтительно ATR-подобные белки.

43. Способ лечения заболевания у пациента, включающий в себя введение указанному пациенту молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.19-22, вектора по п.23, клетки-хозяина по п.24, где заболевание выбрано из группы, включающей воспалительные заболевания кишечника, заболевания, ассоциированные с токсинами, предпочтительно ассоциированные с бактериальными токсинами, заболевания, ассоциированные с сибирской язвой или с ботулиническим токсином С2 клостридий, рак, кожные болезни, воспаления, болезнь Крона, язвенный колит, псориаз, контактный дерматит, атопическая экзема, рак кровеносной и лимфатической систем, рак кожи, рак пищеварительной системы, рак мочевыделительной системы, рак молочной железы, рак яичника, рак женских половых органов, хориокарцинома, рак легких, опухоли головного мозга, опухоли кости, карциноидная опухоль, рак ободочной кишки, рак носоглотки, опухоль эндотелия, рак мочевого пузыря, рак пищевода, ретроперитонеальные саркомы, опухоли мягких тканей, рак щитовидной железы, рак яичек или рак печени, клеточно-пролиферативные расстройства, включая новообразования, меланому, опухоли легких, ободочной кишки, молочной железы, поджелудочной железы, головы и шеи и другие солидные опухоли; миелолинейные расстройства, такие как лейкоз, неходжкинская лимфома, лейкопения, тромбоцитопения, нарушение ангиогенеза, саркома Капоши; аутоиммунные/воспалительные заболевания, включая аллергию, артрит, воспаление дыхательных путей, астму и отторжение трансплантированных органов; сердечно-сосудистые заболевания, включая гипертензию, отеки, стенокардию, атеросклероз, тромбоз, модуляцию агрегации, опосредуемой тромбоцитами, сепсис, инсульт, реперфузионное поражение и ишемию; неврологические расстройства, включая заболевание центральной нервной системы, болезнь Альцгеймера, повреждения головного мозга, амиотрофический боковой склероз и боли; нарушения развития; метаболические расстройства, включая сахарный диабет, остеопороз и ожирение; СПИД и почечные заболевания; инфекции, включая вирусные инфекции, бактериальные инфекции, грибковые инфекции и паразитарные инфекции, ювенильный гиалиновый фиброматоз (ЮГФ), детский системный гиалиноз (ДСГ), болезнь фон Виллебранда, миопатия Бетлема, дистрофический буллезный эпидермолиз, аутоиммунные заболевания и воспаления.

44. Способ по п.43, согласно которому для лечения заболеваний, при которых уровень экспрессии природного гена у пациента, страдающего указанным заболеванием, ниже, чем уровень указанной экспрессии у здорового пациента, данному пациенту вводят молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, которые являются агонистами.

45. Способ по п.43, согласно которому для лечения заболеваний, при которых уровень экспрессии природного гена у пациента, страдающего указанным заболеванием, выше, чем уровень указанной экспрессии у здорового пациента, данному пациенту вводят молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, которые являются антагонистами.

46. Способ лечения заболевания у пациента, включающий в себя введение указанному пациенту полипептида по любому из пп.1-18, лиганда по п.25 или 26 или фармацевтической композиции по п.39,

где заболевание выбрано из группы, включающей воспалительные заболевания кишечника, заболевания, ассоциированные с токсинами, предпочтительно ассоциированные с бактериальными токсинами, заболевания, ассоциированные с сибирской язвой или с ботулиническим токсином С2 клостридий, рак, кожные болезни, воспаления, болезнь Крона, язвенный колит, псориаз, контактный дерматит, атопическая экзема, рак кровеносной и лимфатической систем, рак кожи, рак пищеварительной системы, рак мочевого выделительной системы, рак молочной железы, рак яичника, рак женских половых органов, хориокарцинома, рак легких, опухоли головного мозга, опухоли кости, карциноидная опухоль, рак ободочной кишки, рак носоглотки, опухоль эндотелия, рак мочевого пузыря, рак пищевода, ретроперитонеальные саркомы, опухоли мягких тканей, рак щитовидной железы, рак яичек или рак печени, клеточно-пролиферативные расстройства, включая новообразования, меланому, опухоли легких, ободочной кишки, молочной железы, поджелудочной железы, головы и шеи и другие солидные опухоли; миелолипролиферативные расстройства, такие как лейкоз, неходжкинская лимфома, лейкопения, тромбоцитопения, нарушение ангиогенеза, саркома Капоши; аутоиммунные/воспалительные заболевания, включая аллергию, артрит, воспаление дыхательных путей, астму и отторжение трансплантированных органов; сердечно-сосудистые заболевания, включая гипертензию, отеки, стенокардию, атеросклероз, тромбоз, модуляцию агрегации, опосредуемой тромбоцитами, сепсис, инсульт, реперфузионное поражение и ишемию; неврологические расстройства, включая заболевание центральной нервной системы, болезнь Альцгеймера, повреждения головного мозга, амиотрофический боковой склероз и боли; нарушения развития; метаболические расстройства, включая сахарный диабет, остеопороз и ожирение; СПИД и почечные заболевания; инфекции, включая вирусные инфекции, бактериальные инфекции, грибковые инфекции и паразитарные инфекции, ювенильный гиалиновый фиброматоз (ЮГФ), детский системный гиалиноз (ДСГ), болезнь фон Виллебранда, миопатия Бетлема, дистрофический буллезный эпидермолиз, аутоиммунные заболевания и воспаления.

47. Способ по п.46, согласно которому для лечения заболеваний, при которых уровень активности указанного полипептида у пациента, страдающего указанным заболеванием, ниже, чем уровень указанной активности у здорового пациента, данному пациенту вводят полипептид, лиганд или композицию, которые являются агонистами.

48. Способ по п.46, согласно которому для лечения заболеваний, при которых уровень активности указанного полипептида у пациента, страдающего указанным заболеванием, выше, чем уровень указанной активности у здорового пациента, данному пациенту вводят полипептид, лиганд или композицию, которые являются антагонистами.

49. Способ мониторинга терапевтического лечения заболевания у пациента, предусматривающий мониторинг уровня экспрессии или активности полипептида по любому из пп.1-18 или уровня экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.19-22 в ткани указанного пациента за определенный период времени, где изменение указанного уровня экспрессии или активности за определенный промежуток времени по сравнению с контрольным уровнем является показателем рецидива указанного заболевания.

50. Способ идентификации соединения, которое является эффективным для лечения и/или диагностики заболевания, предусматривающий приведение в контакт молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.19-22 с одним или несколькими соединениями, предположительно обладающими аффинностью связывания с указанной молекулой нуклеиновой кислоты; и отбор соединения, которое специфически связывается с указанной молекулой нуклеиновой кислоты.

51. Способ идентификации соединения, которое является эффективным для лечения и/или диагностики заболевания, предусматривающий приведение в контакт полипептида по любому из пп.1-18 с одним или несколькими соединениями, предположительно обладающими аффинностью связывания с указанным полипептидом; и отбор соединения, которое специфически связывается с указанным полипептидом.

52. Набор, используемый для диагностики заболевания и включающий в себя первый контейнер, содержащий нуклеиново-кислотный зонд, который гибридизуется в жестких условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.19-22; второй контейнер, содержащий праймеры, подходящие для амплификации указанной молекулы нуклеиновой кислоты; и инструкции по использованию указанных зонда и праймеров для облегчения диагностики заболевания.

53. Набор по п.52, который дополнительно включает в себя третий контейнер, содержащий агент для гидролиза негибридизованной РНК.

54. Набор, содержащий массив молекул нуклеиновой кислоты, по меньшей мере одной из которых является молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.19-22.

55. Набор, включающий в себя одно или несколько антител, связывающихся с полипептидом по любому из пп.1-18, и реагент, используемый для детекции реакции связывания между указанным антителом и указанным полипептидом.

56. Трансгенное или дефицитное [по данному полипептиду] животное, не являющееся человеком, которое было трансформировано так, что оно экспрессирует более высокие или более низкие уровни полипептида по любому из пп.1-18 или вообще не экспрессирует указанный полипептид.

57. Способ скрининга на соединение, эффективное для лечения заболевания, предусматривающий контактирование трансгенного животного, не являющегося человеком, по п.56 с соединением-кандидатом и оценку эффективности указанного соединения в отношении указанного заболевания у указанного животного.

58. Применение фармацевтической композиции по п.39 при оплодотворении в пробирке (IVF) или в качестве контрацептива.

59. Применение фармацевтической композиции по п.39 при изготовлении контрацептива.

60. Применение полипептида INSP141, INSP142, INSP143 или INSP144 в качестве мишени для скрининга лекарственных средств-кандидатов, которые могут быть использованы для лечения или предупреждения расстройства, ассоциированного с белком, содержащим домен vWFA и/или ANT_IG.

61. Способ отбора биологически активных соединений, предусматривающий:

(i) контактирование соединения-кандидата с рекомбинантными клетками-хозяевами, экспрессирующими полипептид INSP141, INSP142, INSP143 или INSP144;

(ii) отбор соединений, которые связываются с указанным полипептидом INSP141, INSP142, INSP143 или INSP144 на поверхности указанных клеток и/или модулируют активность указанного полипептида INSP141, INSP142, INSP143 или INSP144.

Десять лучших результатов поиска с помощью INSP141 с использованием BLASTp в неизбыточной базе данных NCBI

INSP141

запрос = INSP141

(306 символов)

База данных: все кодирующие последовательности неизбыточной базы GenBank

Трансляции: +PDB+SwissProt+PIR+PFR

1 448 673 символа ; 466 090 050 символов

Поиск сделан

			Оценка (биты)	Значимость E
Последовательности, обнаруживающие значительное выравнивание				
ref XP_113625.3	аналогичный гипотетическому белку	4933430J11 [Homo...	407	e-113
ref NP_766396.1	гипотетический белок	4933430J11 [Mus musculus] ...	284	1e-75
ap Q9CZ52 ATR_MOUSE	Предшественник рецептора токсина сибирской язвы	(Tumor endo...	225	8e-58
ref XP_132709.1	кДНК RIKEN 2310008J16 [Mus musculus]		225	8e-58
ref NP_444262.1	предшественник маркера 8 опухолевого эндотелиального белка изоформы 2. ...		223	4e-57
ref NP_115584.1	предшественник маркера 8 опухолевого эндотелиального белка изоформы 1 ; ...		223	4e-57
ref NP_060623.2	предшественник маркера 8 опухолевого эндотелиального белка изоформы 3 ; ...		223	4e-57
dbj BAC03731.1	неидентифицированный белковый продукт	[Homo sapiens]	193	3e-48
gb AAP04016.1	Капиллярный белок морфогенеза 2	[Homo sapiens]	193	3e-48
dbj BAA91707.1	неидентифицированный белковый продукт	[Homo sapiens]	172	8e-42
>ref XP_113625.3	Аналогичный гипотетическому белку	4933430J11 [Homo sapiens]		
длина = 483				

Фиг. 1

Десять лучших результатов поиска с помощью INSP142 с использованием
BLASTp в неизбыточной базе данных NCBI

INSP142

запрос = INSP142

{352 символа }

База данных все кодирующие последовательности неизбыточной базы GenBank

Трансляции +PDB+SwissProt+PIR+PRF

1 448 673 символа , 466 390 050 символов

Поиск сделан

Последовательности, обнаруживающие значительное выравнивание				Оценка (биты)	Величина E
ref XP_113625.3	аналогичный гипотетическому белку	4933430J11 [Homo...	510	e-143	
ref NP_766396.1	гипотетический белок	4933430J11 [Mus musculus] ...	336	3e-91	
sp Q9CZ52 ATR_MOUSE	Предшественник рецептора токсина сибирской язвы	(Tumor endo...	266	4e-70	
ref XP_132709.1	кДНК RIKEN 2310008J16 [Mus musculus]		266	4e-70	
ref NP_444262.1	предшественник маркера 8 опухолевого эндотелиального белка изоформы 2 ; ...		265	8e-70	
ref NP_115584.1	предшественник маркера 8 опухолевого эндотелиального белка изоформы 1 ; ...		265	8e-70	
ref NP_060623.2	предшественник маркера 8 опухолевого эндотелиального белка изоформы 3 ; ...		265	8e-70	
dbj BAC03731.1	неидентифицированный белковый продукт	[Homo sapiens]	234	2e-60	
gb AAP04016.1	Капильярный белок морфогенеза 2	[Homo sapiens]	234	2e-60	
dbj BAB28591.1	неидентифицированный белковый продукт	[Mus musculus]	199	6e-50	

>ref|XP_113625.3| Аналогичный гипотетическому белку 4933430J11 [Homo sapiens]

длина = 483

Фиг. 2

Десять лучших результатов поиска с помощью INSP143 с использованием
BLASTp в неизбыточной базе данных NCBI

INSP143

запрос = INSP143

(608 символа)

База данных все кодирующие последовательности неизбыточной базы GenBank

Трансляции +PDB+SwissProt+PIR+PRF

1 448 673 символа ; 466 090 050 символов

Поиск сделан

Последовательности, обнаруживающие значительное выравнивание				Оценка (биты)	Величина E
ref XP_113625.3	аналогичный гипотетическому белку	4933430J11 [Homo...	1003	0.0	
ref NP_766396.1	гипотетический белок	4933430J11 [Mus musculus] ...	514	e-144	
sp Q9C252 ATR_MOUSE	Предшественник рецептора токсина сибирской язвы (Tumor endo...		290	5e-77	
ref XP_132709.1	кДНК RIKEN 2310008J16 [Mus musculus]		290	5e-77	
ref NP_115584.1	предшественник маркера 8 опухолевого эндотелиального белка изоформы 1 ; ...		288	2e-76	
ref NP_444262.1	предшественник маркера 8 опухолевого эндотелиального белка изоформы 2 ; ...		281	2e-74	
gb AAP04016.1	Капиллярный белок морфогенеза 2 [Homo sapiens]		273	5e-72	
dbj BAC03731.1	неидентифицированный белковый продукт [Homo sapiens]		270	4e-71	
ref NP_060623.2	предшественник маркера 8 опухолевого эндотелиального белка изоформы 3 ; ...		266	8e-70	
dbj BAB28591.1	неидентифицированный белковый продукт [Mus musculus]		223	7e-57	

>ref|XP_113625.3| Аналогичный гипотетическому белку 4933430J11 [Homo sapiens]
длина = 483

Фиг. 3

Десять лучших результатов поиска с помощью INSP144 с использованием BLASTp в неизбыточной базе данных NCBI

INSP144

запрос = INSP144

(631 символа)

База данных: все кодирующие последовательности неизбыточной базы GenBank

Трансляции +PDB+SwissProt+PIR+PRF

1 448 673 символа ; 466 090 050 символов

Поиск сделан

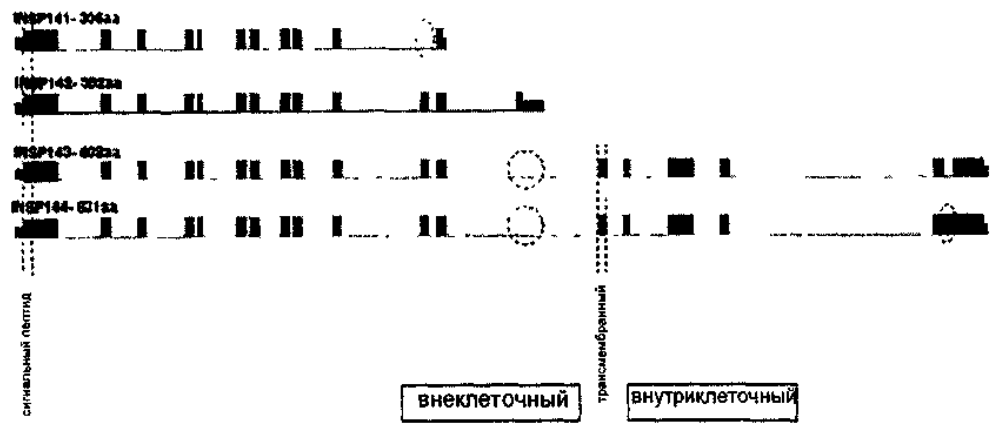
			Оценка (биты)	Вероятность Е
ref XP_113625.3	аналогичный гипотетическому белку	4933430J11 [Homo...	990	0.0
ref NP_766396.1	гипотетический белок	4933430J11 [Mus musculus] ...	503	e-141
sp Q9CZ52 ATR_MOUSE	Предшественник рецептора токсина сибирской язвы (Tumor endo...		290	5e-77
ref XP_132709.1	кДНК RIKEN 2310008J16 [Mus musculus]		290	5e-77
ref NP_115584.1	предшественник маркера 8 опухолевого эндотелиального белка изоформы 1 ; ...		288	3e-76
ref NP_444262.1	предшественник маркера 8 опухолевого эндотелиального белка изоформы 2 ; ...		281	2e-74
gb AAP04016.1	Каплярный белок морфогенеза 2 [Homo sapiens]		273	5e-72
dbj BAC03731.1	неидентифицированный белковый продукт [Homo sapiens]		270	4e-71
ref NP_060623.2	предшественник маркера 8 опухолевого эндотелиального белка изоформы 3 ; ...		266	8e-70
dbj BAB20591.1	неидентифицированный белковый продукт [Mus musculus]		223	8e-57

>ref|XP_113625.3| Аналогичный гипотетическому белку 4933430J11 [Homo sapiens]
длина = 483

Фиг. 4

Выравнивание кодирующих экзонов INSP141, INSP142, INSP143 и INSP144

Предсказания



○ События альтернативного сплайсинга

Фиг. 5

Выравнивание ORF INSP141, INSP142, INSP143, INSP144.

Сигнальный пептид					
INSP141	MGSHESLGPY	FLVFLLLLLL	PPPLFRAGSL	RYHGPDWRIF	HRLALGSRRRA
CLONEDINSP141	MGSHESLGPY	FLVFLLLLLL	PPPLFRAGSL	RYHGPDWRIF	HRLALGSRRRA
INSP142	MGSHESLGPY	FLVFLLLLLL	PPPLFRAGSL	RYHGPDWRIF	HRLALGSRRRA
CLONEDINSP142	MGSHESLGPY	FLVFLLLLLL	PPPLFRAGSL	RYHGPDWRIF	HRLALGSRRRA
INSP143	MGSHESLGPY	FLVFLLLLLL	PPPLFRAGSL	RYHGPDWRIF	HRLALGSRRRA
CLONEDINSP143	MGSHESLGPY	FLVFLLLLLL	PPPLFRAGSL	RYHGPDWRIF	HRLALGSRRRA
INSP144	MGSHESLGPY	FLVFLLLLLL	PPPLFRAGSL	RYHGPDWRIF	HRLALGSRRRA
INSP141	HHHHGPGWRQ	HWRQGGAGHR	CQGSFDLYFI	LDKSGSVNNN	WIDLYMWVEE
CLONEDINSP141	HHHHGPGWRQ	HWRQGGAGHR	CQGSFDLYFI	LDKSGSVNNN	WIDLYMWVEE
INSP142	HHHHGPGWRQ	HWRQGGAGHR	CQGSFDLYFI	LDKSGSVNNN	WIDLYMWVEE
CLONEDINSP142	HHHHGPGWRQ	HWRQGGAGHR	CQGSFDLYFI	LDKSGSVNNN	WIDLYMWVEE
INSP143	HHHHGPGWRQ	HWRQGGAGHR	CQGSFDLYFI	LDKSGSVNNN	WIDLYMWVEE
CLONEDINSP143	HHHHGPGWRQ	HWRQGGAGHR	CQGSFDLYFI	LDKSGSVNNN	WIDLYMWVEE
INSP144	HHHHGPGWRQ	HWRQGGAGHR	CQGSFDLYFI	LDKSGSVNNN	WIDLYMWVEE
INSP141	TVARFQSPNI	RMCFITYSTD	GQTVLPLTSD	KNRIKNGLDQ	LQKIVPDGHT
CLONEDINSP141	TVARFQSPNI	RMCFITYSTD	GQTVLPLTSD	KNRIKNGLDQ	LQKIVPDGHT
INSP142	TVARFQSPNI	RMCFITYSTD	GQTVLPLTSD	KNRIKNGLDQ	LQKIVPDGHT
CLONEDINSP142	TVARFQSPNI	RMCFITYSTD	GQTVLPLTSD	KNRIKNGLDQ	LQKIVPDGHT
INSP143	TVARFQSPNI	RMCFITYSTD	GQTVLPLTSD	KNRIKNGLDQ	LQKIVPDGHT
CLONEDINSP143	TVARFQSPNI	RMCFITYSTD	GQTVLPLTSD	KNRIKNGLDQ	LQKIVPDGHT
INSP144	TVARFQSPNI	RMCFITYSTD	GQTVLPLTSD	KNRIKNGLDQ	LQKIVPDGHT
INSP141	FMQAGFRKAI	QQIESFNNGN	KVPSMIAMT	DGELVAHAFQ	DTLREAQKAR
CLONEDINSP141	FMQAGFRKAI	QQIESFNNGN	KVPSMIAMT	DGELVAHAFQ	DTLREAQKAR
INSP142	FMQAGFRKAI	QQIESFNNGN	KVPSMIAMT	DGELVAHAFQ	DTLREAQKAR
CLONEDINSP142	FMQAGFRKAI	QQIESFNNGN	KVPSMIAMT	DGELVAHAFQ	DTLREAQKAR
INSP143	FMQAGFRKAI	QQIESFNNGN	KVPSMIAMT	DGELVAHAFQ	DTLREAQKAR
CLONEDINSP143	FMQAGFRKAI	QQIESFNNGN	KVPSMIAMT	DGELVAHAFQ	DTLREAQKAR
INSP144	FMQAGFRKAI	QQIESFNNGN	KVPSMIAMT	DGELVAHAFQ	DTLREAQKAR
INSP141	KLGANVYTLG	VADYNLDQIT	AIADSPGHVF	AVENGFKALR	STIDALTSKV
CLONEDINSP141	KLGANVYTLG	VADYNLDQIT	AIADSPGHVF	AVENGFKALR	STIDALTSKV
INSP142	KLGANVYTLG	VADYNLDQIT	AIADSPGHVF	AVENGFKALR	STIDALTSKV
CLONEDINSP142	KLGANVYTLG	VADYNLDQIT	AIADSPGHVF	AVENGFKALR	STIDALTSKV
INSP143	KLGANVYTLG	VADYNLDQIT	AIADSPGHVF	AVENGFKALR	STIDALTSKV
CLONEDINSP143	KLGANVYTLG	VADYNLDQIT	AIADSPGHVF	AVENGFKALR	STIDALTSKV
INSP144	KLGANVYTLG	VADYNLDQIT	AIADSPGHVF	AVENGFKALR	STIDALTSKV
INSP141	CLDVTSEVPS	SECVGEPYHV	VIHGNGFQNL	KKRDEVICRF	IFNESTIIGS
CLONEDINSP141	CLDVTSEVPS	SECVGEPYHV	VIHGNGFQNL	KKRDEVICRF	IFNESTIIGS
INSP142	CLDVTSEVPS	SECVGEPYHV	VIHGNGFQNL	KKRDEVICRF	IFNESTIIDE
CLONEDINSP142	CLDVTSEVPS	SECVGEPYHV	VIHGNGFQNL	KKRDEVICRF	IFNESTIIDE
INSP143	CLDVTSEVPS	SECVGEPYHV	VIHGNGFQNL	KKRDEVICRF	IFNESTIIDE
CLONEDINSP143	CLDVTSEVPS	SECVGEPYHV	VIHGNGFQNL	KKRDEVICRF	IFNESTIIDE
INSP144	CLDVTSEVPS	SECVGEPYHV	VIHGNGFQNL	KKRDEVICRF	IFNESTIIDE
INSP141	TLKSA				
CLONEDINSP141	TLKSA				
INSP142	KPTSIDNNNS	NCPGPKLEKP	GEEYSIEVSL	NKGKTFFKSN	VS7TSTTCPS
CLONEDINSP142	KPTSIDNNNS	NCPGPKLEKP	GEEYSIEVSL	NKGKTFFKSN	VSITS.
INSP143	KPTSIDNNNS	NCPGPKLEKP	GEEYSIEVSL	NKGKTFFKSN	VSITSTTCGI
CLONEDINSP143	KPTSIDNNNS	NCPGPKLEKP	GEEYSIEVSL	NKGKTFFKSN	VSITSTTCGI
INSP144	KPTSIDNNNS	NCPGPKLEKP	GEEYSIEVSL	NKGKTFFKSN	VSITSTTCGI
INSP142	LK				
INSP143	FRNWLYFVPL	LLLVPLLLCC	VWRLCRKQTV	KEPPPVQKPE	KEPEQEKPPS
CLONEDINSP143	FR				
INSP144	FRNWLYFVPL	LLLVPLLLCC	VWRLCRKQTV	KEPPPVQKPE	KEPEQEKPPS
Трансмембранный домен					
INSP143	PPPPPPPPPP	PLPPPPAPV	NTCPTVIICC	CGCQGVGGMR	RIEGLDTEFC
INSP144	PPPPPPPPPP	PLPPPPAPV	NTCPTVIICC	CGCQGVGGMR	RIEGLDTEFC
INSP143	DLSHASCHQV	PWMCCQSRDQ	GRYLSLALAQ	SQYAQAPCCP	RICFPHSQEC
INSP144	DLSHASCHQV	PWMCCQSRDQ	GRYLSLALAQ	SQYAQAPCCP	RICFPHSQEC
INSP143	LSLPQAPCSP	RMCLRHSREC	LALKQARCSP	NICLR-----	-----
INSP144	LSLPQAPCSP	RMCLRHSREC	LALKQARCSP	NICLRHSQHS	RECLARKQAP
INSP143	-----HS	PEYFSQAQTL	CNPKSCLQPS	RECLPLTCSS	RCLRPPARCL
INSP144	CSPRICLRHS	PEYFSQAQTL	CNPKSCLQPS	RECLPLTCSS	RCLRPPARCL
INSP143	RPPSRMLPLL	SPLLRHTAEP	PLSLPPSEPN	F	
INSP144	RPPSRMLPLL	SPLLRHTAEP	PLSLPPSEPN	F	

Фиг. 6

Выравнивание нуклеотидов INSP141, INSP142, INSP143, INSP144

```

INSP143 tgtgctcagcctctctgggccctggcacaggcaccccaagagtgaggtggggtcacagggg
INSP144 tgtgctcagcctctctgggccctggcacaggcaccccaagagtgaggtggggtcacagggg
INSP142 tgtgctcagcctctctgggccctggcacaggcaccccaagagtgaggtggggtcacagggg
INSP141 tgtgctcagcctctctgggccctggcacaggcaccccaagagtgaggtggggtcacagggg
*****

          Сигнальный пептид
          |
INSP143 cagccagataATGGGGAGCCATGAGTCCCTGGGGCCCTACTTCCTGGTCTTCCTGCTGCT
INSP144 cagccagataATGGGGAGCCATGAGTCCCTGGGGCCCTACTTCCTGGTCTTCCTGCTGCT
INSP142 cagccagataATGGGGAGCCATGAGTCCCTGGGGCCCTACTTCCTGGTCTTCCTGCTGCT
INSP141 cagccagataATGGGGAGCCATGAGTCCCTGGGGCCCTACTTCCTGGTCTTCCTGCTGCT
*****
          INSP141-CP1      INSP141-AP1

INSP143 GCTGCTGCTTCCTCCACCGCTTTTATAGAGCAGGAAGCCTTCGGTACCATGGACCTGACTG
INSP144 GCTGCTGCTTCCTCCACCGCTTTTATAGAGCAGGAAGCCTTCGGTACCATGGACCTGACTG
INSP142 GCTGCTGCTTCCTCCACCGCTTTTATAGAGCAGGAAGCCTTCGGTACCATGGACCTGACTG
INSP141 GCTGCTGCTTCCTCCACCGCTTTTATAGAGCAGGAAGCCTTCGGTACCATGGACCTGACTG
*****

INSP143 GAGAATATTTACCGCCTGGCCCTGGGCTCCAGGAGAGCCACCACCACCATGGCCCAGG
INSP144 GAGAATATTTACCGCCTGGCCCTGGGCTCCAGGAGAGCCACCACCACCATGGCCCAGG
INSP142 GAGAATATTTACCGCCTGGCCCTGGGCTCCAGGAGAGCCACCACCACCATGGCCCAGG
INSP141 GAGAATATTTACCGCCTGGCCCTGGGCTCCAGGAGAGCCACCACCACCATGGCCCAGG
*****

INSP143 ATGGAGGCAGCACTGGCGCCAGGGGCAAGCAGGTACACAGATGCCAGGGCTCATTTGACCT
INSP144 ATGGAGGCAGCACTGGCGCCAGGGGCAAGCAGGTACACAGATGCCAGGGCTCATTTGACCT
INSP142 ATGGAGGCAGCACTGGCGCCAGGGGCAAGCAGGTACACAGATGCCAGGGCTCATTTGACCT
INSP141 ATGGAGGCAGCACTGGCGCCAGGGGCAAGCAGGTACACAGATGCCAGGGCTCATTTGACCT
*****

INSP143 CTACTTCATCTTGGACAAGTCTGGCAGCGTGAACAATAACTGGATTGACCTTTATATGTG
INSP144 CTACTTCATCTTGGACAAGTCTGGCAGCGTGAACAATAACTGGATTGACCTTTATATGTG
INSP142 CTACTTCATCTTGGACAAGTCTGGCAGCGTGAACAATAACTGGATTGACCTTTATATGTG
INSP141 CTACTTCATCTTGGACAAGTCTGGCAGCGTGAACAATAACTGGATTGACCTTTATATGTG
*****

INSP143 GGTGGAGGAAACAGTGGCGAGGTTCCAAAGCCCAAAATATTCGGATGTGCTTCATCACCTA
INSP144 GGTGGAGGAAACAGTGGCGAGGTTCCAAAGCCCAAAATATTCGGATGTGCTTCATCACCTA
INSP142 GGTGGAGGAAACAGTGGCGAGGTTCCAAAGCCCAAAATATTCGGATGTGCTTCATCACCTA
INSP141 GGTGGAGGAAACAGTGGCGAGGTTCCAAAGCCCAAAATATTCGGATGTGCTTCATCACCTA
*****

INSP143 CTCCACAGACGGCCAGACTGTCTTGCCACTCACCTCAGACAAGAATAGAATAAAAAACGG
INSP144 CTCCACAGACGGCCAGACTGTCTTGCCACTCACCTCAGACAAGAATAGAATAAAAAACGG
INSP142 CTCCACAGACGGCCAGACTGTCTTGCCACTCACCTCAGACAAGAATAGAATAAAAAACGG
INSP141 CTCCACAGACGGCCAGACTGTCTTGCCACTCACCTCAGACAAGAATAGAATAAAAAACGG
*****

INSP143 TCTTGACCAACTTCAGAAAATTGTGCCTGACGGTCACACATTCATGCAGGCAGGATTTAG
INSP144 TCTTGACCAACTTCAGAAAATTGTGCCTGACGGTCACACATTCATGCAGGCAGGATTTAG
INSP142 TCTTGACCAACTTCAGAAAATTGTGCCTGACGGTCACACATTCATGCAGGCAGGATTTAG
INSP141 TCTTGACCAACTTCAGAAAATTGTGCCTGACGGTCACACATTCATGCAGGCAGGATTTAG
*****

```

Фиг. 7

```

INSP143 AAAGGCAATTCAACAGATCGAAAGTTTCAACTCCGGAAACAAGGTTCCCAGCATGATTAT
INSP144 AAAGGCAATTCAACAGATCGAAAGTTTCAACTCCGGAAACAAGGTTCCCAGCATGATTAT
INSP142 AAAGGCAATTCAACAGATCGAAAGTTTCAACTCCGGAAACAAGGTTCCCAGCATGATTAT
INSP141 AAAGGCAATTCAACAGATCGAAAGTTTCAACTCCGGAAACAAGGTTCCCAGCATGATTAT
*****

INSP143 TGCTATGACTGATGGAGAACTGGTGGCACATGCATTTTCAGGACACTCTCAGAGAAGCTCA
INSP144 TGCTATGACTGATGGAGAACTGGTGGCACATGCATTTTCAGGACACTCTCAGAGAAGCTCA
INSP142 TGCTATGACTGATGGAGAACTGGTGGCACATGCATTTTCAGGACACTCTCAGAGAAGCTCA
INSP141 TGCTATGACTGATGGAGAACTGGTGGCACATGCATTTTCAGGACACTCTCAGAGAAGCTCA
*****

INSP143 AAAGGCTCGGAAACTGGGGGCCAACGTTTACACCCCTGGGTGTGGCTGATTATAATCTGGA
INSP144 AAAGGCTCGGAAACTGGGGGCCAACGTTTACACCCCTGGGTGTGGCTGATTATAATCTGGA
INSP142 AAAGGCTCGGAAACTGGGGGCCAACGTTTACACCCCTGGGTGTGGCTGATTATAATCTGGA
INSP141 AAAGGCTCGGAAACTGGGGGCCAACGTTTACACCCCTGGGTGTGGCTGATTATAATCTGGA
*****

INSP143 CCAGATAACAGCAATTGCAGACAGCCCTGGCCACGTGTTTGCAGTGGAGAAATGGCTTCAA
INSP144 CCAGATAACAGCAATTGCAGACAGCCCTGGCCACGTGTTTGCAGTGGAGAAATGGCTTCAA
INSP142 CCAGATAACAGCAATTGCAGACAGCCCTGGCCACGTGTTTGCAGTGGAGAAATGGCTTCAA
INSP141 CCAGATAACAGCAATTGCAGACAGCCCTGGCCACGTGTTTGCAGTGGAGAAATGGCTTCAA
*****
                                     INSP143-CP3
INSP143 CCAGATAACAGCAATTGCAGACAGCCCTGGCCACGTGTTTGCAGTGGAGAAATGGCTTCAA
INSP144 CCAGATAACAGCAATTGCAGACAGCCCTGGCCACGTGTTTGCAGTGGAGAAATGGCTTCAA
INSP142 CCAGATAACAGCAATTGCAGACAGCCCTGGCCACGTGTTTGCAGTGGAGAAATGGCTTCAA
INSP141 CCAGATAACAGCAATTGCAGACAGCCCTGGCCACGTGTTTGCAGTGGAGAAATGGCTTCAA
*****

INSP143 GGCCCTGAGAAGCACCATTGATGCCCTCACGTCAAAGGTCTGTCTTGATGTGACATCGGT
INSP144 GGCCCTGAGAAGCACCATTGATGCCCTCACGTCAAAGGTCTGTCTTGATGTGACATCGGT
INSP142 GGCCCTGAGAAGCACCATTGATGCCCTCACGTCAAAGGTCTGTCTTGATGTGACATCGGT
INSP141 GGCCCTGAGAAGCACCATTGATGCCCTCACGTCAAAGGTCTGTCTTGATGTGACATCGGT
*****

INSP143 GGAGCCTTCCTCTGAGTGTGTAGGAGAACCCTACCATGTGGTTATTCATGGAAATGGCTT
INSP144 GGAGCCTTCCTCTGAGTGTGTAGGAGAACCCTACCATGTGGTTATTCATGGAAATGGCTT
INSP142 GGAGCCTTCCTCTGAGTGTGTAGGAGAACCCTACCATGTGGTTATTCATGGAAATGGCTT
INSP141 GGAGCCTTCCTCTGAGTGTGTAGGAGAACCCTACCATGTGGTTATTCATGGAAATGGCTT
*****

INSP143 TCAGAAATCTAAAGAAACGGGATGAAGTTATTTGCAGATTTATCTTCAATGAAAGCACTAT
INSP144 TCAGAAATCTAAAGAAACGGGATGAAGTTATTTGCAGATTTATCTTCAATGAAAGCACTAT
INSP142 TCAGAAATCTAAAGAAACGGGATGAAGTTATTTGCAGATTTATCTTCAATGAAAGCACTAT
INSP141 TCAGAAATCTAAAGAAACGGGATGAAGTTATTTGCAGATTTATCTTCAATGAAAGCACTAT
*****
                                     INSP141-AP2
INSP143 CATTTGATGAAAAGCCAACCAAGTATCGACAATAATTCCATGAATTGCCCTGGGCCAAAAC
INSP144 CATTTGATGAAAAGCCAACCAAGTATCGACAATAATTCCATGAATTGCCCTGGGCCAAAAC
INSP142 CATTTGATGAAAAGCCAACCAAGTATCGACAATAATTCCATGAATTGCCCTGGGCCAAAAC
INSP141 CATTTG-----
*****

INSP143 AGAAAAACCTGGAGAGGAGTACTCTATTGAAGTCAGCTTGAACAAAGGCAAAACATTCTT
INSP144 AGAAAAACCTGGAGAGGAGTACTCTATTGAAGTCAGCTTGAACAAAGGCAAAACATTCTT
INSP142 AGAAAAACCTGGAGAGGAGTACTCTATTGAAGTCAGCTTGAACAAAGGCAAAACATTCTT
INSP141 -----GGAGTACTCTATTGAAGTCAGCTtga
*****
                                     INSP141-AP2
                                     INSP143-AP1
INSP143 CAAGAGCAATGTCAGCATCACCAGCACCACATGT-----
INSP144 CAAGAGCAATGTCAGCATCACCAGCACCACATGT-----
INSP142 CAAGAGCAATGTCAGCATCACCAGCACCACATGTCTCTTAAAGtag
*****
                                     INSP141-CP2

```

Фиг. 7 (продолжение)

INSP143-AP1	Трансмембранный домен	INSP143-CP4
-------------	-----------------------	-------------

```

INSP143 ---GGCATTTCGGCAACTGGCTCTATTTGTGCCACTCCTGCTGCTTGTGCCACTGCTG
INSP144 ---GGCATTTCGGCAACTGGCTCTATTTGTGCCACTCCTGCTGCTTGTGCCACTGCTG
-----*****

```

INSP143-CP4

```

INSP143 CTGTGTTGTGCTGGCGGCTGTGCCGCAAGCAGACTGTCAAGGAGCCACCACCTGTGCAG
INSP144 CTGTGTTGTGCTGGCGGCTGTGCCGCAAGCAGACTGTCAAGGAGCCACCACCTGTGCAG
*****

INSP143 AAGCCAGAAAAGGAGCCAGAGCAGGAAAAACCACCATCACCACCACCACCGCCTCCGCCT
INSP144 AAGCCAGAAAAGGAGCCAGAGCAGGAAAAACCACCATCACCACCACCACCGCCTCCGCCT
*****

INSP143 CCACCACCTCCACTCCCACCTCCGCCCCAGCTCCTGTAAACACCTGCCCACTGTGATT
INSP144 CCACCACCTCCACTCCCACCTCCGCCCCAGCTCCTGTAAACACCTGCCCACTGTGATT
*****

INSP143 ATTTGTTGCTGTGGATGCCAAGGAGTGGGCGGGATGAGAAGGATAGAGGGCAATCTGGAT
INSP144 ATTTGTTGCTGTGGATGCCAAGGAGTGGGCGGGATGAGAAGGATAGAGGGCAATCTGGAT
*****

INSP143 ACCTTTTGTGACCTCTCTCAGCAAGCTGCCACCAGGTGCCATGGATGTGTGTGTCAGAGC
INSP144 ACCTTTTGTGACCTCTCTCAGCAAGCTGCCACCAGGTGCCATGGATGTGTGTGTCAGAGC
*****

INSP143 AGGGACCAGGGGAGGTACCTCAGCTTAGCCCTTGACACAGTCCCAATATGCACAGGCTCCC
INSP144 AGGGACCAGGGGAGGTACCTCAGCTTAGCCCTTGACACAGTCCCAATATGCACAGGCTCCC
*****

INSP143 TGCTGCCCAAGGATCTGCTTTCCACACAGCCAGGAGTGCCCTTCCCTACCACAGGCTCCC
INSP144 TGCTGCCCAAGGATCTGCTTTCCACACAGCCAGGAGTGCCCTTCCCTACCACAGGCTCCC
*****

INSP143 TGCAGCCCAAGGATGTGCCTGAGACACAGCCGGGAGTGCCCTCGCCCTCAAACAGGCTCGC
INSP144 TGCAGCCCAAGGATGTGCCTGAGACACAGCCGGGAGTGCCCTCGCCCTCAAACAGGCTCGC
*****

INSP143 TGCAGCCCAACAT-----
INSP144 TGCAGCCCAACATCTGCCTGAGACACAGCCAACACAGCAGGGAGTGCCTTGCCCGCAA
*****

INSP143 -----CTGCCTGAGACACAGCCGGAGTACTTTTCCCAAGCA
INSP144 CAGGCTCCCTGCAGCCCAAGGATCTGCCTGAGACACAGCCGGAGTACTTTTCCCAAGCA
*****

INSP143 CAGACTCTGTGCAACCCAAAGAGCTGCCTTCAACCCAGCCGGGAGTGCCCTCCCCCTCACC
INSP144 CAGACTCTGTGCAACCCAAAGAGCTGCCTTCAACCCAGCCGGGAGTGCCCTCCCCCTCACC
*****

INSP143 TGCTCCTCCAGGTGCCGCTCCCCCAGCTAGGTGCTTGAGGCCTCCCTCCAGGATGCTG
INSP144 TGCTCCTCCAGGTGCCGCTCCCCCAGCTAGGTGCTTGAGGCCTCCCTCCAGGATGCTG
*****

INSP143 CCGCTGCTGTCCCACTGCTCAGGCACACGGCAGAACCCCTTGTCACTCCCCCCTCA
INSP144 CCGCTGCTGTCCCACTGCTCAGGCACACGGCAGAACCCCTTGTCACTCCCCCCTCA
*****

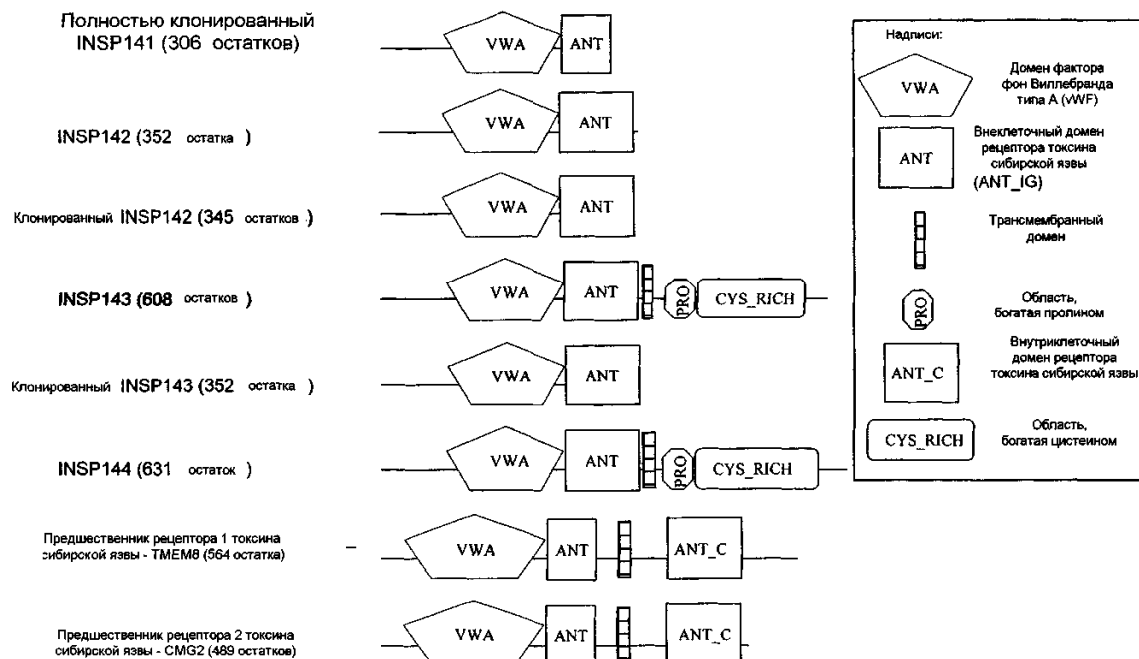
INSP143 GAGCCCAACTTCTaa
INSP144 GAGCCCAACTTCTaa
*****

```

Фиг. 7 (продолжение)

Схематическое представление предсказанных и клонированных

INSP141, INSP142, INSP143, INSP144, TMEM8 и CMG2.



Фиг. 8

Выравнивание аминокислот внеклеточных доменов **vWFA** и **ANT_IG**
в **INSP141, INSP142, INSP143, INSP144, TMEM8** и **CMG2**.

ATR1_HUMAN	-----CGGRREDGGPACYGGFDLYFILDKSGSVLHHWNEIYYFVEQLAHKFISPOLRMSF
ATR2_HUMAN	-----OEQPSRRRFDLYFVLDKSGSVANNWIEIYNFVQQLAERFVSPMRLSF
INSP141	GPGWRQHWROGQAGHRCQGSFDLYFILDKSGSVNNWIDLYMWVEETVARFQSPNIRMCF
INSP142	GPGWRQHWROGQAGHRCQGSFDLYFILDKSGSVNNWIDLYMWVEETVARFQSPNIRMCF
INSP143	GPGWRQHWROGQAGHRCQGSFDLYFILDKSGSVNNWIDLYMWVEETVARFQSPNIRMCF
INSP144	GPGWRQHWROGQAGHRCQGSFDLYFILDKSGSVNNWIDLYMWVEETVARFQSPNIRMCF
	: * : *

	домен vWFA
ATR1_HUMAN	IVFSTRGTTILMKLTEDREQIRQGLEELQKVLPGGDTYMHEGFERASEQIYYENRQGYRTA
ATR2_HUMAN	IVFSSQATIIPLTGDGKISKGLEDLKRVSPVGETYIHEGLKLANEQIQK-A-GGLKTS
INSP141	ITYSTDGQTVLPLTSDKNRIKNGLDQLQKIVPDGHTFMQAGFRKAIQIESFN-SGNKVP
INSP142	ITYSTDGQTVLPLTSDKNRIKNGLDQLQKIVPDGHTFMQAGFRKAIQIESFN-SGNKVP
INSP143	ITYSTDGQTVLPLTSDKNRIKNGLDQLQKIVPDGHTFMQAGFRKAIQIESFN-SGNKVP
INSP144	ITYSTDGQTVLPLTSDKNRIKNGLDQLQKIVPDGHTFMQAGFRKAIQIESFN-SGNKVP
	* : *

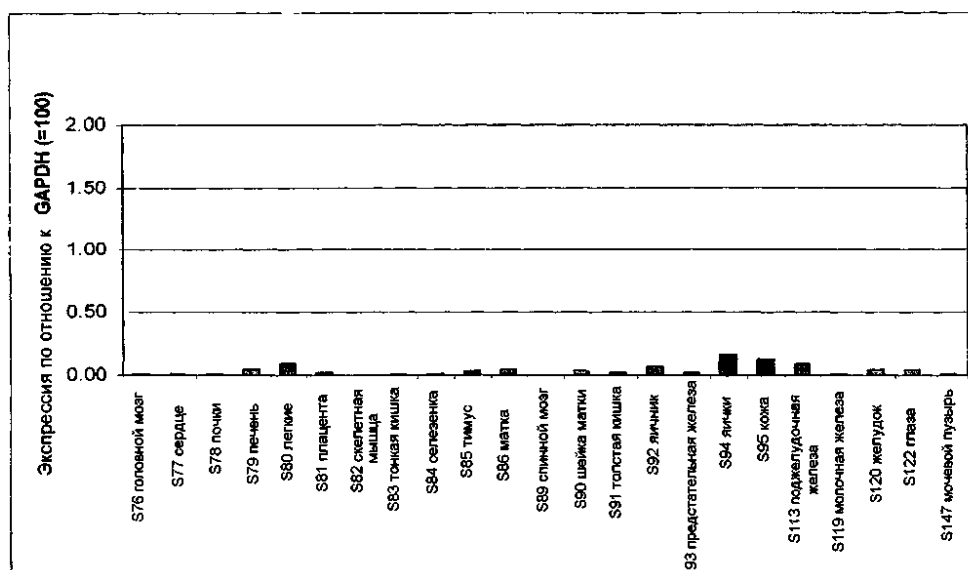
	домен vWFA
ATR1_HUMAN	SVIIALTDGELHEDLFFYSEREANRSRLGAIVYCVGVKDFNETQLARIADSKDHVFPVN
ATR2_HUMAN	SIIIALTDGKLDGLVPSYAEKAKISRLGASVYCVGVLDFFEQAQLERIASQEVFPVK
INSP141	SMIIAMTDGELVAHAFQDTLREAQKARKLGANVYTLGVADYNLDQITAIADSPGHVFAVE
INSP142	SMIIAMTDGELVAHAFQDTLREAQKARKLGANVYTLGVADYNLDQITAIADSPGHVFAVE
INSP143	SMIIAMTDGELVAHAFQDTLREAQKARKLGANVYTLGVADYNLDQITAIADSPGHVFAVE
INSP144	SMIIAMTDGELVAHAFQDTLREAQKARKLGANVYTLGVADYNLDQITAIADSPGHVFAVE
	* : *

	vWFA
ATR1_HUMAN	DGFQALQGIHSILKKSCIEILAAEPSTICAGESFQVVRGNGFRHARNVDRVLCSEFKIN
ATR2_HUMAN	GGFQALKGIINSILAQSCTEILELQPSVVCVGEFQIVLSGRGFMLGSRNGSVLCTYTVN
INSP141	NGFKALRSTIDALTSKVCLDVTSEPSSECVGEPIYHVVIHGNGFQNLKKRDEVICRFIFN
INSP142	NGFKALRSTIDALTSKVCLDVTSEPSSECVGEPIYHVVIHGNGFQNLKKRDEVICRFIFN
INSP143	NGFKALRSTIDALTSKVCLDVTSEPSSECVGEPIYHVVIHGNGFQNLKKRDEVICRFIFN
INSP144	NGFKALRSTIDALTSKVCLDVTSEPSSECVGEPIYHVVIHGNGFQNLKKRDEVICRFIFN
	* : *

	домен ANT_IG
ATR1_HUMAN	DSVTLNEKPFS
ATR2_HUMAN	ETVYTSVKPVS
INSP141	ESTIIGSTLLK
INSP142	ESTIIDEKPTS
INSP143	ESTIIDEKPTS
INSP144	ESTIIDEKPTS
	: *
	ANT_IG

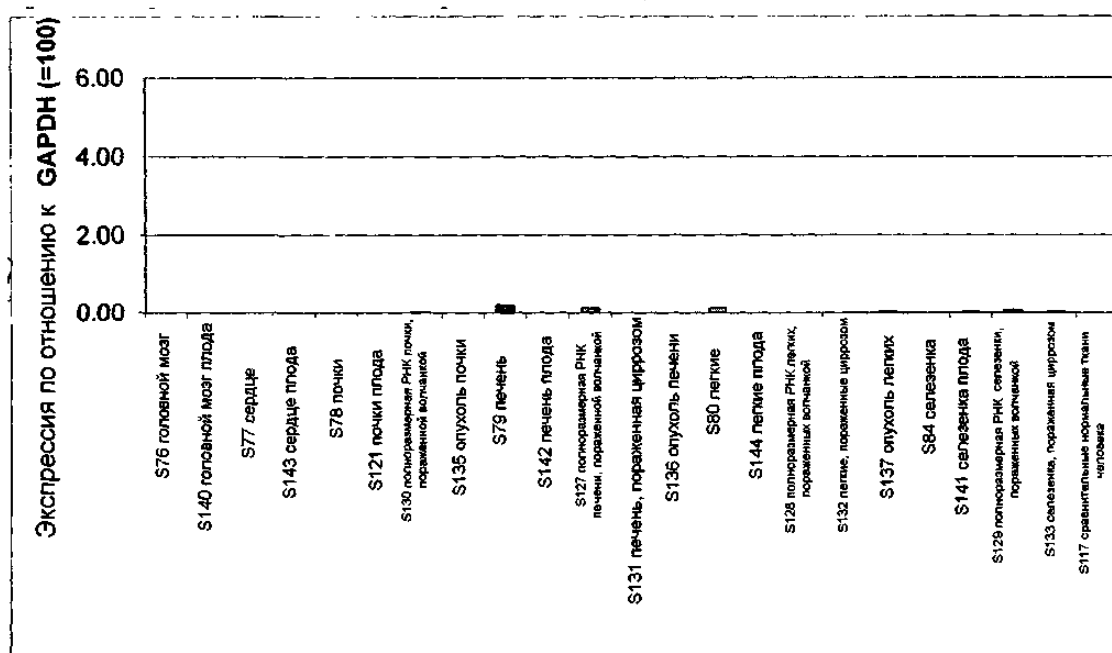
Фиг. 9

Экспрессия **INSP142** в основных человеческих тканях, измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TaqMan)



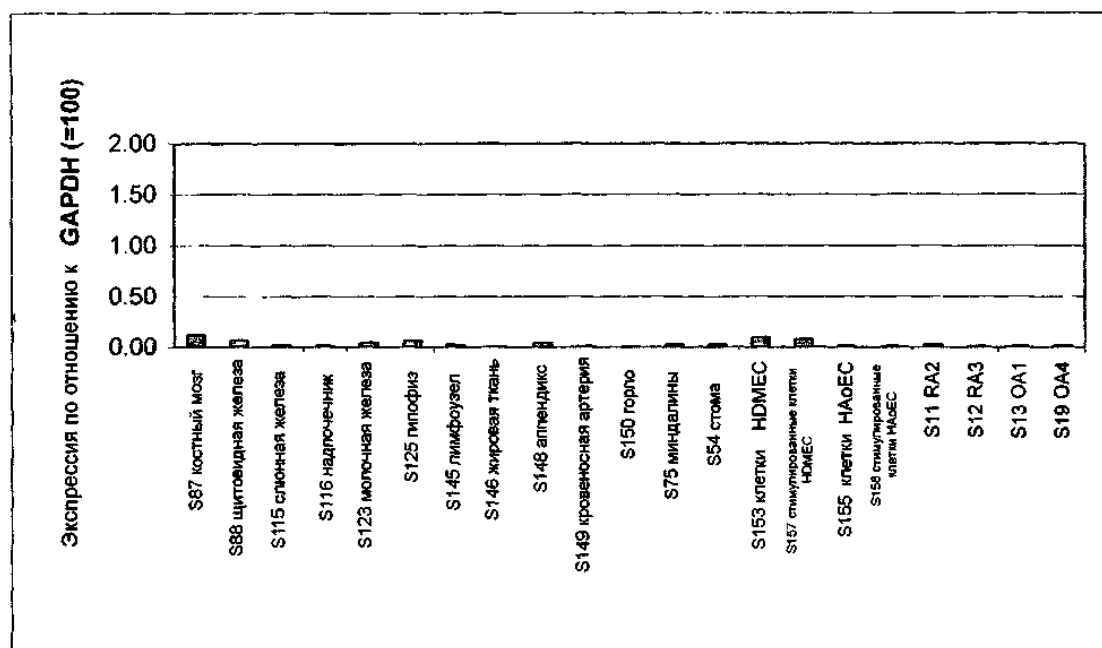
Фиг. 10

Экспрессия INSP142 в сравнительных человеческих тканях, измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TaqMan)



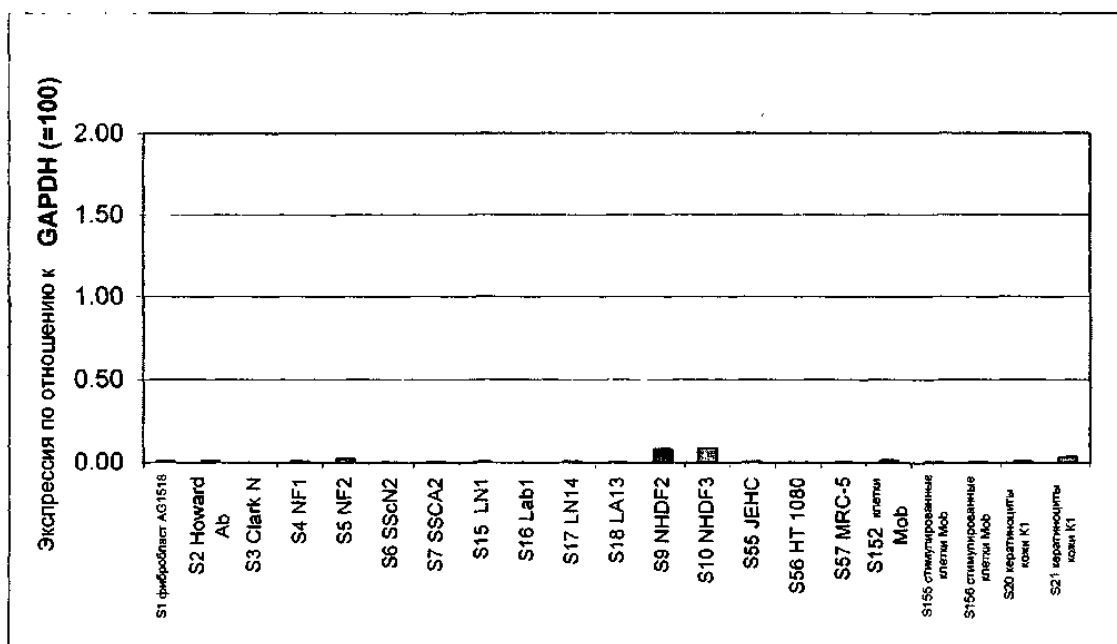
Фиг. 11

Экспрессия INSP142 в секреторных и иммунных тканях, измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TaqMan).



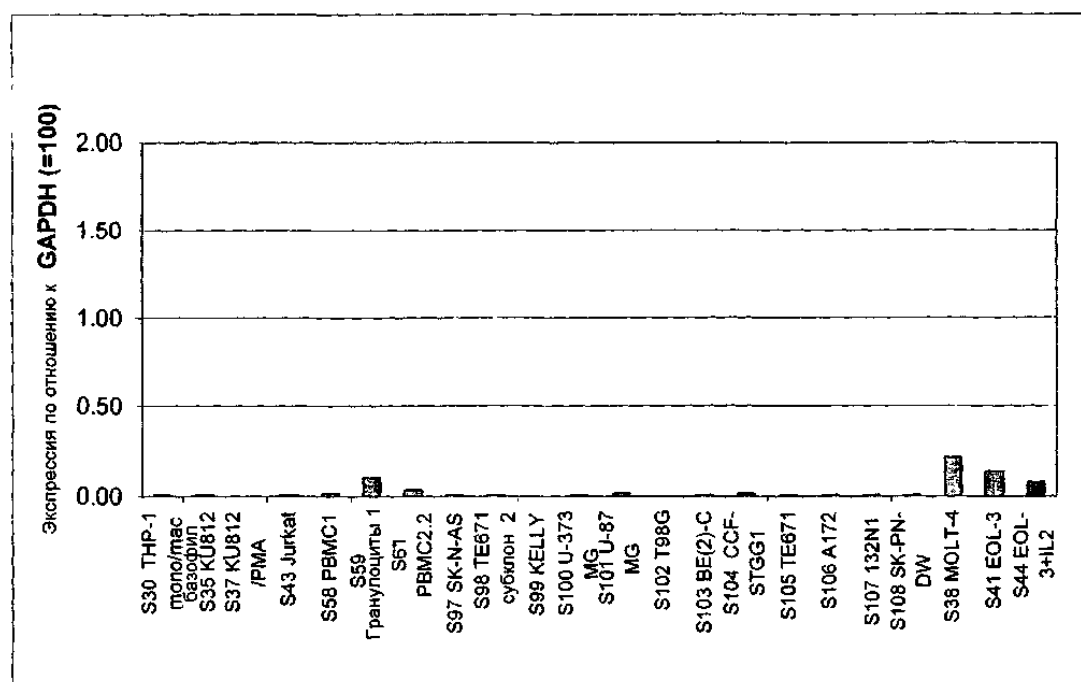
Фиг. 12

Экспрессия INSP142 в первичных клетках и клеточных линиях, измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TaqMan)



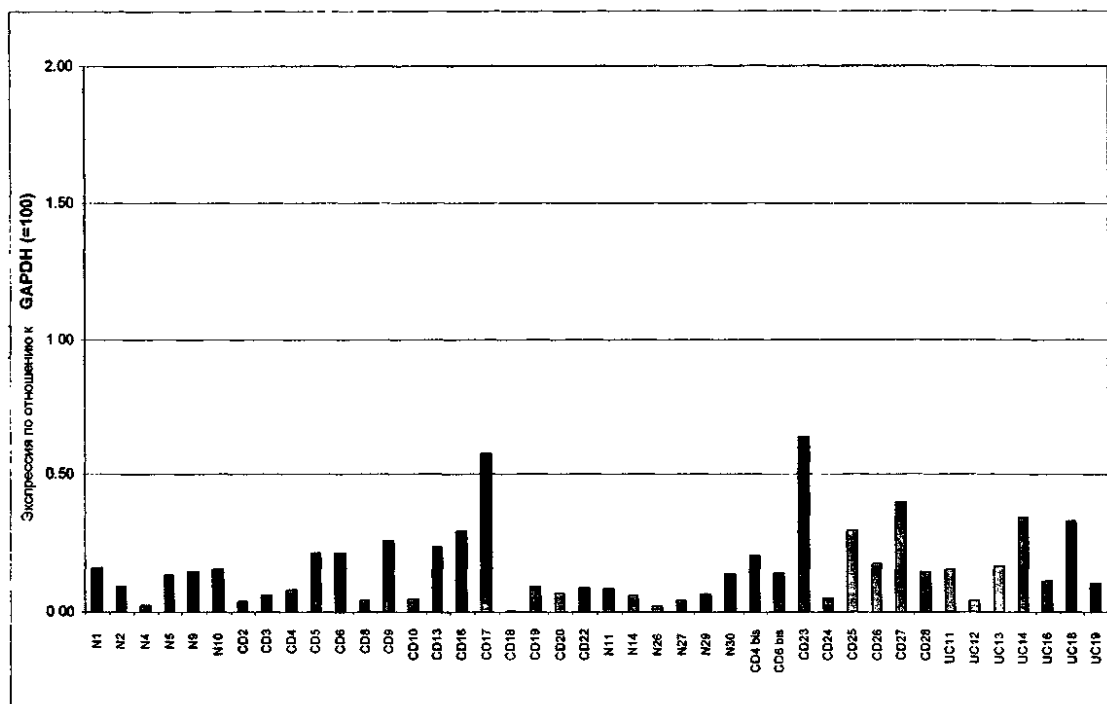
Фиг. 13

Экспрессия INSP142 в первичных клетках и клеточных линиях иммунной системы или ЦНС, измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TaqMan).



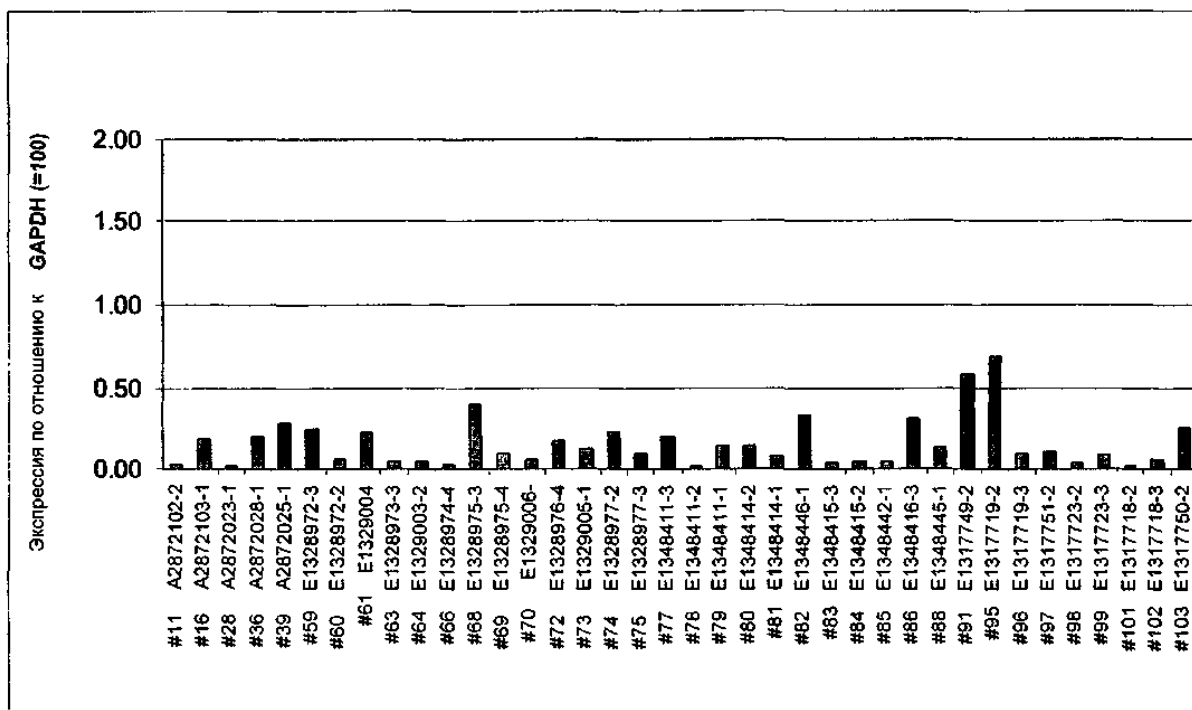
Фиг. 14

Экспрессия INSP142 в биоптатах, взятых из пораженной толстой кишки и подвздошной кишки, измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TagMan)



Фиг. 15

Экспрессия INSP142 в биоптатах, взятых из пораженной кожи после проведения клинических испытаний для IL18BP, измеренная с помощью ОТ-ПЦР (TagMan).



Фиг. 16

Список последовательностей

<110> ARES TRADING S.A.
 <120> БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ДОМЕНЫ vWFA И/ИЛИ ANT_IG
 <130> P038568WO
 <140> PCT/GB2005/004191
 <141> 2005-10-28
 <150> GB 0423974.5
 <151> 2004-10-28
 <160> 169
 <170> SeqWin99, version 1.02
 <210> 1
 <211> 248
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 atggggagcc atgagtcacct ggggccctac ttccctggtct tcctgctgct gctgctgctt 60
 cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtaaccatg gacctgactg gagaatatatt 120
 caccgcctgg ccctggggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggt catttgacct ctacttcac 240
 ttggacaa 248
 <210> 2
 <211> 83
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30
 His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45
 Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60
 Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys
 <210> 3
 <211> 72
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 gtctggcagc gtgaacaata actggattga cctttatatg tgggtggagg aaacagtggc 60
 gaggttccaa ag 72
 <210> 4

```

<211> 24
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 4
Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu
1 5 10 15

Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
20

<210> 5
<211> 72
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 5

cccaaatatt cggatgtgct tcacaccta ctccacagac ggccagactg tcttgccact 60
cacctcagac aa 72

<210> 6
<211> 24
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 6
Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
1 5 10 15

Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys
20

<210> 7
<211> 82
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 7
gaatagaata aaaaacggtc ttgaccaact tcagaaaatt gtgcctgacg gtcacacatt 60
catgcaggca ggatttagaa ag 82

<210> 8
<211> 27
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 8
Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp
1 5 10 15

Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys
20 25

<210> 9
<211> 34
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 9
gcaattcaac agatcgaaaag tttcaactcc ggaa 34

<210> 10

```

```

<211> 12
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 10
Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn
1          5          10

<210> 11
<211> 77
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 11
acaagggttc cagcatgatt attgctatga ctgatggaga actggtggca catgcatttc 60
aggacactct cagagaa 77

<210> 12
<211> 25
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 12
Lys Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala
1          5          10          15

His Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu
          20          25

<210> 13
<211> 69
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 13
gctcaaaagg ctgggaaact gggggccaac gtttacaccc tgggtgtggc tgattataat 60
ctggaccag 69

<210> 14
<211> 23
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 14
Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val
1          5          10          15

Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln
          20

<210> 15
<211> 81
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 15
ataacagcaa ttgcagacag ccttgccac gtgtttgcag tggagaatgg cttcaaggcc 60
ctgagaagca ccattgatgc c 81

<210> 16
<211> 27
<212> Белок
<213> Homo sapiens

```

<400> 16
 Ile Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn
 1 5 10 15
 Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala
 20 25
 <210> 17
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 ctcacgtcaa aggtctgtct tgatgtgaca tcggtggagc ctctctctga gtgtgtagga 60
 g 61
 <210> 18
 <211> 21
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Cys Val Gly Glu
 20
 <210> 19
 <211> 99
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 aaccctacca tgtggttatt catggaaatg gctttcagaa tctaaagaaa cgggatgaag 60
 ttatttcag atttatcttc aatgaaagca ctatcattg 99
 <210> 20
 <211> 33
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Pro Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys
 1 5 10 15
 Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile
 20 25 30
 Gly
 <210> 21
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 ggagtactct attgaagtca gcttga 26
 <210> 22
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 22
Ser Thr Leu Leu Lys Ser Ala
1 5

<210> 23
<211> 921
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 23
atggggagcc atgagtcctt ggggccctac ttcctgggtct tctgtgtgct gctgtgtgctt 60
cctccaccgc ttttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatatatt 120
caccgcctgg ccttgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tggcagggct catttgacct ctacttcato 240
ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc tttatatgtg ggtggaggaa 300
acagtggcga ggttcctaaag cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac 360
ggccagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcattgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
caacagatcg aaagtttcaa ctccggaaac aaggttccca gcatgattat tgctatgact 540
gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
gaaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataactctga ccagataaca 660
gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga 720
agcaccattg atgccctcac gtcaaaggtc tgtcttgatg tgacatcggg ggagccttcc 780
tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta 840
aagaaacggg atgaagttat ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgggagt 900
actctattga agtcagcttg a 921

<210> 24
<211> 306
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 24
Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
20 25 30

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
35 40 45

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
50 55 60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
65 70 75 80

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
85 90 95

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
100 105 110

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
115 120 125

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
130 135 140

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
145 150 155 160

Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
 165 170 175
 Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
 180 185 190
 Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
 195 200 205
 Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
 210 215 220
 Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
 225 230 235 240
 Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser
 245 250 255
 Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile
 260 265 270
 His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys
 275 280 285
 Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Gly Ser Thr Leu Leu Lys
 290 295 300
 Ser Ala
 305

<210> 25
 <211> 248
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 atggggagcc atgagtcctt ggggccctac ttcctggtct tccctgctgct gctgctgctt 60
 cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatattt 120
 caccgcctgg ccctggggtc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtt catttgacct ctacttcac 240
 ttggacaa 248

<210> 26
 <211> 83
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30
 His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45
 Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60
 Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80

Leu Asp Lys

<210> 27
 <211> 72
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 gtctggcagc gtgaacaata actggattga cctttatatg tgggtggagg aaacagtggc 60
 gaggttccaa ag 72

<210> 28
 <211> 24
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu
 1 5 10 15

Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
 20

<210> 29
 <211> 72
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac ggccagactg tcttgccact 60
 cacctcagac aa 72

<210> 30
 <211> 24
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
 1 5 10 15

Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys
 20

<210> 31
 <211> 82
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 gaatagaata aaaaacggtc ttgaccaact tcagaaaatt gtgcctgacg gtcacacatt 60
 catgcaggca ggatttagaa ag 82

<210> 32
 <211> 27
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp
 1 5 10 15

Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys
20 25

<210> 33
<211> 34
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 33
gcaattcaac agatcgaaag tttcaactcc ggaa 34

<210> 34
<211> 12
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 34
Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn
1 5 10

<210> 35
<211> 77
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 35
acaagggttc cagcatgatt attgctatga ctgatggaga actgggtggca catgcatttc 60
aggacactct cagagaa 77

<210> 36
<211> 25
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 36
Lys Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala
1 5 10 15

His Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu
20 25

<210> 37
<211> 69
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 37
gctcaaaagg ctcggaact gggggccaac gtttacaccc tgggtgtggc tgattataat 60
ctggaccag 69

<210> 38
<211> 23
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 38
Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val
1 5 10 15

Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln
20

<210> 39

```

<211>      81
<212>      ДНК
<213>      Homo sapiens

<400>      39
ataacagcaa ttgcagacag ccctggccac gtgtttgcag tggagaatgg cttcaaggcc      60
ctgagaagca ccattgatgc c                                         81

<210>      40
<211>      27
<212>      Белок
<213>      Homo sapiens

<400>      40
Ile Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn
1              5              10              15

Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala
              20              25

<210>      41
<211>      61
<212>      ДНК
<213>      Homo sapiens

<400>      41
ctcacgtcaa aggtctgtct tgatgtgaca tcgggtggagc cttcctctga gtgtgtagga      60
g                                         61

<210>      42
<211>      21
<212>      Белок
<213>      Homo sapiens

<400>      42
Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser
1              5              10              15

Glu Cys Val Gly Glu
              20

<210>      43
<211>      99
<212>      ДНК
<213>      Homo sapiens

<400>      43
aaccctacca tgtggttatt catggaaatg gctttcagaa tctaaagaaa cgggatgaag      60
ttatttgcag atttatcttc aatgaaagca ctatcattg                                         99

<210>      44
<211>      33
<212>      Белок
<213>      Homo sapiens

<400>      44
Pro Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys
1              5              10              15

Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile
              20              25              30

Asp

```

```

<210> 45
<211> 70
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 45
atgaaaagcc aaccagtatc gacaataatt ccatgaattg ccctgggccca aaactagaaa 60
aacctggaga 70

<210> 46
<211> 23
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 46
Glu Lys Pro Thr Ser Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro
1 5 10 15

Lys Leu Glu Lys Pro Gly Glu
20

<210> 47
<211> 79
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 47
ggagtactct attgaagtca gcttgaacaa aggcaaaaca ttcttcaaga gcaatgtcag 60
catcaccagc accacatgt 79

<210> 48
<211> 26
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 48
Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe Phe Lys
1 5 10 15

Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys
20 25

<210> 49
<211> 15
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 49
ccttctctta agtag 15

<210> 50
<211> 4
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 50
Pro Ser Leu Lys
1

<210> 51
<211> 1059
<212> ДНК

```

<213> Homo sapiens

<400> 51

```

atgggggagcc atgagtcacct gggggccctac ttctgtgtct tctgtgtgtt gctgtgtgtt 60
cctccaccgc ttttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatattt 120
caccgcctgg ccttgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtt catttgacct ctacttcac 240
ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc tttatatgtg ggtggaggaa 300
acagtggcga ggttccaaag cccaaatatt cggatgtgtt tcatcaccta ctccacagac 360
ggccagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcatgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
caacagatcg aaagtttcaa ctccggaaac aaggttccca gcatgattat tgctatgact 540
gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataattctgga ccagataaca 660
gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtgaga atggcttcaa ggccctgaga 720
agcaccattg atgccctcac gtcaaaggtc tgtcttgatg tgacatcggt ggagccttcc 780
tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggott tcagaatcta 840
aagaaaacgg atgaagttaa ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgatgaa 900
aagccaacca gtatcgacaa taattccatg aattgccttg ggccaaaact agaaaaacct 960
ggagaggagt actctattga agtcagcttg aacaaaggca aaacattctt caagagcaat 1020
gtcagcatca ccagcaccac atgtccttct cttagtag 1059

```

<210> 52

<211> 352

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 52

```

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
1          5          10          15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
20          25          30

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
35          40          45

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
50          55          60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
65          70          75          80

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
85          90          95

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
100         105         110

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
115         120         125

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
130         135         140

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
145         150         155         160

Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
165         170         175

Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
180         185         190

```

Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
 195 200 205
 Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
 210 215 220
 Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
 225 230 235 240
 Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser
 245 250 255
 Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile
 260 265 270
 His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys
 275 280 285
 Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser
 290 295 300
 Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro Lys Leu Glu Lys Pro
 305 310 315 320
 Gly Glu Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe
 325 330 335
 Phe Lys Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys Pro Ser Leu Lys
 340 345 350

<210> 53
 <211> 248
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 atggggagcc atgagtcocct gggggccctac ttccctggtct tccctgctgct gctgctgctt 60
 cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cgggtaccatg gacctgactg gagaatattt 120
 caccgcctgg ccttgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggagggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggt catttgacct ctacttcac 240
 ttggacaa 248

<210> 54
 <211> 83
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30
 His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45
 Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60
 Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80

Leu Asp Lys

<210> 55
 <211> 72
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 gtctggcagc gtgaacaata actggattga cctttatatg tgggtggagg aaacagtggc 60
 gaggttccaa ag 72

<210> 56
 <211> 24
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu
 1 5 10 15

Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
 20

<210> 57
 <211> 72
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 57
 cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac ggccagactg tcttgccact 60
 cacctcagac aa 72

<210> 58
 <211> 24
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
 1 5 10 15

Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys
 20

<210> 59
 <211> 82
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 gaatagaata aaaaacggtc ttgaccaact tcagaaaatt gtgcctgacg gtcacacatt 60
 catgcaggca ggatttagaa ag 82

<210> 60
 <211> 27
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp
 1 5 10 15

Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys
 20 25

<210> 61
 <211> 34
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 gcaattcaac agatcgaaag tttcaactcc ggaa 34

<210> 62
 <211> 12
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn
 1 5 10

<210> 63
 <211> 77
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 acaaggttc cagcatgatt attgctatga ctgatggaga actggtggca catgcatttc 60
 aggacactct cagagaa 77

<210> 64
 <211> 25
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 64
 Lys Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala
 1 5 10 15

His Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu
 20 25

<210> 65
 <211> 69
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 gctcaaaagg ctcggaact gggggccaac gtttacaccc tgggtgtggc tgattataat 60
 ctggaccag 69

<210> 66
 <211> 23
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val
 1 5 10 15

Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln
 20

<210> 67
 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 67
 ataacagcaa ttgcagacag ccctggccac gtgtttgcag tggagaatgg cttcaaggcc 60
 ctgagaagca ccattgatgc c 81

<210> 68
 <211> 27
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 68
 Ile Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn
 1 5 10 15
 Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala
 20 25

<210> 69
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 ctcacgtcaa aggtctgtct tgatgtgaca tcggtggagc cttcctctga gtgtgtagga 60
 g 61

<210> 70
 <211> 21
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 70
 Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Cys Val Gly Glu
 20

<210> 71
 <211> 99
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 aaccctacca tgtggttatt catggaaatg gctttcagaa tctaaagaaa cgggatgaag 60
 ttatttgcag atttatcttc aatgaaagca ctatcattg 99

<210> 72
 <211> 33
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 Pro Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys
 1 5 10 15
 Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile
 20 25 30

Asp

<210> 73
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 atgaaaagcc aaccagtatc gacaataatt ccatgaattg ccctggggcca aaactagaaa 60
 aacctggaga 70

<210> 74
 <211> 23
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 74
 Glu Lys Pro Thr Ser Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro
 1 5 10 15
 Lys Leu Glu Lys Pro Gly Glu
 20

<210> 75
 <211> 79
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 75
 ggagtactct attgaagtca gcttgaacaa aggcaaaaca ttcttcaaga gcaatgtcag 60
 catcaccagc accacatgt 79

<210> 76
 <211> 26
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 76
 Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe Phe Lys
 1 5 10 15
 Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys
 20 25

<210> 77
 <211> 90
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 77
 ggcattttcc gcaactggct ctattttgtg ccactcctgc tgcttgtgcc actgctgctg 60
 tgttgtgtct ggcggtgtg ccgcaagcag 90

<210> 78
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 78
 Gly Ile Phe Arg Asn Trp Leu Tyr Phe Val Pro Leu Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Leu Leu Cys Cys Val Trp Arg Leu Cys Arg Lys Gln
 20 25 30

<210> 79
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 79
 actgtcaagg agccaccacc tgtgcagaag ccagaaaag 39

<210> 80
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 80
 Thr Val Lys Glu Pro Pro Pro Val Gln Lys Pro Glu Lys
 1 5 10

<210> 81
 <211> 156
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 81
 gagccagagc aggaaaaacc accatcacca ccaccacgcg ctccgcctcc accacctcca 60
 ctcccacctc cgccccagc tctgtaaac acctgcccga ctgtgattat ttgttgctgt 120
 ggatgccaaag gagtgggcgg gatgagaagg atagag 156

<210> 82
 <211> 52
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 82
 Glu Pro Glu Gln Glu Lys Pro Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Val Asn Thr Cys
 20 25 30

Pro Thr Val Ile Ile Cys Cys Cys Gly Cys Gln Gly Val Gly Gly Met
 35 40 45

Arg Arg Ile Glu
 50

<210> 83
 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 83
 ggcaatctgg ataccttttg tgacctctct cagcgaagct gccaccaggt gccatggatg 60
 tgtgtcaga gcagggacca g 81

<210> 84
 <211> 27
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 84
 Gly Asn Leu Asp Thr Phe Cys Asp Leu Ser His Ala Ser Cys His Gln
 1 5 10 15

Val Pro Trp Met Cys Cys Gln Ser Arg Asp Gln
20 25

<210> 85
<211> 140
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 85
gggagggtacc tcagcttagc ccttgacacag tcccaatatg cacaggctcc ctgctgcccc 60
aggatctgct ttccacacag ccaggagtgc ctttccctac cacaggctcc ctgcagcccc 120
aggatgtgcc tgagacacag 140

<210> 86
<211> 47
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 86
Gly Arg Tyr Leu Ser Leu Ala Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Ala Gln Ala
1 5 10 15

Pro Cys Cys Pro Arg Ile Cys Phe Pro His Ser Gln Glu Cys Leu Ser
20 25 30

Leu Pro Gln Ala Pro Cys Ser Pro Arg Met Cys Leu Arg His Ser
35 40 45

<210> 87
<211> 277
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 87
ccgggagtgc ctgcacctca aacaggctcg ctgcagcccc aacatctgcc tgagacacag 60
cccgaggtac ttttcccaag cacagactct gtgcaaccca aagagctgcc ttcaaccag 120
ccgggagtgc ctccccctca cctgctctct caggtgcgc ctccccccag ctagggtgctt 180
gaggcctccc tccaggatgc tgccgtgct gtcccccactg ctccaggcaca cggcagaacc 240
ccctttgtca ctccccccct cagagcccaa cttctaa 277

<210> 88
<211> 91
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 88
Arg Glu Cys Leu Ala Leu Lys Gln Ala Arg Cys Ser Pro Asn Ile Cys
1 5 10 15

Leu Arg His Ser Pro Glu Tyr Phe Ser Gln Ala Gln Thr Leu Cys Asn
20 25 30

Pro Lys Ser Cys Leu Gln Pro Ser Arg Glu Cys Leu Pro Leu Thr Cys
35 40 45

Ser Ser Arg Cys Arg Leu Pro Pro Ala Arg Cys Leu Arg Pro Pro Ser
50 55 60

Arg Met Leu Pro Leu Leu Ser Pro Leu Leu Arg His Thr Ala Glu Pro
65 70 75 80

Pro Leu Ser Leu Pro Pro Ser Glu Pro Asn Phe
85 90

<210> 89
 <211> 1827
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 89
 atggggagcc atgagtcacct ggggacctac ttcttggtct tcttgtgtgt gctgtgtgtt 60
 cctccaccgc ttttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatattt 120
 caccgcctgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtc catttgacct ctacttcac 240
 ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc ttatatgtg ggtggaggaa 300
 acagtggcga ggttcctaaag cccaaatatt cggatgtgtc tcatcaccta ctccacagac 360
 ggccagactg tcttgccact caccctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
 cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcatgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
 caacagatcg aaagtttcaa ctccggaaac aaggttccca gcatgattat tgctatgact 540
 gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
 aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataactctga ccagataaca 660
 gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga 720
 agcaccattg atgccctcac gtcaaaggtc tgtcttgatg tgacatcggg ggagccttcc 780
 tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta 840
 aagaaacggg atgaagttat ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgatgaa 900
 aagccaacca gtatcgacaa taattccatg aattgccctg ggccaaaact agaaaaacct 960
 ggagaggagt actctattga agtcagcttg aacaaaggca aaacattctt caagagcaat 1020
 gtcagcatca ccagcaccac atgtggcatt ttccgcaact ggctctatct tgtgccactc 1080
 ctgtgtgttg tgccactgct gctgtgttgt gtctggcggc tgtgcgcgaa gcagactgtc 1140
 aaggagccac caccctgtga gaagccagaa aaggagccag agcaggaaaa accaccatca 1200
 ccaccaccac cgcctccgcc tccaccacct ccactcccac ctccgcccc agctcctgta 1260
 aacacctgcc ccactgtgat tattttgtgc tgtggatgcc aaggagtggg cgggatgaga 1320
 aggatagagg gcaatctgga taccttttgt gacctctctc acgcaagctg ccaccagggtg 1380
 ccatggatgt gttgtcagag caggagaccag gggaggtacc tcagcttagc ccttgccacag 1440
 tcccaatatg cacaggctcc ctgctgcccc aggatctgct ttccacacag ccaggagtgc 1500
 ctttccctac cacaggctcc ctgcagcccc aggatgtgcc tgagacacag ccgggagtgc 1560
 ctgccctca aacaggctcg ctgcagcccc aacatctgcc tgagacacag cccggagtac 1620
 ttttcccaag cacagactct gtgcaaccca aagagctgcc ttcaacccag ccgggagtgc 1680
 ctccccctca cctgctctct caggtgccgc ctccccccag ctagggtgctt gaggcctccc 1740
 tccaggatgc tgccgctgct gtccccactg ctcaggcaca cggcagaacc ccctttgtca 1800
 ctccccccct cagagcccaa cttctaa 1827

<210> 90
 <211> 608
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 90
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30
 His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45
 Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60
 Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
 85 90 95
 Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met

013251

100					105					110					
Cys	Phe	Ile	Thr	Tyr	Ser	Thr	Asp	Gly	Gln	Thr	Val	Leu	Pro	Leu	Thr
		115					120					125			
Ser	Asp	Lys	Asn	Arg	Ile	Lys	Asn	Gly	Leu	Asp	Gln	Leu	Gln	Lys	Ile
	130					135					140				
Val	Pro	Asp	Gly	His	Thr	Phe	Met	Gln	Ala	Gly	Phe	Arg	Lys	Ala	Ile
145					150					155					160
Gln	Gln	Ile	Glu	Ser	Phe	Asn	Ser	Gly	Asn	Lys	Val	Pro	Ser	Met	Ile
					165					170					175
Ile	Ala	Met	Thr	Asp	Gly	Glu	Leu	Val	Ala	His	Ala	Phe	Gln	Asp	Thr
			180					185					190		
Leu	Arg	Glu	Ala	Gln	Lys	Ala	Arg	Lys	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Tyr	Thr
		195					200					205			
Leu	Gly	Val	Ala	Asp	Tyr	Asn	Leu	Asp	Gln	Ile	Thr	Ala	Ile	Ala	Asp
	210					215					220				
Ser	Pro	Gly	His	Val	Phe	Ala	Val	Glu	Asn	Gly	Phe	Lys	Ala	Leu	Arg
225					230					235					240
Ser	Thr	Ile	Asp	Ala	Leu	Thr	Ser	Lys	Val	Cys	Leu	Asp	Val	Thr	Ser
			245						250					255	
Val	Glu	Pro	Ser	Ser	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Pro	Tyr	His	Val	Val	Ile
			260					265					270		
His	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Leu	Lys	Lys	Arg	Asp	Glu	Val	Ile	Cys
		275					280				285				
Arg	Phe	Ile	Phe	Asn	Glu	Ser	Thr	Ile	Ile	Asp	Glu	Lys	Pro	Thr	Ser
	290					295					300				
Ile	Asp	Asn	Asn	Ser	Met	Asn	Cys	Pro	Gly	Pro	Lys	Leu	Glu	Lys	Pro
305					310					315					320
Gly	Glu	Glu	Tyr	Ser	Ile	Glu	Val	Ser	Leu	Asn	Lys	Gly	Lys	Thr	Phe
			325						330					335	
Phe	Lys	Ser	Asn	Val	Ser	Ile	Thr	Ser	Thr	Thr	Cys	Gly	Ile	Phe	Arg
			340					345					350		
Asn	Trp	Leu	Tyr	Phe	Val	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Pro	Leu	Leu	Leu
		355					360					365			
Cys	Cys	Val	Trp	Arg	Leu	Cys	Arg	Lys	Gln	Thr	Val	Lys	Glu	Pro	Pro
	370					375					380				
Pro	Val	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Glu	Pro	Glu	Gln	Glu	Lys	Pro	Pro	Ser
385					390					395					400
Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro
			405						410				415		
Pro	Ala	Pro	Val	Asn	Thr	Cys	Pro	Thr	Val	Ile	Ile	Cys	Cys	Cys	Gly
			420					425					430		
Cys	Gln	Gly	Val	Gly	Gly	Met	Arg	Arg	Ile	Glu	Gly	Asn	Leu	Asp	Thr

435	440	445
Phe Cys Asp Leu Ser His Ala Ser Cys His Gln Val Pro Trp Met Cys		
450	455	460
Cys Gln Ser Arg Asp Gln Gly Arg Tyr Leu Ser Leu Ala Leu Ala Gln		
465	470	475
Ser Gln Tyr Ala Gln Ala Pro Cys Cys Pro Arg Ile Cys Phe Pro His		
485	490	495
Ser Gln Glu Cys Leu Ser Leu Pro Gln Ala Pro Cys Ser Pro Arg Met		
500	505	510
Cys Leu Arg His Ser Arg Glu Cys Leu Ala Leu Lys Gln Ala Arg Cys		
515	520	525
Ser Pro Asn Ile Cys Leu Arg His Ser Pro Glu Tyr Phe Ser Gln Ala		
530	535	540
Gln Thr Leu Cys Asn Pro Lys Ser Cys Leu Gln Pro Ser Arg Glu Cys		
545	550	555
Leu Pro Leu Thr Cys Ser Ser Arg Cys Arg Leu Pro Pro Ala Arg Cys		
565	570	575
Leu Arg Pro Pro Ser Arg Met Leu Pro Leu Leu Ser Pro Leu Leu Arg		
580	585	590
His Thr Ala Glu Pro Pro Leu Ser Leu Pro Pro Ser Glu Pro Asn Phe		
595	600	605

<210> 91
 <211> 248
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 91
 atggggagcc atgagtcctt gggggcctac ttctgtgtct tctgtgtgct gctgtgtgct 60
 cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatattt 120
 caccgectgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggct catttgacct ctacttcac 240
 ttggacaa 248

<210> 92
 <211> 83
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 92
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30
 His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45
 Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60
 Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile

65 70 75 80

Leu Asp Lys

<210> 93
<211> 72
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 93
gtctggcagc gtgaacaata actggattga cctttatatg tgggtggagg aaacagtggc 60
gaggttccaa ag 72

<210> 94
<211> 24
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 94
Ser Gly Ser Val Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu 60
1 5 10 15 72
Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
20

<210> 95
<211> 72
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 95
cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac ggccagactg tottgccact 60
cacctcagac aa 72

<210> 96
<211> 24
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 96
Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr 60
1 5 10 15 82
Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys
20

<210> 97
<211> 82
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 97
gaatagaata aaaaacggtc ttgaccaact tcagaaaatt gtgcctgacg gtcacacatt 60
catgcaggca ggatttagaa ag 82

<210> 98
<211> 27
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 98

Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp
 1 5 10 15

Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys
 20 25

<210> 99
 <211> 34
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 99
 gcaattcaac agatcgaaag tttcaactcc ggaa 34

<210> 100
 <211> 12
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 100
 Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn
 1 5 10

<210> 101
 <211> 77
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 101
 acaagggttc cagcatgatt attgctatga ctgatggaga actgggtggca catgcatttc 60
 aggacactct cagagaa 77

<210> 102
 <211> 25
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 102
 Lys Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala
 1 5 10 15

His Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu
 20 25

<210> 103
 <211> 69
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 103
 gctcaaaaagg ctcgaaaact gggggccaac gtttacaccc tgggtgtggc tgattataat 60
 ctggaccag 69

<210> 104
 <211> 23
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 104
 Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val
 1 5 10 15

Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln
 20

<210> 105
 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 105
 ataacagcaa ttgcagacag ccctggccac gtgtttgcag tggagaatgg cttcaaggcc 60
 ctgagaagca ccattgatgc c 81

<210> 106
 <211> 27
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 106
 Ile Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn
 1 5 10 15
 Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala
 20 25

<210> 107
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 107
 ctcacgtcaa aggtctgtct tgatgtgaca tcggtggagc cttcctctga gtgtgtagga 60
 g 61

<210> 108
 <211> 21
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 108
 Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Cys Val Gly Glu
 20

<210> 109
 <211> 99
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 109
 aaccctacca tgtggttatt catggaaatg gctttcagaa tctaaagaaa cgggatgaag 60
 ttatttgcag atttatcttc aatgaaagca ctatcattg 99

<210> 110
 <211> 33
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 Pro Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys
 1 5 10 15
 Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile
 20 25 30

Asp

<210> 111
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 111
 atgaaaagcc aaccagtatc gacaataatt ccatgaattg ccctgggcca aaactagaaa 60
 aacctggaga 70

<210> 112
 <211> 23
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 112
 Glu Lys Pro Thr Ser Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro
 1 5 10 15

Lys Leu Glu Lys Pro Gly Glu
 20

<210> 113
 <211> 79
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 113
 ggagtactct attgaagtca gcttgaacaa aggcaaaaca ttcttcaaga gcaatgtcag 60
 catcaccagc accacatgt 79

<210> 114
 <211> 26
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 114
 Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe Phe Lys
 1 5 10 15

Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys
 20 25

<210> 115
 <211> 90
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 115
 ggcattttcc gcaactggct ctattttgtg ccactcctgc tgcttgtgcc actgctgctg 60
 tgttgtgtct ggcggtgtg ccgcaagcag 90

<210> 116
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 116
 Gly Ile Phe Arg Asn Trp Leu Tyr Phe Val Pro Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Leu Cys Cys Val Trp Arg Leu Cys Arg Lys Gln

	20	25	30
<210>	117		
<211>	39		
<212>	ДНК		
<213>	Homo sapiens		
<400>	117		
actgtcaagg agccaccacc tgtgcagaag ccagaaaag			39
<210>	118		
<211>	13		
<212>	Белок		
<213>	Homo sapiens		
<400>	118		
Thr Val Lys Glu Pro Pro Pro Val Gln Lys Pro Glu Lys			
1 5 10			
<210>	119		
<211>	156		
<212>	ДНК		
<213>	Homo sapiens		
<400>	119		
gagccagagc aggaaaaacc accatcacca ccaccaccgc ctccgcctcc accacctcca			60
ctcccacctc cgcccccagc tccctgtaaac acctgcccc ctgtgattat ttgttgcgtg			120
ggatgccaaag gagtgggcgg gatgagaagg atagag			156
<210>	120		
<211>	52		
<212>	Белок		
<213>	Homo sapiens		
<400>	120		
Glu Pro Glu Gln Glu Lys Pro Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro			
1 5 10 15			
Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Val Asn Thr Cys			
20 25 30			
Pro Thr Val Ile Ile Cys Cys Cys Gly Cys Gln Gly Val Gly Gly Met			
35 40 45			
Arg Arg Ile Glu			
50			
<210>	121		
<211>	81		
<212>	ДНК		
<213>	Homo sapiens		
<400>	121		
ggcaatcttg ataccttttg tgacctctct cagcgaagct gccaccaggt gccatggatg			60
tgtgtgcaga gcagggacca g			81
<210>	122		
<211>	27		
<212>	Белок		
<213>	Homo sapiens		
<400>	122		
Gly Asn Leu Asp Thr Phe Cys Asp Leu Ser His Ala Ser Cys His Gln			
1 5 10 15			

Val Pro Trp Met Cys Cys Gln Ser Arg Asp Gln
20 25

<210> 123
<211> 486
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 123
gggaggtacc tcagcttagc ccttgacacag tcccaatatg cacaggetcc ctgctgcccc 60
aggatctgct ttccacacag ccaggagtgc ctttccctac cacaggetcc ctgcagcccc 120
aggatgtgcc tgagacacag ccgggagtgc ctgcccctca aacaggctcg ctgcagcccc 180
aacatctgcc tgagacacag ccaacacagc agggagtgcc ttgcccgcaa acaggctccc 240
tgcagcccaa ggatctgcct gagacacagc ccggagtact ttccccaagc acagactctg 300
tgcaacccaa agagctgcct tcaacccagc cgggagtgcc tccccctcac ctgctcctcc 360
aggtgccgccc tccccccagc taggtgcttg aggcctccct ccaggatgct gcgctgctg 420
tccccactgc tcaggcacac ggcagaaccc cctttgtcac tccccccctc agagcccaac 480
ttctaa 486

<210> 124
<211> 161
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 124
Gly Arg Tyr Leu Ser Leu Ala Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Ala Gln Ala
1 5 10 15

Pro Cys Cys Pro Arg Ile Cys Phe Pro His Ser Gln Glu Cys Leu Ser
20 25 30

Leu Pro Gln Ala Pro Cys Ser Pro Arg Met Cys Leu Arg His Ser Arg
35 40 45

Glu Cys Leu Ala Leu Lys Gln Ala Arg Cys Ser Pro Asn Ile Cys Leu
50 55 60

Arg His Ser Gln His Ser Arg Glu Cys Leu Ala Arg Lys Gln Ala Pro
65 70 75 80

Cys Ser Pro Arg Ile Cys Leu Arg His Ser Pro Glu Tyr Phe Ser Gln
85 90 95

Ala Gln Thr Leu Cys Asn Pro Lys Ser Cys Leu Gln Pro Ser Arg Glu
100 105 110

Cys Leu Pro Leu Thr Cys Ser Ser Arg Cys Arg Leu Pro Pro Ala Arg
115 120 125

Cys Leu Arg Pro Pro Ser Arg Met Leu Pro Leu Leu Ser Pro Leu Leu
130 135 140

Arg His Thr Ala Glu Pro Pro Leu Ser Leu Pro Pro Ser Glu Pro Asn
145 150 155 160

Phe

<210> 125
<211> 1896
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 125

```

atggggagcc atgagtcctt ggggcccctac ttcttggtct tcctgctgct gctgctgctt 60
cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtaaccatg gacctgactg gagaatattt 120
caccgcctgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tggcagggtt catattgacct ctacttcac 240
ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc tttatatgtg ggtggaggaa 300
acagtggcga ggttccaaag cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac 360
ggccagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcattgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
caacagatcg aaagtttcaa ctccggaaac aaggttccca gcatgattat tgctatgact 540
gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggtgatt ataactctgga ccagataaca 660
gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga 720
agcaccattg atgcccctac gtcaaaggct tgtcttgatg tgacatcggt ggagccttcc 780
tctgagtggt taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaattca 840
aagaaacggg atgaagtatt ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgatgaa 900
aagccaacca gtatcgacaa taattccatg aattgccctg ggccaaaact agaaaaacct 960
ggagaggagt actctattga agtcagcttg aacaaaggca aaacattctt caagagcaat 1020
gtcagcatca ccagcaccac atgtggcatt ttccgcaact ggctctatct tgtgccactc 1080
ctgctgcttg tgccactgct gctgtgttgt gtctggcgcc tgtgcgcgaa gcagactgtc 1140
aaggagccac caccgtgtga gaagccagaa aaggagccag agcaggaaaa accaccatca 1200
ccaccaccac cgcctccgcc tccaccacct ccactcccac ctccgcccc agctcctgta 1260
aacacctgcc ccactgtgat tatttgttgc tgtggatgcc aaggagtggg cgggatgaga 1320
aggatagagg gcaatctgga taccttttgt gacctctctc acgcaagctg ccaccagggtg 1380
ccatggatgt gttgtcagag cagggaaccag gggaggtaac tcagcttagc ccttgccacag 1440
tcccaatatg cacaggctcc ctgctgcccaggatctgct ttccacacag ccaggagtgc 1500
ctttccctac cacaggctcc ctgcagccca aggatgtgcc tgagacacag ccgggagtgc 1560
ctcgccctca aacaggctcg ctgcagccca aacatctgcc tgagacacag ccaacacagc 1620
agggagtgcc ttgcccgcga acaggctccc tgcagcccaa ggatctgcct gagacacagc 1680
ccggagtact tttcccaagc acagactctg tgcaacccaa agagctgcct tcaaccacagc 1740
cgggagtgcc tccccctcac ctgctcctcc aggtgcggcc tccccccagc taggtgcttg 1800
aggctccct ccaggatgct gccgtgctg tcccactgc tcaggcacac ggcagaacct 1860
cctttgtcac tccccctc agagcccaac ttctaa 1896

```

<210> 126

<211> 631

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 126

```

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
1 5 10 15

```

```

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
20 25 30

```

```

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
35 40 45

```

```

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
50 55 60

```

```

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
65 70 75 80

```

```

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
85 90 95

```

```

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
100 105 110

```

```

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
115 120 125

```


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

Cys Gln Ser Arg Asp Gln Gly Arg Tyr Leu Ser Leu Ala Leu Ala Gln
465 470 475 480

Ser Gln Tyr Ala Gln Ala Pro Cys Cys Pro Arg Ile Cys Phe Pro His
485 490 495

Ser Gln Glu Cys Leu Ser Leu Pro Gln Ala Pro Cys Ser Pro Arg Met
500 505 510

Cys Leu Arg His Ser Arg Glu Cys Leu Ala Leu Lys Gln Ala Arg Cys
515 520 525

Ser Pro Asn Ile Cys Leu Arg His Ser Gln His Ser Arg Glu Cys Leu
530 535 540

Ala Arg Lys Gln Ala Pro Cys Ser Pro Arg Ile Cys Leu Arg His Ser
545 550 555 560

Pro Glu Tyr Phe Ser Gln Ala Gln Thr Leu Cys Asn Pro Lys Ser Cys
565 570 575

Leu Gln Pro Ser Arg Glu Cys Leu Pro Leu Thr Cys Ser Ser Arg Cys
580 585 590

Arg Leu Pro Pro Ala Arg Cys Leu Arg Pro Pro Ser Arg Met Leu Pro
595 600 605

Leu Leu Ser Pro Leu Leu Arg His Thr Ala Glu Pro Pro Leu Ser Leu
610 615 620

Pro Pro Ser Glu Pro Asn Phe
625 630

<210> 127
<211> 918
<212> DHK
<213> Homo sapiens

<400> 127
atggggagcc atgagtcctt gggggccctac ttcttgggtct tcttgcctgct gctgctgctt 60
cctccaccgc tttttagagc aggaagcctt cggtaaccatg gacctgactg gagaatattt 120
caccgccttg ccttgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtc catttgacct ctacttcac 240
ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc tttatatgtg ggtggaggaa 300
acagtggcga ggttccaaag cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac 360
ggccagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcatgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
caacagatcg aaagtttcaa ctccggaac aaggttccca gcatgattat tgctatgact 540
gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggtgatt ataactctga ccagataaca 660
gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga 720
agcaccattg atgcctcac gtcaaaggtc tgtcttgatg tgacatcggg ggagccttc 780
tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta 840
aagaaacggg atgaagtat ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgggagt 900
actctattga agtcagct 918

<210> 128
<211> 306
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 128
Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
1 5 10 15

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

<210> 129
 <211> 936
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> клонированный INSP141 с гистидиновой меткой

<400> 129

```

atgggggagcc atgagtcacct gggggccctac ttcctggtct tccctgctgct gctgctgctt 60
cctccaccgc ttttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatattt 120
caccgcctgg ccctgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtc catttgacct ctacttcac 240
ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc tttatatgtg ggtggaggaa 300
acagtggcga ggttccaaag cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac 360
ggccagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcattgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
caacagatcg aaagtttcaa ctccggaaac aagggttcca gcatgattat tgctatgaat 540
gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataactctgga ccagataaca 660
gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga 720
agcaccattg atgccctcac gtcaaaggtc tgtcttgatg tgacatcggt ggagccttcc 780
tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta 840
aagaaacggg atgaagttat ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgggagt 900
actctattga agtcagctca ccatcaccat caccat 936

```

<210> 130

<211> 312

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> клонированный INSP141 с гистидиновой меткой

<400> 130

```

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
1          5          10          15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
20          25          30

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
35          40          45

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
50          55          60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
65          70          75          80

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
85          90          95

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
100         105         110

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
115         120         125

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
130         135         140

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
145         150         155         160

Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
165         170         175

Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
180         185         190

```

Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
195 200 205

Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
210 215 220

Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
225 230 235 240

Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser
245 250 255

Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile
260 265 270

His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys
275 280 285

Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Gly Ser Thr Leu Leu Lys
290 295 300

Ser Ala His His His His His His
305 310

<210> 131
<211> 837
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 131
ggaagccttc ggtaccatgg acctgactgg agaatatctc accgcctggc cctgggctcc 60
aggagagccc accaccacca tggcccagga tggaggcagc actggcgcca ggggcaagca 120
ggtcacagat gccagggtc atttgacctc tacttcatct tggacaagtc tggcagcgtg 180
aacaataact ggattgacct ttatatgtgg gtggaggaaa cagtggcgag gttccaaagc 240
ccaaatattc ggatgtgctt catcacctac tccacagacg gccagactgt cttgccactc 300
acctcagaca agaatagaat aaaaaacggc cttgaccaac ttcagaaaat tgtgcctgac 360
ggtcacacat tcatgcaggc aggatttaga aaggcaattc aacagatcga aagtttcaac 420
tccggaaaca aggttcccag catgattatt gctatgactg atggagaact ggtggcacat 480
gcatttcagg acactctcag agaagctcaa aaggctcgga aactgggggc caacgtttac 540
accctgggtg tggctgatta taatctggac cagataacag caattgcaga cagccctggc 600
cacgtgtttg cagtggagaa tggcttcaag gccctgagaa gcaccattga tgcctcaccg 660
tcaaaggctc gtcttgatgt gacatcgggt gagccttctt ctgagtgtgt aggagaaccc 720
taccatgtgg ttattcatgg aaatggcttt cagaatctaa agaaacggga tgaagttatt 780
tgcagattta tcttcaatga aagcactatc attgggagta ctctattgaa gtcagct 837

<210> 132
<211> 279
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 132
Gly Ser Leu Arg Tyr His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu
1 5 10 15
Ala Leu Gly Ser Arg Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg
20 25 30
Gln His Trp Arg Gln Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe
35 40 45
Asp Leu Tyr Phe Ile Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp
50 55 60

Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
 65 70 75 80
 Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
 85 90 95
 Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp
 100 105 110
 Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly
 115 120 125
 Phe Arg Lys Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys
 130 135 140
 Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His
 145 150 155 160
 Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly
 165 170 175
 Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile
 180 185 190
 Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly
 195 200 205
 Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys
 210 215 220
 Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro
 225 230 235 240
 Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg
 245 250 255
 Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Gly
 260 265 270
 Ser Thr Leu Leu Lys Ser Ala
 275

<210> 133

<211> 855

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> клонированный зрелый INSP141 с гистидиновой меткой

<400> 133

ggaagccttc ggtaccatgg acctgactgg agaatatctc accgcctggc cctgggctcc 60
 aggagagccc accaccacca tggcccagga tggaggcagc actggcgcca ggggcaagca 120
 ggtcacagat gccagggctc atttgacctc tacttcatct tggacaagtc tggcagcgtg 180
 aacaataact ggattgacct ttatatgtgg gtggaggaaa cagtggcgag gttccaaaagc 240
 ccaaatattc ggatgtgctt catcacctac tccacagacg gccagactgt cttgccactc 300
 acctcagaca agaatagaat aaaaaacggt cttgaccaac ttcagaaaat tgtgcctgac 360
 ggtcacacat tcatgcaggc aggatttaga aaggcaattc aacagatcga aagtttcaac 420
 tccggaaaca aggttcccag catgattatt gctatgactg atggagaact ggtggcacat 480
 gcatttcagg acactctcag agaagctcaa aaggctcgga aactgggggc caacgtttac 540
 accctgggtg tggctgatta taatctggac cagataacag caattgcaga cagccctggc 600
 cacgtgtttg cagtggagaa tggtctcaag gccctgagaa gcaccattga tgccctcacg 660

```

tcaaagggtct gtcttgatgt gacatcggtg gaggcttctct ctgagtgtgt aggagaaccc 720
taccatgtgg ttattcatgg aaatggcttt cagaatctaa agaaacggga tgaagttatt 780
tgcagattta tcttcaatga aagcaactatc attgggagta ctctattgaa gtcagctcac 840
catcaccatc accat 855

```

<210> 134
 <211> 285
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> клонированный зрелый INSP141 с лиситидиновой меткой

<400> 134
 Gly Ser Leu Arg Tyr His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Gly Ser Arg Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg
 20 25 30
 Gln His Trp Arg Gln Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe
 35 40 45
 Asp Leu Tyr Phe Ile Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp
 50 55 60
 Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
 65 70 75 80
 Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
 85 90 95
 Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp
 100 105 110
 Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly
 115 120 125
 Phe Arg Lys Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys
 130 135 140
 Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His
 145 150 155 160
 Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly
 165 170 175
 Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile
 180 185 190
 Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly
 195 200 205
 Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys
 210 215 220
 Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro
 225 230 235 240
 Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg
 245 250 255
 Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Gly
 260 265 270

Ser Thr Leu Leu Lys Ser Ala His His His His His His
 275 280 285

<210> 135
 <211> 1035
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 135
 atggggagcc atgagtcacct ggggacctac ttctgtgtct tctgtgtgtct gctgtgtgtct 60
 cctccaccgc ttttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatatatt 120
 caccgcctgg ccttgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtc catttgacct ctacttcatc 240
 ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc tttatatgtg ggtggaggaa 300
 acagtggcga ggttccaaag cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac 360
 ggccagactg tcttgccact caccctcagc aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
 cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcatgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
 caacagatcg aaagtgtcaa ctccggaac aaggttccca gcatgattat tgctatgact 540
 gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
 aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataatctgga ccagataaca 660
 gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga 720
 agcaccattg atgcctcac gtcaaaggtc tgtcttgatg tgacatcggg ggaggcttcc 780
 tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaaatcta 840
 aagaaacggg atgaagtatt ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgatgaa 900
 aagccaacca gtatcgacaa taattccatg aattgccctg ggccaaaact agaaaaacct 960
 ggagaggagt actctattga agtcagcttg aacaaaggca aaacattctt caagagcaat 1020
 gtcagcatca ccagc 1035

<210> 136
 <211> 345
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 136
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30
 His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45
 Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60
 Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
 85 90 95
 Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
 100 105 110
 Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
 115 120 125
 Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
 130 135 140
 Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile

145 150 155 160
 Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
 165 170 175
 Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
 180 185 190
 Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
 195 200 205
 Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
 210 215 220
 Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
 225 230 235 240
 Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser
 245 250 255
 Val Glu Ala Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile
 260 265 270
 His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys
 275 280 285
 Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser
 290 295 300
 Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro Lys Leu Glu Lys Pro
 305 310 315 320
 Gly Glu Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe
 325 330 335
 Phe Lys Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser
 340 345

<210> 137
 <211> 1056
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 137
 atggggagcc atgagtcctt gggggccctac ttctgtgtct tctgtgtgct gctgtgtgctt 60
 cctccaccgc ttttttagagc aggaagcctt cggtagcatg gacctgactg gagaatattt 120
 caccgcctgg ccttgggctc caggagagcc caccaccacc atggcccagg atggaggcag 180
 cactggcgcc aggggcaagc aggtcacaga tgccagggtc catttgacct ctacttcac 240
 ttggacaagt ctggcagcgt gaacaataac tggattgacc tttatatgtg ggtggaggaa 300
 acagtggcga ggttccaaag cccaaatatt cggatgtgct tcatcaccta ctccacagac 360
 ggccagactg tcttgccact cacctcagac aagaatagaa taaaaaacgg tcttgaccaa 420
 cttcagaaaa ttgtgcctga cggtcacaca ttcatgcagg caggatttag aaaggcaatt 480
 caacagatcg aaagtgtcaa ctccggaaac aagggttcca gcatgattat tgctatgact 540
 gatggagaac tgggtggcaca tgcatttcag gacactctca gagaagctca aaaggctcgg 600
 aaactggggg ccaacgttta caccctgggt gtggctgatt ataatctgga ccagataaca 660
 gcaattgcag acagccctgg ccacgtgttt gcagtggaga atggcttcaa ggccctgaga 720
 agcaccattg atgccctcac gtcaaaggtc tgtcttgatg tgacatcggt ggagccttcc 780
 tctgagtgtg taggagaacc ctaccatgtg gttattcatg gaaatggctt tcagaatcta 840
 aagaaacggg atgaagtatt ttgcagattt atcttcaatg aaagcactat cattgatgaa 900
 aagccaacca gtatcgacaa taattccatg aattgccttg ggccaaaact agaaaaacct 960
 ggagaggagt actctattga agtcagcttg aacaaaggca aaacattctt caagagcaat 1020
 gtcaagcatca ccagaccac atgtggcatt ttccgc 1056

<210> 138

<211> 352
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 138

```

Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
1          5          10          15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
20          25          30

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
35          40          45

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
50          55          60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
65          70          75          80

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
85          90          95

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
100         105         110

Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
115         120         125

Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
130         135         140

Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
145         150         155         160

Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
165         170         175

Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
180         185         190

Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
195         200         205

Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
210         215         220

Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
225         230         235         240

Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser
245         250         255

Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile
260         265         270

His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys
275         280         285

Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser
290         295         300

Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro Lys Leu Glu Lys Pro

```

305					310					315					320
Gly	Glu	Glu	Tyr	Ser	Ile	Glu	Val	Ser	Leu	Asn	Lys	Gly	Lys	Thr	Phe
				325					330					335	
Phe	Lys	Ser	Asn	Val	Ser	Ile	Thr	Ser	Thr	Thr	Cys	Gly	Ile	Phe	Arg
			340					345				350			

<210>	139
<211>	1074
<212>	ДНК
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> клонированный INSP143 с гистидиновой меткой

<400>	139						
atggggagcc	atgagtgccct	ggggccctac	ttcctggtct	tctgtctgct	gctgctgctt		60
cctccaccgc	tttttagagc	aggaagcctt	cggtaccatg	gacctgactg	gagaatattt		120
caccgcctgg	ccttgggctc	caggagagcc	caccaccacc	atggcccagg	atggaggcag		180
cactggcgcc	aggggcgaagc	aggtcacaga	tgccagggtc	catttgacct	ctacttcate		240
ttggacaagt	ctggcagcgt	gaacaataac	tggattgacc	tttatattgtg	ggtggaggaa		300
acagtggcga	ggttccaaag	cccaaattatt	cggatgtgct	tcattacctt	ctccacagac		360
ggccagactg	tcttgccact	cacctcagac	aagaatagaa	taaaaaacgg	tcttgaccaa		420
cttcagaaaa	ttgtgcctga	cggtcacaca	ttcatgcagg	caggatttag	aaaggcaatt		480
caacagatcg	aaagtttcaa	ctccggaaac	aaggttccca	gcattgattat	tgctatgact		540
gatggagaac	tggtggcaca	tgcatttcag	gacactctca	gagaagctca	aaaggctcgg		600
aaactggggg	ccaacgctta	ccacctgggt	gtggctgatt	ataattcgga	ccagataaca		660
gcaattgcag	acagcccttg	ccacgtgttt	gcagtgagaa	atggcttcaa	ggccctgaga		720
agcaccattg	atgccctcac	gtcaaaggtc	tgtcttgatg	tgacatcggg	ggagccttcc		780
tctgagtgtg	taggagaacc	ctaccatgtg	gttattcatg	gaaatggctt	tcagaatcta		840
aagaaacggg	atgaagttaa	ttgcagattt	atcttcaatg	aaagcactat	cattgatgaa		900
aagccaacca	gtatcgacaa	taattccatt	aattgccttg	ggccaaaact	agaaaaacct		960
ggagaggagt	actctattga	agtcagcttg	aacaagaaggc	aaacattctt	caagagcaat		1020
ctcagccatc	ccagcaccac	atgtgcattt	ttcccaccac	atcaccatca	ccat		1074

<210>	140
<211>	358
<212>	Белок
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> клонированный INSP143 с гистиридиновой меткой

```

<400>      140
Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
1              5              10              15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
      20              25              30

His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
      35              40              45

Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
      50              55              60

Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
65              70              75              80

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
      85              90              95

```

Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
 100 105 110
 Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
 115 120 125
 Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
 130 135 140
 Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
 145 150 155 160
 Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
 165 170 175
 Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
 180 185 190
 Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
 195 200 205
 Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile Thr Ala Ile Ala Asp
 210 215 220
 Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg
 225 230 235 240
 Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser
 245 250 255
 Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile
 260 265 270
 His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys
 275 280 285
 Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser
 290 295 300
 Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro Lys Leu Glu Lys Pro
 305 310 315 320
 Gly Glu Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe
 325 330 335
 Phe Lys Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys Gly Ile Phe Arg
 340 345 350
 His His His His His His
 355

<210> 141

<211> 975

<212> DHK

<213> Homo sapiens

<400> 141

ggaagccttc ggtaccatgg acctgactgg agaataatttc accgcctggc cctgggctcc 60
 aggagagccc accaccacca tggcccagga tggaggcagc actggcgcca ggggcaagca 120
 ggtcacagat gccagggttc atttgacctc tacttcatct tggacaagtc tggcagcgtg 180
 aacaataact ggattgacct ttatatgtgg gtggaggaaa cagtggcgag gttccaaagc 240
 ccaaataattc ggatgtgctt catcacctac tccacagacg gccagactgt cttgccactc 300
 acctcagaca agaatagaat aaaaaacggt cttgaccaac ttcagaaaat tgtgcctgac 360
 ggtcacacat tcattgcaggc aggatttaga aaggcaattc aacagatcga aagtttcaac 420

```

tccggaaaca aggttcccag catgattatt gctatgactg atggagaact ggtggcacat 480
gcatttcagg acactctcag agaagctcaa aaggctcggg aactgggggc caacgtttac 540
accctgggtg tggctgatta taatctggac cagataacag caattgcaga cagccctggc 600
cacgtgtttg cagtggagaa tggcttcaag gccctgagaa gcaccattga tgccttcacg 660
tcaaagggtc gtcttgatgt gacatcgggt gagccttcct ctgagtgtgt aggagaacct 720
taccatgtgg ttattcatgg aaatggcttt cagaatctaa agaaacggga tgaagttatt 780
tgcagattta tcttcaatga aagcactatc attgatgaaa agccaaccag tatcgacaat 840
aattccatga attgccctgg gccaaaacta gaaaaacctg gagaggagta ctctattgaa 900
gtcagcttga acaaaggcaa aacattcttc aagagcaatg tcagcatcac cagcaccaca 960
tgtggcattt tccgc

```

```

<210> 142
<211> 325
<212> Белок
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 142
Gly Ser Leu Arg Tyr His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu
1 5 10 15

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

Gln His Trp Arg Gln Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe
35 40 45

Asp Leu Tyr Phe Ile Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp
50 55 60

Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
65 70 75 80

Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
85 90 95

Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp
100 105 110

Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly
115 120 125

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

Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His
145 150 155 160

Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly
165 170 175

Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile
180 185 190

Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly
195 200 205

Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys
210 215 220

Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro
225 230 235 240

Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg
245 250 255

```

Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp
 260 265 270

Glu Lys Pro Thr Ser Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro
 275 280 285

Lys Leu Glu Lys Pro Gly Glu Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn
 290 295 300

Lys Gly Lys Thr Phe Phe Lys Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr
 305 310 315 320

Cys Gly Ile Phe Arg
 325

<210> 143
 <211> 993
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> клонированный зрелый INSP143 с гистидиновой меткой

<400> 143

ggaagccttc	ggtaccatgg	acctgactgg	agaatatttc	accgcctggc	cctgggctcc	60
aggagagccc	accaccacca	tggcccagga	tggaggcagc	actggcgcca	ggggcaagca	120
ggtcacagat	gccagggctc	atttgacctc	tacttcatct	tggacaagtc	tggcagcgtg	180
aacaataact	ggattgacct	ttatatgtgg	gtggaggaaa	cagtggcgag	gttccaaagc	240
ccaaatattc	ggatgtgctt	catcacctac	tccacagacg	gccagactgt	cttgccactc	300
acctcagaca	agaatagaat	aaaaaacggg	cttgaccaac	ttcagaaaat	tgtgcctgac	360
ggtcacacat	tcatgcaggc	aggatttaga	aaggcaattc	aacagatcga	aagtttcaac	420
tccggaacaa	aggttcccag	catgattatt	gctatgactg	atggagaact	ggtggcacat	480
gcatttcagg	acaactctcag	agaagctcaa	aaggctcgga	aactgggggc	caacgtttac	540
accctgggtg	tggctgatta	taatctggac	cagataacag	caattgcaga	cagccctggc	600
cacgtgtttg	cagtggagaa	tggcttcaag	gccttgagaa	gcaccattga	tgccttcacg	660
tcaaaggtct	gtcttgatgt	gacatcggtg	gagccttcct	ctgagtgtgt	aggagaacct	720
tacctatgtg	ttattcatgg	aaatggcttt	cagaatctaa	agaaacggga	tgaagtattt	780
tgcagattta	tcttcaatga	aagcaactatc	attgatgaaa	agccaaccag	tatcgacaat	840
aattccatga	attgccctgg	gccaaaacta	gaaaaacctg	gagaggagta	ctctattgaa	900
gtcagcttga	acaaaggcaa	aacattcttc	aagagcaatg	tcagcatcac	cagcaccaca	960
tgtggcattt	tccgcaccac	tcaccatcac	cat			993

<210> 144
 <211> 331
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> клонированный зрелый INSP143 с гистидиновой меткой

<400> 144

Gly Ser Leu Arg Tyr His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu	
1 5 10 15	
Ala Leu Gly Ser Arg Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg	
20 25 30	
Gln His Trp Arg Gln Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe	
35 40 45	
Asp Leu Tyr Phe Ile Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp	
50 55 60	

013251

Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser
 65 70 75 80
 Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr
 85 90 95
 Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp
 100 105 110
 Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly
 115 120 125
 Phe Arg Lys Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys
 130 135 140
 Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His
 145 150 155 160
 Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly
 165 170 175
 Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Ile
 180 185 190
 Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly
 195 200 205
 Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys
 210 215 220
 Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro
 225 230 235 240
 Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg
 245 250 255
 Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp
 260 265 270
 Glu Lys Pro Thr Ser Ile Asp Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro
 275 280 285
 Lys Leu Glu Lys Pro Gly Glu Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn
 290 295 300
 Lys Gly Lys Thr Phe Phe Lys Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr
 305 310 315 320
 Cys Gly Ile Phe Arg His His His His His His
 325 330

<210> 145

<211> 516

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 145

ttgacctct acttcatctt ggacaagtct ggcagcgtga acaataactg gattgacctt 60
 tatatgtggg tggaggaaac agtggcgagg ttccaaagcc caaatattcg gatgtgcttc 120
 atcacctact ccacagacgg ccagactgtc ttgccactca cctcagacaa gaatagaata 180
 aaaaacggtc ttgaccaact tcagaaaatt gtgcctgacg gtcacacatt catgcaggca 240
 ggatttagaa aggcaattca acagatcgaa agtttcaact ccggaaacaa ggttcccagc 300
 atgattattg ctatgactga tggagaactg gtggcacatg catttcagga cactctcaga 360

gaagctcaaa aggcctcggaa actggggggcc aacgtttaca ccctgggtgt ggctgattat 420
aatctggacc agataacagc aattgcagac agccctggcc acgtgtttgc agtggagaat 480
ggcttcaagg ccctgagaag caccattgat gccctc 516

<210> 146
<211> 172
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 146
Phe Asp Leu Tyr Phe Ile Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn
1 5 10 15
Trp Ile Asp Leu Tyr Met Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln
20 25 30
Ser Pro Asn Ile Arg Met Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln
35 40 45
Thr Val Leu Pro Leu Thr Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu
50 55 60
Asp Gln Leu Gln Lys Ile Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala
65 70 75 80
Gly Phe Arg Lys Ala Ile Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn
85 90 95
Lys Val Pro Ser Met Ile Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala
100 105 110
His Ala Phe Gln Asp Thr Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu
115 120 125
Gly Ala Asn Val Tyr Thr Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln
130 135 140
Ile Thr Ala Ile Ala Asp Ser Pro Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn
145 150 155 160
Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr Ile Asp Ala Leu
165 170

<210> 147
<211> 174
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 147
acgtcaaagg tctgtcttga tgtgacatcg gtggagcctt cctctgagtg tgtaggagaa 60
ccctaccatg tgggtattca tggaaatggc ttccagaatc taaagaaacg ggatgaagtt 120
atttgcagat ttatcttcaa tgaaagcact atcattggga gtactctatt gaag 174

<210> 148
<211> 58
<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 148
Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln
20 25 30

Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu
35 40 45

Ser Thr Ile Ile Gly Ser Thr Leu Leu Lys
50 55

<210> 149
<211> 174
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 149
acgtcaaagg tctgtcttga tgtgacatcg gtggagcctt cctctgagtg tgtaggagaa 60
ccctaccatg tggttattca tggaaatggc ttccagaatc taaagaaacg ggatgaagtt 120
atttgcagat ttatcttcaa tgaaagcact atcattgatg aaaagccaac cagt 174

<210> 150
<211> 58
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 150
Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile His Gly Asn Gly Phe Gln
20 25 30

Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe Ile Phe Asn Glu
35 40 45

Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser
50 55

<210> 151
<211> 13
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Линкерная последовательность гибридного белка

<400> 151
Glu Phe Gly Ala Gly Leu Val Leu Gly Gly Gln Phe Met
1 5 10

<210> 152
<211> 27
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 152
Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala
20 25

<210> 153
<211> 20
<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер INSP141-CP1
 <400> 153
 gtcacaggga cagccagata 20
 <210> 154
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер INSP141-CP2
 <400> 154
 gctggtgatg ctgacattgc 20
 <210> 155
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер INSP141-AP1
 <400> 155
 atggggagcc atgagtcctt ggggccctac ttcttg 36
 <210> 156
 <211> 47
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер INSP141-AP2
 <400> 156
 agctgacttc aatagagtac tcccaatgat agtgctttca ttgaaga 47
 <210> 157
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер INSP143-AP1
 <400> 157
 gcggaaaatg ccacatgtgg tgctggtgat gctgacattg ctcttg 46
 <210> 158
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер 21M13
 <400> 158
 tgtaaaacga cggccagt 18
 <210> 159

<211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер M13REV

 <400> 159
 caggaacag ctatgacc 18

 <210> 160
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер T7

 <400> 160
 taatacgact cactatagg 19

 <210> 161
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер T3

 <400> 161
 attaaccctc actaaagg 18

 <210> 162
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер INSP142-936F

 <400> 162
 ccctgggcca aaactagaaa a 21

 <210> 163
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер INSP142-1044R

 <400> 163
 aagagaagga catgtggtgc tg 22

 <210> 164
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Праймер hGAPDH-F

 <400> 164

ccacccatgg caaattcc 18

<210> 165
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер hGAPDH-R

<400> 165
 gatgggattt ccattgatga ca 22

<210> 166
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер интрон-hGAPDH-F

<400> 166
 cctagtccca gggctttgat t 21

<210> 167
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер интрон-hGAPDH-R

<400> 167
 ctgtgctccc actcttgatt t 21

<210> 168
 <211> 500
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 168
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30
 His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45
 Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60
 Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
 85 90 95
 Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
 100 105 110
 Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
 115 120 125

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

Leu Leu Leu Cys Cys Val Trp Arg Leu Cys Arg Lys Gln Ala Ser Ala
 465 470 475 480
 Pro Cys Pro Pro Ser Ser Gly Ala Gln Ala Gln Ala His Pro Leu Arg
 485 490 495
 Asp Ser Asn Met
 500
 <210> 169
 <211> 641
 <212> Белок
 <213> неизвестный
 <220>
 <223> IPI00480015.1
 <400> 169
 Met Gly Ser His Glu Ser Leu Gly Pro Tyr Phe Leu Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ser Leu Arg Tyr
 20 25 30
 His Gly Pro Asp Trp Arg Ile Phe His Arg Leu Ala Leu Gly Ser Arg
 35 40 45
 Arg Ala His His His His Gly Pro Gly Trp Arg Gln His Trp Arg Gln
 50 55 60
 Gly Gln Ala Gly His Arg Cys Gln Gly Ser Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Asn Asn Asn Trp Ile Asp Leu Tyr Met
 85 90 95
 Trp Val Glu Glu Thr Val Ala Arg Phe Gln Ser Pro Asn Ile Arg Met
 100 105 110
 Cys Phe Ile Thr Tyr Ser Thr Asp Gly Gln Thr Val Leu Pro Leu Thr
 115 120 125
 Ser Asp Lys Asn Arg Ile Lys Asn Gly Leu Asp Gln Leu Gln Lys Ile
 130 135 140
 Val Pro Asp Gly His Thr Phe Met Gln Ala Gly Phe Arg Lys Ala Ile
 145 150 155 160
 Gln Gln Ile Glu Ser Phe Asn Ser Gly Asn Lys Val Pro Ser Met Ile
 165 170 175
 Ile Ala Met Thr Asp Gly Glu Leu Val Ala His Ala Phe Gln Asp Thr
 180 185 190
 Leu Arg Glu Ala Gln Lys Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Val Tyr Thr
 195 200 205
 Leu Gly Val Ala Asp Tyr Asn Leu Asp Gln Val Ile Pro Ser Ser Pro
 210 215 220
 Gly His Val Phe Ala Val Glu Asn Gly Phe Lys Ala Leu Arg Ser Thr
 225 230 235 240

Ile Asp Ala Leu Thr Ser Lys Val Cys Leu Asp Val Thr Ser Val Glu
 245 250 255
 Pro Ser Ser Glu Cys Val Gly Glu Pro Tyr His Val Val Ile His Gly
 260 265 270
 Asn Gly Phe Gln Asn Leu Lys Lys Arg Asp Glu Val Ile Cys Arg Phe
 275 280 285
 Ile Phe Asn Glu Ser Thr Ile Ile Asp Glu Lys Pro Thr Ser Ile Asp
 290 295 300
 Asn Asn Ser Met Asn Cys Pro Gly Pro Lys Leu Glu Lys Pro Gly Glu
 305 310 315 320
 Glu Tyr Ser Ile Glu Val Ser Leu Asn Lys Gly Lys Thr Phe Phe Lys
 325 330 335
 Ser Asn Val Ser Ile Thr Ser Thr Thr Cys Arg Pro Pro Arg Pro Ser
 340 345 350
 Tyr Gly Ala Leu Phe Leu His Gln Gly Ile Phe Arg Asn Trp Leu Tyr
 355 360 365
 Phe Val Pro Leu Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Leu Cys Cys Val Trp
 370 375 380
 Arg Leu Cys Arg Lys Gln Ala Ser Ala Pro Cys Pro Pro Ser Ser Gly
 385 390 395 400
 Ala Gln Ala Gln Ala His Pro Leu Arg Asp Ser Asn Met Arg Arg Ser
 405 410 415
 Leu Pro Gly Thr Ser Ser Gln Ala Gln Gly Gly Gln Ser Asp Thr Pro
 420 425 430
 Lys Ala Val Leu Cys Pro Gly Ala Pro Gly Gln Gly Pro Ser Cys Val
 435 440 445
 Gln Gly Gln Gly Arg Ala Arg Pro Pro Pro Ser Ser Leu Ser Pro Val
 450 455 460
 Asn Thr Cys Pro Thr Val Ile Ile Cys Cys Cys Gly Cys Gln Gly Val
 465 470 475 480
 Gly Gly Met Arg Arg Ile Glu Gly Asn Leu Asp Thr Phe Cys Asp Leu
 485 490 495
 Ser His Ala Ser Cys His Gln Val Pro Trp Met Cys Cys Gln Ser Arg
 500 505 510
 Asp Gln Gly Arg Tyr Leu Ser Leu Ala Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Ala
 515 520 525
 Gln Ala Pro Cys Cys Pro Arg Ile Cys Phe Pro His Ser Gln Glu Cys
 530 535 540
 Leu Ser Leu Pro Gln Ala Pro Cys Ser Pro Arg Met Cys Leu Arg His
 545 550 555 560
 Ser Arg Glu Glu Cys Leu Ala Arg Lys Gln Ala Pro Cys Ser Pro Arg
 565 570 575

Ile Cys Leu Arg His Ser Pro Glu Tyr Phe Ser Gln Ala Gln Thr Leu
 580 585 590
 Cys Asn Pro Lys Ser Cys Leu Gln Pro Ser Arg Glu Cys Leu Pro Leu
 595 600 605
 Thr Cys Ser Ser Arg Cys Arg Leu Pro Pro Ala Arg Cys Leu Arg Pro
 610 615 620
 Pro Ser Arg Met Leu Pro Leu Leu Ser Pro Leu Leu Arg His Thr Ala
 625 630 635 640
 Glu



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2