

Настоящее изобретение относится к новому белку INSP002, идентифицированному в настоящей заявке как секреируемый белок, т.е. как член семейства DAN, относящегося к суперсемейству цитокинов, имеющих в своей структуре цистиновые узлы, и к применению этого белка и последовательностей нуклеиновой кислоты кодирующего гена для диагностики, профилактики и лечения заболеваний.

Все цитируемые публикации, патенты и патентные заявки во всей своей полноте введены 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 определения функций исследуемых последовательностей белков. Такие средства становятся все более необходимыми, и это связано с тем, что оснащение научно-исследовательских лабораторий, занимающихся определением функций этих последовательностей белков, пока не дает возможности быстро обрабатывать все нарастающий поток данных для этих последовательностей.

Поскольку эффективность и точность методов биоинформатики возрастает, то эти методы быстро вытесняют стандартные методы биохимической характеризации. Действительно, современные средства биоинформатики, используемые для идентификации белков настоящего изобретения, могут давать окончательные результаты с достаточно высокой степенью достоверности.

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

Общее описание секреируемых белков

Способность клеток продуцировать и секретировать внеклеточные белки, является главным фактором во многих биологических процессах. Ферменты, факторы роста, белки внеклеточного матрикса и молекулы, передающие сигналы, секретируются клетками посредством слияния секреторной везикулы с плазматической мембраной. В большинстве случаев, но не всегда, белки транспортируются в эндоплазматический ретикулум и в секреторные везикулы посредством сигнального пептида. Сигнальные пептиды представляют собой цис-активные последовательности, которые влияют на транспорт полипептидных цепей из цитоплазмы в мембрano-ассоциированный компартмент, такой как секреторная везикула. Полипептиды, которые нацелены на секреторные везикулы, либо секретируются во внеклеточный матрикс, либо удерживаются в плазматической мембране. Полипептиды, которые удерживаются в плазматической мембране, имеют один или более трансмембранных доменов. Примерами секреируемых белков, которые играют главную роль в функционировании клеток, являются цитокины, гормоны, белки внеклеточного матрикса (адгезивные молекулы), протеазы и факторы роста и дифференцировки.

Факторы роста представляют собой относительно большую группу полипептидов, которые обладают общей способностью индуцировать размножение клеток как *in vivo*, так и *in vitro*. Факторы роста отличаются от классических эндокринных гормонов, таких как инсулин или гормон роста, по двум своим важным механизмами действия. Во-первых, эндокринные гормоны обычно синтезируются в конкретных железах (таких как поджелудочная железа, в случае инсулина), тогда как факторы роста часто синтезируются в клетках и тканях различных типов. Во-вторых, классические эндокринные гормоны высвобождаются в физиологические жидкости в области их синтеза и переносятся в кровотоке в их ткань-мишень. Важные отличительные свойства факторов роста заключаются в том, что в большинстве случаев они действуют только в тех тканях, в которых они синтезируются (см. Health. J.K. (1993) *Growth Factors*, Oxford University Press, Oxford, UK, pp.15-33).

Хотя уровень сходства последовательностей факторов роста невысок, однако, по своему структурному и функциональному сходству, они могут быть подразделены на суперсемейства. Примерами таких суперсемейств являются:

- (a) гемопоэтические факторы роста, такие как гормон роста, IL-2, IL-4, G-CSF и CNTF, каждый из которых имеет структурный мотив в виде пучка из четырех спиралей;
- (b) члены семейства, имеющие бета-конформацию типа "клеверный лист", такие как IL-1-бета, IL-1-альфа, FGF и фактор роста кератиноцитов;
- (c) EGF-подобные факторы роста, такие как EGF и TGF-альфа, каждый из которых имеет иммуноглобулин-подобный домен; и
- (d) факторы роста, имеющие в своей структуре цистиновые узлы, такие как NGF, TGF-бета, PDGF и гликопротеиновые гормоны.

Факторы роста являются внеклеточными молекулами, и для осуществления своего биологического действия, они взаимодействуют со специфическими высокоаффинными рецепторами, локализованными на плазматических мембранах клеток-мишеней. Характеризация молекул ряда различных рецепторов факторов роста показала, что они могут быть разделены на определенные семейства: тирозинкиназные рецепторы, ассоциированные с G-белком рецепторы, состоящие из семи трансмембранных доменов, и

серин/треонинкиназные рецепторы. Тирозинкиназные рецепторы отличаются тем, что они имеют внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, обладающий тирозинкиназной активностью. Серин/треонинкиназные рецепторы факторов роста имеют сходство с тирозинкиназными рецепторами, содержащими внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Внутриклеточный домен обладает присущей ему серин/треонинкиназной активностью.

Нарушение регуляции факторов роста приводит к ряду патологических состояний, включая, но, не ограничиваясь ими, онкологические заболевания (Bartucci M. et al. (2001) *Cancer Res.* Sep. 15; 61(18):6747-54, Dias S. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Sep. 11; 98(19):10857-62, Djavan B. et al. (2001) *World J. Urol.* 19(4):225-33), воспалительные заболевания (Fiocchi C. (2001) *J.Clin.Invest.* Aug; 108(4):523-6, Hodge S. et al. (2001) *Respirology.* Sep. 6(3):205-211, Fenwick S.A. et al. (2001) *J. Anat.* Sep. 199(Pt 3):231-40), неврологические заболевания (Cooper J.D. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(18):10439-44, Fahnestock M. et al. (2001) *Mol. Cell. Neurosci.* 18(2):210-20) и метаболические заболевания (Vickers M.H. et al. (2001) *Endocrinology* 142(9):3964-73).

Суперсемейство, имеющее в структуре цистиновые узлы

Типичная структура, наблюдаемая у суперсемейства с цистиновыми узлами, основана на присутствии 6 цистиновых остатков, образующих 3 дисульфидных связи. Две из этих дисульфидных связей образуют "кольцеобразную" структуру, которая пронизана третьей дисульфидной связью (Sun et al. 1995). Домены "цистиновый узел" часто обнаруживают более чем 6 цистиновых остатков. Дополнительные цистиновые остатки обычно используются для образования других дисульфидных связей в домене "цистиновый узел" или межцепьевых дисульфидных связей во время димеризации.

Это суперсемейство с "цистиновыми узлами" подразделяется на подсемейство, которое включает гликопротеиновые гормоны (например, фолликулостимулирующий гормон), белки трансформирующего фактора роста-бета (TGF-бета) (например, белок морфогенеза кости 4), белки, подобные тромбоцитарному фактору роста (PDGF-подобные белки) (например, тромбоцитарный фактор роста A), факторы роста нервных клеток (NGF) (например, нейротропный фактор головного мозга) и семейство отобранных методом дифференциального скрининга аберрантных генов в нейробластоме (DAN) (например, cerberus). Суперсемейство DAN включает Cerl, Cerberus, Caronte, Drm/Gremlin, PRDC, DAN Dante и CeCanl (Massague et al., *Genes Dev.* 2000 Mar. 15;14(6):627-44; Massague & Wotton, *EMBO J.* 2000 Apr. 17;19(8):1745-54).

Предполагается, что члены подсемейства DAN способны модулировать действие членов подсемейства белков TGF-бета (Pearce et al., *Dev.Biol.* 1999 May 1;209(1):98-110). Более конкретно, возможно, что члены подсемейства DAN способны модулировать действие белков морфогенеза кости (BMP) в процессе ее развития.

Было обнаружено, что члены подсемейства DAN действуют как антагонисты белков морфогенеза кости (BMP), которые являются членами подсемейства TGF-бета, входящего в суперсемейство, имеющее домены "цистиновый узел" (Stanley et al., *Mech.Dev.* 1998 Oct, 77(2):173-84; Massague et al. 2000 (supra); Massague J. & Wotton D, 2002 (supra)). Мономеры BMP подвергаются гомо- или гетеродимеризации посредством связывания своих доменов "цистиновый узел", после чего они взаимодействуют с рецепторами клеточной поверхности. Считается, что члены подсемейства DAN способны связываться с BMP посредством их собственных доменов "цистиновый узел". Это приводит к предотвращению связывания BMP с его природным партнером по димеризации, в результате чего, BMP теряет свою способность взаимодействовать со своим сигнальным рецептором, присутствующим на поверхности клетки. Эксперименты, конкретно направленные на DAN, Cerl и DRM, показали, что они ингибируют действие BMP4 (Pearce et al., 1999 (см. выше)).

Более ясное понимание функции cerberus было достигнуто в результате исследования на связывание (Piccolo S. et al. *Nature* 1999 Feb. 25;397(6721):707-10). В первых функциональных исследованиях, проводимых на cerberus, использовали белок cerberus Xenopus laevis (cer). Микроинъекция мРНК cerberus Xenopus в эмбрионах Xenopus показала, что белок cerberus индуцирует образование эктопических головок в передней эндодерме организатора Спэманна (Bouwmeester et al. *Nature* 1996 Aug. 15;382(6592):595-601; Bouwmeester T. Int., J. Dev. Biol. 200, 145(1 Spec No):251-8). Исследования на связывание, проведенные Piccolo и сотрудниками; показали, что белок cerberus Xenopus связывается с белками Nodal, BMP и Wnt через независимые сайты и ингибирует их действие. Более конкретно, эти исследователи обнаружили, что белок cerberus обладает высокоспецифичной аффинностью и ингибирующими действием по отношению к Xnr-1 (члену семейства Nodal), BMP4 (члену семейства BMP) и Xwmt-8 (члену семейства Wnt). В этой работе была установлена взаимосвязь cerberus, а, следовательно, и других членов семейства DAN с путями эволюции и дифференцировки тканей.

Склерозтин, кодируемый геном SOST, также является членом подсемейства DAN (Brumkow et al., 2001, *Am. J. Hum. Genet.* 68:577-589). Ген SOST ассоциируется со склеростеозом, т.е. склерозирующей дисплазией кости, наследуемой по аутосомно-рецессивному типу. Фенотип, ассоциируемый со склеростеозом, представляет собой прогрессирующее разрастание скелетных костей, которое приводит к гигантизму, деформации лица и к ущемлению седьмого и восьмого черепных нервов (Brumkow et al. 2001 (см. выше)). Взаимосвязь между склеростеозом и SOST была установлена посредством картирования по го-

мозиготности семей, подверженных указанному заболеванию. Brumkow и сотрудники идентифицировали сходство между фенотипом, ассоциированным со склеростеозом, и эффектами, ассоциированными с другими членами подсемейства DAN. Аргумент в пользу такой взаимосвязи является еще более убедительным, если предположить, что склеростеоз может быть обусловлен потерей негативного регулятора для члена подсемейства TGF-бета, а более конкретно, BMP.

Поэтому, идентификация секрецируемых белков и, в частности, факторов роста, таких как члены суперсемейства, имеющие в своей структуре цистиновые узлы, в частности, члены подсемейства DAN, является крайне необходимой для лучшего понимания основных путей, которые приводят к развитию приведенных выше патологических состояний и ассоциированных с ними заболеваний, приведенных выше, и для разработки более эффективных методов генотерапии или лекарственной терапии указанных заболеваний.

Описание изобретения

Настоящее изобретение основано на обнаружении функций белка INSP002, действующего как секрецируемый белок, в частности, как секрецируемый белок подсемейства DAN, входящего в суперсемейство, имеющего "цистиновые узлы" в своей структуре.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, который

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:7;

(ii) представляет собой фрагмент, который обладает функцией секрецируемого белка, предпочтительно, функцией члена суперсемейства цитокинов с цистиновыми узлами, более предпочтительно, члена подсемейств DAN, или который имеет общую с полипептидом (i) антигенную детерминанту; или

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

Предпочтительно, полипептид первого аспекта настоящего изобретения:

(i) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:8;

(ii) представляет собой его фрагмент, который обладает функцией секрецируемого белка, предпочтительно, функцией члена суперсемейства цитокинов с цистиновыми узлами, более предпочтительно, члена подсемейств DAN, либо который имеет общую с полипептидами (i) антигенную детерминанту; или

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

В соответствии с другим вариантом своего первого аспекта, настоящее изобретение относится к полипептиду, который

i) состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8;

(ii) представляет собой его фрагмент, который обладает функцией секрецируемого белка, предпочтительно, функцией члена суперсемейства цитокинов с цистиновыми узлами, более предпочтительно, члена подсемейств DAN, или который имеет общую с полипептидом (i) антигенную детерминанту; или

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

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, будет далее называться "полипептид экзона 1 INSP002". Полипептид, имеющий последовательность, представленную SEQ ID NO:4, будет далее называться "полипептид экзона 2 INSP002". Полипептид, имеющий последовательность, представленную SEQ ID NO:6, будет далее называться "полипептидом INSP002". Первые 22 аминокислоты полипептида экзона 1 INSP002 представляют собой сигнальный пептид, а последовательности полипептида INSP002 без сигнальной последовательности представлены в SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8. Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:7, будет далее называться "полипептид экзона 1 INSP002 без сигнального пептида". Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:8, будет далее называться "полипептидом INSP002 без сигнального пептида".

В соответствии с другим вариантом своего первого аспекта, настоящее изобретение относится к полипептиду, который

i) содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:14;

(ii) представляет собой его фрагмент, который обладает функцией секрецируемого белка, предпочтительно, функцией члена суперсемейства цитокинов с цистиновыми узлами, более предпочтительно, члена подсемейств DAN, или который имеет общую с полипептидом (i) антигенную детерминанту; или

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

Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:14, представляет собой вариант полипептида INSP002. Он идентичен полипептиду INSP002, за исключением того, что по сравнению с полипептидом INSP002, содержит две аминокислотные делеции в положениях 107 и 108 и одну аминокислотную замену в положении 110. Полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:14, далее будет называться "вариантом полипептида INSP002".

Предпочтительно полипептид первого аспекта настоящего изобретения функционирует как член суперсемейства цитокинов, имеющих в своей структуре цистиновые узлы, предпочтительно как член

подсемейства DAN. Термин "цитокин с цистиновыми узлами" хорошо известен, и специалист с помощью одного из известных анализов, может легко установить, функционирует ли данный полипептид как член суперсемейства цитокинов, имеющих цистиновые узлы в своей структуре.

В частности, специалист с помощью одного из известных анализов может легко установить, функционирует ли данный полипептид как член подсемейства DAN, и является ли он антагонистом членов суперсемейства TGF-бета, в частности, антагонистом BMP. Для того чтобы определить, функционирует ли полипептид как антагонист BMP, в качестве системы для анализа может быть использован эмбрион Xenopus, поскольку некоторые BMP экспрессируются в эмбрионе Xenopus (Chang C. et al., 1999, Development 126:3347-3357, Hawley S. et al., 1995, Genes Dev. 9:2923-2935, Hemmati-Brivanlou, A., and G. H. Thomsen. 1995, Dev. Genet. 17:78-89, Jones CM. et al., 1992, 10 Development 115:639-647). Сверхэкспрессия сигналов BMP-2/4-класса или BMP-7-класса в ранней мезодерме индуцирует вентральные пути, в то время как ингибиторы этих сигналов (такие как Noggin, Xnr3, Chordin или Follistatin) индуцируют дорсальные пути. Поэтому действие полипептида на эмбриональное развитие может быть использовано для того, чтобы определить является ли данный полипептид антагонистом BMP.

Используемый термин "полипептид INSP002" включает полипептиды, содержащие полипептид экзоны 1 INSP002, полипептид экзоны 1 INSP002 без сигнального пептида, полипептид экзоны 2 INSP002, полипептид INSP002 или полипептид INSP002 без сигнального пептида, а также полипептиды, состоящие из полипептида экзоны 1 INSP002, полипептида экзоны 1 INSP002 без сигнального пептида, полипептида экзоны 2 INSP002, полипептида INSP002, полипептида INSP002 без сигнального пептида или варианта полипептида INSP002.

Во втором своем аспекте настоящее изобретение относится к очищенной молекуле нукleinовой кислоты, кодирующй полипептид первого аспекта настоящего изобретения.

При этом предпочтительно, чтобы указанная очищенная молекула нукleinовой кислоты содержала последовательность нукleinовой кислоты, представленную в SEQ ID NO:1 (кодирующую полипептид экзоны 1 INSP002), в SEQ ID NO:3 (кодирующую полипептид экзоны 2 INSP002), в SEQ ID NO:5 (кодирующую полипептид INSP002) или в SEQ ID NO:13 (кодирующую вариант полипептида INSP002), или представляя собой избыточный эквивалент или фрагмент любой из этих последовательностей.

Настоящее изобретение также относится к очищенной молекуле нукleinовой кислоты, состоящей из последовательности нукleinовой кислоты, представленной в SEQ ID NO:1 (кодирующую полипептид экзоны 1 INSP002), в SEQ ID NO:3 (кодирующую полипептид экзоны 2 INSP002), в SEQ ID NO:5 (кодирующую полипептид INSP002) или в SEQ ID NO:13 (кодирующую вариант полипептида INSP002), или представляющей собой избыточный эквивалент или фрагмент любой из этих последовательностей.

В соответствии с одним из вариантов этого аспекта настоящего изобретения очищенная молекула нукleinовой кислоты не содержит 5'-нетранслируемую область, расположенную выше последовательности нукleinовой кислоты, кодирующую полипептид экзоны 1 INSP002 и последовательности нукleinовой кислоты, кодирующую полипептид INSP002 (нуклеотиды 1-151 SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:5). В соответствии с этим вариантом настоящего изобретения очищенная молекула нукleinовой кислоты, предпочтительно, содержит нуклеотиды 152-475 SEQ ID NO:1 или нуклеотиды 152-721 SEQ ID NO:5. Настоящее изобретение, кроме того, относится к очищенной молекуле нукleinовой кислоты, состоящей из нуклеотидов 152-475 SEQ ID NO:1 или нуклеотидов 152-721 SEQ ID NO:5. Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид INSP002 без 5'-нетранслируемой области (нуклеотиды 152-721 SEQ ID NO:5), представлена в SEQ ID NO:11, а нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид экзоны 1 INSP002 без 5'-нетранслируемой области (нуклеотиды 152-475 SEQ ID NO:1), представлена в SEQ ID NO:12.

В соответствии с другим вариантом этого аспекта настоящего изобретения очищенная молекула нукleinовой кислоты не кодирует сигнальный пептид, расположенный в начале полипептида экзоны 1 INSP002 и полипептида INSP002 (нуклеотиды 152-217 SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:5). В соответствии с этим вариантом настоящего изобретения, очищенная молекула нукleinовой кислоты, предпочтительно, содержит нуклеотиды 218-475 SEQ ID NO:1 (кодирующие полипептид экзоны 1 INSP002 без сигнального пептида) или нуклеотиды 218-721 SEQ ID NO:5 (кодирующие полипептид INSP002 без сигнального пептида). Настоящее изобретение, кроме того, относится к очищенной молекуле нукleinовой кислоты, состоящей из нуклеотидов 218-475 SEQ ID NO:1 (кодирующих полипептид INSP002 без сигнального пептида) или нуклеотидов 218-721 SEQ ID NO:5 кодирующих полипептид INSP002 без сигнального пептида). Нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелый полипептид INSP002 (SEQ ID NO:7), представлена в SEQ ID NO:9, а нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелый полипептид экзоны 1 INSP002, представлена в SEQ ID NO:10.

В соответствии с другим вариантом этого аспекта настоящего изобретения очищенная молекула нукleinовой кислоты не содержит 5'-нетранслируемую область, расположенную выше последовательности нукleinовой кислоты, кодирующей вариант полипептида INSP002 (нуклеотиды 1-68 SEQ ID NO:13). В соответствии с этим вариантом настоящего изобретения очищенная молекула нукleinовой кислоты, предпочтительно, содержит нуклеотиды или состоит из нуклеотидов 69-719 SEQ ID NO:13. Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариант полипептида INSP002 без 5'-нетранслируемой области

(нуклеотиды 69-719 SEQ ID NO:13) представлена в SEQ ID NO:15.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к очищенной молекуле нукleinовой кислоты, которая гибридизуется в условиях высокой жесткости с молекулой нукleinовой кислоты второго аспекта настоящего изобретения.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к вектору, такому как экспрессирующий вектор, содержащий молекулу нукleinовой кислоты второго или третьего аспекта настоящего изобретения.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, трансформированному вектором четвертого аспекта настоящего изобретения.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к лиганду, который специфически связывается с полипептидом первого аспекта настоящего изобретения, обладающим активностью цитокина, имеющего цистиновые узлы в своей структуре, и который, предпочтительно, ингибитирует такую активность. При этом предпочтительно, чтобы лиганд ингибировал функцию полипептида первого аспекта настоящего изобретения, который является членом подсемейства DAN цитокинов, имеющих цистиновые узлы в своей структуре. Лиганды для полипептида настоящего изобретения могут образовывать различные формы, включая природные или модифицированные субстраты, ферменты, рецепторы, небольшие органические молекулы, такие как небольшие природные или синтетические органические молекулы, имеющие молекулярную массу до 2000 Да, предпочтительно, 800 Да или менее, пептидомиметики, неорганические молекулы, пептиды, полипептиды, антитела, структурные или функциональные миметики приведенных выше соединений. В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к соединению, которое эффективно модифицирует экспрессию природного гена, кодирующего полипептид первого аспекта настоящего изобретения, или регулирует активность полипептида первого аспекта настоящего изобретения.

Соединение седьмого аспекта настоящего изобретения может либо повышать (служить агонистом), либо снижать (служить антагонистом) уровень экспрессии гена или активности полипептида. Важно отметить, что идентификация функции полипептида INSP002 дает возможность разработать способы скрининга, позволяющие идентифицировать соединения, эффективные для лечения и/или диагностики заболеваний.

В восьмом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду первого аспекта настоящего изобретения, или к молекуле нукleinовой кислоты второго или третьего аспекта настоящего изобретения, или к вектору четвертого аспекта настоящего изобретения, или к лиганду пятого аспекта настоящего изобретения, или к соединению шестого аспекта настоящего изобретения, которые могут быть использованы для лечения или диагностики. Эти молекулы могут быть также использованы для производства лекарственного средства, предназначенного для лечения клеточно-пролиферативных расстройств, autoimmune/воспалительных заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний, неврологических расстройств, нарушений развития, метаболических расстройств, инфекций и других патологических состояний.

В девятом аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики заболеваний у человека, включающему оценку уровня экспрессии природного гена, кодирующего полипептид первого аспекта настоящего изобретения, или уровня активности полипептида первого аспекта настоящего 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 полипептида или молекулы нукleinовой кислоты в течение определенного периода времени по сравнению с контрольным уровнем служит показателем рецидива заболевания.

В соответствии с девятым и десятым аспектами настоящего изобретения расстройством или заболеванием, предпочтительно, является расстройство или заболевание, которое ассоциируется с аберрантными уровнями цитокина, имеющего цистиновые узлы в своей структуре, предпочтительно, члена подсемейства DAN. Заболеванием или расстройством может быть заболевание или расстройство, которое ассоциируется с аберрантными уровнями лиганда для цитокина, имеющего цистиновые узлы в своей структуре, предпочтительно, для члена подсемейства DAN. Так, например, таким заболеванием или расстройством может быть расстройство или заболевание, которое ассоциируется с аберрантными уровнями члена суперсемейства TGF-бета. В частности, указанным заболеванием или расстройством может быть заболевание или расстройство, которое ассоциируется с BMP, такое как невропатия, нефропатия, такая как диабетическая нефропатия, рак, заживание ран, фиброз, остеопения, остеопороз, переломы и склеростез.

Предпочтительный способ детекции полипептидов первого аспекта настоящего изобретения включает стадии;

(а) контактирования лиганда шестого аспекта настоящего изобретения, такого как антитело, с биологическим образцом в условиях, подходящих для образования комплекса лиганд-полипептид; и

(б) детекции указанного комплекса.

Что касается девятого аспекта настоящего изобретения, то каждому специалисту известно, что для детекции аномальных уровней белка существуют различные методы, такие как методы гибридизации нуклеиновой кислоты с короткими зондами, методы анализа на точечную мутацию, метод амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и методы, в которых используются антитела. Аналогичные методы могут быть использованы в течение коротких или продолжительных промежутков времени, что позволяет наблюдать за терапевтическим лечением заболевания пациента. Настоящее изобретение также относится к набору, который может быть использован в указанных методах диагностики заболевания.

В десятом аспекте настоящее изобретение относится к использованию полипептида первого аспекта настоящего изобретения в качестве секретируемого белка. Предпочтительно, настоящее изобретение относится к применению полипептида первого аспекта настоящего изобретения в качестве цитокина, более предпочтительно, в качестве цитокина, имеющего цистиновые узлы в своей структуре, в частности, в качестве члена подсемейства DAN цитокинов, имеющих цистиновые узлы в своей структуре.

В одиннадцатом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей полипептид первого аспекта настоящего изобретения или молекулу нуклеиновой кислоты второго или третьего аспекта настоящего изобретения, или вектор четвертого аспекта настоящего изобретения, или клетку-хозяина пятого аспекта настоящего изобретения, или лиганд шестого аспекта настоящего изобретения, или соединения седьмого аспекта настоящего изобретения в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

В двенадцатом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду первого аспекта настоящего изобретения, или к молекуле нуклеиновой кислоты второго или третьего аспекта настоящего изобретения, или к вектору четвертого аспекта настоящего изобретения, или к клетке-хозяину пятого аспекта настоящего изобретения, или к лиганду шестого аспекта настоящего изобретения, или к соединению седьмого аспекта настоящего изобретения, которые могут быть использованы для производства лекарственного средства для диагностики или лечения заболеваний.

В тринадцатом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания у пациента, предусматривающему введение указанному пациенту полипептида первого аспекта настоящего изобретения, или молекулы нуклеиновой кислоты второго или третьего аспекта настоящего изобретения, или вектора четвертого аспекта настоящего изобретения, или лиганда шестого аспекта настоящего изобретения, или соединения седьмого аспекта настоящего изобретения.

В соответствии с двенадцатым и тринадцатым аспектами настоящего изобретения заболеванием является, предпочтительно, заболевание, которое ассоциируется с аберрантными уровнями цитокина, имеющего цистиновые узлы в своей структуре, а предпочтительно, члена подсемейства DAN. Таким заболеванием может быть заболевание, которое ассоциируется с аберрантными уровнями лиганда для цитокина, имеющего цистиновые узлы в своей структуре, а предпочтительно, лиганда для члена подсемейства DAN. Так, например, таким заболеванием может быть заболевание, которое ассоциируется с аберрантными уровнями члена суперсемейства TGF-бета. В частности, указанным заболеванием или расстройством может быть заболевание или расстройство, которое ассоциируется с ВМР, такое как невропатия, нефропатия, такая как диабетическая нефропатия, рак, заживление ран, фиброз, остеопения, остеопороз, переломы и склеростеоз.

Для заболеваний, при которых у пациента уровень экспрессии природного гена, кодирующего полипептид первого аспекта настоящего изобретения, или при которых активность полипептида первого аспекта настоящего изобретения ниже, чем уровень экспрессии или активности у здорового пациента, полипептид, молекула нуклеиновой кислоты, лиганд или соединения, вводимые указанному пациенту, должны обладать агонистическими свойствами. И, наоборот, для заболеваний, при которых у данного пациента уровень экспрессии природного гена, кодирующего полипептид первого аспекта настоящего изобретения, или при которых активность полипептида первого аспекта настоящего изобретения выше, чем уровень экспрессии или активности у здорового пациента, полипептид, молекула нуклеиновой кислоты, лиганд или соединения, вводимые указанному пациенту, должны обладать антагонистическими свойствами. Примерами таких антагонистов являются молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты, рибозимы и лиганды, такие как антитела.

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

Краткое описание стандартных способов и методик, которые могут быть использованы для осуществления настоящего изобретения, приводится ниже. Следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивается конкретно описанными способами, протоколами, клеточными линиями, векторами и реагентами. Следует также отметить, что используемая здесь терминология приводится лишь в целях опи-

сания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не должна рассматриваться как ограничение объема настоящего изобретения. Объем настоящего изобретения ограничивается лишь прилагаемой формулой изобретения.

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

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

Более полное описание таких методов можно найти в литературе. Так, например, наиболее подходящие описания, которые могут быть использованы для консультации, приводятся в следующих работах: Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition (1989); DNA Cloning, Volumes I and 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 and M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer and Walker, eds. 1987, Academic Press, London); Scopes, (1987) Protein Purification: Principles and Practice, Second Edition (Springer Verlag, N.Y.); and Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds. 1986).

Используемый термин "полипептид" включает любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями или модифицированными пептидными связями, т.е. пептидными изостерами. Этот термин относится к коротким цепям (пептидам или полипептидам) и к более длинным цепям (белкам).

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

Полипептид первого аспекта настоящего изобретения может образовывать часть гибридного белка. Так, например, часто оказывается предпочтительным, чтобы данный полипептид включал одну или более дополнительных аминокислотных последовательностей, которые могут содержать секреторную или лидерную последовательности, про-последовательности, 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, например, к соединению, увеличивающему время полужизни полипептида (например, к полиэтиленгликолю).

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 в данной области. 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 сшивание, циклизация, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, образование GPI-якоря, иодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизация, сelenоилирование, присоединение аминокислот к белкам, опосредуемое переносом РНК, такое как аргинилирование и убихитинизация.

Модификации могут присутствовать в любом участке полипептида, включая пептидный остов, аминокислотные боковые цепи и амино- или карбокси-концы. Действительно, блокирование амино- или карбокси-конца 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 полипептида, которые получены рекомбинантным методом, природа и степень модификации, по большей части, будет определяться способностью к посттрансляционной модификации конкретной клетки-хозяина и присутствием сигналов модификации в амино-

кислотной последовательности рассматриваемого полипептида. Так, например, картины гликозилирования могут варьироваться у различных типов клеток-хозяина.

Полипептиды настоящего изобретения могут быть получены любым подходящим способом. Такими 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 первого аспекта настоящего изобретения могут представлять собой полипептиды, гомологичные полипептидам INSP002. Два полипептида могут быть определены 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 определена. (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heijne, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Grabskov, M. and 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 они происходят), и мутанты (такие как мутанты, содержащие аминокислотные замены, инсерции или делеции) полипептидов INSP002. Такими мутантами могут быть полипептиды, в которых один или более 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 Asn и Gln; между основными остатками Lys и Arg; или между ароматическими остатками Phe и Tug. 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 "молчачие" 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 более аминокислотных остатков включают группу-заместитель.

Обычно считается, что два полипептида, имеющие более чем 30% идентичность, являются функционально эквивалентными. Предпочтительно, чтобы функционально эквивалентные полипептиды первого аспекта настоящего изобретения имели степень идентичности последовательности полипептида INSP002 или его активных фрагментов, составляющую более 35%. Более предпочтительными являются полипептиды, имеющие степень идентичности более чем 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99% или более соответственно.

Функционально эквивалентными полипептидами первого аспекта настоящего изобретения могут быть также полипептиды, которые были идентифицированы с применением одного или более методов сопоставления структур. Так, например, для идентификации полипептидов с неизвестными функциями, в отношении которых, несмотря на их низкую степень идентичности полипептидам INSP002, делается предположение, что они обладают активностью секреции молекулы, где указанное предположение основано на их значительной структурной гомологии с последовательностями полипептида INSP002, может быть использована технология информационной обработки потока данных для генома (Inpharmatica Genome Threader), которая составляет один из аспектов методов поиска, используемых для генерирования базы данных поиска Biopendium (см. совместно рассматриваемую заявку на патент Великобритании, PCT/GB01/01105). Термин "значительная структурная гомология" означает, что технология Inpharmatica Genome Threader позволяет предсказать, с достоверностью 10% и выше, что два белка имеют структурную гомологию.

Полипептиды первого аспекта настоящего изобретения также включают фрагменты полипептидов INSP002 и фрагменты функциональных эквивалентов полипептидов INSP002, при условии, что эти фрагменты сохраняют активность цитокина, имеющего цистиновые узлы в своей структуре, а предпочтительно, активность члена подсемейства DAN, имеющего цистиновые узлы в своей структуре, либо они имеют антигенную детерминанту, общую для полипептидов INSP002.

Используемый здесь термин "фрагмент" означает полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая идентична части, но не всей, аминокислотной последовательности полипептидов INSP002, либо одному из их функциональных эквивалентов. Эти фрагменты должны содержать, по крайней мере п смежных аминокислот последовательности, и в зависимости от конкретной последова-

тельности, п, предпочтительно, равно 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 или более). Небольшие фрагменты могут образовывать антигенную детерминанту.

Указанные фрагменты могут присутствовать в "свободной форме", т.е. не являясь частью другого полипептида или не быть присоединенными к другим аминокислотам или полипептидам, либо они могут входить 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 про-полипептидную область, присоединенную к амино-концу указанного фрагмента, и/или дополнительную область, присоединенную к карбоксильному концу этого фрагмента. При этом в состав одного более крупного полипептида могут входить несколько фрагментов.

Полипептиды настоящего изобретения или их иммуногенные фрагменты (содержащие, по крайней мере одну антигенную детерминанту) могут быть использованы для генерирования лигандов, таких как поликлональные или моноклональные антитела, которые обладают иммunoспецифичностью к 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 специалиста, такие антитела, помимо других применений, могут быть также использованы в качестве диагностических или терапевтических средств.

Термин "иммunoспецифический" означает, что антитела имеют, в основном, более высокую аффинность к полипептидам настоящего изобретения, чем к другим родственным полипептидам известного уровня. 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 детерминантой. Такие антитела связываются с полипептидами первого аспекта настоящего изобретения.

Под понятием "значительно более высокая аффинность" подразумевается заметно повышенная аффинность к полипептиду настоящего изобретения по сравнению с аффинностью известных секрециируемых белков.

При этом, предпочтительно, чтобы аффинность к полипептиду настоящего изобретения, по крайней мере, в 1,5, 2, 5, 10, 100, 10³, 10⁴, 10⁵ или 10⁶ раз превышала аффинность к известным секрециируемым белкам, таким как цитокины, имеющие цистиновые узлы в своей структуре, в частности, таким как члены подсемейства DAN.

Если желательно использовать поликлональные антитела, то выбранное млекопитающее, такое как мышь, кролик, коза или лошадь, может быть иммунизовано полипептидом первого аспекта настоящего 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. Затем связанный полипептид может быть использован для иммунизации животного. Сыворотку, взятую у иммунизированного животного, собирают и обрабатывают известными методами, например, иммуноаффинной хроматографией.

Моноклональные антитела против полипептидов первого аспекта настоящего изобретения могут быть легко продуцированы любым специалистом. Общая методика получения моноклональных антител с использованием гибридомной техники хорошо известна в данной области (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 and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985)).

Панели моноклональных антител, продуцированных против полипептидов первого аспекта настоящего 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 в данной области, а также они могут быть клонированы и экспрессированы в соответствующих векторах.

Могут быть также использованы химерные антитела, в которых не-человеческие вариабельные 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); Verhoeyen et al. Science, 239, 1534 (1988); Kabat et al. J. Immunol., 147, 1709 (1991); Queen et al. Proc. Nati Acad. Sci. USA, 86, 10029 (1989); Gorman et al., Proc. Nati Acad. Sci. USA, 88, 34181 (1991); and Hodgson et al, Bio/Technology, 9, 421 (1991)). Используемый термин "гуманизованное антитело" означает молекулы антитела, в которых аминокислоты CDR и другие выбранные аминокислоты в вариабельных 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. имеющее два различных антиген-связывающих домена, каждый из которых обладает специфичностью к различным эпитопам.

Для отбора генов, кодирующих антитела, обладающие способностью связываться с полипептидами настоящего изобретения, 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 увеличена путем перестановки цепей (Clackson T. et al. (1991), *Nature* 352, 624-628).

Антитела, генерированные описанными выше 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 этих целей антитела могут быть помечены аналитически детектируемым реагентом, таким как радиоизотоп, флуоресцентная молекула или фермент.

Предпочтительными молекулами нуклеиновой кислоты второго и третьего аспектов настоящего изобретения являются молекулы, которые кодируют полипептидные последовательности, представленные в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:14, и функционально эквивалентные полипептиды. Эти молекулы нуклеиновой кислоты могут быть использованы в способах и для целей, описанных в настоящей заявке. Молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, предпочтительно, содержат, по крайней мере п смежных нуклеотидов в описываемых последовательностях, и в зависимости от конкретной последовательности, п предпочтительно, равно 10 или более (например, 12, 14, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40 или более).

Молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения также включают последовательности, комплементарные последовательностям молекул нуклеиновой кислоты, описанных выше (например, для использования в качестве антисмысловых последовательностей или в качестве зондов).

Молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения 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 микроорганизма. 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, также известная как смысловая цепь, либо некодирующая цепь, также называемая антисмысловой цепью.

Термин "молекула нуклеиновой кислоты" также охватывает аналоги ДНК и РНК, такие как аналоги, содержащие модифицированные остатки и связанные с пептидом нуклеиновые кислоты (PNA). Используемый термин "PNA" означает антисмысловую молекулу или антиген, который содержит олигонуклеотид, состоящий, по крайней мере, из пяти нуклеотидов, и присоединенный к пептидному остатку из аминокислотных остатков, которые, предпочтительно, заканчиваются лизином. Концевой лизин предает 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 приостанавливают элонгацию транскрипта (Nielsen P.E. et al. (1993), *Anticancer Drug Des.* 8:53-63).

Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид SEQ ID NO:2, может быть идентична кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO:1 (нуклеотиды 152-475), и представлена в SEQ ID NO:12. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид SEQ ID NO:7, может быть идентична кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO:1 (нуклеотиды 218-475), и представлена в SEQ ID NO:10. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид SEQ ID NO:4, может быть идентична кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO:3. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид SEQ ID NO:6, может быть идентична кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO:5 (нуклеотиды 152-721), и представлена в SEQ ID NO:11. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид SEQ ID NO:8, может быть идентична кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO:5 (нуклеотиды 218-721), и представлена в SEQ ID NO:9. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид SEQ ID NO:14, может быть идентична кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO:13 (нуклеотиды 69-719), и представлена в SEQ ID NO:15.

Эти молекулы могут также иметь различные последовательности, которые, вследствие вырожденности генетического кода, кодируют полипептид SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:14. Такими молекулами нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:14,

могут быть, но не ограничиваются ими, кодирующая последовательность для отдельного зрелого полипептида; кодирующая последовательность для зрелого полипептида вместе с другими кодирующими последовательностями, такими как последовательности, кодирующие лидерную или секреторную последовательность, такую как про-, пре- или препро-полипептидную последовательность; кодирующая последовательность зрелого полипептида с приведенными выше дополнительными кодирующими последовательностями или без них, либо вместе с дополнительными некодирующими последовательностями, включая некодирующие 5'- и 3'-последовательности, такие как транскрибированные нетранслированные последовательности, которые играют определенную роль в транскрипции (включая сигналы терминации) и в связывании с рибосомой и обеспечивают стабильность мРНК. Молекулами нуклеиновой кислоты могут также включать вспомогательные последовательности, кодирующие дополнительные аминокислоты, такие как аминокислоты, обладающие дополнительными функциональными свойствами.

Молекулы нуклеиновой кислоты второго и третьего аспектов настоящего изобретения могут также кодировать фрагменты или функциональные эквиваленты полипептидов и фрагментов первого аспекта настоящего изобретения. Такая молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой природный вариант, такой как природный аллельный вариант, либо указанной молекулой может быть 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.

Из рассматриваемых вариантов можно отметить варианты, которые отличаются от приведенных выше молекул нуклеиновой кислоты тем, что они имеют нуклеотидные замены, делеции или инсерции. Замены, делеции или инсерции могут быть осуществлены по отношению к одному или более нуклеотидам. Варианты могут быть модифицированы в кодирующей или в некодирующей области или в той и другой области. Альтерации в кодирующих областях могут приводить к консервативным или неконсервативным аминокислотным заменам, делециям или инсерциям.

Молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения могут быть также сконструированы методами, в основном, известными в данной области, включая, в зависимости от различных целей, модификацию клонирования, процессинга и/или экспрессии генного продукта (полипептида). Перестановка ДНК путем рандомизированной фрагментации и повторной сборки с помощью ПЦР генных фрагментов и синтетических олигонуклеотидов 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 первого аспекта настоящего изобретения, могут быть лигированы с гетерологичной последовательностью так, чтобы комбинированная молекула нукleinовой кислоты кодировала гибридный белок. Такие комбинированные молекулы нукleinовой 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 нукleinовой кислоты может оказаться полезным экспрессировать гибридный белок, который будет распознаваться коммерчески доступным антителом. Гибридный белок может быть также сконструирован таким образом, чтобы он содержал сайт расщепления, расположенный между последовательностью полипептида настоящего изобретения и последовательностью гетерологичного белка, и чтобы такой полипептид мог быть отщеплен и выделен из указанного гетерологичного белка.

Молекулами нукleinовой кислоты настоящего изобретения могут быть также антисмыловые молекулы, которые являются частично комплементарными молекулам нукleinовой кислоты, кодирующими полипептиды настоящего изобретения, и поэтому, они гибридизуются с кодирующими молекулами нукleinовой кислоты (в результате гибридизации). Антисмыловые молекулы, такие как олигонуклеотиды, могут быть сконструированы так, чтобы они распознавали нужную нукleinовую кислоту, кодирующую полипептид настоящего изобретения, специфически связывались с этой нукleinовой кислотой и предупреждали ее транскрипцию, в соответствии с методами, хорошо известными специалистам (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 термин "гибридизация" означает присоединение двух молекул нукleinовой 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 контактировать 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 BLOTTО); концентрация молекул; использование соединений, повышающих скорость ассоциации молекул (сульфата декстрана или полиэтиленгликоля); и жесткость условий промывки после гибридизации (Sambrook et al.

[см. выше]).

Ингибиование гибридизации полностью комплементарной молекулы с молекулой-мишенью может быть оценено с использованием гибридизационного анализа, известного в данной области (Sambrook et al. [см. выше]). В основном, гомологичная молекула будет затем конкурировать с полностью гомологичной молекулой за связывание с молекулой-мишенью и ингибиовать 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 способствуют ассоциации наиболее сходных молекул, но не ассоциации молекул, не обладающих таким сходством. Условия гибридизации высокой жесткости определены как условия инкубирования в течение ночи при 42°C в растворе, содержащем 50% формамид, 5X SSC (150мМ NaCl, 15мМ тринатрийцитрат), 50мМ фосфат натрия (рН 7,6), 5x раствор Денхардта, 10% сульфат декстрана 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, осуществляющую 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 крайней мере на 70% идентичны молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды INSP002 (SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:14), и к 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 крайней мере, на 80% идентична кодирующими последовательностям для SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:7, представленным в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:12; кодирующей последовательности для SEQ ID NO:4, представленной в SEQ ID NO:3; кодирующими последовательностями для SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:8, представленным в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:11; или кодирующими последовательностями для SEQ ID NO:14, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:15; либо, чтобы она представляла собой комплементарную им молекулу нуклеиновой кислоты. При этом особенно предпочтительно, чтобы молекулы нуклеиновой кислоты по всей своей длине были по крайней мере на 90%, более предпочтительно по крайней мере на 95%, особенно предпочтительно по крайней мере на 98% или 99% идентичны указанным последовательностям. Предпочтительными вариантами этого аспекта являются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды, которые обладают, в основном, такой же биологической функцией или активностью, что и полипептиды INSP002.

Настоящее изобретение относится к способу детекции молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, включающему стадии:

(a) контактирования нуклеинового зонда настоящего изобретения с биологическим образцом в условиях гибридизации, способствующих образованию дуплексов; и

(b) детекции любого такого образованного дуплекса.

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 INSP002, 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 описанные и обсуждаемые методы, которые приводятся ниже в качестве иллюстрации. Методы секвенирования и анализа ДНК хорошо известны и, в основном, доступны в данной области, и могут быть реально использованы для осуществления многих вариантов настоящего изобретения, обсуждаемых в настоящей заявке. В указанных методах могут использоваться ферменты, такие как фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, секвеназа (US Biochemical Corp., Cleveland, OH), полимераза Taq (Perkin Elmer), термостабильная полимераза 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 DNA Sequencers (Perkin Elmer).

Одним из методов выделения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с функцией, эквивалентной функции полипептида INSP002, является зондирование библиотеки геномных ДНК или кДНК природным или искусственно сконструированным зондом с использованием стандартных методик, известных в данной области (см. например, "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al. (eds). Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, 1989, 1992). Особенно подходящими являются зонды, содержащие 15, предпочтительно по крайней мере 30, более предпочтительно по край-

ней 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:5, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15). Для облегчения идентификации такие зонды могут быть помечены аналитически детектируемым реагентом. Подходящими реагентами являются, но не ограничиваются ими, радиоизотопы, флуоресцентные красители и ферменты, способные катализировать образование детектируемого продукта. С использованием этих зондов специалист 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 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 в данной области методов детекции расположенных выше 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 TM (Clontech Laboratories Inc.), значительно упростили поиск более длинных кДНК. Для поиска неизвестной последовательности нукleinовой 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 также использована 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 PromoterFinderTM для "прогулки" по геномной ДНК (Clontech, Palo Alto, CA). Этот способ позволяет избежать необходимости скрининга библиотек и может быть использован для обнаружения участков стыка инtron/экзон.

При скрининге на полноразмерные ДНК 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'-нетранскрибированных регуляторных областей.

В одном из вариантов осуществления изобретения, молекулы нукleinовой кислоты настоящего изобретения могут быть использованы для определения локализации в хромосоме. В этом методе молекула нукleinовой 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 важным звеном в подтверждении корреляции этих последовательностей с геноассоциированным заболеванием. После картирования последовательности с определением ее точной 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 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 обнаружения 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 нукleinовой кислоты может быть также использована для детекции различий в хромосомной локализации, обусловленных транслокацией, инверсией и т.п., у нормальных индивидуумов, индивидуумов-носителей и у индивидуумов с заболеванием.

Молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения 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 позволили 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 заболевании. Такая аномальная экспрессия может иметь кратковременную, пространственную или количественную природу.

Для ингибирования эндогенной экспрессии гена, кодирующего полипептид настоящего изобретения, могут быть также использованы 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 днРНК-олигонуклеотиды синтезируют *in vitro* и вводят в клетку. Последовательность-специфическое связывание этих днРНК-олигонуклеотидов запускает процесс деградации мРНК-мишени, приводит к снижению уровня или к отмене экспрессии целевого белка.

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

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

Полипептиды настоящего изобретения 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 экспрессионную 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, эпизомная и вирусные системы, включая, например, векторы, происходящие от бактериальных плазмид, бактериофага, транспозонов, дрожжевых эпизом, инсерционных элементов, дрожжевых хромосомных элементов, вирусов, таких как бакуловирус, паповавирусы, такие как SV40, вирусы коровьей оспы, аденоавирусы, вирусы оспы домашней птицы, псевдорабивирусы 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 также использованы искусственные хромосомы (НАС).

Особенно подходящими экспрессионными 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 Ti или pBR322); или клеточные системы животных. Для продуцирования полипептидов настоящего изобретения могут быть также использованы бесклеточные системы трансляции.

Введение молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид настоящего изобретения, в клетки-хозяева может быть осуществлено методами, описанными во многих известных лабораторных руководствах, таких как руководство Davis et al. I 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; трасвекция; микронижекция; трансфекция, опосредованная катионным липидом; электропорация; трансдукация; загрузка путем соскоба; введение методом биобаллистики или инфицирование (см. Sambrook et al., 1989, [см. выше], Ausubel et al. [см. выше],

Spector, Goldman & Leinwald, 1998). В эукариотических клетках экспрессионные 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 лидерную 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 pSportITM (Gibco BRL) и т.п. В клетках насекомых может использоваться бакуловирусный промотор полиэдрона. 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.

Экспрессионный 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 последовательность так, чтобы она могла присоединяться к регуляторным последовательностям в соответствующей ориентации, т.е. с сохранением рамки считывания.

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

Для длительного высокоеффективного продуцирования рекомбинантного полипептида, предпочтительной является стабильная экспрессия. Так, например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют нужный полипептид, могут быть трансформированы с использованием экспрессионных векторов, которые могут содержать вирусные сайты инициации репликации и/или эндогенные экспрессионные элементы и выбранный маркерный ген, присутствующий на том же самом или на отдельном векторе. 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 клонны 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 в данной области, и такими клеточными линиями являются многие иммортализованные клеточные линии, имеющиеся в Американской коллекции типовых культур (ATCC), включая, но не ограничиваясь ими, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почек детёнышней 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 экспрессионных 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*.

В данной области 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 US 5693506, US 5659122 и US 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 генерированием из них целых регенерированных растений, которые содержали бы перенесенный ген. В частности, из культивируемых клеток или тканей могут быть регенерированы все растения, включая, но, не ограничиваясь ими, все основные виды сахарного тростника, сахарной свеклы, хлопчатника, плодовых и других деревьев, 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 в данной области. Примерами являются гены тимидинкиназы (Wigler M. et al. (1977) *Cell* 11:223-32) и аденин-fosфорибозилтрансферазы вируса простого герпеса (Lowy I. et al. (1980) *Cell* 22:817-23), которые могут быть использованы в tk- или арг^r-клетках соответственно.

Кроме того, в качестве основы для отбора могут быть использованы гены резистентности к антиметаболиту, антибиотику или к гербициду, например, ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), который придает резистентность к метотрексату (Wigler M. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3567-70); ген prt, который придает резистентность к аминогликозидам, неомицину и к G-418 (Colbere-Garapin F. et al. (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14), и гены als или rat, которые придают резистентность к хлорсульфурон- и фосфинотрицинацетилтрансферазе 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 настоящего изобретения, 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 настоящего изобретения, 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 (таких 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, M.N. 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 анализаах на присутствие нуклеиновых кислот и аминокислот. Методами, используемыми в целях продуцирования меченых зондов для гибридизации или ПЦР-зондов для детекции последовательностей, родственных молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептиды настоящего изобретения, являются мечение олигонуклеотидами, ник-трансляция, мечение по концам или ПЦР-амплификация с использованием меченного полинуклеотида. Альтернативно, последовательности, кодирующие полипептид настоящего изобретения, могут быть клонированы в вектор для продуцирования мРНК-зонда. Такие векторы известны в данной области, 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 меченых нуклеотидов. Эти методики могут быть осуществлены 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, хемилуминисцентные или

хромогенные агенты, а также субстраты, кофакторы, ингибиторы, магнитные частицы и т.п.

Молекулы нукleinовой кислоты настоящего изобретения могут быть также использованы для генерирования трансгенных животных, в частности, грызунов. Такие трансгенные животные входят в дополнительный аспект настоящего изобретения. Такое 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 генерирования животных-моделей в целях поиска молекул лекарственных средств, которые являются эффективными в качестве модуляторов полипептидов настоящего изобретения.

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 фосфоцеллюзне, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксиаппаратах и хроматографию на лектине. Для очистки наиболее подходящей является высокоеффективная жидкостная хроматография. В случае если данный полипептид был денатурирован в процессе выделения или очистки, то для восстановления активной конформации может быть использована хорошо известная техника рефолдинга белков.

Если необходимо, то для облегчения очистки белков могут быть также использованы специальные векторные конструкции, полученные путем присоединения последовательностей, кодирующих полипептиды настоящего изобретения, 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 A, которые позволяют проводить очистку на иммобилизованном иммуноглобулине; и домен, используемый в системе FLIGS удлинение/аффинная очистка (Immunex Corp., Seattle, WA). Для облегчения очистки, между доменом для очистки и полипептидом настоящего изобретения 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 настоящего изобретения, 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 восстановлена для выделения и очистки экспрессированного полипептида. Если полипептид продуцируется внутри клетки, то перед выделением полипептида клетки должны быть сначала подвергнуты лизису.

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

Соединения-агонисты или соединения-анатагонисты 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 I(2):Chapter 5 (1991).

Соединения, которые могут рассматриваться как наиболее вероятные кандидаты на хорошие антагонисты, представляют собой молекулы, которые связываются с полипептидом настоящего изобретения, 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 настоящего изобретения и, тем самым, ингибируют или подавляют его активность. Таким образом, связывание полипептида с нормальными связывающимися клеточными молекулами может ингибироваться так, чтобы подавлялась нормальная биологическая активность полипептида.

Полипептид настоящего изобретения, который используется в таком методе скрининга, может на-

ходиться в растворе в свободном состоянии, может быть иммобилизован на твердом носителе, может присутствовать на клеточной поверхности, либо он может быть локализован внутри клетки. В основном такие методы скрининга предусматривают использование соответствующих клеток или клеточных мембран, экспрессирующих полипептид, который контактирует с тестируемым соединением, что приводит к связыванию, либо к стимуляции или ингибированию функционального ответа. Функциональный ответ клеток, контактируемых с тестируемым соединением, сравнивают с контрольными клетками, которые не контактировали с тестируемым соединением. С помощью подходящей системы детекции, такой анализ 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.

Предпочтительный способ идентификации соединения-агониста или соединения-антагониста по отношению к полипептиду настоящего изобретения включает:

(а) контактирование клетки, экспрессирующей на клеточной поверхности полипептид первого аспекта настоящего изобретения, который ассоциирован со вторым компонентом, способным давать детектируемый сигнал в ответ на связывание соединения с указанным полипептидом, и при этом соединение скринируют в условиях, стимулирующих связывание с полипептидом; и

(б) определение события связывания указанного соединения с указанным полипептидом, либо его активации или ингибирования путем измерения уровня сигнала, генерируемого в результате взаимодействия указанного соединения с указанным полипептидом.

Еще более предпочтительный способ идентификации агониста или антагониста по отношению к полипептиду настоящего изобретения включает:

(а) контактирование клетки, экспрессирующей на клеточной поверхности полипептид, который ассоциирован со вторым компонентом, способным давать детектируемый сигнал в ответ на связывание соединения с полипептидом, и при этом соединение скринируют в условиях, стимулирующих связывание с полипептидом; и

(б) определение события связывания соединения с полипептидом, либо его активации или ингибирования путем сравнения уровня сигнала, генерируемого в результате взаимодействия соединения с полипептидом, с уровнем сигнала, полученного в отсутствии указанного соединения.

В других предпочтительных вариантах изобретения общие методы, описанные выше, могут дополнительно включать осуществление идентификации агониста или антагониста в присутствии меченого или немеченого лиганда для полипептида.

В другом варианте изобретения способ идентификации агониста или антагониста полипептида настоящего изобретения включает: определение факта ингибирования связывания лиганда с клетками, которые содержат полипептид настоящего изобретения на своей поверхности, или с клеточными мембранами, содержащими такой полипептид, в присутствии соединения-кандидата в условиях, стимулирующих связывание с полипептидом, и определение количества лиганда, связанного с полипептидом. Считается, что соединение, способное приводить к снижению уровня связывания с лигандом, является агонистом или антагонистом. При этом предпочтительно, чтобы указанный лиганд был меченным.

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

(а) инкубирования меченого лиганда с целой клеткой, экспрессирующей полипептид настоящего изобретения на клеточной поверхности, или с клеточной мембраной, содержащей полипептид настоящего изобретения;

(б) измерения количества меченого лиганда, связанного с целой клеткой или с клеточной мембраной;

(с) добавления соединения-кандидата к смеси меченого лиганда и целой клетки или клеточной мембранны стадии (а) и доведение этой смеси до состояния равновесия;

(д) измерения количества меченого лиганда, связанного с целой клеткой или с клеточной мембраной, после проведения стадии (с); и

(е) сравнения различия в количествах связанного меченого лиганда стадий (б) и (д), где соединение, вызывающее снижение уровня связывания в стадии (д), считается агонистом или антагонистом.

В вышеописанных анализах может быть установлено, что указанные полипептиды модулируют различные физиологические и патологические процессы дозозависимым способом. Так, например, "функциональными эквивалентами" полипептидов настоящего изобретения являются полипептиды, которые в приведенных выше анализах обладают той же самой дозозависимой модулирующей активностью. Хотя уровень дозозависимой активности необязательно является идентичным уровню полипептидов настоящего изобретения, однако, предпочтительно, чтобы в данном анализе на активность "функциональные эквиваленты" обнаруживали в основном такую же аналогичную зависимость от дозы, как и полипептиды настоящего изобретения. В некоторых описанных выше вариантах 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, или с помощью анализа на конкуренцию с меченым со-

единением-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 тестируемым соединением на продуцирование мРНК, кодирующей указанный полипептид, в клетках. Так, например, анализ ELISA может быть разработан так, чтобы можно было измерить секреции или клеточно-ассоциированные уровни полипептида с использованием моноклональных или поликлональных антител стандартными методами, известными в данной области, и этот 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.

Аналитическими способами, которые также входят в объем настоящего изобретения, являются способы, предусматривающие использование генов и полипептидов настоящего изобретения в анализах на сверхэкспрессию или в анализах на исключение. Такие анализы предусматривают манипуляцию с уровнями указанных генов/полипептидов в клетках и оценку влияния этой манипуляции на физиологию клеток, подвергнутых манипуляции. Так, например, такие эксперименты позволяют точно выявить пути передачи сигнала и метаболические пути, в которых участвуют конкретные гены/полипептиды, а также получить информацию относительно идентичности полипептидов, с которыми взаимодействуют исследуемые полипептиды, и найти ключ к разгадке механизмов, с помощью которых регулируются родственные гены и белки.

Другой метод, который может быть использован для скрининга на лекарственные средства, дает возможность осуществлять высокоеффективный скрининг соединений, обладающих подходящей аффинностью связывания с нужным полипептидом (см., Международную патентную заявку WO 84/03564). В этом методе, большое число различных небольших тестируемым соединений синтезируют на твердом субстрате, который затем может быть подвергнут реакции с полипептидом настоящего изобретения и промывке. Одним из способов иммобилизации полипептида является использование не-нейтрализующих антител. Связанный полипептид может быть затем детектирован методами, хорошо известными в данной области. Очищенный полипептид также может быть непосредственно нанесен на планшеты для последующего использования в приведенных выше способах скрининга на лекарственные средства.

Полипептид настоящего изобретения может быть использован для идентификации мембранно-ассоциированных или растворимых рецепторов с помощью стандартной техники связывания с рецептором, известной в данной области, такой как анализы на связывание и перекрестное сшивание с лигандом, в которых 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 плазменный резонанс и спектроскопия. Анализы на связывание могут быть использованы для очистки и клонирования рецептора, но они могут быть также использованы для идентификации агонистов и антагонистов указанного полипептида, которые конкурируют с указанным полипептидом за связывание с рецептором. Стандартные методы проведения скрининг-анализов хорошо известны в данной области.

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

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

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим полипептид, нуклеиновую кислоту, лиганд или соединение настоящего изобретения в комбинации с подходящим фармацевтическим носителем. Эти композиции могут быть использованы в качестве терапевтических или диагностических реагентов, 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 крайней мере 85 мас.% от всего количества X+Y в данной композиции составляет X. Предпочтительно X составляет по крайней мере примерно 90% по общей массе X+Y в данной композиции, более предпочтительно по крайней мере примерно 95, 98 или даже 99 мас.%.

Фармацевтические композиции предпочтительно должны содержать терапевтически эффективное количество полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты, лиганда или соединения настоящего изобретения. Используемый здесь термин "терапевтически эффективное количество" означает количество тера-

певического агента, необходимого для лечения, ослабления или профилактики 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. Животное-модель может быть также использовано для определения соответствующего интервала концентраций и способа введения. Такая 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, возраста, массы и пола индивидуума, его режима питания и частоты введения лекарственного средства, а также от комбинации(й) лекарственных средств, чувствительности данного индивидуума на реакцию и его переносимость/восприимчивость к данной 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 этот носитель сам по себе не индуцирует выработывание антител, оказывающих негативное воздействие на индивидуума, которому вводят указанную композицию, и что данный вводимый носитель 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 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-забуферивающие вещества и т.п. С помощью таких носителей могут быть получены фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, супензий и т.п., для перорального введения пациенту.

Композиции настоящего изобретения, после их приготовления, могут быть непосредственно введены индивидуумами, подвергаемыми лечению, могут быть животные, в частности человек.

Фармацевтические композиции, используемые в настоящем изобретении, могут быть введены различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, пероральное, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интрамедулярное, интратекальное, интравентрикулярное, трансдермальное или чрескожное введение (см. например, WO 98/10734), а также подкожное, внутрибрюшинное, интраназальное, кишечное, местное, подъязычное, интравагинальное или ректальное введение. Для введения фармацевтических композиций настоящего изобретения могут быть также использованы «генные ружья» или безигольные шприцы. В основном, терапевтические композиции могут быть приготовлены в виде растворов для инъекций, либо в виде жидких растворов или супензий, либо они могут быть получены в виде твердых форм, подходящих для получения растворов или супензий в жидких носителях перед их введением путем инъекции.

Указанные композиции могут быть непосредственно доставлены, в основном, путем подкожной, внутрибрюшинной, внутривенной или внутримышечной инъекции, либо они могут быть доставлены в интерстициальное пространство ткани. 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 настоящего изобретения превышает активность, требуемую для лечения конкретного патологического состояния, то в данном случае может быть рассмотрено несколько подходов. Один из таких подходов включает 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 ингибирования вторичного сигнала, и, тем самым, эффективном 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

соответствующие части.

В альтернативном подходе, экспрессия гена, кодирующего полипептид, может быть ингибирирована методами блокирования экспрессии, такими как использование молекул антисмысловой нуклеиновой кислоты (описанных выше), которые могут быть либо эндогенно генерированы, либо введены отдельно. Модификации экспрессии генов могут быть получены путем конструирования комплементарных последовательностей или антисмысловых молекул (ДНК, РНК или РНА) для контролирующих элементов, 5'-последовательностей или регуляторных последовательностей (сигнальной последовательности, промоторов, энхансеров и инtronов) гена, кодирующего полипептид. Аналогичным образом, 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 and 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 настоящего изобретения 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.

РНК-молекулы 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 молекулы или использование в указанном остове молекулы фосфортиоата или 2'-О-метила вместо фосфодиэтеразных связей. Эта концепция может рассматриваться и при производстве 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 уридинина, которые не могут легко распознаваться эндогенными эндонуклеазами.

Для лечения аномальных состояний, ассоциированных с недостаточной экспрессией полипептида настоящего изобретения и его активностью, имеется несколько способов. Один из таких способов предусматривает введение индивидууму терапевтически эффективного количества соединения, которое активирует полипептид, т.е. соединение-агонист, описанное 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 производства у индивидуума данного полипептида соответствующими клетками может быть применена генотерапия. Генотерапию используют для перманентного лечения заболеваний, связанных с аномальным производством полипептида, путем замены дефектного гена "правильным" терапевтическим геном.

Генотерапия настоящего изобретения может быть осуществлена *in vivo* или *ex vivo*. Для генотерапии *ex vivo* требуется 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 пациента.

Для введения пациенту, терапевтический ген обычно является "упакованным". Носители для доставки генов могут быть невирусными, такими как липосомы, либо они могут представлять собой дефектные по репликации вирусы, такие как адено-вирус, описанный Berkner K.L., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158, 39-66 (1992) или векторы на основе адено-ассоциированного 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 настоящего изобретения, может быть сконструирована для экспрессии в дефектном по репликации ретровирусном векторе. Затем эта экспрессионная конструкция может быть выделена и введена в упаковывающую клетку, трансдуцированную ретровирусным плазмидным вектором, содержащим РНК, кодирующую указанный полипептид, так, чтобы указанная упаковывающая клетка производила инфекционные вирусные частицы, содержащие нужный ген. Эти клетки-продуценты могут быть введены индивидууму для конструирования клеток *in*

vivo и экспрессии полипептид *in vivo* (см. Chapter 20 Gene Therapy and 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 настоящего изобретения являются агенты, вызывающие заболевание, настоящее изобретение относится к их возможному применению в вакцинах для вырабатывания антител против указанного агента, вызывающего заболевания. Если приведенный выше полипептид или молекула нуклеиновой кислоты должны быть активированы, то разрабатываемая вакцина должна вырабатывать антитела или Т-клетки против указанных агентов (как описано в WO 00/29428).

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

Поскольку полипептиды могут разрушаться 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.

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

Доставка антител, связывающихся с полипептидами настоящего изобретения, методами генотерапии может быть осуществлена, например, как описано в Международной патентной заявке WO 98/55607.

Для получения вакциновых композиций может быть также использована технология безигольного 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 также относится к применению молекул нуклеиновой кислоты настоящего изобретения в качестве диагностических реагентов. Детекция мутированной формы гена, характеризующейся существованием молекул нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, которые ассоциируются с дисфункцией, используется в качестве диагностического средства, которое может облегчать установление диагноза заболевания или установления 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 уровне ДНК рядом методов.

Молекулы нуклеиновой кислоты, используемые для диагностики, могут быть получены из клеток данного индивидуума, таких как клетки крови, мочи, слюны, биоптата ткани или материала, полученного после аутопсии. Геномные ДНК могут быть использованы непосредственно для детекции либо перед проведением анализа они могут быть амплифицированы ферментативно с использованием 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 аспектов настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания у пациента, включающему оценку уровня экспрессии природного гена, кодирующего полипептид настоящего изобретения, и сравнение полученного уровня экспрессии с контрольным уровнем, где уровень, отличающийся от указанного контрольного уровня, является признаком наличия данного заболевания. Этот способ может включать следующие стадии:

а) контактирование образца ткани, взятой у пациента, с нуклеиновокислотным зондом в жестких условиях, в результате чего образуется гибридный комплекс между молекулой нуклеиновой кислоты настоящего изобретения 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 данного пациента, которые отличаются от уровней гибридного комплекса в контрольном образце, является признаком наличия данного заболевания.

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

а) получения образцов тканей от пациента, исследуемого на наличие заболевания;

б) выделения молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения из указанного образца ткани; и

с) установления диагноза заболевания у данного пациента путем обнаружения присутствия мутации молекулы нуклеиновой кислоты, которая ассоциируется с данным заболеванием.

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

Делекции и инсерции могут быть детектированы по изменению размера амплифицированного продукта по сравнению с нормальным генотипом. Точечная мутация может быть идентифицирована путем гибридизации амплифицированной ДНК с меченой РНК настоящего изобретения, или альтернативно, с меченой антисмысловой ДНК-последовательностью настоящего изобретения. 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 нуклеинокислотным зондом, который гибридизуется с ДНК в жестких условиях, в результате чего образуется гибридная двухцепочечная молекула, которая имеет негибридизованную часть цепи нуклеинокислотного зонда в любой области, соответствующей мутации, ассоциированной с заболеванием; и установления присутствия или отсутствия негибридизованной части цепи нуклеинокислотного зонда как показателя наличия или отсутствия ассоциированной с заболеванием мутации в соответствующей области ДНК-цепи.

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

Точечные мутации и другие отличия между последовательностями эталонного гена и "мутантных" генов могут быть идентифицированы другими хорошо известными методами, такими как прямое секвенирование ДНК или определение конформационного полиформизма одноцепочечных последовательностей (см. Ogita et al., Genomics, 5, 874-879 (1989)). Так, например, секвенирующий праймер может быть использован вместе двухцепочечным ПЦР-продуктом или с одноцепочечной матричной молекулой, генерированной с помощью модифицированной ПЦР. Определение последовательности осуществляют в соответствии со стандартными методиками с использованием радиоактивно меченых нуклеотидов или в соответствии с методами автоматического секвенирования с использованием флуоресцентных меток. Клонированные ДНК-сегменты могут быть также использованы в качестве зондов для детекции специфических ДНК-сегментов. Чувствительность этого метода значительно повышается при использовании в комбинации с ПЦР. Кроме того, точечные мутации и другие модификации последовательностей, такие как полиморфизм, могут быть детектированы, как описано выше, например, с использованием алель-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 путем 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 микроделекции, 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, не прибегая к их выделению и/или иммобилизации на мемbrane. Гибридизация *in situ* с флуоресценцией (FISH) является в настоящее время наиболее широко используемым методом, и множество его описаний уже появилось в литературе (см. например, Trachuck et al. Science 250, 559-562 (1990) и Trask et al. Trends, Genet., 7, 149-154 (1991)).

В другом варианте осуществления изобретения для проведения эффективного скрининга генетических вариантов, мутаций и полиморфизма может быть создан массив олигонуклеотидных зондов, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения. Технология создания массивов хорошо известна в данной области, находит широкое применение и может быть использована для решения ряда проблем молекулярной генетики, касающихся экспрессии генов, сцепления генов и генетической измен-

чивости (см. например, M. Chee et al., *Science* (1996). Vol. 274, pp.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 Schema M. et al. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:10614-10619. Олигонуклеотидные пары могут быть использованы в количестве от двух пар до одного миллиона пар. 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 настоящего изобретения олигонуклеотид может быть синтезирован на поверхности субстрата с использованием процедуры химического связывания и струйного аппарата для нанесения путем разбрзгивания, как описано в заявке PCT WO 95/251116 (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 использованием вакуумной системы и методов термического, УФ-, механического или химического связывания. Массив, такой как массивы, описанные выше, может быть создан вручную или с использованием 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 двух и выше одного миллиона, которое является подходящим для эффективного использования коммерчески доступного оборудования.

Помимо методов, описанных выше, заболевания могут быть диагностированы методами, включающими 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 в данной области, например, путем амплификации нуклеиновых кислот, а именно, с помощью ПЦР или ОТ-ПЦР, путем проведения анализов на защиту от РНКазы, с помощью Нозерн-блот-анализов и другими методами гибридизации.

Аналитические методы, которые могут быть использованы для определения уровней полипептида настоящего изобретения в образце, взятом у хозяина, хорошо известны специалистам, и 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 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 при определении 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 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 настоящего изобретения, 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 настоящего изобретения. Антитела, подходящие для использования в диагностических целях, могут быть получены способом, аналогичным способу, описанному выше для терапии.

Диагностические анализы на присутствие полипептида осуществляют методами, в которых используют антитело и метку для детекции полипептида в физиологических жидкостях или 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. При этом могут быть использованы репортерные молекулы широкого ряда, известные в данной области, и некоторые из них описаны выше.

Количества полипептида, экспрессируемого у индивидуума, в контролльном и зараженном образцах 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 использован для выявления отсутствия, присутствия и избыточной экспрессии полипептида и для мониторинга регуляции уровней полипептида во время терапевтического лечения. Такие анализы могут быть также использованы для оценки эффективности конкретного курса терапевтического лечения при исследовании животных в клинических испытаниях или для наблюдения за лечением отдельного пациента.

Диагностический набор настоящего изобретения может содержать:

- (а) молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения;
- (б) полипептид настоящего изобретения; или
- (с) лиганд настоящего изобретения.

В одном из аспектов настоящего изобретения, диагностический набор может включать первый контейнер, содержащий нуклеиновокислотный зонд, который гибридизуется в жестких условиях с молекулой нуклеиновой кислоты настоящего изобретения; 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 расщепления негибридизованной РНК.

В альтернативном аспекте настоящего изобретения, диагностический набор может содержать массив молекул нуклеиновой кислоты, по крайней мере, одной из которых является молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения.

Для детекции полипептида настоящего изобретения диагностический набор может содержать одно или более антител, связывающихся с полипептидом настоящего изобретения, и реагент, используемый для детекции реакции связывания между антителом и полипептидом.

Такие наборы могут быть использованы для диагностики заболевания или восприимчивости к заболеванию, в частности, для диагностики пролиферативных расстройств, аутоиммунных/воспалительных заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний, неврологических расстройств, нарушений развития, метаболических расстройств, инфекций и других патологических состояний. Такими заболеванием или расстройством являются, предпочтительно, заболевание или расстройство, ассоциированное с аберрантными уровнями цитокина, имеющего цистиновые узлы в своей структуре, предпочтительно, члена подсемейства DAN. Таким заболеванием или расстройством может быть также расстройство или заболевание, которое ассоциируется с аберрантными уровнями лиганда для цитокина, имеющего цистиновые узлы в своей структуре, предпочтительно, для члена подсемейства DAN. Так, например, таким заболеванием или расстройством может быть заболевание или расстройство, которое ассоциируется с аберрантными уровнями члена суперсемейства TGF-бета. В частности, указанным заболеванием или расстройством может быть заболевание или расстройство, которое ассоциируется с BMP, такое как невропатия, нефропатия, такая как диабетическая нефропатия, рак, заживление ран, фиброз, остеопения, остеопороз, переломы и склеростеоз. Различные аспекты и варианты настоящего изобретения будут более подробно проиллюстрированы на примерах, в частности, для полипептидов INSP002.

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

Краткое описание графического материала

Фиг. 1 - результаты, полученные с помощью BLAST в неизбыточной базе данных NCBI с использованием объединенной полипептидной последовательности SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4;

фиг. 2 - сопоставление, осуществляющее с помощью программы BLAST, объединенной полипептидной последовательности SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4 с близкородственной последовательностью *segberius*-родственного белка 1 *Homo sapiens*;

фиг. 3 - четыре наилучших соответствия в базах данных NCBI-nr и NCBI-nt BLAST, полученных для INSP002 26 ноября 2002;

фиг. 4 - сопоставление INSP002 с AK095926.1;

фиг. 5 - сопоставление INSP002 с IMAGE: 4558384;

фиг. 6 - нуклеотидная последовательность INSP002 с трансляцией;

фиг. 7 - неполная клонированная последовательность INSP002 с трансляцией;

фиг. 8 - карта для неполного PCR-II-TOPO-INSP002;

фиг. 9 - сопоставление предсказанной последовательности INSP002 (верхняя строка) с неполной клонированной последовательностью (нижняя строка);

фиг. 10 - нуклеотидная последовательность и трансляция кДНК-вставки в Image: 4558384;

фиг. 11 - сопоставление последовательностей предсказанного INSP002 (верхняя строка) с IMAGE: 4558384 (BC025333.1)(нижняя строка);

фиг. 12 - нуклеотидная последовательность и трансляция INSP002V, генерированного с помощью ПЦР, в Image: 4558384;

фиг. 13 - карта pCR4blunt-TOPO-INSP002V;

фиг. 14 - сравнение предсказанного INSP002 (верхняя строка) с вариантом последовательности INSP002V (нижняя строка);

фиг. 15 - карта экспрессирующего вектора pEAK12d;

фиг. 16 - карта вектора pDONR201 Gateway;

фиг. 17 - карта pEAK12d-INSP002-V-6HIS;

фиг. 18 - последовательность полноразмерного INSP002, клонированного из сердца;

фиг. 19 - карта плазмида pCR4blunt-TOPO-INSP002FL, кодирующей полноразмерный INSP002, клонированного из сердца.

Примеры

Пример 1. Сравнение белка INSP002 с белками в базе данных последовательностей.

Полипептидную последовательность, происходящую от объединенных последовательностей SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4, которая представляет собой транслированную последовательность следующих друг за другом экзонов INSP002, использовали в качестве запрашиваемой последовательности в программе BLAST для поиска в базе данных неизбыточных последовательностей NCBI. Наилучшие десять соответствий дают последовательности, аннотированные как белки *cerberus* или *cerberus*-родственные белки, которые являются членами семейства цитокинов с цистиновыми узлами, и которые сопоставляли с запрашиваемой последовательностью с высокозначимыми величинами E ($2E^{-10}$ - $2E^{-06}$) (фиг. 1). На фиг. 2 показано сопоставление запрашиваемой последовательности INSP002 с последовательностью *cerberus*-родственного белка 1 *Homo sapiens* (Feng et al. 2001).

Полипептидную последовательность, происходящую от объединенных последовательностей SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4, которая представляет собой транслированную последовательность следующих друг за другом экзонов INSP002, вводили в программу SignalP V2.0.b2 (Nielsen et al. 1997 Protein Eng. 1:1-6). С помощью этой программы было предсказано, что указанная полипептидная последовательность имеет сигнальный пептид. Наиболее вероятно, что сайт отщепления сигнального пептида находится между остатками 22 и 23 указанной полипептидной последовательности INSP002, происходящей от объединенных последовательностей SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4.

Нуклеотидная последовательность SEQ ID NO:1, кодирующая экзон 1 полипептида SEQ ID NO:2, содержит 5'-нетранслируемую область (5'UTR) и белок-кодирующую последовательность (CDS). CDS начинается с нуклеотида 152.

Пример 2. Повторение BLAST-поиска.

BLAST-поиск в базах данных NCBI-nr и NCBI-nt проводили 26 ноября 2002 с использованием полипептидной последовательности SEQ ID NO:6, происходящей от объединенных последовательностей SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4. Наилучшие четыре соответствия, идентифицированные в результате проведенного поиска, показаны на фиг. 3.

Этот поиск выявил, что полипептид INSP002 идентичен гипотетическому белку FLJ38067 на аминокислотном уровне и соответствующей нуклеотидной последовательности AK095926, клонированной из сердца и депонированной 16 июля 2002 г. На фиг. 4 показано сопоставление запрашиваемой последовательности INSP002 с белком, происходящем от кДНК-клона AK095926.

Граница сплайсинга экзона 1 и экзона 2, предсказанная для INSP002, была экспериментально подтверждена присутствием AK095926.

<p>450 . : . : . : .</p> <p>451 GATGTGTAAGGCTGTGCCCTCGTTCAAG GTGTTCTCCCGGC >>...>> </p>	<p>10225 GATGTGTAAGGCTGTGCCCTCGTTCAAGTG,..CAGGTGTTCTCCCGGC</p>
<p>Экзон1</p>	<p>Экзон2</p>
<p>500 . : . : . : .</p> <p>492 CCGGCTGCTCAGCCATACGCCCTCCGAATCATCTGTGCTTGGTCATTGCG </p>	
<p>13670 CCGGCTGCTCAGCCATACGCCCTCCGAATCATCTGTGCTTGGTCATTGCG</p>	

Исследования также показали, что части INSP002 идентичны IMAGE-клону 4558384 (BC025333.1), депонированному 8 марта 2002 г. На фиг. 5 показано сопоставление частей запрашиваемой последовательности INSP002 с IMAGE-клоном 4558384.

Пример 3. Частичное клонирование кДНК INSP002.

(i) Библиотеки кДНК.

Библиотеки человеческих кДНК (в векторах бактериофага лямбда (λ)) закупали у Stratagene или Clontech или получали в Научно-исследовательском институте фармакологии Серено в векторах λ ZAP или λ GT10 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). Список используемых библиотек и штаммов-хозяев приведен в табл. 1.

(ii) ПЦР предполагаемых кДНК, полученных из фаговой библиотеки ДНК.

Неполную кДНК, кодирующую INSP002 (фиг. 6), получали в виде продукта ПЦР-амплификации, состоящего из 159 п.н. (фиг. 7), с использованием геноспецифических клонирующих праймеров (INSP002-CP1 и INSP002-CP2, фиг. 6 и табл. II). ПЦР осуществляли в конечном объеме 50 мкл, содержащем IX буфер AmpliTaqTM, 200 мкМ dNTP, 50 пмоль каждого клонирующего праймера, 2,5 единиц AmpliTaqTM (Perkin-Elmer) и 100 нг каждой фаговой библиотеки ДНК с использованием аппарата MJ Research DNA Engine с установленной программой, работающей в следующем режиме; 94°C, 1 мин; 40

циклов - 94°C, 1 мин, x °C и у мин и 72°C (где x означает наименьшую температуру Tm=5°C, и у=1 мин на т.п.н. продукта); затем 1 цикл - 72°C, 7 мин и цикл выдерживания при 4°C.

Продукты амплификации визуализировали на 0,8% агарозном геле в 1Х буфере TAE (Life Technologies) и ПЦР-продукты, мигрирующие в предполагаемой молекулярной массе, выделяли из геля с использованием системы очистки ДНК Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega). ПЦР-продукты, элюированные в 50 мкл стерильной воды, либо непосредственно субклонировали, либо хранили при -20°C.

(iii) Геноспецифические клонирующие праймеры для ПЦР.

Пары ПЦР-праймеров, имеющих длину от 18 до 25 нуклеотидов, конструировали для амплификации полноразмерной последовательности предполагаемой кДНК с использованием программы Primer Designer Software (Scientific & Educational Software, PO Box 72045, Durham, NC 27722-2045, USA). ПЦР-праймеры оптимизировали так, чтобы Tm была близка к 55±10°C, и содержание GC составляло 40-60%. Отбирали праймеры, которые обнаруживали высокую селективность для последовательности-мишени INSP002 (низкий уровень или отсутствие неспецифического праймирования с другими матрицами).

(iv) Субклонирование ПЦР-продуктов.

ПЦР-продукты субклонировали в клонирующий вектор, модифицированный топоизомеразой I (pCRII-TOPRO) с использованием набора для клонирования TOPRO TA, закупленного у Invitrogen Corporation (cat. № K4600-01 и K3575-01 соответственно), и с использованием условий, указанных производителем. Вкратце, 4 мкл выделенного из геля ПЦР-продукта, полученного в результате амплификации библиотеки последовательностей почки плода человека (библиотека номер 12), инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре с 1 мкл вектора TOPRO и 1 мкл солевого раствора. Затем реакционную смесь трансформировали в штамм TOP10 Ecoli (Invitrogen) следующим образом: 50 мкл-аликвоту клеток One Shot TOP10 оттаивали на льду и добавляли 2 мкл реакционной смеси TOPRO. Смесь инкубировали в течение 15 ч на льду и затем подвергали тепловому шоку путем инкубирования при 42°C в течение точно 30 с. Затем образцы снова помещали на лед и добавляли 250 мкл теплой среды SOC (при комнатной температуре). Образцы инкубировали со встряхиванием (220 об/мин) в течение 1 ч при 37°C. Затем смесь для трансформации высевали на чашки с L-бульоном (LB), содержащие ампициллин (100 мкг/мл), и инкубировали в течение ночи при 37°C. Резистентные к ампициллину колонии, содержащие кДНК-вставки, идентифицировали с помощью ПЦР колоний.

(v) ПЦР колоний.

Колонии инокулировали в 50 мкл стерильной воды с использованием стерильной зубочистки. Затем 10 мкл-аликвоту инокулята подвергали ПЦР в общем реакционном объеме 20 мкл, как описано выше, за исключением того, что в качестве пар праймеров использовали SP6 и T7. Циклы проводили в следующих условиях: 94°C, 2 мин, 30 циклов при 94°C, 30 с.; 47°C, 30 с. и 72°C, 1 мин; 1 цикл, 72°C, 7 мин. Затем перед проведением анализа образцы выдерживали при 4°C (цикл выдерживания).

Продукты ПЦР-реакции анализировали на 1% агарозных гелях в буфере 1 Х ТАЕ. Колонии, которые давали ПЦР-продукт предполагаемого размера (159 п.н. -кДНК + 187 п.н., что обусловлено присутствием сайта множественного клонирования или 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 при 37°C.

(vi) Получение и секвенирование плазмидной ДНК.

Минипрепарат плазмидной ДНК получали из 5 мл культур с использованием роботизированной системы Qiaprep Turbo 9600 (Qiagen) или набора Wizard Plus SV Miniprep (Promega cat. № 1460) в соответствии с инструкциями производителей. Плазмидную ДНК элюировали в 100 мкл стерильной воды. Концентрацию ДНК измеряли с использованием фотометра Эппendorфа ВО. Затем плазмидную ДНК (200-500 нг) подвергали ДНК-секвенированию с использованием праймера 17 и праймера SP6 и с использованием системы BigDye Terminator (Applied Biosystems cat. № 4390246) в соответствии с инструкциями производителей. Реакционные смеси для секвенирования очищали на колонках с Dye-Ex (Qiagen) или на планшетах для очистки Montage SEQ 96 (Millipore cat. № LSKS09624) и затем анализировали на секвенаторе Applied Biosystems 3700.

(vii) Идентификация кДНК-библиотек, содержащих INSP002.

ПЦР-продукты, полученные с использованием INSP002-CP1 и INSP002-CP2 и мигрирующие при "правильном" размере (159 п.н.), идентифицировали в библиотеках кДНК коры головного мозга, толстой кишки, легких плода и почек плода (библиотеки 8, 9, 11 и 12). Последовательность ПЦР-продукта, клонированного в вектор pCRII-TOPRO, показана на фиг. 7 и карта плазмиды (плазмиды ID 13422) - на фиг. 8. Неполная клонированная кДНК представляла собой часть экзона 2 INSP002, как было показано путем сопоставления предсказанной нуклеотидной последовательности INSP002 и клонированной неполной нуклеотидной последовательности на фиг. 9а, и сопоставления предсказанной последовательности белка INSP002 и клонированной неполной последовательности белка на фиг. 9б.

Пример 4. Генерирование ORF INSP002 из Image: 4558384.

Image-клон 4558384 (в плазмиде pOTB7), выделенный из ретинобластомы, закупали у Resgen (Invitrogen Corp.). Уколочную культуру E.coli 4558384 засевали путем разбрзгивания на LB-чашки, содержащие ампициллин (100 мкг/мл) и культивировали в течение ночи при 37°C. Отдельные резистентные к

ампициллину моноколонии инокулировали в 5 мл среды LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), и инкубировали со встряхиванием при 220 об/мин в течение ночи при 37°C. Получали минипрепарат плазмидной ДНК, который секвенировали с использованием праймеров SP6, T7, M13F, INSP002-CP1 и INSP002-CP2, как описано в примере 3(vi).

Последовательность вставки показана на фиг. 10. Сопоставление нуклеотидной последовательности и предполагаемой аминокислотной последовательности, предсказанной, исходя из кДНК Image 4558384, с INSP002, показано на фиг. 11. Очевидно, что кДНК Image 4558384 представляет собой вариант сплайсинга INSP002. Этот вариант, по сравнению с предсказанный последовательностью INSP002, содержит 87 п.н.-вставку, которая вводит сдвиг рамки считывания и ранний стоп-кодон. Помимо 3'-нетранслируемой последовательности, он также содержит Alu-повтор, что указывает на контаминирующее включение геномной ДНК в кДНК. Экзоны 2 и 4 Image 4558384 эквивалентны экзонам 1 и 2 предсказанного INSP002. Однако Image 4558384 вводит дополнительный экзон между экзонами 1 и 2 предсказанного INSP002. Дополнительный экзон кодирует ранний стоп-кодон, что предотвращает трансляцию домена "цистиновый узел". Границы сплайсинга в Image 4558384 показаны ниже:

500	. . : . . : . . : . . :	
492	GGCTGTGCCCTTCGTTCAAG	ACACGGGAGTCTCGCTATGTTG
	>>>...>>>	
10234	GGCTGTGCCCTTCGTTCAAGGTG...	TAGACACGGGAGTCTCGCTATGTTG
	Экзон2	Экзон3
550	. . : . . : . . : . . :	
533	CCCAAGCTAGTCTTGAGCTTCTGGCCTAAGCAATCCTCCCACCTCAGCC	
10741	CCCAAGCTAGTCTTGAGCTTCTGGCCTAAGCAATCCTCCCACCTCAGCC	
600	. . : . . : . . : . . :	
583	TCC [REDACTED] GTTCTAG	GTGTTCTCCGGCCGGCTGCTCAGCCA
	>>>...>>>	
10791	TCC [REDACTED] GTTCTAGGTG...	CAGGTGTTCTCCGGCCGGCTGCTCAGCCA

Для удаления геномной ДНК в целях генерирования полноразмерной кДНК, кодирующей ORF INSP002, рекомендуется использовать ПЦР-стратегию. ПЦР-праймеры были сконструированы для амплификации 5'-конца (выше) и 3'-конца (ниже) последовательности INSP002, которая фланкирует 87 п.н.-вставку в клоне Image. Обратный праймер для расположенной выше последовательности и прямой праймер для расположенной ниже последовательности содержали комплементарные последовательности у своих 3'- и 5'-концов соответственно для создания перекрывающихся концов так, чтобы ПЦР-продукты от каждой реакции могли смешиваться и подвергаться отжигу, что обеспечивало бы амплификацию полноразмерной кДНК в третьей ПЦР-реакции, проводимой с использованием присоединяемого выше "гнездового" прямого праймера и присоединяемого ниже "гнездового" обратного праймера.

Первая ПЦР-реакционная смесь, используемая для амплификации 5'-конца INSP002 (выше от 87 п.н.-вставки), содержала, в конечном объеме 50 мкл, 5 мкл 10X буфера Pfx Platinum, 1,5 мкл dNTP (10 мМ), 1 мкл MgSO₄ (50 мМ), 1,5 мкл INSP002V-5'-F (10 мкМ), 1,5 мкл INSP002V-5'-R (10 мкМ), 0,75 мкл Pfx Platinum и 135 нг плазмидной кДНК IMAGE:4558384. Амплификацию осуществляли в следующих условиях: 1 цикл при 94°C, 2 мин, 30 циклов при 94°C, 15 с и 68°C, 1 мин. и 1 цикл при 68°C, 7 мин. Вторую ПЦР-реакцию амплификации 3'-конца INSP002 (ниже от 87 п.н.-вставки) осуществляли в тех же самых условиях, за исключением того, что в качестве праймеров использовали INSP002V-3'-F и INSP002V-3'-R.

Продукты амплификации визуализировали на 0,8% агарозном геле в 1Х буфере ТАЕ (Invitrogen). ПЦР-продукты, мигрирующие в предполагаемой молекулярной массе (520 п.н. и 448 п.н. для ПЦР 1 и 2 соответственно) выделяли из геля с использованием системы очистки ДНК Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega). ПЦР-продукты элюировали в 50 мкл стерильной воды, и концентрацию ДНК измеряли с использованием фотометра Эппendorфа ВО. Затем 50 нг каждого очищенного ПЦР-продукта использовали в качестве матрицы для "гнездовой" ПЦР в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл 10X буфера Pfx Platinum, 1,5 мкл dNTP (10 мМ), 1 мкл MgSO₄ (50 мМ), 1,5 мкл INSP002V-5'nest-F (10 мкМ), 1,5 мкл INSP002V-3' nest-R (10 мкМ). Реакционную смесь нагревали при 95°C в течение 3 мин и добавляли 0,75 мкл полимеразы Pfx Platinum. Амплификацию осуществляли в следующих условиях: 1 цикл при 94°C, 2 мин, 30 циклов при 94°C, 15 с, 61°C, 30 с и 68°C 1 мин и 1 цикл 68°C, 7 мин. ПЦР-продукты, мигрирующие в предполагаемой молекулярной массе 719 п.н., выделяли из геля с использованием системы очистки ДНК Wizard PCR Preps DNA Purification System и элюировали в 50 мкл стерильной воды. Затем 4 мкл очищенного ПЦР-продукта лигировали в вектор pCR4blunt-TOPO, как описано в

разделе 1.4. Резистентные к ампициллину колонии тестировали на вставки с помощью ПЦР колоний с использованием праймеров T3 и T7, как описано в разделе 1.5. Колонии, которые давали ПЦР-продукт ожидаемого размера (719 п.н.+106 п.н., что обусловлено присутствием сайта множественного клонирования или MCS), культивировали в 5 мл LB-бульона, содержащего ампициллин (100 мкг/мл), со встряхиванием при 220 об/мин при 37°C. Минипрепарат плазмидной ДНК получали из 5 мл культур и секвенировали с использованием праймеров T3 и T7, как описано в разделе 1.6. Последовательность одного из полученных клонов и соответствующая плазмидная карта (pCR4blunt-TOPO-INSP002V) показаны на фиг. 12 и 13 соответственно. Трансляция клонированной последовательности показала, что INSP002V содержит 2 аминокислотных делеции ($\Delta V107$ и $\Delta Q108$) и одну аминокислотную замену (F110L) по сравнению с предсказанный последовательностью INSP002. Сопоставление нуклеотидной и аминокислотной последовательностей предсказанного INSP002 и INSP002V проиллюстрировано на фиг. 14.

При сравнении с предсказанным INSP002 было выявлено, что на границе сплайсинга между экзонами 1 и 2 используется расположенный выше донорный сайт длиной 6 п.н. Это приводит к делеции двух аминокислот (ValGlu). Используемый акцептор сплайсинга аналогичен акцептору, используемому в предсказанным INSP002, однако за этим акцептором имеются две ошибки, обнаруженные при секвенировании. Это приводит к аминокислотной замене (Phe → Leu).

Пример 5. Конструирование плазмида для экспрессии INSP002V в клетках HEK293/EBNA.

Клон pCR4blunt-TOPO, содержащий полноразмерную кодирующую последовательность (ORF) INSP002V, идентифицированную путем секвенирования ДНК (фиг. 13), затем использовали для субклонирования вставки в вектор для экспрессии pEAK12d в клетках млекопитающего (фиг. 15) с использованием методики клонирования Gateway™ (Invitrogen).

(i) Генерирование Gateway-совместимой ORF INSP002, присоединенной к последовательности-метке 6HIS, с сохранением рамки считывания.

Первая стадия способа клонирования Gateway включает двухстадийную ПЦР-реакцию, которая генерирует ORF INSP002V, flankированную у 5'-конца сайтом рекомбинации attB1 и последовательностью Козака, и у 3'-конца - последовательностью, кодирующую, с сохранением рамки считывания, б-гистидиновую (6HIS) метку стоп-кодоном и сайтом рекомбинации attB2 (Gateway-совместимой кДНК). Первая ПЦР-реакционная смесь (в конечном объеме 50 мкл) содержала: 25 нг pCR4blunt-TOPO-INSP002V (плазмида 13075 и фиг. 13), 1,5 мкл dNTP (10 мМ), 5 мкл 10X полимеразного буфера Pfx, 1 мкл MgSO₄ (50 мМ), 0,5 мкл каждого геноспецифического праймера (100 мкМ) (INSP002V EX1 и INSP002V-EX2) и 0,5 мкл ДНК-полимеразы Pfx Platinum (Invitrogen). ПЦР-реакцию осуществляли с использованием начальной стадии денатурации при 95°C, 2 мин, с последующим проведением 12 циклов при 94°C, 15 с, и 68°C, 30 с. ПЦР-продукты очищали непосредственно из реакционной смеси с использованием системы очистки ДНК Wizard PCR Prep (Promega) в соответствии с инструкциями производителей. Вторая ПЦР-реакционная смесь (в конечном объеме 50 мкл) содержала: 10 мкл очищенного ПЦР-продукта, 1,5 мкл dNTP (5мМ), 1 мкл MgSO₄ (50 мМ), 5 мкл 10X полимеразного буфера Pfx Platinum, 0,5 мкл каждого праймера для конверсии Gateway (100 мкМ) (прямого праймера GCP и обратного праймера GCP) и 0,5 мкл ДНК-полимеразы Pfx Platinum. Вторую ПЦР-реакцию осуществляли при следующих условиях: 95°C, 1 мин., 4 цикла при 94°C, 15 с; 45°C, 30 с и 68°C, 3,5 мин; 25 циклов при 94°C, 15 с; 55°C, 30 с и 68°C, 3,5 мин. ПЦР-продукты очищали, как описано выше.

(ii) Субклонирование Gateway-совместимой ORF INSP002V во встраивавший вектор pDONR201 Gateway и экспрессирующий вектор pEAK12d.

Вторая стадия способа клонирования Gateway включает субклонирование Gateway-модифицированного ПЦР-продукта во встраивавший вектор pDONR201 Gateway (Invitrogen, фиг. 16), которое осуществляли следующим образом: 5 мкл очищенного ПЦР-продукта инкубировали с 1,5 мкл вектора pDONR201 (0,1 мкг/мкл) , 2 мкл буфера BP и 1,5 мкл клоназной ферментной смеси BP (Invitrogen) при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакцию прекращали добавлением протеиназы K (2 мкг) и инкубировали при 37°C еще 10 мин. Аликвоту реакционной смеси (2 мкл) трансформировали в клетки DH10B E.coli путем электропорации с использованием импульсного устройства Biorad Gene Pulser. Трансформанты высевали на LB-планшеты с канамицином. Плазмидный минипрепарат ДНК (Mini-prep) приготавливали из 1-4 полученных колоний с использованием набора Wizard Plus SV Minipreps (Promega), и затем 1,5 мкл плазмидного элюата использовали в реакционной смеси для рекомбинации, содержащей 1,5 мкл вектора pEAK12d (фиг. 9) (0,1 мкг/мл), 2 мкл буфера LR и 1,5 мкл клоназы LR (Invitrogen) в конечном объеме 10 мкл. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем реакцию прекращали добавлением протеиназы K (2 мкг) и смесь инкубировали при 37°C в течение еще 10 мин. Аликвоту этой реакционной смеси (1 мкл) использовали для трансформации клеток DH10B E.coli путем электропорации.

Клоны, содержащие "правильную" вставку, идентифицировали путем проведения ПЦР колоний, как описано выше, за исключением того, что для ПЦР использовали праймеры pEAK12d F и pEAK12d R. Плазмидный минипрепарат ДНК выделяли из клонов, содержащих "правильную" вставку, с использованием роботизированной системы Qiaprep Turbo 9600 (Quigen) или вручную с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep (Promega), и последовательность подтверждалась с использованием прай-

меров pEAK12d F и pEAK12d R.

Очищенный в градиенте CsCl максипрепарат ДНК плазмида pEAK12d-INSP002V-6HIS (плазмида ID номер 13227, фиг. 17) получали из 500 мл культуры клонов с подтвержденной последовательностью (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), ресуспенсировали при концентрации 1 мкг/мл в стерильной воде и хранили при -20°C.

(iii) Конструирование экспрессирующего вектора pEAK12d.

Вектор pEAK12d представляет собой совместимый с системой клонирования Gateway вариант вектора pEAK12 для экспрессии в клетках млекопитающих (закупленного у Edge Biosystems), в котором нужная кДНК экспрессируется под контролем человеческого промотора EF1α. Вектор pEAK12d генерирували, как описано ниже.

pEAK12 расщепляли рестриктирующими ферментами HindIII и NotI, затупляли по концам фрагментом Кленова (New England Biolabs) и дефосфорилировали с использованием щелочной фосфатазы кишечника теленка (Roche). После дефосфорилирования вектор лигировали с сохранением рамки считывания с затупленным по концам кластером C Gateway (система конверсии вектора Gateway, Invitrogen, cat № 11828-019), который содержит сайты рекомбинации AttR, flankирующие ген ccdB и ген резистентности к хлорамфениколу и трансформировали в клетки DB3.1 E.coli (которые обеспечивают размножение векторов, содержащих ген ccdB). Минипрепарат ДНК выделяли из нескольких полученных колоний с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep (Promega) и расщепляли ферментами Asel/EcoRI для идентификации клонов с получением фрагмента длиной 670 п.н., что указывало на то, что этот кластер был встроен в "правильной" ориентации. Полученная плазмида была обозначена pEAK12d (фиг. 15).

Пример 6. Экспрессия INSP002-SV-6HIS-V1 в клетках млекопитающих (плазмида № 13227) и очистка.

Клетки почек эмбриона человека 293, экспрессирующие ядерный антиген вируса Эпштейна Барра (HEK293-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 во флаконы с 2x T225 (50 мл на флакон в среде DMEM/F12 (1:1)), содержащие посевную среду с 2% FBS (JRH) при плотности 2x10⁵ клеток/мл. На следующий день (день трансфекции 0) осуществляли трансфекцию с использованием реагента JetPEI™ (2 мкл/мкг плазмидной ДНК, PolyPlus-трансфекция). Для каждого флакона, 113 мкг ДНК (№ 13227) ко-трансфектировали 2,3 мкг GFP (флуоресцентного репортерного гена). Затем смесь для трансфекции добавляли во флаконы с 2x T225 и инкубировали при 37°C (5% CO₂) в течение 6 дней. Для повышения шансов получить большее количество материала, эту процедуру повторяли в еще в двух колбах, в результате чего получали всего 200 мл продукта. Подтверждение позитивной трансфекции проводили путем качественной оценки флуоресценции на день 1 и на день 6 (Axiovert 10 Zeiss).

На 6-й день (день сбора), супернатанты (200 мл) из четырех флаконов объединяли и центрифугировали (4°C, 400 г), затем помещали в сосуд, содержащий уникальный идентификатор.

Одну аликвоту (500 мкл) оставляли для проведения количественной оценки (QC) 6xHis-меченного белка (QC внутреннего биопроцессинга).

Способ очистки

200 мл образца культуральной среды, содержащего рекомбинантный белок с С-концевой меткой 6His, разводили холодным буфером А (50 mM Na₂PO₄; 600 mM NaCl; 8,7 % (мас/об) глицерина, pH 7,5) до конечного объема 400 мл. Образец фильтровали через стерильный фильтр 0,22 мкм (Millipore, 500 мл-фильтровальное устройство) и выдерживали при 4°C в стерильном квадратном 500 мл-сосуде со средой (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., сначала проводили металлоаффинную хроматографию на колонке с Poros 20 MC (Applied Biosystems), загруженной ионами Ni (4,6x50 мм, 0,83 мл), затем проводили гель-фильтрацию на колонке (1,0x10 см) со средой, содержащей сефадекс G-25 (Amersham Pharmacia).

Для проведения первой стадии хроматографии, металлоаффинную колонку регенерировали 30 колончными объемами раствора EDTA (100 mM EDTA; 1M NaCl; pH 8,0), снова загружали ионы металла путем промывки 15 колончными объемами 100 mM раствора NiSO₄, после чего промывали 10 колончными объемами буфера А, затем промывали 7 колончными объемами буфера В (50 mM Na₂PO₄; 600 mM NaCl; 8,7 % (мас/об) глицерин, 400 mM имидазол; pH 7,5) и, наконец, уравновешивали 15 колончными объемами буфера А, содержащего 15 mM имидазола. Образец загружали на аффинную колонку с металлическим Ni партиями по 200 мл. 200 мл образца переносили с помощью устройства для загрузки образцов Labomatic в 200 мл-петлю для образца и затем загружали на аффинную колонку с металлическим Ni при скорости потока 10 мл/мин. Для загрузки 400 мл образца на колонку процедуру переноса и загрузки повторяли еще раз. По окончании процедуры загрузки колонку промывали 12 колончными объемами буфера А, затем 28 колончными объемами буфера А, содержащего 20 mM имидазола. Во время промывки 20 mM имидазолом, вы свобождаемые примесные белки элюировались с колонки. И нако-

нец, рекомбинантный His-меченный белок элюировали 10 колоночными объемами буфера В при скорости потока 2 мл/мин и элюированный белок собирали в 1,6 мл-фракции.

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) и затем уравновешивали 4 колонками буфера C (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl; 1,5 мМ KH₂PO₄; 8 мМ Na₂HPO₄; 20% (мас/об) глицерина; pH 7,4). Фракции пиков, элюированные с Ni-колонки, автоматически пропускали через многофункциональное устройство для загрузки образцов, подсоединенное к рабочей станции VISION с колонки, загружали в колонку с сефадексом G-25 и затем белок элюировали буфером С при скорости потока 2 мл/мин. Обессоленный образец собирали в 2,2 мл-фракцию. Эту фракцию фильтровали через стерильный центрифужный фильтр 0,22 мкм (Millipore), разделяли на аликвоты, 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 анти-His антител.

После электрофореза белки подвергали электрофоретическому переносу из геля на нитроцеллюлозную мембрану при 290 mA в течение 1 ч при 4°C. Мембрану блокировали 5% сухим молоком в буфере E (137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 1,5 мМ KH₂PO₄; 8 мМ Na₂HPO₄; 0,1 % твина 20, pH 7,4) в течение 1 ч при комнатной температуре и затем инкубировали со смесью 2 кроличьих поликлональных анти-His антител (G-18 и H-15, 0,2 мгк/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 (3x10 мин) и 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 (3x10 мин), мембрану проявляли в течение 1 мин с помощью ECL-набора (Amersham Pharmacia). Затем мембрану экспонировали с пленкой Hyperfilm (Amersham Pharmacia), пленку проявляли и снимок вестерн-блота визуально анализировали.

Пример 7. Клонирование полноразмерного INSP002 из сердца.

Полноразмерную кодирующую последовательность INSP002 клонировали из кДНК сердца, как описано ниже.

(i) Генерирование кДНК-матрицы сердца.

Полноразмерную РНК сердца человека закупали у Clontech. Качество и концентрацию РНК анализировали с использованием биоанализатора Agilent 2100.

Реакционная смесь для синтеза кДНК содержала 1 мкл oligo(dT)₁₅ праймера (500 мкг/мл, Promega cat. № C1101), 2 мкг полноразмерной РНК и 1 мкл dNTP (10 мМ) в объеме 12 мкл. Полученную смесь нагревали при 65°C в течение 5 мин и затем охлаждали на льду. Затем добавляли следующие реагенты: 4 мкл 5X буфера для первой цепи, 2 мкл DTT (0,1 M), 1 мкл ингибитора рекомбинантной рибонуклеазы RNaseOut (40 единиц/мкл, Promega, cat.№ 2511) и смесь инкубировали при 42°C в течение 2 ч, после чего добавляли 1 мкл (200 единиц) Superscript II (Invitrogen cat. № 18064-014). Смесь инкубировали при 42°C в течение 50 мин и затем нагревали при 70°C в течение 15 мин. Для удаления матричной РНК добавляли 1 мкл (2 единицы) РНКазы Н E.coli (Invitrogen, cat. № 18021-014) и реакционную смесь инкубировали еще 20 мин при 37°C. Конечную реакционную смесь разводили 200 мкл стерильной воды и хранили при -80°C.

(ii) Клонирование полноразмерной кодирующей последовательности INSP002 с помощью ПЦР.

Полноразмерную кодирующую последовательность INSP002 клонировали из кДНК сердца человека с помощью ПЦР в 50 мкл реакционной ПЦР-смеси, содержащей 5 мкл кДНК сердца, 5 мкл 10X буфера Pfx, 1,5 мкл dNTP (10 мМ), 1 мкл MgSO₄ (50 мМ), 1,5 мкл геноспецифического прямого праймера INSP002-FL-F (10 мкл), 1,5 мкл геноспецифического обратного праймера INSP002-FL-R (10 мкМ) и 0,5 мкл ДНК-полимеразы Pfx Platinum (Invitrogen). Циклы проводили в следующих условиях: 1 цикл при 94°C, 4 мин, 35 циклов при 94°C, 15 с, при 55°C, 30 с, при 68°C, 1 мин и 1 цикл при 68°C, 10 мин, затем цикл выдерживания при 4°C.

Продукты амплификации визуализировали на 0,8% агарозном геле в 1X буфере TAE (Invitrogen) и ПЦР-продукты, мигрирующие в предполагаемой молекулярной массе (589 п.н.), выделяли из геля с использованием набора для экстракции в геле Qiagen MinElute (Qiagen). ПЦР-продукты элюировали в 50 мкл 10 mM Трис-HCl, pH 8,5 и субклонировали в вектор pCR4blunt-TOPRO, как описано выше (раздел 1.4). Несколько резистентных к ампциллину колоний подвергали ПЦР-реакции, как описано в разделе 1.5. Колонии, содержащие вставку "правильного" размера (589 п.н.+106 п.н., что обусловлено присутствием MCS), культивировали в течение ночи при 37°C в 5 мл L-бульона (LB), содержащего ампциллин (100 мкг/мл), со встряхиванием при 220 об/мин при 37°C. Минипрепарат плазмидной ДНК получали из 5 мл культур с использованием роботизированной системы Qiaprep Turbo 9600 (Qiagen) или с использованием набора Wizard Plus SV Miniprep (Promega cat. № 1460) в соответствии с инструкциями производителей, и затем 200-500 нг минипрепарата ДНК секвенировали, как описано в разделе 1.6 с использованием праймеров T3 и T7 (табл. III). Клонированная последовательность представлена на фиг. 18. Карта полученной плазиды, pCR4blunt-TOPRO-INSP002FL (плазмиды ID № 13514) показана на фиг. 19.

Таблица I
Библиотеки человеческих кДНК

Библиотека	Источник ткани/клетки	Вектор	Штамм-хозяин	Поставщик	№ в каталоге
1	Головной мозг плода человека	Zap II	XL1-Blue MRF'	Stratagen	936206
2	Яичник человека	GT10	LE392	Clontech	HL1098a
3	Гипофиз человека	GT10	LE392	Clontech	HL1097a
4	Плацента человека	GT11	LE392	Clontech	HL1075b
5	Яички человека	GT11	LE392	Clontech	HL1010b
6	Черное вещество человека	GT10	LE392	Получено авторами	
7	Головной мозг плода человека	GT10	LE392	Получено авторами	
8	Кора головного мозга человека	GT10	LE392	Получено авторами	
9	Толстая кишка человека	GT10	LE392	Clontech	HL1034a
10	Головной мозг плода человека	GT10	LE392	Clontech	HL1065a
11	Легкие плода человека	GT10	LE392	Clontech	HL1072a
12	Почки плода человека	GT10	LE392	Clontech	HL1071a
13	Печень плода человека	GT10	LE392	Clontech	HL1064a
14	Костный мозг человека	GT10	LE392	Clontech	HL1058a

15	Моноциты периферической крови человека	GT10	LE392	Clontech	HL1050a
16	Плацента человека	GT10	LE392	Получено авторами	
17	SHSY SY человека	GT10	LE392	Получено авторами	
18	Человеческая клеточная линия U373	GT10	LE392	Получено авторами	
19	Человеческая клеточная линия CF Roc-1	Uni Zap	XL1-Blue MRF'	Stratagen	936206
20	Сетчатка глаза человека	GT10	LE392	Clontech	HL1132a
21	Мочевой пузырь человека	GT10	LE392	Получено авторами	
22	Человеческие тромбоциты	Uni Zap	XL1-Blue MRF'	Получено авторами	
23	Человеческая нейробластома Kan+TS	GT10	LE392	Получено авторами	
24	Гладкая мышца бронхов человека	GT10	LE392	Получено авторами	
25	Гладкая мышца бронхов человека	GT10	LE392	Получено авторами	
26	Тимус человека	GT10	LE392	Clontech	HL1127a
27	5'-фрагмент селезенки человека	GT11	LE392	Clontech	HL1134b
28	Моноциты периферической крови человека	GT10	LE392	Clontech	HL1050a
29	Яички человека	GT10	LE392	Clontech	HL1065a
30	Головной мозг плода человека	GT10	LE392	Clontech	HL1065a
31	Черное вещество человека	GT10	LE392	Clontech	HL1093a
32	Плацента человека #11	GT11	LE392	Clontech	HL1075a
33	Головной мозг плода человека	GT10	LE392	Clontech	Сделано по заказу
34	Плацента человека #59	GT10	LE392	Clontech	HL5014a
35	Гипофиз человека	GT10	LE392	Clontech	HL1097a
36	Поджелудочная железа человека #63	Uni Zap XR	XL1-Blue MRF'	Stratagen	937208
37	Плацента человека #19	GT11	LE392	Clontech	HL1008
38	5'-фрагмент печени человека	GT11	LE392	Получено авторами	HL1115b

39	Матка человека	Zap-CMV XR	XL1-Blue MRF'	Stratagen	980207
40	кДНК-библиотека крупных вставок почки человека	Triple x2	XL1-Blue	Получено авторами	HL5507u

Таблица II
Праймеры для клонирования INSP002

Праймер	Последовательность (5'→3')
INSP002-CP1	CTC AGC CAT ACG CCT CCG AA
INSP002-CP2	GCT GAG CTG CCA GTG AGA CA
INSP002V-5'-F	ACC TGG AAG GAA GCG ACT GCA CTG A
INSP002V-5'-R	GCA GCC GGG CCG GGA GAG AAC GAA GGG CAC AGC CTT A
INSP002V-3'-F	AGG CTG TGC CCT TCG TTC TCT CCC GGC CCG GCT GCT C
INSP002V-3'-R	ACT CCA GGA CGG GCA CTG TGT CTA C
INSP002V-5'-nest-F	GTC GAC TGC TAG TGA CCT TGA G
INSP002V-3'-nest-R	ACA TCA TCC AGG TCC ACG TCT T

Таблица III
Праймеры для субклонирования и секвенирования INSP002

Праймер	Последовательность (5'→3')
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
M13F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
pEAK12-F	GCC AGC TTG GCA CTT GAT GT
pEAK12-R	GAT GGA GGT GGA CGT GTC AG
INSP002V-EX1	AA GCA GGC TTC <u>GCC ACC</u> ATG CTC CTT GGC CAG CTA TC
INSP002VEX2	GTG ATG GTG ATG GTG TGC TTT TGG GCT GCA GTG AC
GCP Прямой	G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GCC ACC
GCP Обратный	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TCA ATG GTG ATG GTG ATG GTG

Таблица IV
ПЦР-праймеры для клонирования полноразмерного INSP002

Праймер	Последовательность (5'→3')
INSP002V-FL-F	GAT GCT CCT TGG CCA GCT AT
INSP002V-FL-R	CCA TCC ACG ATG CTC AGT TC

Подчеркнутая последовательность = последовательность Козака
Последовательность, обозначенная жирным шрифтом = стоп-кодон
Последовательность, обозначенная курсивом = метка His

Список последовательностей

Примечание: для аминокислот, кодируемый участком стыка "экзон-экзон", аминокислота будет дополнительно приписана 5'-экзону

SEQ ID NO:1 (INSP002-нуклеотидная последовательность, экзон 1)

```

1 AAATGCCCTCC CAGGCTATCC AGGAGGGGCC AAGAGATTAA AAGCAGGTT
51 AGAAGGCTCA GATGCCACTC ACCAGACAGC AGGGTCGACT GCTAGTGACC
101 TTGAGCCAG TCCGGACAGA CAGACAGGCAGA GACAGACGCA CGGACAAGCA
151 GATGCTCCCTT GGCCAGCTAT CCACCTTCT GTGCCCTGCTT AGGGGGGCC
201 TGCCCTACAGG CTCAGGGAGG CCTGAACCCC AGTCTCCCTCG ACCTCAGTCC
251 TGGGCTGCAG CCAATCAGAC CTGGGCTCTG GCCCCAGGGG CCCTGCC
301 ACTGGTGCCA GCTTCTGCC TTGGGAGCTG GAAGGCCTTC TTGGGCTGC
351 AGAAAGCCAG GCAGCTGGGG ATGGCAGGC TGCAAGCGTGG GCAAGACGAG
401 GTGGCTGCTG TGACTCTGCC GCTGAACCCCT CAGGAAGTGA TCCAGGGAT
451 GTGTAAAGCT GTGCCCTTCG TTCAG

```

SEQ ID NO:2 (INSP002-последовательности белка, экзон 1)

```

1 MLLGQLSTLL CLLSGALPTG SGRPEPQSPR PQSWAAANOT WALGPGALPP
51 LVPASALGSW KAFLGLQKAR QLGMGRLQRG QDEVAAVTLP LNPQEVIQGM
101 CKAVPFVQ

```

SEQ ID NO:3 (INSP002-нуклеотидная последовательность, экзон 2)

```

1 GTGTTCTCCC GGCCCCGGCTG CTCAGCCATA CGCTCCGAA ATCATCTGTG
51 CTTGGTCAT TGCTCTCTC TCTACATCCC TGGCTCGGAC CCCACCCAC
101 TAGTCTGTG CAAACAGCTGT ATGCCCTGCTC GCAAGCGTTG GGCACCCGTG
151 GTCCCTGTGGT GTCTCACTGG CAGCTCAGGC TCCCGTCGAC GGGTGAAGAT
201 ATCCACCATG CTGATCGAGG GGTGTCACTG CAGCCCAAAA GCATGA

```

SEQ ID NO:4 (INSP002-последовательности белка, экзон 2)

```

1 VFSRPGCSAI RLRRNHLFGH CSSLYIPGSD PTPLVLNCNSC MPARKRWAPV
51 VLWCLTGSSA SRRRVKISTM LIEGCHCSPK A

```

SEQ ID NO:5 (INSP002-нуклеотидная последовательность)

```

1 AAATGCCCTCC CAGGCTATCC AGGAGGGGCC AAGAGATTAA AAGCAGGTT
51 AGAAGGCTCA GATGCCACTC ACCAGACAGC AGGGTCGACT GCTAGTGACC
101 TTGAGCCAG TCCGGACAGA CAGACAGGCAGA GACAGACGCA CGGACAAGCA
151 GATGCTCCCTT GGCCAGCTAT CCACCTTCT GTGCCCTGCTT AGGGGGGCC
201 TGCCCTACAGG CTCAGGGAGG CCTGAACCCC AGTCTCCCTCG ACCTCAGTCC
251 TGGGCTGCAG CCAATCAGAC CTGGGCTCTG GCCCCAGGGG CCCTGCC
301 ACTGGTGCCA GCTTCTGCC TTGGGAGCTG GAAGGCCTTC TTGGGCTGC
351 AGAAAGCCAG GCAGCTGGGG ATGGCAGGC TGCAAGCGTGG GCAAGACGAG
401 GTGGCTGCTG TGACTCTGCC GCTGAACCCCT CAGGAAGTGA TCCAGGGAT
451 GTGTAAAGCT GTGCCCTTCG TTCAGGTGTT CTCCCGGCC GGCTGCTCAG
501 CCATACGCT CGGAATCAT CTGTGCTTTG GTCATTGCTC CTCTCTCTAC
551 ATCCCTGGCT CGGACCCAC CCCACTAGTC CTGTGCAACA GCTGTATGCC
601 TGCTCGCAAG CGTTGGCAG CGGTGGTCT GTGGGTGTCTC ACTGGCAGCT
651 CAGCCTCCCG TCGACGGGTG AAGATATCCA CCATGCTGAT CGAGGGGTGT
701 CACTGCAGCC CAAAGCATG A

```

SEQ ID NO:6 (INSP002-последовательность белка)

```

1 MLLGQLSTLL CLLSGALPTG SGRPEPQSPR PQSWAAANOT WALGPGALPP
51 LVPASALGSW KAFLGLQKAR QLGMGRLQRG QDEVAAVTLP LNPQEVIQGM

```

101 CKAVPFVQVF SRPGCSAIRL RNHLFGHCS SLYIPGSOPT PLVLCNSCNP
151 ARKRWAPVVL WCLTGSASR RRVKISTMLI EGCHCSPKA

SEQ ID NO:7 (INSP002-последовательности белка без сигнального пептида, экзон 1)

1 RPEPQSPRPQ SWAAANQTWA LGPGALPPLV PASALGSWKA FLGLQKARQL
51 GMGRILQRGQQ EVAATLPLN PQEVIQGMCK AVPFVQ
151

SEQ ID NO:8 (INSP002-последовательность белка без сигнального пептида)

1 RPEPQSPRPQ SWAAANQTWA LGPGALPPLV PASALGSWKA FLGLQKARQL
51 GMGRILQRGQQ EVAATLPLN PQEVIQGMCK AVPFVQFSR PGCSAIRLRN
101 HLCFGHCSSL YIPGSOPTPL VLCNSCNP KRWPVVLMC LTGSSASRRR
151 VKISTMLIEG CHCSPKA

SEQ ID NO:9 (Нуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность белка INSP002 без сигнального пептида-зрелый полипептид INSP002)

1 AGGCCTGAAC CCCAGTCAG TCGACCTCA CGGCCAATCA GACCTGGGCT
61 CTGGGCCAG GGCCCTGCC CCCACTGGTG CCAGCTTCG CCGCCAGGGG CTGGCAAGGCC
121 TTCTTGGCC TCCAGAAAGC CAGGCAGCTG GGGATGGGCA GGCTGCACGG TGGGCAAGAC
181 GAGGTGGCTG CTGTGACTCT GCCTGAAAC CCGCCTGAGG TGATCCAGGG GATGTGTAAAG
241 GCTGTGCCCT TGTTTCAGGT TTCTCCCGG CCGCCTGAGG TGATCCAGGG GATGTGTAAAG
301 CATCTGTCT TTGGTCATTG CTCCCTCTCTC TACATCCCTG GCTCGGACCC CACCCCACTA
361 GTCTGTGCA ACAGCTGTAT GCCTGCTGCG AAGCGTTGGG CACCCGTTGGT CCTGTGGTGT
421 CTCACTGGCA GCTCAGCTC CGCTGACGG GTGAAGATAT CCACCATGCT GATCGAGGGG
461 TGTCACTGCA GCCCAAAAGC ATGA

SEQ ID NO:10 (Нуклеотидная последовательность экзона 1, кодирующего белок INSP002 без сигнального пептида-экзон 1 зрелого полипептида INSP002)

1 AGGCCTGAAC CCCAGTCAG TCGACCTCA CGGCCAATCA GACCTGGGCT
61 CTGGGCCAG GGCCCTGCC CCCACTGGTG CCAGCTTCG CCGCCAGGGG CTGGCAAGGCC
121 TTCTTGGCC TCCAGAAAGC CAGGCAGCTG GGGATGGGCA GGCTGCACGG TGGGCAAGAC
181 GAGGTGGCTG CTGTGACTCT GCCTGAAAC CCGCCTGAGG TGATCCAGGG GATGTGTAAAG
241 GCTGTGCCCT TGTTTCAGGT TTCTCCCGG CCGCCTGAGG TGATCCAGGG GATGTGTAAAG

SEQ ID NO:11 (Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок INSP002 без 5'-нетранслируемой области)

1 ATGCTCCTT GGCCAGCTAT CCACTCTCT GTGCCTGCCT AGCGGGGCCST
51 GCCTACAGG CTCAGGGAGG CCTGAACCCCC AGTCTCCTCG ACCTCAGTCT
101 GGGCTGCAG CCAATCAGAC CTGGCTCTG GGCCCAAGGGG CCCTGCCCTCA
151 CTGGTGCCA GCTTCTGCC TTGGGAGCTG GAAGGCCCTC TTGGGCCCTGCA
201 GAAAGCCAG GCAGCTGGGG ATGGGCAAGGC TGCAAGCTGG GCAAGACGAGG
251 TGCTGTGCT TGACTCTGCC GCTGAACCCCT CAGGAAGTGA TCCAGGGGATG
301 TGTAAAGGCT TGCCCTTCTG TTCAAGGTGT TTCCCCGGCCC GGCTGCTCAGC
351 CATAACGCTT CCGAACATCA CTGCTCTTTC GTCAATGCTC CTCTCTCTACA
401 TCCCTGGCT CGGACCCAC CCCACTAGTC CTGTGCAACA GCTGTATGCC
451 GCTCGCAAG CGTTGGGCAC CGCTGGCTCT GTGGTGTCTC ACTGGCAGCTC
501 AGCCTCCCG TCGACGGGTG AAGATATCCA CCATGCTGAT CGAGGGGTGTC
551 ACTGCAGCC CAAAAGCATG A

SEQ ID NO:12 (Нуклеотидная последовательность экзона 1, кодирующего белок INSP002 без 5'-нетранслируемой области)

1 ATGCTCCTT GGCCAGCTAT CCACTCTCT GTGCCTGCCT AGCGGGGCCST
51 GCCTACAGG CTCAGGGAGG CCTGAACCCCC AGTCTCCTCG ACCTCAGTCT
101 GGGCTGCAG CCAATCAGAC CTGGCTCTG GGCCCAAGGGG CCCTGCCCTCA
151 CTGGTGCCA GCTTCTGCC TTGGGAGCTG GAAGGCCCTC TTGGGCCCTGCA

201 GAAAGCCAG GCAGCTGGGG ATGGGCAGGC TCCAGCGTGG GCAAGACGAGG
 251 TGGCTGCTG TGACTCTGCC GCTGAACCT CAGGAAGTGA TCCAGGGATG
 301 TGTAAGGCT GTGCCCTTCG TTCAG

SEQ ID NO:13 (Нуклеотидная последовательность, кодирующая
 вариант полипептида INSP002)

1 GTCGACTGCT AGTGACCTTG AGCCCCAGTCC GGACAGCAG ACAGGCAGAC AGACGCACGG
 61 ACAAGCAGAT GCTCTCTGGG CAGCTATGCC CTCTCTGTG CCTGCTTAGC GGGGGCCCTGC
 121 CTACAGGCTC AGGGAGGCTC GAGCCCCAGT CTCCCTGCCA TCAGTCTGG GCTGCAGCCA
 181 ATCAGACCTG GGCTCTGGG CCAGGGGCC CGTCCCCACT GGTGCCAGCT TCTGCCCTTG
 241 GGAGCTGGAA GGCCCTCTTG GGCTCTGCAGA AAGCCAGGCA GCTGGGGATG GGCAGGCTGC
 301 AGCGTGGGC AGACGGAGGTC GCTGCTGTGA CTCTGCCCTG GAACCCCTAG GAAAGTGTAC
 361 AGGGGATGTG TAAGGCTGTG CCCTCTGTG TCTCCCGGCC CGGCTGCTCA GCCATACGCC
 421 TCCGAATCA TCTGTGCTTT GGTATTGCT CCTCTCTCTA CATCCCTGGC TCGGACCCCA
 481 CCCCCACTAGT CCTGTGCAAC AGCTGTATGC CTGCTGCCA GCGTTGGGCA CCCGGTGGTCC
 541 TGTGGTGTCT CACTGGCAGC TCAGCCTCCC GTGACGGGT GAAGATATCC ACCATGCTGA
 601 TCGAGGGGTG TCACTGCAGC CCAAAGCAT GAAGTGTGCA TCTGGATGGG TGCACGGAGA
 661 CACGACACCTT GGAGAAATGA GGGGAGATGG ACCAAGAAAG ACGTGGACCT GGATGATGT

SEQ ID NO:14 (Вариант полипептида INSP002)

1 MLLQLSTLL CLLSGALPTG SGRPEPQSPR PQSWAANOT WALPGPALPP LPVPSALGSW
 61 KAFLGLQKAR QLGMRQLQRC QDEVAATLIP LNPQEVIQGM CKAVPFLSR PGCSAIRLRN
 121 HLCFGHCCSSL YIPGSDPTPL VLCNSCMPAR KRWAPVVLNC LTGSSASRRR VKISTMLIEG
 161 CRCSPKA

SEQ ID NO:15 (Нуклеотидная последовательность, кодирующая
 вариант полипептида INSP002 без 5'-нетранслируемой области)

1 ATGCTCTTG GCCAGCTATC CACTCTCTG TGCCCTGCTTA GCGGGGCCCT GCCTACAGGC
 61 TCAGGGAGGC CTGAACCCCA GTCTCTCGA CCTCACTCTT GGGCTGCCAGC CAATCAGACC
 121 TGGGCTCTGG GCCCAGGGGC CCTGCCCTCA CTGGTGCCTG CCTCTGCCCT TGGGAGCTGG
 181 AAGGGCTCTCT TGGGCCCTGCA GAAAGCCAGG CAGCTGGGG TGGGAGGGCT GCAGGGTGGG
 241 CAAGACGAGG TGGCTGCTGT GACTCTGCCG CTGAACCCCT AGGAAGTGTAT CCAGGGGATG
 301 TGTAAGGCTG TGCCCTCTGTG TCTCTCCCCG CCCGGCTGCT CAGCCATACG CCTCCGAAAT
 361 CATCTGTGCT TTGGTCATTG CTCTCTCTC TACATCCCTG GCTCGGACCC CACCCCACTA
 421 GTCCCTGTGCA ACAGCTGTAT GCTGCTGCC AAGCGTTGGG CACCCGGTGGT CCTGTGGTGT
 481 CTCACTGGCA GCTCAGCCCTC CGCTCGACCG GTGAAGATAT CCACCATGCT GATCGAGGGG
 541 TGTCACTGCA GCCCCAAAGC A

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид с функцией секреторного белка, являющегося членом суперсемейства цитокинов, имеющих в своей структуре цистeinовые узлы, предпочтительно с функцией члена подсемейства DAN, где полипептид:
 - (i) состоит из или представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:14;
 - (ii) представляет собой фрагмент последовательности (i) ; или
 - (iii) идентичен полипептидам (i) или (ii) более чем на 70%.
2. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что состоит из 7 или более аминокислотных остатков (например, из 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 или более) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:14.
3. Очищенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид по п.1 или 2.
4. Очищенная молекула нуклеиновой кислоты по п.3, отличающаяся тем, что состоит из или представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15.
5. Очищенная молекула нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты по п.3 или 4 в условиях высокой жесткости.
6. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.3-5.
7. Клетка-хозяин, трансформированная вектором по п.6.
8. Антитело, которое специфически связывается с полипептидом по п.1 или 2 и которое предпочтительно ингибирует полипептид с активностью цитокина, имеющего структуру с цистeinовыми узлами, предпочтительно полипептид с активностью подсемейства DAN по п.1 или 2.
9. Применение полипептида по п.1 или 2 для лечения или диагностики заболевания.
10. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.3-5 для лечения или диагностики заболевания.
11. Применение вектора по п.6 для лечения или диагностики заболевания.
12. Применение антитела по п.8 для лечения или диагностики заболевания.
13. Способ диагностики заболевания у пациента, предусматривающий оценку уровня экспрессии

природного гена, кодирующего полипептид по п.1 или 2, или оценку активности полипептида по п.1 или 2 в ткани указанного пациента и сравнение указанного уровня экспрессии или активности с контрольным уровнем, где уровень, отличный от указанного контрольного уровня, свидетельствует о наличии заболевания.

14. Способ по п.13, осуществляемый *in vitro*.

15. Способ по п.13 или 14, который предусматривает стадии:

(а) контактирования антитела по п.8 с биологическим образцом в условиях, подходящих для образования комплекса антитело-полипептид; и

(б) детекции указанного комплекса.

16. Способ по п.13 или 14, предусматривающий стадии:

а) контактирования образца ткани, взятой у пациента, с нуклеотидным зондом в жестких условиях, при которых возможно образование гибридного комплекса между молекулой нукleinовой кислоты по любому из пп.3-5 и зондом;

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

с) обнаружения гибридных комплексов в указанных образцах; причем обнаружение уровней гибридного комплекса в образце пациента, которые отличаются от уровней гибридного комплекса в контрольном образце, свидетельствует о наличии заболевания.

17. Способ по п.13 или 14, предусматривающий:

а) контактирование образца нукleinовой кислоты из ткани, взятой у пациента, с нуклеотидным праймером в жестких условиях, при которых возможно образование гибридного комплекса между молекулой нукleinовой кислоты по любому из пп.3-5 и праймером;

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

с) амплификацию образца нукleinовой кислоты и

д) обнаружение уровня амплифицированной нукleinовой кислоты в образцах, взятых у пациента, и в контрольных образцах, причем обнаружение уровней амплифицированной нукleinовой кислоты в образце пациента, которые существенно отличаются от уровней амплифицированной нукleinовой кислоты в контрольном образце, свидетельствует о наличии заболевания.

18. Способ по п.13 или 14, предусматривающий:

а) получение образца тканей пациента, исследуемого на наличие заболевания;

б) выделение молекулы нукleinовой кислоты по любому из пп.3-5 из указанного образца ткани и

с) диагностирование заболевания у пациента путем обнаружения мутации в молекуле нукleinовой кислоты, связанной заболеванием, которая свидетельствует о наличии заболевания.

19. Способ по п.18, дополнительно предусматривающий амплификацию молекулы нукleinовой кислоты с образованием продукта амплификации и обнаружение наличия или отсутствия мутации в продукте амплификации.

20. Способ по п.18 или 19, где наличие или отсутствие мутации у пациента определяют путем осуществления контакта указанной молекулы нукleinовой кислоты с нуклеотидным зондом, который гибридизуется с указанной молекулой нукleinовой кислоты в жестких условиях с образованием гибридной двухцепочечной молекулы, где гибридная двухцепочечная молекула имеет негибридизуемую часть цепи нуклеотидного зонда в любой области, соответствующей мутации, связанной с заболеванием; и обнаружение наличия или отсутствия негибридизуемой части цепи зонда, что свидетельствует о наличии или отсутствии связанной с заболеванием мутации.

21. Способ по любому из пп.13-20, где указанное заболевание выбрано из пролиферативного заболевания, аутоиммунного/воспалительного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания, неврологического расстройства, нарушения развития, метаболического расстройства, инфекции или другого патологического состояния.

22. Применение полипептида по п.1 или 2 в качестве секретируемого белка.

23. Применение полипептида по п.1 или 2 в качестве цитокина, предпочтительно в качестве цитокина с цистиновыми узлами, предпочтительно в качестве цитокина подсемейства DAN с цистиновыми узлами.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по п.1 или 2.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая молекулу нукleinовой кислоты по любому из пп.3-5.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор по п.6.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по п.8.

28. Композиция вакцины, содержащая полипептид по п.1 или 2.

29. Композиция вакцины, содержащая молекулу нукleinовой кислоты по любому из пп.3-5.

30. Применение полипептида по п.1 или 2 для получения лекарственного средства для лечения пролиферативных расстройств, аутоиммунных/воспалительных заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний, неврологических расстройств, нарушений развития, метаболических расстройств, инфекций и других патологических состояний.

риода времени, при этом изменение указанного уровня экспрессии или активности за определенный период времени по сравнению с контрольным уровнем свидетельствует о регрессии указанного заболевания.

51. Способ мониторинга терапевтического лечения заболевания у пациента, предусматривающий мониторинг уровня экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.3-5 в течение определенного периода времени, при этом изменение указанного уровня экспрессии или активности за определенный период времени по сравнению с контрольным уровнем свидетельствует о регрессии указанного заболевания.

52. Способ идентификации соединения, которое является эффективным для лечения и/или диагностики заболевания, предусматривающий контактирование полипептида по п.1 или 2 с одним или несколькими соединениями, предположительно обладающими аффинностью связывания с указанным полипептидом, и отбор соединения, которое специфически связывается с указанным полипептидом.

53. Способ идентификации соединения, которое является эффективным для лечения и/или диагностики заболевания, предусматривающий контактирование молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.3-5 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.

54. Набор, применяемый для диагностики заболевания, содержащий первый контейнер с нуклеотидным зондом, который гибридизуется в жестких условиях с молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.3-5; второй контейнер с подходящими для амплификации указанными молекулами нуклеиновой кислоты; и инструкции по применению зонда и праймеров для осуществления диагностики заболевания.

55. Набор по п.54, отличающийся тем, что дополнительно содержит третий контейнер с агентом для расщепления негибридизованной РНК.

56. Набор, содержащий массив молекул нуклеиновой кислоты, по крайней мере одна из которых является молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп.3-5.

57. Набор, содержащий одно или более антител, который связываются с полипептидом по п.1 или 2; и реагент, используемый для обнаружения реакции связывания между указанным антителом и указанным полипептидом.

58. Трансгенное животное или животное с «нокаутом», не являющееся человеком, трансформированное таким образом, чтобы происходила повышенная или пониженная экспрессия полипептида по п.1 или 2, или экспрессия не происходила вообще.

59. Способ скрининга соединения, эффективного для лечения заболевания, предусматривающий контактирование трансгенного животного, не являющегося человеком, по п.58 с соединением-кандидатом и определение эффективности указанного соединения для лечения заболевания указанного животного.

Список последовательностей

Gln Asp Glu Val Ala Ala Val Thr Leu Pro Leu Asn Pro Gln Glu Val
85 90 95

Ile Gln Gly Met Cys Lys Ala Val Pro Phe Val Gln
100 105

<210> 3
<211> 246
<212> ДНК
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> Нуклеотидная последовательность INSP002 - экзон 2

<400> 3

gtgttctccc ggcccggtcgt ctcagccata cgccctccgaa atcatctgtg ctgggtcat 60
tgctcccttc tctacatccc tggctggac cccacccac tagtccctgtg caacagctgt 120
atgcctgtcgt gcaaggcttg ggcacccgtg gtccctgttgt gtctactgg cagctcagcc 180
tcccgtcgac gggtaagat atccaccatg ctgatcgagg ggtgtactg cagccccaaa 240
qcatqa 246

<210> 4

<211> 81

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Последовательность белка INSP002 - экзон 2

400-4
Val Rhei S

Val Phe Ser Arg Pro Gly Cys Ser Ala Ile Arg Leu Arg Asn His Leu
1 5 10 15

10 10

Cys Phe Gly His Cys Ser Ser Leu Tyr Ile Pro Gly Ser Asp Pro Thr
20 25 30

Pro Leu Val Leu Cys Asn Ser Cys Met Pro Ala Arg Lys Arg Trp Ala
35 40 45

Pro Val Val Leu Trp Cys Leu Thr Gly Ser Ser Ala Ser Arg Arg Arg
50 55 60

Val Lys Ile Ser Thr Met Leu Ile Glu Gly Cys His Cys Ser Pro Lys
65 70 75 80

<210> 5
<211> 721
<212> ДНК
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> Нуклеотидная последовательность JNSP002

5400> 5

aaatggctcc caaggatccaa aqqaqqqqcc aaqaqattaa aqcaaggttc aqaaqgctca 60

gatgccactc accagacacgc agggtcgact gctagtgacc ttgagccca gtcggacaga 120
 cagacaggca gacagacca cggaacaagca gatgctcctt ggccagctat ccactcttct 180
 gtgcctgctt agcggggccc tgcctacagg ctcaaggagg cctgaacccc agtctcctcg 240
 acctcagttc tgggctgcag ccaatcacac ctggcctctg ggcccaggggg ccctgcccc 300
 actggtgcca gcttcgtccc tgggagctg gaaggccctc tgggctgc agaaaagccag 360
 gcagctgggg atggcaggc tgcaagctgg gcaagacag gtggctgctg tgactctgcc 420
 gctgaacccct caggaagtga tccagggat gtgttaaggct gtgccttc tcaggtgtt 480
 ctccggccccc ggctgctca g cccatccctt ccgaaatcat ctgtcttc tgcatgtctc 540
 ctctctcac atccctggct cggacccac cccactagtc ctgtcaaca gctgtatgcc 600
 tgctcgcaag cggtggcac ccgtggctc gtggtgtctc actggcagct cagcctcccg 660
 tcgacgggtg aagatatcca ccatgctgat cgaggggtgt cactgcagcc caaaagcatg 720
 a 721

<210> 6

<211> 189

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Последовательность белка INSP002

<400> 6

Met	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Ser	Gly	Ala
1	5				10			15							

Leu	Pro	Thr	Gly	Ser	Gly	Arg	Pro	Glu	Pro	Gln	Ser	Pro	Arg	Pro	Gln
20				25				30							

Ser	Trp	Ala	Ala	Ala	Asn	Gln	Thr	Trp	Ala	Leu	Gly	Pro	Gly	Ala	Leu
35					40			45							

Pro	Pro	Leu	Val	Pro	Ala	Ser	Ala	Leu	Gly	Ser	Trp	Lys	Ala	Phe	Leu
50				55			60								

Gly	Leu	Gln	Lys	Ala	Arg	Gln	Leu	Gly	Met	Gly	Arg	Leu	Gln	Arg	Gly
65				70			75		80						

Gln	Asp	Glu	Val	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Pro	Leu	Asn	Pro	Gln	Glu	Val
85						90		95							

Ile	Gln	Gly	Met	Cys	Lys	Ala	Val	Pro	Phe	Val	Gln	Val	Phe	Ser	Arg
100						105		110							

Pro	Gly	Cys	Ser	Ala	Ile	Arg	Leu	Arg	Asn	His	Leu	Cys	Phe	Gly	His
115				120			125								

Cys	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Pro	Gly	Ser	Asp	Pro	Thr	Pro	Leu	Val	Leu
130				135			140								

Cys	Asn	Ser	Cys	Met	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Trp	Ala	Pro	Val	Val	Leu
145				150			155		160						

Trp	Cys	Leu	Thr	Gly	Ser	Ser	Ala	Ser	Arg	Arg	Arg	Val	Lys	Ile	Ser
165				170			175								

Thr	Met	Leu	Ile	Glu	Gly	Cys	His	Cys	Ser	Pro	Lys	Ala			
180				185											

<210> 7

<211> 86
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Последовательность белка INSP002 - экзон 1 без
 сигнального пептида
 <400> 7
 Arg Pro Glu Pro Gln Ser Pro Arg Pro Gln Ser Trp Ala Ala Ala Asn
 1 5 10 15

Gln Thr Trp Ala Leu Gly Pro Gly Ala Leu Pro Pro Leu Val Pro Ala
 20 25 30

Ser Ala Leu Gly Ser Trp Lys Ala Phe Leu Gly Leu Gln Lys Ala Arg
 35 40 45

Gln Leu Gly Met Gly Arg Leu Gln Arg Gly Gln Asp Glu Val Ala Ala
 50 55 60

Val Thr Leu Pro Leu Asn Pro Gln Glu Val Ile Gln Gly Met Cys Lys
 65 70 75 80

Ala Val Pro Phe Val Gln
 85

<210> 8
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Последовательность белка INSP002 без
 сигнального пептида
 <400> 8
 Arg Pro Glu Pro Gln Ser Pro Arg Pro Gln Ser Trp Ala Ala Ala Asn
 1 5 10 15

Gln Thr Trp Ala Leu Gly Pro Gly Ala Leu Pro Pro Leu Val Pro Ala
 20 25 30

Ser Ala Leu Gly Ser Trp Lys Ala Phe Leu Gly Leu Gln Lys Ala Arg
 35 40 45

Gln Leu Gly Met Gly Arg Leu Gln Arg Gly Gln Asp Glu Val Ala Ala
 50 55 60

Val Thr Leu Pro Leu Asn Pro Gln Glu Val Ile Gln Gly Met Cys Lys
 65 70 75 80

Ala Val Pro Phe Val Gln Val Phe Ser Arg Pro Gly Cys Ser Ala Ile
 85 90 95

Arg Leu Arg Asn His Leu Cys Phe Gly His Cys Ser Ser Leu Tyr Ile
 100 105 110

Pro Gly Ser Asp Pro Thr Pro Leu Val Leu Cys Asn Ser Cys Met Pro
 115 120 125

Ala Arg Lys Arg Trp Ala Pro Val Val Leu Trp Cys Leu Thr Gly Ser
130 135 140

Ser Ala Ser Arg Arg Arg Val Lys Ile Ser Thr Met Leu Ile Glu Gly
145 150 155 160

Cys His Cys Ser Pro Lys Ala
165

<210> 9
<211> 504
<212> ДНК
<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> Нуклеотидная последовательность INSP002 без сигнального пептида

<400> 9

aggcctgaac cccagtcctcc tcgacacctcg tccctgggtcg cagccaaatca gaccctgggtc 60
ctggggccag gggccctgcctcccactggtg ccagctctcg cccttgggag ctggaaaggcc 120
ttcttgggcccgc tgccagaatgc caggcagctg gggatgggca ggctgcagcg tggcaagac 180
gagggtggctg ctgtgactct gcgcgtgaac cctcaggaaag tgatccaggg gatgtgttaag 240
gctgtgcctc tcgttcagggt gttctcccg cccggctgtct cagccatacg cctccgaaat 300
catctgtgtct ttggtcattt ctccctcttc tacatccctg gtcgcgaccc cacccccacta 360
gtcgtgtgcac agacgtgtat gcctgtcgc aagcgttggg caccctgtgt cctgtgtgt 420
ctcaactggca gctcggccctc ccgtgcacgg gtgaagatccatccatgtct gatcgagggg 480
tgtcaactgcac gccccaaaatgc atga 504

<210> 10

<211> 258

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Нуклеотидная последовательность INSP002 - экзон 1 без сигнального пептида

<400> 10

aggccctgaac cccagtcgtcc tcgacacctcg tccggggctg cagccaatca gaccgggctc 60
 ctggggcccaag gggccctgccc cccactggtg ccagcttctg cccttgggag ctggaaaggccc 120
 ttctttggggcc tgcagaaaaggc caggcagctg gggatgggca ggctgcacgc tggttggggcaagac 180
 gaggttggctg ctgtactct gccgctgaac cctcaggaag tgatccaggg gatgtgttaag 240
 gctgtgcctct tcgttcag 258

<210> 11

<211> 570

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Нуклеотидная последовательность INSP002 без 5' UTR

<400> 11

atgtcccttg gccagctatc cactcttgc tgccctgcta gcggggccct gcctacaggc 60
tcaggggaggg ctgaacccca gtctccctcgta cctcagtcct ggctgcagc caatcagacc 120
tgggctctgg gcccaggggc ctgccttcca ctggtgcctt ccctgcctt tggagactgg 180
aaggcctctt tgggcctgca gaaaggcagg cagttggga tgggcaggct gcagcgtggg 240
caagacgagg tggctgtgt gactctgcgg ctgaacccctc aggaagtgtat ccaggggatg 300
tgttaaggctg tgccctcgat tcagggtgttc tccccggcccg gctgtcagc catacgccctc 360
cgaaatcatc tgtgtttgg tcattgtctcc ttctctaca tccctggctc ggacccacc 420

ccactagtc tggcaacag ctgtatgcct gctcgcaagg gtgggcacc cgtggcctg 480
 tgggtctca ctggcagtc agcctccgt cgacgggtga agatatccac catgtgatc 540
 gagggtgtc actgcagccc aaaagcatga 570

<210> 12
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Нуклеотидная последовательность INSP002 - экзон 1 без 5'UTR

<400> 12
 atgccttg gccagctatc cactttctg tgccctgtta gcggggccct gcctacaggc 60
 tcagggaggc ctgaacccca gtctctcga cctcagtcct gggtgcagc caatcagacc 120
 tggcctctgg gcccaggggc cctgccccca ctggtccagc ttctgcctt tggagctgg 180
 aaggccctct tggcctcga gaaagccagg cagctggga tggcaggct gcagcgtggg 240
 caaagcaggagg tggctgtgt gactctgccg ctgaaccctc aggaagtgtat ccagggatg 300
 tgtaaggctg tgcccttcgt tcag 324

<210> 13
 <211> 719
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Нуклеотидная последовательность INSP002 - вариант полипептида INSP002

<400> 13
 gtcgactgct agtgacccctg agcccaagtcc ggacagacac acaggcagac agacgcacgg 60
 acaaggcagat gtccttggc cagctatcca ctcttcgtt cctgcattgc gggccctgc 120
 ctacaggctc agggaggccct gaaccccaat ctccctcgtt ctagtctgg gctgcagcca 180
 atcagacctg ggctctggc ccagggggccc tgcccccact ggtgcaggct tctgccttg 240
 ggagctggaa ggccttcgtt ggcctcaga aagccaggca gctgggatg ggcaggctgc 300
 agcgtggca agacgagggt gctgctgtt ctctgccttca gaaccctcag gaagtgtatcc 360
 aggggatgtg taaggctgtt cccttcgtt tctccggcc cggctgcata gccatacgcc 420
 tccaaaatca tctgtgtttt ggtcatgtt cctctctata caicccctggc tggacccca 480
 ccccaactgt ctgtgtcaac agctgttatgc ctgtgtcaaa gcggtggca cccgtggcc 540
 tgtgggtctt cactggcagc ttagctccc gtgcacgggtt gaagatatcc accatgtgt 600
 tcgagggttg tcaactgcagc cccaaagcat gaactgagca tctggatgg tgacggaga 660
 cacgcacccctt ggagaaatga ggggagatgg accaagaaag acgtggacccat ggatgtatgt 719

<210> 14
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Нуклеотидная последовательность INSP002 - вариант полипептида INSP002

<400> 14
 Met Leu Leu Gly Gln Leu Ser Thr Leu Leu Cys Leu Leu Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Ser Gly Arg Pro Glu Pro Gln Ser Pro Arg Pro Gln
 20 25 30

Ser Trp Ala Ala Ala Asn Gln Thr Trp Ala Leu Gly Pro Gly Ala Leu
 35 40 45

Pro Pro Leu Val Pro Ala Ser Ala Leu Gly Ser Trp Lys Ala Phe Leu
 50 55 60

Gly Leu Gin Lys Ala Arg Gln Leu Gly Met Gly Arg Leu Gin Arg Gly
 65 70 75 80

Gln Asp Glu Val Ala Ala Val Thr Leu Pro Leu Asn Pro Gln Glu Val
 85 90 95

Ile Gln Gly Met Cys Lys Ala Val Pro Phe Val Leu Ser Arg Pro Gly
 100 105 110

Cys Ser Ala Ile Arg Leu Arg Asn His Leu Cys Phe Gly His Cys Ser
 115 120 125

Ser Leu Tyr Ile Pro Gly Ser Asp Pro Thr Pro Leu Val Leu Cys Asn
 130 135 140

Ser Cys Met Pro Ala Arg Lys Arg Trp Ala Pro Val Val Leu Trp Cys
 145 150 155 160

Leu Thr Gly Ser Ser Ala Ser Arg Arg Val Lys Ile Ser Thr Met
 165 170 175

Leu Ile Glu Gly Cys His Cys Ser Pro Lys Ala
 180 185

<210> 15

<211> 561

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Нуклеотидная последовательность INSP002 - вариант полипептида INSP002
 без 5' UTR

<400> 15

atgctcccttg gccagctatc cactcttctg tgccctgtta gcggggccct gcctacaggc 60
 tcagggaggc ctgaacccca gtctcctcgaa cctcagtctt gggctgcagc caatcagacc 120
 tgggtctgg gcccaggggc cctgccccca ctgggtccag ctctgcctt tgggagctgg 180
 aaggccttctt tggccctgca gaaagccagg cagctggga tgggcaggct gcagcgtggg 240
 caagacgagg tggctgtgtgt gactctgcgg ctgaacccctc aggaagtgtat ccagggatg 300
 tgttaaggctg tgcccttcgt tctctcccg cccggctgtct cagccatacg cctccgaaat 360
 catctgtgttttgcatttg ctccctctc tacatccctg gctcgaccc caccctacta 420
 gtcctgtgca acagctgttat gcctgtcgacgg aacgcgtggg caccctgtgtt cctgtgtgtt 480
 ctcactggca gtcagccctc ccgtcgacgg gtgaagatata ccaccatgtt gatcgagggg 540
 tgtcaactgca gcccaaaggc a 561

<210> 16

<211> 20

<212> ДНК

<213> Синтезированная последовательность

<220>

<223> ПЦР - праймер

<400> 16

ctcagccata cgcctccgaa

20

<210> 17
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность

<220>
 <223> ПЦР - праймер

<400> 17
 gctgagctgc cagtgagaca

20

<210> 18
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность

<220>
 <223> ПЦР - праймер

<400> 18
 acctggaaagg aagcgactgc actga

25

<210> 19
 <211> 37
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность

<220>
 <223> ПЦР - праймер

<400> 19
 gcagccgggc cgggagagaa cgaagggcac agcccta

37

<210> 20
 <211> 37
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность

<220>
 <223> ПЦР - праймер

<400> 20
 aggctgtgcc cttcgttctc tcccggcccg gctgctc

37

<210> 21
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность

<220>
 <223> ПЦР - праймер

<400> 21
 actccaggac gggcactgtg tctac

25

<210> 22
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность

<220>
 <223> ПЦР - праймер
 <400> 22
 gtcgactgct agtgacccttg ag 22
 <210> 23
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность
 <220>
 <223> ПЦР - праймер
 <400> 23
 acatcatcca ggccacgtc tt 22
 <210> 24
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность
 <220>
 <223> ПЦР - праймер
 <400> 24
 attaggtga cactatag 18
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность
 <220>
 <223> ПЦР - праймер
 <400> 25
 taatacgact cactatagg 20
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность
 <220>
 <223> ПЦР - праймер
 <400> 26
 attaaccctc actaaaggga 20
 <210> 27
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность
 <220>
 <223> ПЦР - праймер

<400> 27		
tgtaaaacsga cggccagt	18	
<210> 28		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Синтезированная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР - праймер		
<400> 28		
gccagcttgg cacttgatgt	20	
<210> 29		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Синтезированная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР - праймер		
<400> 29		
gatggaggtg gacgtgtcag	20	
<210> 30		
<211> 37		
<212> ДНК		
<213> Синтезированная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР - праймер		
<400> 30		
aagcaggctt cgccaccatg ctccctggcc agctatc	37	
<210> 31		
<211> 35		
<212> ДНК		
<213> Синтезированная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР - праймер		
<400> 31		
gtgatggta tggtgtgcctt ttgggctgca gtgac	35	
<210> 32		
<211> 37		
<212> ДНК		
<213> Синтезированная последовательность		
<220>		
<223> ПЦР - праймер		
<400> 32		
ggggacaagt ttgtacaaaa aaggcaggctt cgccacc	37	
<210> 33		

<211> 51
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность

<220>
 <223> ПЦР - праймер

<400> 33
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt tcaatggtga tggtatgg g 51

<210> 34
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность

<220>
 <223> ПЦР - праймер

<400> 34
 gatgctccct ggccagctat 20

<210> 35
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность

<220>
 <223> ПЦР - праймер

<400> 35
 ccatccacga tgctcagttc 20

<210> 36
 <211> 1756
 <212> ДНК
 <213> Синтезированная последовательность

<220>
 <223> Векторная вставка

<220>
 <221> Последовательность векторной вставки, содержащая Image 4558384
 (фигура 10)

<400> 36
 cggcacgagg gggagacctg gaaggaaagcg actgcactga tccagaaaatg cctccaggc 60
 tatccaggag gggcaagag attaaaagca gggtcagaag gtcagatgc cactcaccag 120
 acagcagggt cgactgctag tgaccttag cccagtccgg acagacagac aggcagacag 180
 acgcacggac aagcagatgc tcctggcca gctatccact ctctgtgcc tgcttagcgg 240
 ggccctgcct acaggctca gggggctga accccagtct cctcgacctc agtccctggc 300
 tgcagccaat cagacctggg ctctggccc aggggcccgg ccccccactgg tgccagcttc 360
 tgcccttggg agctggaagg cctctggg cctgcagaaa gccaggcagc tggggatggg 420
 caggctgcag cgtggcaag acgaggtggc tgctgtgact ctgcccgtga accctcagga 480
 agtgatccag gggatgtgt aaggctgtgcc ctgcgtcag acacgggagt ctgcgtatgt 540
 tgcccaagct agtcttgagc ttctggccctc aagcaatctt cccacctcag cctccgtaggt 600
 tcttaggttt ctccggccc ggctgcgtcag ccatacgctt ccggaaatcat ctgtgcatttg 660
 gtcatgtcctt ctctctctac atccccggctt cggacccac cccactagtc ctgtgcacaca 720
 gctgtatgcc tgctcgcaag cgtggccac ccgtggctt gtgggtctc actggcagct 780
 cagcctcccg tcgacgggtg aagatatcca ccatgctgat cgaggggtgt cactgcagcc 840
 caaaagcatg aactgagcat ctggatgggt gcacggagac acgcacccctg gagaaatgag 900

gggagatgga ccaagaaga cgtggacctg gatgatgtac tctgggtcaa gagaccagg 960
 atgcagggtt aggccagacag gtccccagag tcctcaccct gctccccaga cagtagacac 1020
 agtgcccgtc ctggagttgc accactgata gtcacagcac acaatgattg acaactact 1080
 tttttttt tttttgagat ggagtctcgc tctgtcgccc aggctggagt gcagtggcgc 1140
 aatcttagct cactgcaagc tccaccctcc gggttatgc catttcctg tctcggcgc 1200
 ccgagtagct gggactacag gcaccccca acacgcccgg staaatttt gtatttttag 1260
 taaagacagg gtttcaccgt gttagccagg atggtctta tctccgtacc tcgtatctg 1320
 cctgccttgg ccttattttttaa ggacagagtc tctctgtc acccaggctg 1380
 gagtgcaatg ggcgcgtt ggctcaact tgccaggcgc aagcaggct 1440
 cctgcctcag cctcctgagt agctggact acaggcaccc gccaccatgc ccagctaatt 1500
 tttgtattt tagtagagac agagttcac catattagcc tggctggct caaactccgt 1560
 gcctcagggtg atctgcccac ctggccctcc caaagtgtg ggatcaaatac cactgttaat 1620
 cattaggctc aactgtctt tatagaatga ggtcaaagac actccagggtt gcaggaggg 1680
 tagatggccc cacccagacc gagagacaca gtatgaccc cagcctaggg acmccaaaaa 1740
 aaaaaaaaaa aaaaaa 1756

<210> 37

<211> 133

<212> PRT

<213> Синтезированная последовательность

<220>

<223> Homo sapiens

<220>

<221> Предсказанный продукт трансляции SEQ ID No:36

<400> 37

Met	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Ser	Gly	Ala
1	5		10		15										

Leu	Pro	Thr	Gly	Ser	Gly	Arg	Pro	Glu	Pro	Gln	Ser	Pro	Arg	Pro	Gln
20		25		30											

Ser	Trp	Ala	Ala	Ala	Asn	Gln	Thr	Trp	Ala	Leu	Gly	Pro	Gly	Ala	Leu
35		40		45											

Pro	Pro	Leu	Val	Pro	Ala	Ser	Ala	Leu	Gly	Ser	Trp	Lys	Ala	Phe	Leu
50		55		60											

Gly	Leu	Gln	Lys	Ala	Arg	Gln	Leu	Gly	Met	Gly	Arg	Leu	Gln	Arg	Gly
65		70		75		80									

Gln	Asp	Glu	Val	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Pro	Leu	Asn	Pro	Gln	Glu	Val
85		90		95											

Ile	Gln	Gly	Met	Cys	Lys	Ala	Val	Pro	Phe	Val	Gln	Thr	Arg	Glu	Ser
100		105		110											

Arg	Tyr	Val	Ala	Gln	Ala	Ser	Leu	Glu	Leu	Leu	Ala	Ser	Ser	Asn	Pro
115		120		125											

Pro	Thr	Ser	Ala	Ser
130				

<210> 38

<211> 589

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Полноразмерный INSP002, клонированный из кДНК человеческого сердца

<400> 38

gatgtccctt ggccagctat ccactcttct gtgcctgctt agcggggccc tgcctacagg 60
 ctcagggagg cctgaacccc agtctctcg acctcagtc tggtctgcag ccaatcagac 120
 ctggctctg ggcccagggg ccctgcccc actgtgcca gttctgccc ttggagctg 180
 gaaggcctc tggcctgc agaaagccag gcagctgggg atggcaggg tcagcgtgg 240
 gcaagacgag gtggctgctg tgactctgcc gctgaacct caggaagtga tccaggggat 300
 gtgttaaggct gtgccctcg ttcaagggtt ctcccgcccc ggctgcctag ccataccct 360
 ccgaaatcat ctgtgccttg gtattgtc ctctctcac atccctggct cgacccccc 420
 cccactagtc ctgtgcaaca gctgtatgcc tgctcgcaag cggtggcac cggtggct 480
 gtggtgtc tc actggcagct cagccccc tcgacgggtg aagatatcca ccatgctgat 540
 cgaggggtgt cactgcagcc caaaagcatg aactgagcatg cgtggatgg 589

Query= INSP002

(189 letters)

Database: ncbi-nt

1,021,646 sequences; 4,527,726,597 total letters

Searching.....done

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
gi 15217064 gb AF400435.1 AF400435 Homo sapiens cerberus-related...	69	2e-10
gi 11427432 ref XM_005320.1 Homo sapiens cerberus 1 (Xenopus la...	69	2e-10
gi 4885134 ref NM_005454.1 Homo sapiens cerberus 1 (Xenopus lae...	69	2e-10
gi 5802091 gb AF139721.1 AF139721 Gallus gallus cerberus homolog...	68	3e-10
gi 5902633 gb AF179484.1 AF179484 Gallus gallus caronte (CAR) mR...	67	5e-10
gi 2853615 gb AF035579.1 AF035579 Mus musculus cerberus homolog ...	61	5e-08
gi 6753409 ref NM_009887.1 Mus musculus cerberus 1 homolog (Xen...	61	5e-08
gi 2654026 gb AF031896.1 AF031896 Mus musculus cerberus-related ...	61	5e-08
gi 1513087 gb U64831.1 XLU64831 Xenopus laevis head-inducing fac...	57	9e-07
gi 6679017 ref NM_008675.1 Mus musculus neuroblastoma, suppress...	55	3e-06

Фиг. 1. Наилучшие десять соответствий для INSP002, полученные с помощью BLAST в неизбыточной базе данных NCBI

```

>g1|15217064|gb|AF400435.1|AF400435 Homo sapiens cerberus-related 1
(CER1) mRNA, complete cds
Length = 804

Score = 68.9 bits (167), Expect = 2e-10
Identities = 36/102 (35%), Positives = 53/102 (51%)
Frame = +1

Query: 87 VTLPLNPQEVIQGMCKAVPFVQVFSRPGCSAIRLRNHLCFGHCSSLYIPGSDPTPLVLCN 146
V LP+ EV C+ VPF Q + GC + ++N+LCFG C S++ PG+ C+
Sbjct: 442 VILPIKSHEVHWETCRTVPFSQTITHEGCEKVVVONNLCFGKCGSVHEPGAAQHSHTSCS 621

Query: 147 SCMPARKRWAPVVLWCLTGSSASRRVKISTMLIEGCHCSPK 188
C+PA+ + L C SS +K+ ML+E C C K
Sbjct: 622 HCLPAKFTTMHLPLNTELSSV---IKV-VMLVEECQCKVK 732

```

Фиг. 2. Сопоставление с использованием наилучших соответствий для cerberus-родственного белка Homo sapiens

i) ncbi-nr

```

Database: All non-redundant GenBank CDS
translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF
1,242,768 sequences; 395,571,179 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:
Score      E
(bits)    Value

ref|NP_689867.1| hypothetical protein FLJ38607 [Homo sapiens] >g... 394 e-109
ref|XP_113990.1| hypothetical protein XP_113990 [Homo sapiens] 221 5e-57
ref|XP_164658.1| similar to hypothetical protein FLJ38607 [Homo ... 70 1e-11
ref|NP_005445.1| cerberus 1; cerberus-related 1; cerberus 1 (Xen... 69 3e-11
gb|AAD51610.1|AF139721_1 cerberus homolog [Gallus gallus] 68 6e-11

```

ii) ncbi-nt

```

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,
or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
1,469,831 sequences; 7,238,625,236 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:
Score      E
(bits)    Value

ref|NM_152654.1| Homo sapiens hypothetical protein FLJ38607 (FLJ... 394 e-108
dbj|AK095926.1| Homo sapiens cDNA FLJ38607 fis, clone HEART2004941 394 e-108
gb|BC025333.1| Homo sapiens, clone IMAGE:4558384, mRNA, partial cds 221 e-103
ref|XM_113990.1| Homo sapiens LOC199699 (LOC199699), mRNA 221 e-103
gb|AC092069.2| Homo sapiens chromosome 19 clone CTC-425F1, compl... 222 1e-56

```

Фиг. 3. Наилучшие четыре соответствия для INSP002, полученные с помощью BLAST в базах данных NCBI-nr и NCBI-nt

007611

```
>dbj|AK095926.1| Homo sapiens cDNA FLJ38607 fis, clone HEART2004941
Length = 1731

Score = 394 bits (1013), Expect = e-108
Identities = 189/189 (100%), Positives = 189/189 (100%)
Frame = +2

Query: 1 MLLGQLSTLLCLLSGALPTGSGRPEPQSPPQSWAAANQTWALGPGALPPLVPASALGSW 60
       MLLGQLSTLLCLLSGALPTGSGRPEPQSPPQSWAAANQTWALGPGALPPLVPASALGSW
Sbjct: 44 MLLGQLSTLLCLLSGALPTGSGRPEPQSPPQSWAAANQTWALGPGALPPLVPASALGSW 223

Query: 61 KAFLGLQKARQLGMGRQLRGQDEVAATLPLNPQEVIQGMCKAVPFVQVFSRPGCSAIRL 120
       KAFLGLQKARQLGMGRQLRGQDEVAATLPLNPQEVIQGMCKAVPFVQVFSRPGCSAIRL
Sbjct: 224 KAFLGLQKARQLGMGRQLRGQDEVAATLPLNPQEVIQGMCKAVPFVQVFSRPGCSAIRL 403

Query: 121 RNHLCFGHCSSLYIPGSDPTPLVLCNSCMPARKRWAPVVLWCLTGSSASRRRVKISTMLI 180
       RNHLCFGHCSSLYIPGSDPTPLVLCNSCMPARKRWAPVVLWCLTGSSASRRRVKISTMLI
Sbjct: 404 RNHLCFGHCSSLYIPGSDPTPLVLCNSCMPARKRWAPVVLWCLTGSSASRRRVKISTMLI 583

Query: 181 EGCHCSPKA 189
       EGCHCSPKA
Sbjct: 584 EGCHCSPKA 610
```

Фиг. 4. Сопоставление INSP002 с AK095926.1

```
>gb|BC025333.1| Homo sapiens, clone IMAGE:4558384, mRNA, partial cds
Length = 1746

Score = 221 bits (562), Expect(2) = e-103
Identities = 108/108 (100%), Positives = 108/108 (100%)
Frame = +1

Query: 1 MLLGQLSTLLCLLSGALPTGSGRPEPQSPPQSWAAANQTWALGPGALPPLVPASALGSW 60
       MLLGQLSTLLCLLSGALPTGSGRPEPQSPPQSWAAANQTWALGPGALPPLVPASALGSW
Sbjct: 187 MLLGQLSTLLCLLSGALPTGSGRPEPQSPPQSWAAANQTWALGPGALPPLVPASALGSW 366

Query: 61 KAFLGLQKARQLGMGRQLRGQDEVAATLPLNPQEVIQGMCKAVPFVQ 108
       KAFLGLQKARQLGMGRQLRGQDEVAATLPLNPQEVIQGMCKAVPFVQ
Sbjct: 367 KAFLGLQKARQLGMGRQLRGQDEVAATLPLNPQEVIQGMCKAVPFVQ 510

Score = 178 bits (451), Expect(2) = e-103
Identities = 81/81 (100%), Positives = 81/81 (100%)
Frame = +2

Query: 109 VFSRPGCSAIRLRNHLCFGHCSSLYIPGSDPTPLVLCNSCMPARKRWAPVVLWCLTGSSA 168
       VFSRPGCSAIRLRNHLCFGHCSSLYIPGSDPTPLVLCNSCMPARKRWAPVVLWCLTGSSA
Sbjct: 596 VFSRPGCSAIRLRNHLCFGHCSSLYIPGSDPTPLVLCNSCMPARKRWAPVVLWCLTGSSA 775

Query: 169 SRRRVKISTMLIEGCHCSPKA 189
       SRRRVKISTMLIEGCHCSPKA
Sbjct: 776 SRRRVKISTMLIEGCHCSPKA 838
```

Фиг. 5. Сопоставление INSP002 с IMAGE: 4558384

```
1 AAATGCCTCC CAGGCTATCC AGGAGGGGCC AAGAGATTAA AAGCAGGTTC AGAAGGCTCA
61 GATGCCACTC ACCAGACACG AGGGTCACT GCTAGTGACCT TTGAGCCAG TCCGGACAGA
121 CAGACAGGGCA GACAGACGCA CGGACAGACGA GATGCTCTTT GGCCAGCTAT CCACCTCTCT
m l l g q i s t l

181 GTGCCCTGCTT AGCGGGGCC TGCCCTACAGG CTCAGGGAGG CCTGAACCCC AGTCTCTCG
l c l l s g a l p t g s g r p e p q s p
241 ACCTCAGTCC TGGGCTGCAG CCAATCAGAC CTGGGCTCTG GGCCCAGGGG CCCTGCC
r p q s w a a a n q t w a l g p g a l p
301 ACTGGTGCCA GCTTCTGCC TTGGGAGCTG GAAGGCCTTC TTGGGCTCG AGAAAGCCAG
l v p a s a l g s w k a f l g l q k a
361 GCACGTGGGG ATGGGCAGGC TGCAAGGTGG GCAGACAGAG GTGGCTCTG TGACTCTGCC
r q l g m g r l q r g q d e v a a v t l
421 GCTGAAACCT CAGGAAGTGA TCCAGGGGAT GTCTAAGGCT GTGCCCTTCG TTCAGGTGTT
p l n p q e v i q g m c k a v p f v q v
481 CTCCGGCCCC GGCTGCTCAG CCATACGCCT CCCAATTCAT CTGTGCTTGT GTCATTTGCTC
f s r p g c i r l r n h l c f g h c
541 CTCTCTCTAC ATCCCTGGCT CGGACCCAC CCCACTAGTC CTGTGCAACA GCTGTATGCC
s s l y i p g s d p t p l v l c n s c m
601 TGCTCGCAAG CGTTGGGCAC CGCTGGCTCT GTGGTGTCTC ACTGGCAGCT CAGCCTCCCG
p a r k r w a p v v l w c l f g s s a s
661 TCGACGGGTG AAGATATCCA CCATGCTGAT CGAGGGGTGT CACTGCAGCC CAAAAGCATG
r r r v k i s t m l i e g c h c s p k a
721 AACTGAGCAT CGTGGATGGG TGCACGGAGA CACGCACCTT GGAGAAATGA GGGGAGAT
```

Фиг. 6. Нуклеотидная последовательность INSP002 с трансляцией

```

1   CTCAGCCATA CGCCTCCGAA ATCATCTGTG CTTTGGTCAT TGCTCCTCTC TCTACATCCC
      s   a   i   r   l   r   n   h   l   c   f   g   h   c   s   s   l   y   i

61  TGGCTCGGAC CCCACCCCCAC TAGTCCTGTG CAACAGCTGT ATGCCTGCTC GCAAGCGTTG
P   g   s   d   p   t   p   l   v   l   c   n   s   c   m   p   a   r   k   r

121  GGCACCCGTG GTCTCTGGT GTCTCACTGG CAGCTCAGC
      w   a   p   v   v   l   w   c   l   t   q   s   s

```

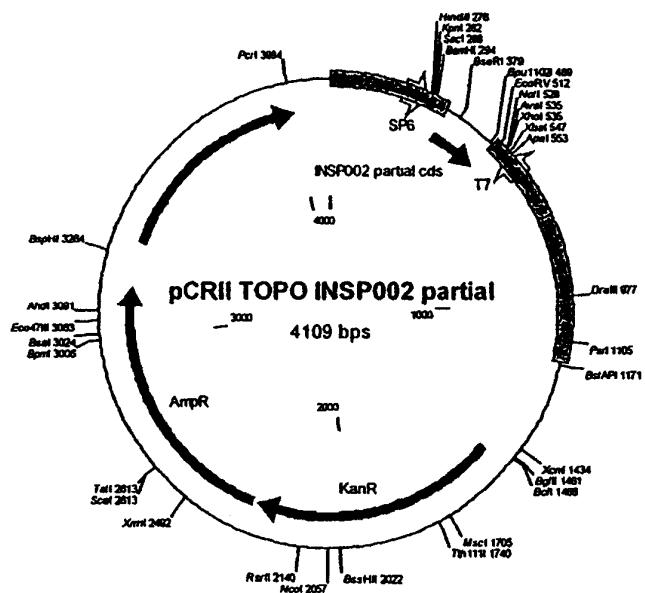
Фиг. 7. Неполная клонированная последовательность INSP002 с трансляцией

Молекула: product1, 4109 bps DNA Circular
Название файла:~7879480.cm5

Описание: Ligation of NoName into PCRII-TOPO-open

Особенности молекулы:

Тип	Начало	Конец	Название	Описание
Область	1	336		LacZα'
Маркер	239		SP6	
Ген	337	495	INSP002	partial cds Inserted PCR product
Область	496	747		'LacZα
Маркер	584		C T7	
Область	749	1163		f1 ori
Ген	1497	2291	KanR	Канамицин-резистентный ген
Ген	2309	3169	AmpR	Ампциллин-резистентный ген
Ген	3314	3987		pUC ori



Фиг. 8. Карта неполной pCRII-TOPO-INSPIR

Фиг. 9. Сопоставление предсказанной INSP002 (верхняя строка) с неполной клонированной последовательностью (нижняя строка)

INSPpr	CAGAAATGCCCTCCAGGCTATCCAGGAGGGCCAAGAGATTAAAAGCAGGTTCAGAAGGC : Serono
INSPpr	TCAGATGCCACTACCAGACAGCAGGGTCGACTGCTAGTGACCTTGAGCCCAGTCCGGAC Serono
INSPpr	AGACAGACAGGCAGACAGCACGCACGGACAAGCAGATGCTCCTGGCCAGCTATCCACTCT Serono
INSPpr	TCTGTGCGCTGCTTAGCGGGGCCCTGCCTACAGGCTCAGGGAGGCCCTGAACCCCCAGTCTCC Serono
INSPpr	TCGACCTCAGTCCTGGGCTGCAGCCAATCAGACCTGGGCTCTGGGCCAGGGCCCTGCC Serono
INSPpr	CCCACTGGTGCAGCTCTGCCCTGGGAGCTGGAAGGCCTCTGGGCCAGAGAAGC Serono
INSPpr	CAGGCAGCTGGGATGGCAGGCTGCAGCGTGGGCAAGACGAGGTGGCTGTGACTCT Serono
INSPpr	GCCGCTGAACCCCTCAGGAAGTGTACAGGGATGTGTAAGGCTGTGCCCTCGTCAGGT Serono
INSPpr	GTTCTCCCGCCCCGGCTGCCATGCCATACGCCCTCCGAATCATCTGTGCCCTTGTCATTG Serono
INSPpr	CTCCCTCTCTACATCCCTGGCTGGACCCACCCCCTAGTCCTGTGCAACAGCTGTAT Serono
INSPpr	GCCTGCTCGCAAGCGTTGGCACCCGTGGTCTGTTCTACTGGCAGCTCAGCCTC Serono
INSPpr	CCGTGACGGTGAAGATCCACCATGCTGATCGAGGGGTGTCACTGCAGCCAAAGC Serono

Фиг. 9а. Сопоставление нуклеотидных последовательностей.

Serono	----- INSP00 MLLQLSTLLCLLSALPTGSRPEPQSPPRQSWAAANQTWALGPALPPLVPAASALGSW 10 20 30 40 50 60
Serono	-----SAIRL INSP00 KAFLGLQKARQLGMGRQLQRQDDEVAAVTLPLNPQEVIQGMCKAVPFEVQFSRPGCSAIRL 70 80 90 100 110 120
Serono	----- INSP00 RNHLCFGHCSSLYIPGSOPTPLVLCNSCMPARKRWAPVVLNCLTGSSA----- 130 140 150 160 170 180
INSP00	EGCHCSPKA

Фиг. 9б. Сопоставление последовательностей белка

1 CGGCACGAGG GGGAGACCTG GAAGGAAGCG ACTGCACTGA TCCAGAAATG CCTCCCAGGC
 INSP002V-5'-F
 61 TATCCAGGAG GGGCCAAGAG ATTAAAAGCA GGTTCAGAAG GCTCAGATGC CACTCACAG
 121 ACAGCAGGGT CGACTGCTAG TGACCTTGAG CCCAGTCCGG ACAGACAGAC AGGCAGACAG
 INSP002V-5'nest-F
 181 ACGCACGGAC AAGCAGATGC TCCTGGCCA GCTATCCACT CTTCTGTGCC TGCTTAGCGG
 m l l g q l s t l l c l l s
 241 GGCCCTGCCT ACAGGCTAG GGAGGCCTGA ACCCCAGTCT CCTCGACCTC AGTCCTGGGC
 g a l p t g s g r p e p q s p r p q s w
 301 TGCAGCCAAT CAGACCTGGG CTCTGGGCC AGGGGCCCTG CCCCCACTGG TGCCAGCTTC
 a a a n q t w a l g p g a l p p l v p a
 361 TGCCCTTGGG AGCTGGAAGG CCTTCTTGGG CCTGCAGAAA GCCAGGCAGC TGGGGATGGG
 s a l g s w k a f l g l q k a r q l g m
 421 CAGGCTGCAG CGTGGGCAAG ACGAGGTGGC TGCTGTGACT CTGCCGCTGA ACCCTCAGGA
 g r l q r g q d e v a a v t l p l n p q
 481 ATGTATCCAG GGGATGTGTA AGGCTGTGCC CTTCGTTAG ACAGGGTAC CAGCTTATG
 e v i q g m c k a v p f v q t r e s r y
 INSP002V-5'-R
 541 GGCCCTAGCT ATGCTTGACG TCTCTGGCTC AACCAAATGCT CCCACCTGAG CGCTGTAC
 v a q a s l e l l a s s n p p t s a s
 601 CTTCTGGCTT CTCCGGCCC GGCTGCTAG CCATACGCCT CCGAAATCAT CTGTGTTTG
 INSP002V-3'-F
 661 GTCATTGCTC CTCTCTCTAC ATCCCTGGCT CGGACCCAC CCCACTAGTC CTGTGCAACA
 721 GCTGTATGCC TGCTCGCAAG CGTTGGCAC CCGTGGCCT GTGGTGTCTC ACTGGCAGCT
 781 CAGCCTCCCG TCGACGGGTG AAGATATCCA CCATGCTGAT CGAGGGGTGT CACTGCAGCC
 841 CAAAAGCATG AACTGAGCAT CTGGATGGGT GCACGGAGAC ACGCACCTTG GAGAAATGAG
 901 GGGAGATGGA CCAAGAAAGA CGTGGACCTG GATGATGTAC TCTGGTCAA GAGACCAGGG
 INSP002V-3'nest-R
 961 ATGCAGGGTT AGGCAGACAG GTCCCCAGAG TCCTCACCC GCTCCCCAGA CAGTAGACAC
 ←
 1021 AGTGCCTGTC CTGGAGTTGC ACCACTGATA GTCACAGCAC ACAATGATTG ACAACTCACT
 INSP002V-3'-R
 1081 TTTTTTTTT TTTTGAGAT GGAGTCTCGC TCTGTCGCC AGGCTGGAGT GCAGTGGCGC
 1141 AATCTCAGCT CACTGCAAGC TCCACCTCCC GGGTTATGC CATTCTCCTG TCTCAGCCTC
 1201 CCGAGTAGCT GGGACTACAG GCACCCGCCA ACACGCCGG STAATTTTT GTATTTTAG
 1261 TAAAGACAGG GTTTCACCGT GTAGGCCAGG ATGGTCTCTA TCTCCTGACC TCGTGATCTG
 1321 CCTGCCTTGG CCTTATTATT TTTTTTTAA GGACAGAGTC TCTCTCTGTC ACCCAGGCTG
 1381 GAGTGCAATG GCGCGATCTT GGCTCACTGT AACTCCACT TGCCAGGCTC AAGCAGTTCT
 1441 CCTGCCTCAG CCTCCTGAGT AGCTGGACT ACAGGCACCC GCCACCATGC CCAGCTAATT
 1501 TTTGTATTT TAGTAGAGAC AGAGTTTCAC CATATTAGCC TGGCTGGTCT CAAACTCCTG
 1561 GCCTCAGGTG ATCTGCCAC CTCGGCCTCC CAAAGTGTG GGATCAAATC CACTGTTAAT
 1621 CATTAGGCTG AACTGTCTCT TATAGAATGA GGTCAAAGAC ACTCCCAAGTT GCAGGGAGGG
 1681 TAGATGGCCC CACCCAGACC GAGAGACACA GTGATGACCT CAGCCTAGGG ACMCCAAAAA
 1741 **AAAAAAAAAA AAAAAA**

Фиг. 10. Нуклеотидная последовательность и трансляция кДНК-вставки в Image 4558384. Положение 87 п.н-вставки по сравнению с предсказанным INSP002 показано в затененной рамке. Последовательность Alu в 3'-некодирующей последовательности показана курсивом.

Фиг. 11. Сопоставление последовательностей предсказанного EVSP002 (верхняя строка) с Image: 4558384 (BC02533.1) (нижняя строка)

INSP00	-----	CAGAAATGCCTCCAGGCTATCCAGGAG
BC0253	GGGAGACCTGGAAGGAAGCGACTGCACTGATCCAGAAATGCCTCCAGGCTATCCAGGAG	
	10 20 30 40 50 60	
	30 40 50 60 70 80	
INSP00	GGGCCAAGAGATTAAAAGCAGGTTCAAAGGCTCAGATGCCACTCACCAAGACAGCAGGGT	
BC0253	GGGCCAAGAGATTAAAAGCAGGTTCAAAGGCTCAGATGCCACTCACCAAGACAGCAGGGT	
	70 80 90 100 110 120	
	90 100 110 120 130 140	
INSP00	CGACTGCTAGTGACCTTGAGCCCAGTCGGACAGACAGACAGGCAGACAGACGCACGGAC	
BC0253	CGACTGCTAGTGACCTTGAGCCCAGTCGGACAGACAGACAGGCAGACAGACGCCACGGAC	
	130 140 150 160 170 180	
	150 160 170 180 190 200	
INSP00	AAGCAGATGCTCCTGGCCAGCTATCCACTTCTGTGCCCCCTAGCGGGCCCTGCCT	
BC0253	AAGCAGATGCTCCTGGCCAGCTATCCACTTCTGTGCCCCCTAGCGGGCCCTGCCT	
	190 200 210 220 230 240	
	210 220 230 240 250 260	
INSP00	ACAGGCTCAGGGAGGCCTGAACCCCAGTCCTCGAACCTCAGTCCTGGGCTGCAGCCAAT	
BC0253	ACAGGCTCAGGGAGGCCTGAACCCCAGTCCTCGAACCTCAGTCCTGGGCTGCAGCCAAT	
	250 260 270 280 290 300	
	270 280 290 300 310 320	
INSP00	CAGACCTGGGCTCTGGGCCAGGGGCCCTGCCCACTGGTGCCAGCTTCTGCCCTTGGG	
BC0253	CAGACCTGGGCTCTGGGCCAGGGGCCCTGCCCACTGGTGCCAGCTTCTGCCCTTGGG	
	310 320 330 340 350 360	
	330 340 350 360 370 380	
INSP00	AGCTGGAAGGCCCTCTGGGCTGCAGAAAGCCAGGCAGCTGGGATGGGCAGGCTGCAG	
BC0253	AGCTGGAAGGCCCTCTGGGCTGCAGAAAGCCAGGCAGCTGGGATGGGCAGGCTGCAG	
	370 380 390 400 410 420	
	390 400 410 420 430 440	
INSP00	CGTGGCAAGACGAGGTGGCTGCTGTGACTCTGCCCTGAACCCCTAGGAAGTGATCCAG	
BC0253	CGTGGCAAGACGAGGTGGCTGCTGTGACTCTGCCCTGAACCCCTAGGAAGTGATCCAG	
	430 440 450 460 470 480	
	450 460 470	
INSP00	GGGATGTGAAGGCTGTGCCCTCGTTCAAGCAATCTCCACCTCAGCCTCTGAGTTCTAGGTGTT	
BC0253	GGGATGTGAAGGCTGTGCCCTCGTTCAAGACACGGGAGTCTCGCTATGTTGCCCAAGCT	
	490 500 510 520 530 540	
	550 560 570 580 590 600	
	480	
INSP00	-----GTGTT	
BC0253	AGTCTTGAGCTCTGGCCTCAAGCAATCTCCACCTCAGCCTCTGAGTTCTAGGTGTT	
	610 620 630 640 650 660	
	490 500 510 520 530 540	
INSP00	CTCCCGGCCGGCTGCTCAGCCATACGCCCTCGAAATCATCTGTGCTTGGTCATTGCTC	
BC0253	CTCCCGGCCGGCTGCTCAGCCATACGCCCTCGAAATCATCTGTGCTTGGTCATTGCTC	

550 560 570 580 590 600
 INSP00 CTCTCTACATCCCTGGCTCGGACCCCACCCCACTAGTCCTGTGCAACAGCTGTATGCC
 :::::::::::::::::::::
 BC0253 CTCTCTACATCCCTGGCTCGGACCCCACCCCACTAGTCCTGTGCAACAGCTGTATGCC
 670 680 690 700 710 720

610 620 630 640 650 660
 INSP00 TGCTCGCAAGCGTTGGCACCCTGGCTGTGGTCTCACTGGCAGCTCAGCCTCCCG
 :::::::::::::::::::::
 BC0253 TGCTCGCAAGCGTTGGCACCCTGGCTGTGGTCTCACTGGCAGCTCAGCCTCCCG
 730 740 750 760 770 780

670 680 690 700 710 720
 INSP00 TCGACGGGTGAAGATATCCACCATGCTGATCGAGGGGTGTCACTGCAGCCCCAAAGCATG
 :::::::::::::::::::::
 BC0253 TCGACGGGTGAAGATATCCACCATGCTGATCGAGGGGTGTCACTGCAGCCCCAAAGCATG
 790 800 810 820 830 840

INSP00 A-----

:

BC0253 AACTGAGCATCTGGATGGTGACGGAGACACGCACCTTGGAGAAATGAGGGGAGATGGA

850 860 870 880 890 900

INSP00 -----

BC0253 CCAAGAAAGACGTGGACCTGGATGATGTACTCTGGGTCAAGAGACCAGGGATGCAGGGTT

910 920 930 940 950 960

INSP00 -----

BC0253 AGGCAGACAGGTCCCCAGACTCCTCACCCCTGCTCCCCAGACAGTAGACACAGTCAGCGTC

970 980 990 1000 1010 1020

INSP00 -----

BC0253 CTGGAGTTGCACCACTGATAGTCACAGCACACAATGATTGACAACACTTTTTTTTT

1030 1040 1050 1060 1070 1080

INSP00 -----

BC0253 TTTTGAGATGGAGTCTCGCTCTGTCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCAATCTCAGCT

1090 1100 1110 1120 1130 1140

INSP00 -----

BC0253 CACTGCAAGCTCCACCTCCCCGGTTATGCCATTCTCCTGTCTCAGCCTCCCGAGTAGCT

1150 1160 1170 1180 1190 1200

INSP00 -----

BC0253 GGGACTACAGGCACCCGCCAACACGCCCGGCTAATTTTTGTATTTTAGTAAAGACAGG

1210 1220 1230 1240 1250 1260

INSP00 -----

BC0253 GTTTCACCGTGTAGCCAGGATGGCTCTATCTCCTGACCTCGTGTCTGCCTGCCTGG

1270 1280 1290 1300 1310 1320

INSP00 -----

BC0253 CCTTATTATTTTTTAAGGACAGAGTCTCTCTGTCAACCAGGCTGGAGTGCAATG

1330 1340 1350 1360 1370 1380

INSP00 -----
BC0253 GCGCGATCTGGCTCACTGTAACCTCCACTGCCAGGCTCAAGCAGTCTCCTGCCTCAG
 1390 1400 1410 1420 1430 1440

INSP00 -----
BC0253 CCTCCTGAGTAGCTGGACTACAGGCACCCGCCACCATGCCAGCTAAATTGTATTT
 1450 1460 1470 1480 1490 1500

INSP00 -----
BC0253 TAGTAGAGACAGAGTTCACCATATTAGCCTGGTGGTCAAACCTGGCCTCAGGTG
 1510 1520 1530 1540 1550 1560

INSP00 -----
BC0253 ATCTGCCACCTCGGCCCTCCAAAGTGCTGGATCAAATCCACTGTTAATCATTAGGCTG
 1570 1580 1590 1600 1610 1620

INSP00 -----
BC0253 AACTGTCTCTTATAGAATGAGGTCAAAGACACTCCCAGTTGCAGGGAGGGTAGATGGCCC
 1630 1640 1650 1660 1670 1680

INSP00 -----
BC0253 CACCCAGACCGAGAGACACAGTGATGACCTCAGCCTAGGGACACCAAAAAAAA
 1690 1700 1710 1720 1730 1740

INSP00 -----
BC0253 AAAAAA

Фиг. 11а. Нуклеотидные последовательности

4558384_OR	MLLGQLSTLLCLLSGALPTGSGRPEPQSPPQSWAAANQTWALGPGALPPLVPASALGSW
INSP002_PR	MLLGQLSTLLCLLSGALPTGSGRPEPQSPPQSWAAANQTWALGPGALPPLVPASALGSW *****
4558384_OR	KAFLGLQKARQLGMGRQLRGQDEVAAVTLPLNPQEVIQGMCKAVPFVQTR-----
INSP002_PR	KAFLGLQKARQLGMGRQLRGQDEVAAVTLPLNPQEVIQGMCKAVPFVQFSRPGCSAIRL *****
4558384_OR	-----SRYVAQAS---LELLASSNPP-----TSAS-----
INSP002_PR	RNHLCFGHCSSLYIPGSDPTPLVLCNSCMPARKRWAPVVLWCLTGSSASRRRVKISTMLI * * * * * ***
4558384_OR	-----
INSP002_PR	EGCHCSPKA

Фиг. 11б. Последовательности белка

```

1 GTCGACTGCT AGTGACCTTG AGCCCAGTCC GGACAGACAG ACAGGCAGAC AGAGGCACGG
61 ACAAGCAGAT GCTCCTTGGC CAGCTATCCA CTCTCTGTG CCTGCTTAGC GGGGCCCTG
m l l g q l s t l l c l l s g a l

121 CTACAGGCTC AGGGAGGCCT GAACCCCAGT CTCCCTGACC TCAGTCCTGG GCTGCAGCCA
p t g s g r p e r q s p r p q s w a a a

181 ATCAGACCTG GGCTCTGGC CCAGGGGCC TGCCCCACT GTGCCAGCT TCTGCCCTTG
n q t w a l g p q a l p p l v p a s a l

241 GGAGCTGGAA GCCCTCTTG GCCCTGCAGA AAGCCAGCA CCTCGGGATC CCCAGGCTG
g s w k a f l g l q k a r g q l g m g r l

301 AGCGTGGCA AGACGAGGTG GCTGCTGTGA CTCTGCCGCT GAACCCCTAG GAAGTGATCC
q r g q d e v a a v t l p l n p q e v i

361 AGGGGATGTG TAAGGCTGTG CCCTTCGTMTC TCTCCCGCC CGGCTGCTCA GCCATACGCC
q g m c k a v p f v l s r p g c s a i r

421 TCCGAAATCA TCTGTGCTTT GGTCATTGCT CCTCTCTCTA CATCCCTGGC TCGGACCCCA
l r n h l c f g h c s s l y i p g s d p

481 CCCCACTAGT CCTGTGCAAC AGCTGTATGC CTGCTCGAA GCGTTGGCA CCCGTGGTCC
t p l v l c n s c m p a r k r w a p v v

541 TGTGGTGTCT CACTGGCAGC TCAGCCTCCC GTCGACGGGT GAAGATATCC ACCATGCTGA
l w c l t g s s a s r r r v k i s t m l

601 TCGAGGGGTG TCACTGCAGC CAAAAGCAT GAACTGAGCA TCTGGATGGG TGCACGGAGA
i e g c h c s p k a

661 CACGCACCTT GGAGAAATGA GGGGAGATGG ACCAAGAAAG ACGTGGACCT GGATGATGT

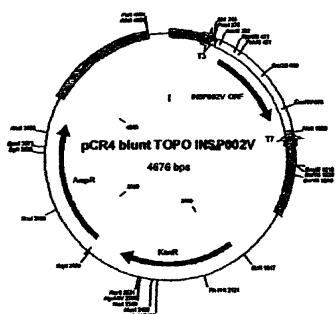
```

Фиг. 12. Нуклеотидная последовательность и трансляция последовательности INSP002V, генерированной с помощью ПЦР из Image 4558384

Молекула: pCR4 blunt TOPO INSP002V, кольцевая ДНК 4676 п.н.
 Название файла: pCR4 blunt TOPO INSP002V.cm5
 Описание: Лигирование продукта INSP002-nestFR в pCR4blunt-Topo
 Примечания: Плазмида ID 13075

Особенности молекулы:

Тип	Начало	Конец	Название	Описание
Область	2	216		область lac-промотора
Область	205	221		сайт обратного праймирования M13
Область	217	294		гибридный ген LacZα-ccdB
Маркер	243		T3	полилинкер
Область	262	294		сайт клонирования TOPO
Область	294	294		ПЦР-продукт INSP002
Область	295	1013		' гибридный ген LacZα-ccdB
Ген	363	923	INSP002V ORF	' полилинкер
Область	1014	1529		' сайт клонирования TOPO
Область	1014	1031		- Сайт прямого праймирования 20M13
Область	1014	1014		- Сайт инициации рУС
Маркер	1066		C T7	
Область	1089	1074	C	
Ген	1878	2672	KanR	
Область	2864	2868		Сайт связывания с рибосомой
Ген	2876	3736	AmpR	
Область	3881	4554		Сайт инициации рУС



Фиг. 13. Карта pCR4blunt-Topo-INSP002V

Фиг. 14. Сопоставление предсказанной последовательности INSP002 (верхняя строка) с последовательностью варианта INSP002V (нижняя строка)

INSPpr CAGAAATGCCCTCCAGGCTATCCAGGAGGGCCAAGAGATTAAAAGCAGGTTCAGAAGGC
 INSPen -----

70	80	90	100	110	120
TCAGATGCCACTCACCAAGACAGCAGGGTCGACTGCTAGTGACCTTGAGGCCAGTCCGGAC					
:::::::::::::::::::					
INSPen -----GTCGACTGCTAGTGACCTTGAGGCCAGTCCGGAC					
10 20 30					
130	140	150	160	170	180
AGACAGACAGGCAGACAGACGCACGGACAAGCAGATGCTCCTGGCCAGCTATCCACTCT					
:::::::::::::::::::					
INSPen AGACAGACAGGCAGACAGACGCACGGACAAGCAGATGCTCCTGGCCAGCTATCCACTCT					
40	50	60	70	80	90
190	200	210	220	230	240
TCTGTGCCTGCTTAGCGGGGCCCTGCCTACAGGCTCAGGGAGGCCTGAACCCCAGTCTCC					
:::::::::::::::::::					
INSPen TCTGTGCCTGCTTAGCGGGGCCCTGCCTACAGGCTCAGGGAGGCCTGAACCCCAGTCTCC					
100	110	120	130	140	150
250	260	270	280	290	300
TCGACCTCAGTCCTGGGCTGCAGCCAATCAGACCTGGCTCTGGGCCAGGGGCCCTGCC					
:::::::::::::::::::					
INSPen TCGACCTCAGTCCTGGGCTGCAGCCAATCAGACCTGGCTCTGGGCCAGGGGCCCTGCC					
160	170	180	190	200	210
310	320	330	340	350	360
CCCCTGGGCCAGCTCTGCCCTGGGAGCTGGAAAGGCCTTCTGGGCCCTGCAGAAAGC					
:::::::::::::::::::					
INSPen CCCCTGGGCCAGCTCTGCCCTGGGAGCTGGAAAGGCCTTCTGGGCCCTGCAGAAAGC					
220	230	240	250	260	270
370	380	390	400	410	420
CAGGCAGCTGGGATGGGCAGGCTGCAGCGTGGCAAGACGAGGTGGCTGCTGTGACTCT					
:::::::::::::::::::					
INSPen CAGGCAGCTGGGATGGGCAGGCTGCAGCGTGGCAAGACGAGGTGGCTGCTGTGACTCT					
280	290	300	310	320	330

Фиг. 14а. Нуклеотидные последовательности

	430	440	450	460	470	480
INSPpr	GCCGCTGAACCCCTCAGGAAGTGATCCAGGGGATGTGTAAGGCTGTGCCCTCGTTCAAGGT :::-----					
INSPen	GCCGCTGAACCCCTCAGGAAGTGATCCAGGGGATGTGTAAGGCTGTGCCCTCGTTCAAGGT--- 340 350 360 370 380 390					
	490	500	510	520	530	540
INSPpr	GTTCTCCGGCCCGGCTGCTCAGCCATACGCCCTCGAAATCATCTGTGCTTGGTCATTG :::-----					
INSPen	--TCTCCGGCCCGGCTGCTCAGCCATACGCCCTCGAAATCATCTGTGCTTGGTCATTG 400 410 420 430 440					
	550	560	570	580	590	600
INSPpr	CTCCTCTCTACATCCCTGGCTGGACCCCACCCACTAGTCCTGTGCAACAGCTGTAT :::-----					
INSPen	CTCCTCTCTACATCCCTGGCTGGACCCCACCCACTAGTCCTGTGCAACAGCTGTAT 450 460 470 480 490 500					
	610	620	630	640	650	660
INSPpr	GCCTGCTCGCAAGCGTTGGCACCCGTGGCTGTGGTGTCTACTGGCAGCTCAGCCTC :::-----					
INSPen	GCCTGCTCGCAAGCGTTGGCACCCGTGGCTGTGGTGTCTACTGGCAGCTCAGCCTC 510 520 530 540 550 560					
	670	680	690	700	710	720
INSPpr	CCGTCGACGGGTGAAGATATCCACCATGCTGATCGAGGGGTGTCACTGCAGCCAAAAGC :::-----					
INSPen	CCGTCGACGGGTGAAGATATCCACCATGCTGATCGAGGGGTGTCACTGCAGCCAAAAGC 570 580 590 600 610 620					
	 INSPpr ATGA----- ::: INSPen ATGAACTGAGCATCTGGATGGGTGCACGGAGACACGCACCTTGGAGAAATGAGGGAGAT 630 640 650 660 670 680					
	 INSPpr ----- INSPen GGACCAAAGAAAGACGTGGACCTGGATGATGT 690 700 710					
INSP002V INSP002	23 MLLQLSTLLCLLSGALPTGSGRPEPQSPPQSWAAANQTWALGPALPPLVPASALGSW 1 MLLQLSTLLCLLSGALPTGSGRPEPQSPPQSWAAANQTWALGPALPPLVPASALGSW *****					
INSP002V INSP002	83 KAFLGLQKARQLGMGRLQRQDDEVAAVTLPLNPQEVIQGMCKAVPF--VLSRPGCSAIRL 61 KAFLGLQKARQLGMGRLQRQDDEVAAVTLPLNPQEVIQGMCKAVPFVQFSRPGCSAIRL *****					
INSP002V INSP002	141 RNHLCFGHCSSLYIPGSDPTPLVLCNSCMPARKRWAPVVLWCLTGSSASRRRVKISTMLI 121 RNHLCFGHCSSLYIPGSDPTPLVLCNSCMPARKRWAPVVLWCLTGSSASRRRVKISTMLI *****					
INSP002V INSP002	201 EGCHCSPKA 181 EGCHCSPKA *****					

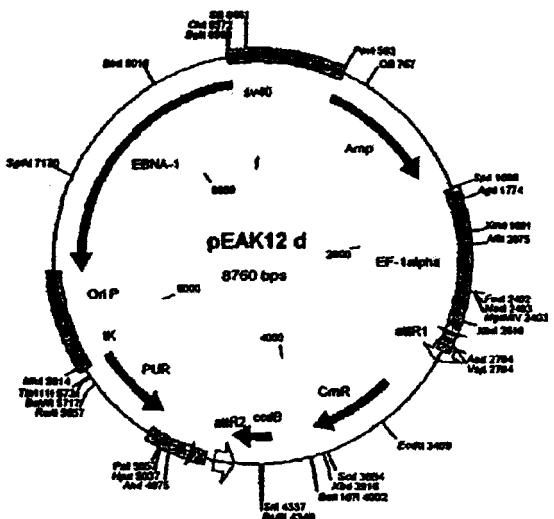
Фиг. 14б. Последовательности белка

Молекула: pEAK12 d, кольцевая ДНК 8760 п.н.
 Название файла: pEAK12DEST.cm5

Описание: Вектор для экспрессии в клетках
 млекопитающего (плазмида ID 11345)

Особенности молекулы:

Тип	Начало	Конец	Название	Описание
Область	2	595		pmb-ori
Ген	596	1519	Amp	
Область	1690	2795	EF-1alpha	
Область	2703	2722		положение праймера pEAK12F MCS
Область	2796	2845		
Маркер	2855		attR1	
Ген	3256	3915	CmR	
Ген	4257	4562	ccdB	
Маркер	4603		C attR2	
Область	4733	4733		MCS
Область	4734	5162		poly A/сплайсинг
Область	4819	4848	C	положение праймера pEAK12R
Ген	5781	5163	C PUR	PUROMYCIN
Область	6005	5782	C tK	промотор tK
Область	6500	6006	C Ori P	
Ген	8552	6500	C EBNA-1	
Область	8553	8752	sv40	



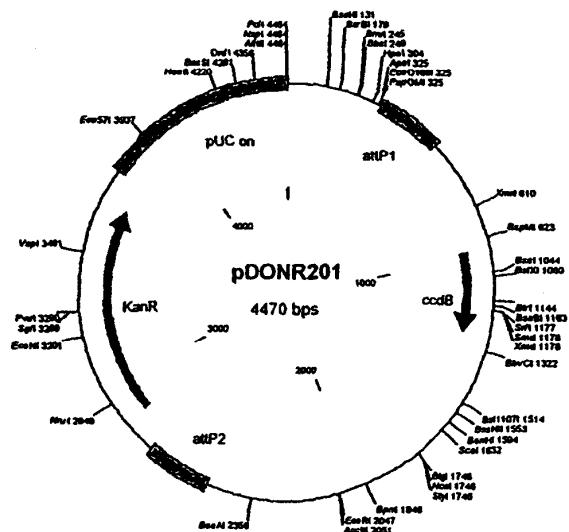
Фиг. 15. Карта экспрессирующего вектора pEAK12d

Молекула: pDONR201, кольцевая ДНК 4470 п.н.
Название файла:pDONR201.cm5

Описание: вводный вектор Gateway (Invitrogen)-плазмиды ID 13309

Особенности молекулы:

Тип	Начало	Конец	Название
Область	332	563	attP1
Ген	959	1264	ccdB
Область	2513	2744	attP2
Ген	2868	3677	KanR
Область	3794	4467	pUC ori

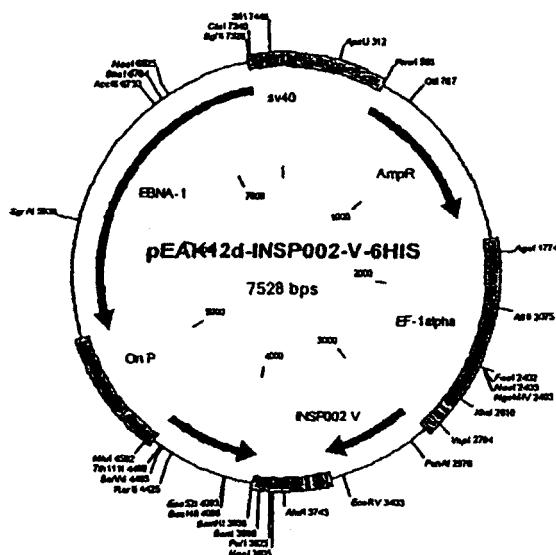


Фиг. 16. Карта вектора pDONR201 Gateway

Молекула: pEAK12d-INSP002-V-6HIS, кольцевая ДНК 7528 п.н.
 Название файла:pEAK12d-INSP002V-6HIS.cm5
 Описание: кДНК встроена между сайтами attR1 и attR2
 Примечание: плазмида ID 13227

Особенности молекулы:

Тип	Начало	Конец	Название	Описание
Область	2	595		pmb-ori
Ген	596	1519	AmpR	
Область	1690	2795	EF-lalpha	промотор
Область	2703	2722		pEAK12F
Область	2796	2845		MCS''
Область	2855	2874		attB1
Ген	2888	3469	INSP002-V	
Область	3474	3495		attB2
Область	3501	3501		'MCS
Область	3502	3930		poly A/сплайсинг
Область	3616	3597	C	pEAK12R
Ген	4549	3931	C	Пуромицин R
Область	4773	4550	C	промотор tK
Область	5268	4774	C Ori P	
Ген	7320	5268	C EBNA-1	
Область	7321	7520	sv40	



Фиг. 17. Карта pEAK12d-INSP002-V-6HIS

1 GATGCTCCTT GGCCAGCTAT CCACTCTTCT GTGCCTGCTT AGCGGGGCC CTCACAGG
 m l l g q r s t l l c l l s g a l p t
 INSP002-FL-F

61 CTCAGGGAGG CCTGAACCCC AGTCTCCTCG ACCTCAGTCC TGGGCTGCAG CCAATCAGAC
 g s g r p e p q s p r p q s w a a a n q

121 CTGGGCTCTG GGCCCAGGGG CCCTGCCCGG ACTGGTGCCA GCTTCTGCC TTGGGAGCTG
 t w a l g p g a l p p l v p a s a l g s

181 GAAGGCCTTC TTGGGCCTGC AGAAAGCCAG GCAGCTGGGG ATGGGCAGGC TGCAGCGTGG
 w k a f l g l q k a r q l g m g r l q r

241 GCAAGACGAG GTGGCTGCTG TGACTCTGCC GCTGAACCCCT CAGGAAGTGA TCCAGGGGAT
 g q d e v a a v t l p l n p q e v i q g

301 GTGTAAGGCT GTGCCCTTCG TTCAGGTGTT CTCCCGGCC GGCTGCTCAG CCATACGCCT
 m c k a v p f v q v f s r p g c s a i r

361 CCGAAATCAT CTGTGCTTTG GTCATTGCTC CTCTCTCTAC ATCCCTGGCT CGGACCCCAC
 l r n h l c f g h c s s l y i p g s d p

421 CCCACTAGTC CTGTGCAACA GCTGTATGCC TGCTCGCAAG CGTTGGGCAC CCGTGGTCCT
 t p l v l c n s c m p a r k r w a p v v

481 GTGGTGTCTC ACTGGCAGCT CAGCCTCCCG TCGACGGGTG AAGATATCCA CCATGCTGAT
 l w c l t g s s a s r r r v k i s t m l

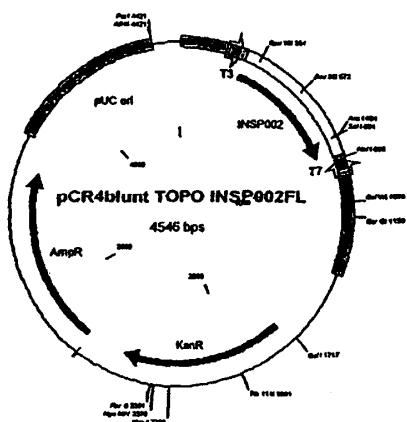
541 CGAGGGGTGT CACTGCAGCC CAAAAGCATG AACTGAGCAT CGTGGATGG
 l e g c h c s p k a ← INSP002-FL-R

Фиг. 18. Полноразмерный INSP002, клонированный из кДНК человеческого сердца

Молекула: pCR4blunt TOPO INSP002FL, кольцевая ДНК 4546 п.н.
 Название файла:pCR4 blunt TOPO INSP002 FL.cm5,
 Описание: Лигирование Noname в открытый pCR4blunt-TOPO*

Особенности молекулы:

Тип	Начало	Конец	Название	Описание
Область	2	216		область lac-промотора
Область	205	221		сайт обратного праймирования M13
Область	217	294		гибридный ген LacZa-ccdB
Маркер	243		T3	
Область	262	294		полилинкер
Область	294	294		сайт клонирования TOPO
Область	295	883		ПЦР-продукт INSP002-F3R3
Ген	296	865	INSP002	OPC INSP002
Область	884	1399		'гибридный ген LacZa-ccdB
Область	884	901		полилинкер
Область	884	884		'сайт клонирования TOPO
Маркер	936		C T7	промотор T7
Область	959	944	C	Сайт прямого праймирования - 20M13
Ген	1748	2542	KanR	OPC гена резистентности к канамицину
Область	2734	2738		Сайт связывания с рибосомой
Ген	2746	3606	AmpR	OPC гена резистентности к ампциллину
Область	3751	4424	pUC ori	сайт инициации pUC



Фиг. 19

