

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **018190**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2013.06.28**

(21) Номер заявки  
**200901168**

(22) Дата подачи заявки  
**2008.02.29**

(51) Int. Cl. *C12N 15/67* (2006.01)**(54) УЛУЧШЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВА БЕЛКОВ**(31) **07103406.0; 07104226.1; 07116358.8**(32) **2007.03.02; 2007.03.15; 2007.09.13**(33) **EP**(43) **2010.06.30**(86) **PCT/EP2008/052493**(87) **WO 2008/107388 2008.09.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ФАРМА  
ГМБХ УНД КО. КГ (DE)**

(72) Изобретатель:  
**Кауфманн Хитто, Флорин Лоре,  
Беккер Эрик, Олайиоисе Монилола,  
Хауссер Ангелика, Фугманн Тим (DE)**

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

(56) EP-A-1652530

HANADA KENTARO ET AL.: "Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide", NATURE (LONDON), vol. 426, no. 6968, 2003, pages 803-809, XP002441536, ISSN: 0028-0836, the whole document

ALPY FABIEN ET AL.: "Give lipids a START: The StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals", JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 118, no. 13, July 2005 (2005-07), pages 2791-2801, XP002441537, ISSN: 0021-9533, the whole document

KAWANO MIYUKI ET AL.: "Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 281, no. 40, October 2006 (2006-10), pages 30279-30288, XP002441538, ISSN: 0021-9258, the whole document

TOTH BALAZS ET AL.: "Phosphatidylinositol 4-kinase III beta regulates the transport of ceramide between the endoplasmic reticulum and Golgi", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 281, no. 47, November 2006 (2006-11), pages 36369-36377, XP002441539, ISSN: 0021-9258, the whole document

(57) Изобретение относится к области получения белков и технологии клеточного культивирования. При создании изобретения идентифицирован CERT в качестве нового субстрата PKD *in vivo*. Фосфорилирование на серине 132 с помощью PKD снижает аффинность CERT к его липид-мишени фосфатидилинозитол-4-фосфату в мембранах комплекса Гольджи и снижает связанную с переносом церамида активность, что позволяет идентифицировать PKD в качестве регулятора липидного гомеостаза. При создании изобретения установлено, что CERT, в свою очередь, имеет решающее значение для активации PKD и зависящего от PKD транспорта карго-белка в плазматическую мембрану. Таким образом, взаимосвязь PKD и CERT имеет решающее значение для поддержания целостности мембран комплекса Гольджи и секреторного транспорта.

**B1****018190****018190****B1**

### **Предпосылки создания изобретения**

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к области технологии культивирования клеток. Оно относится к способу производства белков, а также к способу создания новых экспрессионных векторов и клеток-хозяев, предназначенных для получения биофармацевтических средств. Изобретение относится также к фармацевтическим композициям и способам лечения.

#### **Известный уровень техники**

Рынок биофармацевтических средств, предназначенных для применения в терапии человека, продолжает увеличиваться с высокой скоростью, в 2003 г. в клинических условиях прошли оценку 270 новых биофармацевтических средств и их примерная стоимость составила 30 млрд (Werner 2004). Биофармацевтические средства можно получать с помощью различных систем клеток-хозяев, включая клетки бактерий, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки растений и клетки млекопитающих, в том числе клеточные линии человеческого происхождения. В настоящее время все возрастающее количество биофармацевтических средств получают в эукариотических клетках благодаря их способности осуществлять правильный процессинг и модификацию человеческих белков. Таким образом, успешное производство биофармацевтических средств с высоким выходом с использованием эукариотических клеток имеет решающее значение и зависит от характеристик рекомбинантной моноклональной клеточной линии, применяемой в этом процессе. Таким образом, существует большая потребность в создании новых систем клеток-хозяев с улучшенными характеристиками и разработке методов культивирования линий клеток-продуцентов, обладающих высокой продуктивностью, которая является основой высокопроизводительных процессов.

Применяемые ранее подходы были сфокусированы на разработке процесса и разработке реактора. В настоящее время основные усовершенствования связаны с разработкой составов сред и созданием клеток-хозяев с помощью методов геной инженерии. В промышленности для производства биофармацевтических средств наиболее широко применяемыми системами клеток-хозяев млекопитающих являются иммортализованные линии клеток яичника китайского хомячка (CHO) (Wurm, 2004).

Первые стратегии метаболического конструирования, направленные на повышение продуктивности линий клеток млекопитающих, были сфокусированы на возможности их выращивания в суспензии в бесывороточных средах. Осуществление стабильной экспрессии трансферрина и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) в клетках линии CHO-K1 позволило получить клеточную линию, обладающую способностью к пролиферации в безбелковых условиях (Pak и др., 1996). Другие подходы к повышению продуктивности клеточных линий включают использование регуляторных элементов ДНК в предназначенных для трансфекции векторах для направленного переноса или создания "горячих точек" регуляции транскрипции. Установлено, что и регуляторные элементы, такие как S/MAR (области, ассоциированные с каркасом/матрицей), которые оказывают влияние на структуру хроматина, так и UCOE (повсеместно распространенные элементы открытия хроматина), выведенные из генов "домашнего хозяйства", оказывают положительное воздействие на удельную продуктивность рекомбинантных белков, продуцируемых линиями CHO-клеток (Barnes и Dickson, 2006).

Поскольку известно, что апоптоз является основной причиной клеточной гибели в процессах производства в культурах клеток млекопитающих (al-Rubeai и Singh, 1998), интенсивно изучалось воздействие экспрессии антиапоптозных генов на жизнеспособность культур клеток-хозяев млекопитающих. Большинство созданных антиапоптозных стратегий сфокусировано на сверхэкспрессии антиапоптозных генов семейства bcl-2 (например, bcl-1 или bcl-xL (Kaufmann и Fussenegger, 2003). В результате повышения устойчивости клеток к апоптозным стимулам в процессе ферментации, таким как истощение питательных веществ и накопление побочных отходов, процессы производства с использованием усовершенствованных в отношении апоптоза клеточных линий характеризуются пролонгированной жизнеспособностью культур и в некоторых случаях повышенным выходом продукта (Chiang и Sisk, 2005).

Поскольку большинство биофармацевтических продуктов представляет собой белки, которые секретируются из клетки в процессе производства, то механизм секреторного транспорта линии клеток-продуцентов представляет собой другую важную мишень для новых стратегий разработки клеток-хозяев.

Секреция белков представляет собой сложный многостадийный механизм. Белки, предназначенные для транспорта во внеклеточное пространство или наружную плазматическую мембрану, сначала импортируются посредством котрансляции в эндоплазматический ретикулум. В нем они упаковываются в липидные пузырьки и транспортируются в аппарат Гольджи и, наконец, из транс-Гольджи-сети (TGN) в плазматическую мембрану, где происходит их высвобождение в культуральную среду (Seth и др., 2006).

Выход для любого процесса получения биофармацевтического продукта в большой степени зависит от уровня белкового продукта, секретлируемого клетками-продуцентами в единицу времени при их выращивании в условиях данного процесса. Для синтеза и секреции терапевтического белка из эукариотической клетки необходим ряд сложных биохимических внутриклеточных процессов. Все эти стадии, такие как транскрипция, транспорт РНК, трансляция, посттрансляционная модификация и транспорт белков, строго регулируются в линии клетки-хозяина дикого типа и должны оказывать воздействие на удельную продуктивность любой линии клеток-продуцентов, выведенной из этого хозяина.

Многие конструктивные подходы основаны на углубленном понимании молекулярных сетей, которые регулируют такие процессы, как транскрипция и трансляция, приводящие к повышению выхода на указанных стадиях производства белков. Однако, как это характерно для любого многостадийного процесса производства, расширение узкого места на ранних стадиях в ходе процесса может создавать узкие места по его ходу, прежде всего после трансляции. Установлено, что вплоть до определенного порога удельная продуктивность клетки-производителя линейно коррелирует с уровнем транскрипции генного продукта (Varnes и др., 2007). Однако дальнейшее повышение уровня экспрессии продукта на уровне мРНК может приводить к перегрузке механизма белкового синтеза, укладки или транспорта, что приводит к внутриклеточному накоплению белкового продукта. Фактически, это часто можно наблюдать в современных процессах производства (фиг. 1).

Созданию специфических целенаправленных конструктивных подходов, предназначенных для решения этой проблемы и повышения эффективности секреции белковых продуктов из эукариотических клеток, в настоящее время препятствует недостаточное понимание сложной регуляторной сети, которая запускает транспорт белков в плазматическую мембрану.

Первые опыты, связанные с конструированием внутриклеточного транспорта секреторируемых терапевтических белков, были сконцентрированы на сверхэкспрессии молекулярных шаперонов типа связывающего белка BiP/GRP78, протеиндисульфидизомеразы (PDI). Шапероны представляют собой клеточные белки, расположенные в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), которые способствуют укладке и сборке вновь синтезированных белков. В отличие от того, что следовало ожидать, было установлено, что сверхэкспрессия BiP в клетках млекопитающих скорее снижает, а не повышает секрецию белков, ассоциированных с ним (Dogne и Kaufman, 1994). Аналогично этому было установлено, что сверхэкспрессия PDI в CHO-клетках приводила к снижению экспрессии слитого белка TNFR:FC (Davis и др., 2000), в то время как удельная скорость производства антитела возрастала на 40% (Borth и др., 2005). Возможным объяснением этих неожиданно установленных факторов может быть то, что повышение способности клеточного белка к укладке создает узкое место для происходящих далее стадий, что подтверждается установленными транспортными проблемами из ЭР в цистерны, располагающиеся ближе к ядру клетки (дис-Гольджи), которые возникают при производстве IFN-гамма в линии CHO-клеток (Hooker и др., 1999).

Другим современным подходом к повышению способности к секреции клеток млекопитающих является гетерологичная сверхэкспрессия транскрипционного фактора белка 1, связывающегося с X-боксом (XBP-1). XBP-1 представляет собой один из основных регуляторов (мастер-регулятор) дифференцировки плазматических клеток, специализированного типа клеток, оптимизированного для производства высоких уровней и секреции антител (Iwakoshi и др., 2003). XBP-1 регулирует этот процесс путем связывания с так называемыми реагирующими на стресс ЭР-элементами (ERSE) в промоторах широкого спектра генов секреторных путей, что приводит к (I) физическому увеличению ЭР, (II) повышению массы и функции митохондрий, (III) увеличению размера клеток и (IV) повышению уровня общего белкового синтеза (Shaffer и др., 2004).

В настоящее время описаны попытки повышения секреции белков путем сверхэкспрессии XBP-1 в неплазматических клетках, прежде всего в линиях клеток-производителей. Установлено, что в клетках линии CHO-K1 уровень производства двух репортерных белков (секреторируемой щелочной фосфатазы (SEAP) и секреторируемой альфа-амилазы (SAMY)) повышался после интродукции XBP-1 в CHO-K1-клетки. Однако не удалось продемонстрировать это действие в опытах по кратковременной экспрессии с использованием других клеточных линий, таких как HEK293-, HeLa- или HT-1080-клетки (Tigges и Fussenegger, 2006). В заявке на патент WO 2004/111194 на имя Ailor Eric заявлено применение сверхэкспрессии XBP-1 или ATF6 для создания высокопродуктивных клеточных линий.

Важно отметить, что XBP-1 не только регулирует дифференцировку плазматических клеток, но играет также важную роль в ответе несвернутых белков (UPR) (Brewer и Hendershot, 2005). UPR представляет собой сложную сеть трансдукции сигнала, которая активируется путем ингибирования укладки белка в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). UPR координирует адаптивные ответы на эту стрессовую ситуацию, включая индукцию присутствующих в ЭР молекулярных шаперонов и экспрессию протеинфолдазы для повышения способности к укладке белков ЭР, индукцию синтеза фосфолипидов, ослабление общей трансляции и повышающую регуляцию ассоциированного с ЭР расщепления для снижения загрузки ЭР несвернутыми белками. При серьезном или пролонгированном стрессе ЭР UPR, в конце концов, индуцирует гибель клеток в результате апоптоза (Schroder, 2006).

Процесс окончательной дифференцировки, такой как созревание лимфоцита, с образованием плазматической клетки, как правило, рассматривают как напоминающую апоптоз программу, во время которой клетка теряет способность к пролиферации, превращаясь в окончательно дифференцированную секреторную клетку. Фактически практически все типы клеток, специально предназначенные для секреции белка с высоким уровнем (например, железистые клетки, панкреатические бета-клетки), которые являются окончательно дифференцированными, не обладают способностью к пролиферации и имеют ограниченное время жизни перед тем, как подвергаются, в конце концов, запрограммированной клеточной гибели (Chen-Kiang, 2003). Таким образом, сверхэкспрессия XBP-1 в качестве регулятора как дифферен-

цировки плазматических клеток, так и UPR имеет потенциальный недостаток из-за присущего ей риска ингибирования пролиферации и/или индукции апоптоза.

В целом, существует необходимость в улучшении секреторной активности клеток-хозяев, предназначенных для производства рекомбинантного белка. Это может быть еще более важным в сочетании с новыми технологиями повышения транскрипции и процессами, в которых используются высокие титры, для предупреждения возникновения посттрансляционных узких мест и внутриклеточного накопления белкового продукта (фиг. 1). Однако, как установлено в настоящее время, существует два основных препятствия на пути целенаправленного воздействия на механизм секреторного транспорта, а именно: все еще недостаточно данных об основах регуляторных механизмов и требуется предупреждать сопутствующее ингибирование роста или апоптозный ответ клетки-производителя.

В настоящем изобретении описана новая и неожиданная роль белка-переносчика церамида (CERT) в транспорте секреторируемых белков в плазматическую мембрану, а также представлен способ эффективного улучшения производства белков, которые транспортируются с помощью секреторного пути из эукариотических клеток.

CERT (который называют также белком, связывающим антиген, который характерен для синдрома Гудпасчера) представляет собой цитозольный белок, важный для переноса церамида без участия сосудов от места его производства в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) к мембранам комплекса Гольджи, где имеет место его превращение в сфингомиелин (SM) (Hanada и др., 2003).

Известны две изоформы CERT: имеющая более высокий уровень экспрессии полученная в результате альтернативного сплайсинга форма, в которой отсутствует состоящая из 26 аминокислот богатая серином область (SEQ ID NO: 10, 11), и полноразмерный состоящий из 624 аминокислот белок, обозначенный как CERT<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 12, 13) (Raya др., 2000). Обе изоформы CERT несут карбоксиконцевой домен (START), родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (StAR), который является необходимым и достаточным для связывания и транспорта церамида (Hanada и др., 2003). START-домены являются высококонсервативными среди организмов от мух и червей до человека (фиг. 2). Они состоят из ~210 аминокислот и образуют гидрофобный туннель, который содержит мономерный липид (Alru и Tomasetto, 2005; Soccio и Breslow, 2003). START-домены обнаружены в 15 белках млекопитающих, причем CERT в наибольшей степени напоминает белок-транспортёр фосфатидилхолина Pctp, который связывает и осуществляет челночный перенос фосфатидилхолина (PC) между мембранами, и белок-транспортёр липидов StarD10, специфический для PC и PE (Olayioye и др., 2005; Soccio и Breslow, 2003; Wirtz, 2006). Помимо START-домена белки CERT содержат также аминоконцевой PH-домен, обладающий специфичностью в отношении PI(4)P, который ответственен за локализацию в комплексе Гольджи (Hanada и др., 2003; Levine и Munro, 2002), и FFAT-мотив (два остатка фенилаланина в кислотном тракте), который осуществляет направленный перенос белка в ЭР путем взаимодействия с присутствующими в ЭР трансмембранными белками VAP-A и VAP-B (Kawano и др., 2006; Loewen и др., 2003).

Основная роль CERT в переносе (траффике) липидов была продемонстрирована с использованием линии клеток яичника китайского хомячка LY-A, в которой экспрессия мутантного нефункционального белка CERT нарушала транспорт церамида, что приводило к пониженному уровню в клетках сфингомиелина (Hanada и др., 2003). Непузырьковый перенос липидов, вероятно, имеет место в так называемых сайтах мембранного контакта (MCS), в которых ЭР находится в близком расположении с другими органеллами (Levine и Loewen, 2006). Таким образом, CERT может перемещаться взад и вперед на очень короткое расстояние между ЭР и мембранами комплекса Гольджи или, вероятно, контактирует одновременно с двумя компартментами. В случае сверхэкспрессии START-домена CERT достаточно для переноса церамида к аппарату Гольджи (Kawano и др., 2006). Однако в физиологических условиях мотивы, обеспечивающие направленный перенос и в аппарат Гольджи, и в ЭР, являются важными для функции CERT. Установлено, что в клетках линии LY-A CERT содержит мутацию в PH-домене (G67E), приводящую к получению белка, дефектного в отношении PI(4)P-связывания (Hanada и др., 2003). Необходимость в связывании PI(4)P для появления функциональной активности CERT дополнительно подтверждена в современном исследовании, в котором установлено, что активность PI4KIII-бета необходима для эффективного переноса церамида в комплекс Гольджи (Toth и др., 2006), ферментативная активность которого стимулируется протеинкиназой D (PKD).

PKD принадлежит к подсемейству серин/треонинспецифических протеинкиназ (содержащему PKD1/PKC $\mu$ , PKD2 и PKD3/PKC $\nu$ ), и в настоящее время установлено, что она имеет решающее значение для регуляции белкового транспорта из мембран комплекса Гольджи в плазматическую мембрану (см. обзор у Ryck и др., 2003; Wang, 2006). Рекрутмент и активация PKD в TGN опосредуется липидом диацилглицерином (DAG (Baron и Malhotra, 2002)), пул которого создается с помощью сфингомиелинсинтазы из церамида и фосфатидилхолина.

При создании настоящего изобретения установлено, что PKD фосфорилирует CERT на остатке 132 серина, примыкающем к PH-домену, при этом происходит регуляция по типу отрицательной связи PI(4)P-связывания, направленного переноса в комплекс Гольджи и транспорта церамида. Кроме того, в результате переноса церамида, для которого требуется производство DAG, на мембраны комплекса

Гольджи, CERT стимулирует активность PKD, что создает регуляторную петлю по типу обратной связи, которая гарантирует поддержание конститутивного секреторного транспорта.

Важно отметить, что имеются дополнительные данные, демонстрирующие, что в различных эукариотических клеточных линиях (COS7 и HEK293) интродукция гена, кодирующего CERT, существенно повышала секрецию гетерологичного белка в культуральную среду. Это действие оказалось еще более выраженным при использовании мутанта CERT, который не может фосфорилироваться PKD. Делеция акцепторного сайта фосфорилирования в CERT препятствует отрицательному контролю PKD над CERT, но при этом сохраняется ненарушенной положительная регуляция по типу обратной связи CERT на PKD посредством поддержания конверсии церамида в сфингомиелин и DAG. Таким образом, можно предположить также, что механизм усиления секреции, предлагаемый в настоящем изобретении, можно осуществлять не только с использованием CERT дикого типа, но также всех мутантов CERT, которые препятствуют отрицательному воздействию PKD на CERT, несущие точечные мутации акцепторного серина, делеции, затрагивающие этот остаток, а также мутации или делеции сайта "причаливания" PKD в CERT или даже только в START-домене.

CERT принадлежит к семейству белков, родственных белкам-переносчикам липидов StAR (Soccio и Breslow, 2003), которые характеризуются наличием START-доменов, предназначенных для связывания липидов. Поскольку продемонстрировано, что присутствие START-домена в CERT является необходимым и достаточным для действия CERT (Hanada и др., 2003), можно предположить, что усиливающее секрецию действие, характерное для CERT, может равным образом достигаться при сверхэкспрессии другого представителя этого семейства белков. Это является наиболее вероятным для близкородственных представителей PCTP-подсемейства, включающего PCTP (SEQ ID NO: 26, 27), сам CERT/GPBP, StarD7 и StarD10. Эти белки обладают различными специфичностями в отношении связывания липидов и могут одинаковым образом оказывать воздействия на функцию органелл, участвующих в секреции гетерологичных белков.

Кроме того, экспрессия родственных белков STARD4 (SEQ ID NO: 20, 21) и STARD5 (SEQ ID NO: 22, 23), которые индуцируются при стрессе ЭР, может функционально удовлетворять требованию к увеличенному транспорту липидов в процессе производства.

Присутствие несущих START-домен белков в эукариотических организмах от мухи, червя до мыши и человека свидетельствует о том, что основные механизмы переноса липидов являются консервативными в царстве эукариот. Кроме того, можно предположить, что принцип, предложенный в настоящем изобретении - состоящий в повышении секреции путем усиления экспрессии CERT - может оказаться пригодным для всех эукариотических клеток, включая клетки дрожжей.

В целом, в настоящем изобретении предложен способ повышения секреторного транспорта белков в эукариотических клетках путем гетерологичной экспрессии CERT, мутантов CERT или других представителей семейства несущих домен START белков. Этот способ является наиболее пригодным для создания оптимизированных систем клеток-хозяев, обладающих повышенной продуктивностью (производительной мощностью), в отношении экспрессии и производства рекомбинантных белковых продуктов.

Способ, предлагаемый в настоящем изобретении, имеет преимущество с нескольких точек зрения.

Во-первых, при создании изобретения продемонстрировано, что гетерологичная экспрессия CERT имеет стратегическое значение для увеличения производства рекомбинантного белка благодаря повышенной способности к секреции клетки-хозяина. Повышение удельной продуктивности клеток-продуцентов приводит к более высоким выходам продукта в процессах промышленного получения белков. С учетом современной тенденции к использованию процессов с применением высоких титров и более сложных технологий повышения экспрессии становится очевидным, что посттрансляционные узкие места являются ограничивающими скорость стадиями при получении белков и поэтому должны привлекать повышенное внимание к подходам воздействия на секрецию.

Во-вторых, START-домен CERT является высококонсервативным среди эукариотических организмов от *C. elegans* до человека. Это с большей долей вероятности позволяет предположить, что способ, предлагаемый в настоящем изобретении, может найти применение не только в случае систем клеток-хозяев млекопитающих, но равным образом пригоден для получения белков во всех эукариотических клетках, включая клетки насекомых и клетки дрожжей.

Согласно третьей важной особенности CERT в качестве цитозольного фактора является частью ответа несвернутых белков и поэтому не принимает участие в программе ответа клеток на стресс, который индуцируется прекращением трансляции белка и - если не восстанавливается - приводит к остановке клеточного цикла или даже апоптозу. В противоположность этому, в результате его независимой роли в переносе липидов направленный перенос CERT может обуславливать повышение белковой секреции без сопутствующей индукции апоптоза. Таким образом, сверхэкспрессия CERT в клетках-хозяевах, которые являются продуцентами, может иметь преимущества по сравнению с подходами, основанными на генетическом конструировании с использованием ХВР-1.

В-четвертых, при создании настоящего изобретения установлено, что мутация Ser132 CERT нарушает фосфорилирование CERT с помощью PKD, что освобождает CERT от регуляторного воздействия

по типу отрицательной связи. При этом положительная стимуляция PKD с помощью CERT посредством DAG остается интактной (фиг. 3А). Эти данные позволяют предположить, что CERT находится "выше в пути передачи сигнала" относительно PKD, что, как было установлено, имеет решающее значение для регуляции более поздних стадий секреторного транспорта, а именно транспорта из транс-Гольджи-сети в плазматическую мембрану (Liljedahl и др., 2001). Касательно белкового транспорта это означает, что CERT действует "по ходу в пути передачи сигнала" относительно ЭР, что делает CERT предпочтительной мишенью для манипуляций по сравнению с XBP-1 или специфических расположенных в ЭР белков (фиг. 3Б).

Поскольку CERT может оказывать воздействие даже на самые последние стадии секреторного пути, можно предположить, что гетерологичная экспрессия CERT потенциально должна повышать секрецию, не создавая при этом узких мест для последующего процесса. При создании изобретения установлено, что CERT в настоящее время является основной действующей по ходу передачи сигнала мишенью для создания с помощью генной инженерии секреторного пути для повышения производства гетерологичного белка.

В целом, воздействие белка-транспортера липидов CERT на секреторный транспорт из ЭР в аппарат Гольджи и из аппарата Гольджи в плазматическую мембрану, без недостатков, связанных с ингибированием роста или индуцирующим апоптоз стрессом, делает CERT, мутантов CERT и другие белки из семейства несущих START-домен белков наиболее привлекательными и перспективными мишенями для основанных на применении генной инженерии подходов, целью которых является повышение секреторной способности эукариотических клеток.

Применимость.

Целенаправленную манипуляцию CERT, предложенную в настоящем изобретении, можно применять для широкого спектра задач. В частности, можно выделить два главных подхода, которые основаны на:

(I) сверхэкспрессии и/или повышении активности CERT или производного CERT для повышения способности клетки к секреторному транспорту или

(II) снижении активности и/или экспрессии CERT в качестве средства генной терапии для снижения пролиферации и/или инвазии раковых клеток.

Применимость сверхэкспрессии CERT.

В настоящем изобретении предложен способ создания улучшенных эукариотических клеток-хозяев, предназначенных для получения гетерологичных белков, путем интродукции гена, кодирующего CERT, мутанты CERT или другие белки семейства несущих домен START белков. Это может приводить к повышению выхода белка в производственных процессах, основанных на применении эукариотических клеток. Тем самым можно снижать стоимость продуктов указанных процессов и одновременно уменьшать количество партий, которые необходимо обрабатывать для получения материала в количестве, достаточном для исследовательских опытов, диагностических, клинических испытаний или для поставки на рынок в качестве терапевтического белка. Таким образом, способ, предлагаемый в изобретении, может ускорять разработку лекарственного средства, поскольку часто получение достаточных количеств материала для доклинических испытаний представляет собой основной объем работ с точки зрения временных затрат.

Настоящее изобретение можно применять также для улучшения характеристик всех эукариотических клеток, применяемых для создания одного или нескольких специфических белков, которые предназначены для диагностических целей, исследовательских целей (идентификация цели, идентификация пути, оптимизация пути), или для производства терапевтических белков либо для продажи, либо для клинической разработки.

Как продемонстрировано при создании настоящего изобретения, гетерологичная экспрессия CERT не только повышает секрецию белков, но влияет также на уровень трансмембранных белков на клеточной поверхности. Ингибирование или снижение экспрессии CERT приводит к резкому снижению количества рецепторов клеточной поверхности, таких как рецептор трансферрина (фиг. 8). Поскольку секретруемые и трансмембранные белки имеют одинаковые секреторные пути и одинаково транспортируются в липидных пузырьках, эти данные подчеркивают важность CERT в модуляции секреции, а также транспорта связанных с мембраной рецепторов клеточной поверхности.

Таким образом, способ, представленный в настоящем описании, можно применять также для академических и промышленных исследований, целью которых является характеристика функции рецепторов клеточной поверхности. Например, его можно применять для производства и последующей очистки, кристаллизации и/или анализа поверхностных белков. Это имеет решающее значение для разработки новых лекарственных терапий для человека, поскольку рецепторы клеточной поверхности представляют собой основной класс мишеней лекарственных средств. Кроме того, может оказаться целесообразным изучать внутриклеточные комплексы передачи сигналов, ассоциированные с рецепторами клеточной поверхности, или анализировать связь типа клетка-клетка, которая частично опосредуется взаимодействием растворимых факторов роста с соответствующими им рецепторами на той же или другой клетке.

Применимость снижения/ингибирования CERT.

При создании настоящего изобретения установлено, что снижение экспрессии CERT приводит к пониженной секреции растворимых внеклеточных белков, а также к уменьшению уровня рецепторов на клеточной поверхности. Это делает CERT привлекательной мишенью для терапевтической манипуляции.

Одним из отличительных признаков конверсии обычной здоровой клетки в раковую клетку является приобретение независимости от присутствия экзогенных факторов роста (Hanahan и Weinberg, 2000). В отличие от здоровой клетки опухолевые клетки обладают способностью сами продуцировать все факторы роста, необходимые для их выживания и пролиферации. Помимо этого аутокринного механизма раковые клетки часто характеризуются позитивной регуляцией экспрессии рецепторов факторов роста на их поверхности, что приводит к повышенной реактивности в отношении паракринно действующих факторов и факторов выживания, секретируемых из клетки в окружающую ткань. Путем направленного воздействия на CERT в опухолевых клетках, например, с помощью подходов, основанных на применении siРНК, можно нарушать механизмы аутокринной, а также паракринной стимуляции роста и/или выживания двумя путями: (I) с помощью снижения транспорта и секреции факторов роста и (II) с помощью снижения уровня соответствующих рецепторов фактора роста на опухолевых клетках. Таким путем можно снижать как уровень стимулирующего рост сигнала, так и способность раковой клетки воспринимать и реагировать на эти сигналы. Таким образом, ингибирование экспрессии CERT в раковых клетках может представлять собой эффективный инструмент подавления пролиферации и выживания раковых клеток.

Кроме того, CERT может представлять собой эффективную терапевтическую мишень для подавления инвазии и метастазов опухоли. На поздних стадиях большинства типов рака человека первичные опухоли порождают новые клетки, которые удаляются от исходной области, внедряются в прилегающие ткани и достигают новых областей, в которых они могут успешно формировать новые колонии, известные как метастазы.

Предпосылкой для инвазии в ткань является то, что раковые клетки экспрессируют полный набор протеаз, которые помогают им мигрировать через окружающую здоровую ткань, пересекать базальную мембрану, поступать в кровоток и, наконец, внедряться в ткань, которой они достигли. Некоторые из этих протеаз экспрессируются в качестве связанных с мембраной белков, например МТ-ММР (Egeblad и Werb, 2002) и ADAM (Blobel, 2005). Благодаря их имеющей решающее значение роли в ремоделировании матрикса, потери факторов роста и инвазии опухоли, обсуждается применение самих протеаз в качестве мишеней лекарственных средств, предназначенных для лечения рака (Overall и Kleinfeld, 2006). При создании изобретения предложена гипотеза о том, что ингибирование экспрессии и/или активности CERT в опухолевых клетках должно снижать уровень связанных с мембраной протеаз на поверхности клетки-мишени. Это может снижать или даже нарушать способность опухолевой клетки к инвазии, а также ее способность к утере факторов роста, что приводит к пониженной инвазивности и снижению метастатического потенциала опухоли. Таким образом, направленное воздействие на CERT может представлять собой новый путь предупреждения поздней стадии онкогенеза, прежде всего конверсию доброкачественного/плотного узла в агрессивную метастазирующую опухоль.

Таким образом, для терапевтических применений задача состоит в снижении и/или ингибировании активности и/или экспрессии CERT. Для этой цели можно использовать нуклеотидную композицию, которую применяют в терапии человека для лечения заболевания путем ингибирования функции CERT, при этом лекарственное средство состоит из агента, применяемого для РНКi, и siРНК или антисмысловой РНК, специфически ингибирующей CERT посредством связывания через мотив последовательности РНК CERT. Снижение/ингибирование активности/экспрессии CERT можно обеспечивать также с помощью лекарственной субстанции, которая содержит нуклеотиды, связывающие и вызывающие молчание промотора гена CERT.

Кроме того, лекарственная субстанция или продукт может содержать новое химическое вещество или пептид, или белок, ингибирующее/ингибирующий экспрессию или активность CERT. В том случае, когда в качестве фармацевтически активного вещества применяют белок, то он может представлять собой (I) белок, связывающийся с промотором CERT, который ингибирует тем самым экспрессию CERT, (II) белок, связывающийся с CERT или PKD, который тем самым предупреждает связывание PKD и CERT и препятствует фосфорилированию CERT с помощью PKD, (III) белок, подобный CERT, который, однако, не полностью выполняет функции CERT, что означает "доминантно-негативный" вариант CERT, или (IV) белок, служащий в качестве каркаса и для CERT, и для PKD, обуславливающий необратимое связывание CERT с PKD (т.е. образует стабильный комплекс PKD/CERT), который не является функциональным из-за ингибирования фосфорилирования CERT с помощью PKD и препятствует диссоциации CERT из указанного комплекса.

Краткое изложение сущности изобретения.

Настоящее изобретение не является очевидным из известного уровня техники. К моменту создания изобретения были известны экспериментальные данные только о том, что белок CERT играет роль в транспорте церамида, являющегося предшественником сфингомиелина, из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи. Только представленные в настоящем описании данные позволяют получить

новую рабочую модель, объясняющую роль CERT в транспорте белков из аппарата Гольджи в плазматическую мембрану в эукариотических клетках. В известном уровне техники отсутствует какой-либо намек на возможность повышать скорость секреторного транспорта белков в линиях эукариотических клеток путем интродукции гена, который кодирует CERT, или другого представителя семейства белков, несущих START-домен.

С помощью предлагаемой в настоящем изобретении рабочей модели неожиданно был идентифицирован CERT в качестве нового *in vivo* субстрата PKD и имеющего решающее значение регулятора функции аппарата Гольджи.

PKD известна в данной области. Семейство серин/треонинспецифических протеинкиназ, к которому она относится, состоит из трех структурно родственных членов: PKD1/ПКС $\mu$ , PKD2 и PKD3/ПКС $\nu$ ). PKD содержит два аминоконцевых подобных "цинковым пальцам" богатых цистеином мотивов, которые связывают DAG, плекстрин-гомологичный домен (PH), который оказывает регуляторное воздействие по типу отрицательной связи на ферментативную функцию PKD, и карбоксиконцевой киназный домен.

Три изоформы PKD локализованы в цитозоле, ядре, комплексе Гольджи и плазматической мембране, где они регулируют разнообразные клеточные процессы от пролиферации, дифференцировки, апоптоза, реорганизации скелета и образования метастазов до пузырькового переноса (см. обзор у Rykx и др., 2003; Wang, 2006). К настоящему времени известно лишь несколько физиологических субстратов PKD, которые представляют собой нейронный белок Kidins220, Ras-эффектор RIN1, гистодацетилазу 5, Е-кадхерин и PI4КIII $\beta$  (Iglesias и др., 2000; Jaggi и др., 2005; Vega и др., 2004; Wang и др., 2002). В составе комплекса с TGN PKD имеет решающее значение в расщеплении транспортных носителей на пути к поверхности клетки (Liljedahl и др., 2001; Yeaman и др., 2004). PKD образует комплекс с TGN с помощью богатых цистеином областей (Baron и Malhotra, 2002; Hausser и др., 2002; Maeda и др., 2001), где она активируется с помощью PKC $\zeta$ -опосредуемого фосфорилирования (см. Anel и Malhotra, 2005).

В настоящее время установлено, что белок PI4КIII $\alpha$ , который играет ключевую роль в структуре и функции аппарата Гольджи, является субстратом PKD в этой органелле (Hausser и др., 2005). Опосредуемое PKD фосфорилирование PI4КIII $\alpha$  на остатке серина 294 стимулирует его липидкиназную активность, что приводит к повышенному производству фосфатидилинозитол-4-фосфата (PI(4)P) и транспорту протеина G вируса везикулярного стоматита в плазматическую мембрану (Hausser и др., 2005).

Протеинкиназа D (PKD) идентифицирована в качестве имеющего решающее значение регулятора секреторного транспорта в транс-Гольджи-сети (TGN). Рекрутмент и активация PKD в TGN опосредуется липидом диацилглицерином (DAG), пул которого создается с помощью сфингомиелинсинтазы из церамида и фосфатидилхолина. Непузырьковый перенос церамида из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи опосредуется белком-переносчиком липидов CERT. Это описано, например, у Hanada и др., Nature, т. 426, 1983, с. 803-809 и Hanada, Molecular and Cellular Biochemistry 286, 2003, с. 23-31, а также в соответствующих заявках на патент WO 2005/004898 и EP 1652530. Однако ни в одном из указанных документов Hanada не продемонстрировал или указал на роль модуляции экспрессии или активности CERT (также как и других содержащих START-домен белков) в методе получения белков для диагностических, исследовательских или терапевтических целей. Кроме того, в этих документах/заявках на патент не описан какой-либо путь применения блокирующего агента, который снижает или полностью блокирует экспрессию или активность CERT, в фармацевтической композиции. Hanada скорее сделал заключение о возможном применении самого CERT в качестве лекарственного средства, предназначенного для увеличения транспорта церамида.

Однако при создании настоящего изобретения CERT идентифицирован в качестве нового субстрата *in vivo* для PKD. Фосфорилирование на остатке серина 132 с помощью PKD снижает аффинность CERT к его липиду-мишени фосфатидилинозитол 4-фосфату на мембранах комплекса Гольджи и снижает активность транспорта церамида, что позволяет идентифицировать PKD в качестве регулятора липидного гомеостаза. В настоящем изобретении установлено также, что CERT в свою очередь играет решающую роль в активации PKD и в зависящем от PKD транспорте белка-переносчика (карго-белок) в плазматическую мембрану. Таким образом, взаимосвязь PKD и CERT является ключевым моментом в поддержании целостности мембран в комплексе Гольджи и секреторном транспорте.

#### Описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - внутриклеточное накопление продукта.

Повышение уровня внутриклеточного продукта в процессе периодической ферментации с подпиткой проиллюстрировано для трех вариантов процесса.

Периодическую ферментацию с подпиткой осуществляли с использованием трех различных клонов СНО-клеток-продуцентов, экспрессирующих человеческие антитела типа IgG: процесс А (окружности), процесс Б (ромбы) и процесс М (треугольники) соответственно. Каждый раз через день получали образцы клеток, фиксировали и подвергали анализу методом прямой иммунофлуоресценции для выявления легких цепей антител. Количество продукта оценивали с помощью FACS и выражали в % относительно количества в день 1.

На фиг. 2 - семейство белков, несущих START-домен.

Филогенетическая схема (А) человеческих несущих START-домен белков, (Б) организации их доменов (4 ТМ, четыре трансмембранных домена; Pte, митохондриальная препоследовательность; Thio, ацил-СоА-тиоэстераза) и (В) их гомологов из мух и червей (по данным (Soccio и Breslow, 2003)).

На фиг. 3 - CERT является имеющим решающее значение регулятором функции комплекса Гольджи и действует по ходу передачи сигнала относительно XBP-1 в секреторном пути.

(А) CERT и PKD связаны регуляторной петлей по типу обратной связи. На схеме обобщены современные рабочие гипотезы, согласно которым PKD активируется DAG и фосфорилирует CERT. Фосфорилированный CERT отщепляется от PI(4)P и высвобождает церамид в месте его действия (назначения). Церамид в комплексе Гольджи превращается в сфингомиелин и DAG, что, в свою очередь, необходимо для активации PKD. Эта цепь может прерываться мутацией сайта фосфорилирования CERT (S132A).

(Б) Схематическое изображение пути секреторируемого белка, начиная с его транскрипции и трансляции, через ЭР и компартменты комплекса Гольджи в плазматическую мембрану (PM), где белок, наконец, высвобождается из клетки в среду. Стрелками обозначена роль современных генно-инженерных подходов, целью которых является повышение производства белка. Наибольшие усилия сфокусированы на технологиях повышения уровня транскрипции, в меньшей степени - на воздействии на трансляцию и к настоящему времени известно только три примера, в которых описано целенаправленное воздействие на белки, участвующие в посттрансляционном процессинге в ЭР (BiP, PDI и XBP-1). CERT действует по ходу передачи сигнала ЭР в секреторном пути и поэтому согласно изобретению представляет собой первую мишень для генно-инженерных манипуляций на последних стадиях процесса секреции.

На фиг. 4 - CERT выявляется с помощью антитела к субстрату PKD.

(А) Клетки линии HEK293T трансфектировали экспрессионными плазмидами, кодирующими меченные с помощью Flag CERTL и CERT. Клетки лизировали через 24 ч после трансфекции и изоформы CERT подвергали иммунопреципитации с использованием антитела к Flag. После иммунопреципитации белки подвергали ДСН-ПААГ, а затем иммуноблоттингу с использованием антитела к субстрату PKD (pMOTIF; верхняя панель) и после очистки иммуноблоттов с использованием антитела к Flag (нижняя панель).

(Б) Клетки линии HEK293T трансфектировали экспрессионной плазмидой Flag-CERT наряду с GFP-PKD1 K612W (PKD-KD) или незагруженным вектором. CERT анализировали с помощью вестерн-блоттинга согласно методу, описанному в (А). Экспрессию PKD-KD подтверждали иммуноблоттингом с использованием PKD-специфического антитела (C20; нижняя панель).

(В) Клетки линии COS7 совместно трансфектировали экспрессионными плазмидами Flag-CERT и PKD1-GFP, фиксировали и окрашивали специфическим антителом к Flag (красный цвет). Изображения представляют собой наложения нескольких конфокальных срезов. Масштабная полоска, 20 мкм.

На фиг. 5 - PKD фосфорилирует CERT на остатке серина 132.

(А) Сравнительный анализ первичной структуры пептидных последовательностей, применяемых для получения антитела к субстрату PKD и двух потенциальных распознаваемых PKD мотивов в CERT.

(Б) Клетки линии HEK293T трансфектировали экспрессионными плазмидами, кодирующими меченные с помощью Flag CERT дикого типа (WT), CERT-S132A и CERT-S272A. Клетки лизировали и белки CERT подвергали иммунопреципитации и анализировали с помощью вестерн-блоттинга, как описано на фиг. 4.

(В) Рекомбинантный GST-Flag-CERT дикого типа (WT) и несущие S132A слитые белки инкубировали в буфере для киназ, содержащем [32P]-АТФ, в отсутствие (-) и присутствии (+) очищенной PKD1 в течение 30 мин. Белки разделяли с помощью ДСН-ПААГ и переносили на мембрану. Включение радиоактивного фосфата анализировали с помощью устройства типа PhosphorImager (верхняя часть), затем подвергали иммуноблоттингу с использованием специфического антитела к Flag для подтверждения равной загрузки белков CERT.

(Г) Рекомбинантные белки CERT анализировали *in vitro* в буфере для киназ, используя очищенную PKD1, согласно методу, описанному в (В), в присутствии немеченой АТФ. Иммуноблоттинг осуществляли с использованием антитела pMOTIF и после очистки с использованием специфического антитела к Flag для подтверждения равной загрузки белков CERT. PKD1 и белки CERT обозначены стрелками; полосы, обозначенные звездочками, соответствуют неспецифическому связыванию.

На фиг. 6 - фосфорилирование CERT на серине 132 модулирует PI(4)P-связывание и активность переноса церамида.

Клетки линии HEK293T трансфектировали экспрессионными плазмидами, кодирующими меченные с помощью GFP CERT дикого типа (WT, SEQ ID NO: 10, 12) и CERT-S132A (SEQ ID NO: 14). Клетки собирали путем гипотонического лизиса через 24 ч после трансфекции и цитозольную фракцию получали после центрифугирования при 100000×g.

Образцы, характеризующиеся одинаковыми уровнями GFP-флуоресценции, использовали для (А) перекрывающихся анализов белков-липидов. Цитозольную фракцию из клеток линии HEK293T, коротковременно экспрессирующих варианты CERT, инкубировали с мембранами, на которые были точно нанесены градиенты концентраций различных фосфоинозитидов, и связанные белки CERT выявляли с

помощью метки GFP.

(Б) Донорские липосомы, содержащие TNPPE и пирен-церамид, смешивали с 10-кратным избытком немеченых акцепторных липосом. Через 60 с добавляли цитозольную фракцию из клеток, кратковременно экспрессирующих меченный с помощью GFP CERT дикого типа (WT), S132A или только GFP (con), и определяли флуоресценцию пирена при длине волны 395 нм (длина волны возбуждения: 340 нм). Спектры стандартизовали относительно максимальной флуоресценции в Triton X-100 и относительно максимальной флуоресценции GFP.

На фиг. 7 - CERT регулирует активацию PKD и секреторный транспорт.

(А) Данные получали с помощью вестерн-блоттинга лизатов целых клеток линии HEK293T, трансфектированных либо меченным с помощью Flag CERT дикого типа (SEQ ID NO: 10, 12), либо мутантом CERT S132A (SEQ ID NO: 14). Блот зондировали фосфоспецифическим антителом к pS916 PKD (верхняя панель), специфическим антителом к PKD (средняя панель) и специфическим антителом к Flag (нижняя панель) соответственно для подтверждения экспрессии меченных с помощью Flag конструкций CERT.

(Б). Данные оценки HRP-активности в супернатантах клеток линии HEK293T, совместно трансфектированных Flag-ss-HRP и незагруженным вектором (черные столбики), меченной с помощью GFP PKD1 с "выключенным" (dead) киназным доменом (KD, белые столбики), Flag-CERT дикого типа (WT, затененные столбики) или Flag-CERT-S132A (темно-серые столбики). Строили график зависимости количества относительных световых единиц (RLU) от указанного времени после замены среды. Значения соответствуют средним значениям, полученным для взятых в трех повторностях образцов, "усами" обозначены СКО.

(В). Данные конфокальной иммунофлуоресценции GFP-CERT (зеленый цвет) и маркера цис/промежуточного компартмента аппарата Гольджи GS28 (красный цвет) в клетках линии COS7. Изображения представляют собой наложения нескольких конфокальных срезов. Масштабная полоска, 20 мкм.

(Г). Наложения конфокальных изображений, демонстрирующие совместную локализацию GFP-CERT (зеленый цвет) и HRP-Flag (красный цвет) в клетках линии COS7. Масштабная полоска, 20 и 5 мкм (увеличенное изображение).

На фиг. 8 - регуляция по типу отрицательной связи CERT с помощью РНК-интерференции ингибирует секреторный транспорт.

(А) Данные количественной оценки HRP-активности в супернатантах клеток линии COS7, обработанных либо нуклеотидом-"имитатором" (белый цвет), либо lacZ- (светло-серый цвет), т.е. lacZ-специфической siPHK, SEQ ID NO: 9, либо CERT-специфическими олигонуклеотидами siPHK (темно-серый цвет = siCERT № 1 SEQ ID NO: 7 и черный цвет = siCERT № 2 SEQ ID NO: 8). Результаты представлены в виде относительных световых единиц (RLU) по трем экспериментам, "усами" обозначены СКО.

(Б) Данные, полученные с помощью вестерн-блоттинга клеточных лизатов (А), зондированных антителом к рецептору трансферрина. Одинаковую загрузку подтверждали с помощью специфического антитела к тубулину.

На фиг. 9 - понятия консенсуса для START-домена.

Консенсус рассматривается относительно количества белков, которые совпадают по указанной консенсусной последовательности, а не относительно количества совпадающих аминокислот. Это означает, что в случае 80%-ной консенсусной последовательности 80% белков, несущих START-домен, которые сравнивали, имели данную аминокислоту в конкретном положении, например гидрофобную аминокислоту, сокращенно обозначенную как "h".

Указанную консенсусную последовательность создавали, используя в качестве базовой WEB-программу "SMART" (см. также Ponting и Aravind, TIBS 24, 1999, с. 130-132).

(А). 80%-ная консенсусная последовательность (SEQ ID NO: 28) для несущих START-домен белков.

(Б). Консенсусную последовательность START-домена выводили на основе сравнительного анализа белков, несущих START-домен. В сравнительный анализ включали 50, 65 и 80%-ные консенсусные последовательности.

Ниже представлены следующие объединения в группы аминокислот с помощью сокращений и в зависимости от соответствующих классов.

Класс имеющих решающее значение остатков	
спиртовые, o	S,T
алифатические, l	I,L,V
любые, .	A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
ароматические, a	F,H,W,Y
заряженные, c	D,E,H,K,R
гидрофобные, h	A,C,F,G,H,I,K,L,M,R,T,V,W,Y
отрицательно заряженные, -	D,E
полярные, p	C,D,E,H,K,N,Q,R,S,T
положительно заряженные, +	H,K,R
малые, s	A,C,D,G,N,P,S,T,V
очень маленькие, u	A,G,S
спиралевидные, t	A,C,D,E,G,H,K,N,Q,R,S,T

На фиг. 10 - интродукция CERT повышает производство моноклональных антител.

Экспрессионные конструкции "имитатора", CERT-WT или мутанта CERT-SA стабильно интродуцировали в линию клеток CHO-продуцентов, секретирующую человеческое моноклональное антитело IgG-типа. Затем оценивали воздействие трансгенов на удельную продуктивность IgG в указанных стабильных клонах (А) в серийных маточных культурах и (Б) в условиях получения с периодической подпиткой, как показано на фиг. 11, где n=3-4 для каждого генотипа. "Усами" обозначены стандартные отклонения.

Показан один репрезентативный результат из результатов, полученных в трех независимых экспериментах.

На фиг. 11 - гетерологичный CERT повышает секрецию HSA.

(А). Повышенный титр и удельная продуктивность в серийных культурах. CHO-клетки, секретирующие человеческий сывороточный альбумин (HSA), стабильно трансфектировали либо незагруженной плазмидой ("Имитатор"), либо CERT дикого типа (CERT-WT), либо мутантом CERT S132A (CERT-SA). В образовавшихся стабильных клеточных пулах (n=3 для каждого генотипа) определяли титр HSA с использованием 3-5 серийных пассажей. Удельную продуктивность HSA (черные столбики) и титр (серые столбики) рассчитывали для каждого генотипа и наносили на график в виде средних значений трех пулов. "Усами" обозначены стандартные отклонения.

(Б) и (В). Клетки, указанные в (А), выращивали во встряхиваемых колбах в течение 7 дней и подпитывали каждые 24 ч, начиная со дня 3. Отбирали образцы из жидкой культуры клеток в день 3, 5 и 7 и оценивали титр рекомбинантного продукта в виде HSA. Удельную продуктивность (Б) и титр (В) рассчитывали и строили график в зависимости от времени ферментации. Сравнивали следующие клетки: "Имитатор" (-□-), CERT-WT (-▲-) и CERT-SA (-●-); "усами" обозначены стандартные отклонения, полученные при использовании трех стабильных пулов для каждого генотипа.

#### Описание перечня последовательностей

- SEQ ID NO: 1: ПЦР-праймер для человеческой ДНК CERT-S132A,
- SEQ ID NO: 2: ПЦР-праймер для человеческой ДНК CERT-S132Arev,
- SEQ ID NO: 3: ПЦР-праймер для человеческой ДНК CERT-S272A,
- SEQ ID NO: 4: ПЦР-праймер для человеческой ДНК CERT-S272Arev,
- SEQ ID NO: 5: ПЦР-праймер для человеческой ДНК CERT-138truncation,
- SEQ ID NO: 6: ПЦР-праймер для человеческой ДНК CERT-138truncationrev,
- SEQ ID NO: 7: siPHK/ДНК siCERT-1,
- SEQ ID NO: 8: siPHK/ДНК siCERT-2,
- SEQ ID NO: 9: siPHK/ДНК siLacZ,
- SEQ ID NO: 10: человеческая кДНК CERT,
- SEQ ID NO: 11: человеческий белок CERT,
- SEQ ID NO: 12: человеческая кДНК CERT L,
- SEQ ID NO: 13: человеческий белок CERT L,
- SEQ ID NO: 14: человеческая кДНК CERT S132A,
- SEQ ID NO: 15: человеческий белок CERT S132A,
- SEQ ID NO: 16: человеческая кДНК START-домена CERT,
- SEQ ID NO: 17: человеческий белок START-домена CERT,
- SEQ ID NO: 18: человеческая кДНК START-домена CERT L,
- SEQ ID NO: 19: человеческий белок START-домена CERT L,
- SEQ ID NO: 20: человеческая кДНК StarD4,
- SEQ ID NO: 21: человеческий белок StarD4,
- SEQ ID NO: 22: человеческая кДНК StarD5,
- SEQ ID NO: 23: человеческий белок StarD5,
- SEQ ID NO: 24: человеческая кДНК StarD6,

SEQ ID NO: 25: человеческий белок StarD6,  
 SEQ ID NO: 26: человеческая кДНК PCTP,  
 SEQ ID NO: 27: человеческий белок PCTP,  
 SEQ ID NO: 28: консенсусная последовательность START-домена (фиг. 9).

#### Подробное описание изобретения

Посттрансляционная модификация белков путем фосфорилирования представляет собой обычный механизм, который индуцирует конформационные изменения, которые модулируют ферментативную активность, опосредует взаимодействия типа белок-белок или регулирует субклеточную локализацию. PKD представляет собой имеющий решающее значение регулятор в комплексе Гольджи, при этом PI4KIII $\beta$  представляет собой единственный идентифицированный к настоящему времени ее субстрат. Для решения вопроса о том, может ли локализованный в комплексе Гольджи белок CERT служить субстратом для PKD, при создании изобретения применяли фосфоспецифическое антитело к субстрату, обозначенное как pMOTIF, которое образуется к консенсусным мотивам, фосфорилируемым PKD (Dorpler и др., 2005). Клетки линии HEK293T трансфектировали экспрессионными векторами, кодирующими меченные с помощью Flag CERT и CERT<sub>L</sub>. Изоформы CERT подвергали иммунопреципитации с использованием специфических антител к Flag и анализировали методом вестерн-блоттинга с использованием антитела pMOTIF (фиг. 4А). Был обнаружен сигнал pMOTIF, соответствующий молекулярной массе CERT, и более слабый, соответствующий CERT<sub>L</sub> (фиг. 4А). Более слабое выявление фосфорилированной изоформы CERT<sub>L</sub> может быть связано с известной способностью этой изоформы образовывать агрегаты, которые могут влиять на доступность сайта фосфорилирования (фосфосайта) для киназ (Raya и др., 2000). Для исследования, зависит ли распознавание CERT антителом pMOTIF от PKD, при создании изобретения экспрессировали CERT в сочетании с вариантом PKD1 с "выключенным" киназным доменом (K621W) в клетках линии HEK293T. Было установлено, что этот мутант локализован в комплексе Гольджи и подавляет фосфорилирование PI4KIII $\beta$  по доминантно-негативному типу (Hausser и др., 2005). Совместная экспрессия неактивной PKD приводила к тому, что CERT больше не выявлялся с помощью pMOTIF, это позволяет предположить, что сигнал pMOTIF действительно является результатом опосредуемого PKD фосфорилирования CERT (фиг. 4Б). Белки-переносчики липидов, вероятно, проявляют активность в MCS, которые образуются между ЭР и TGN (Levine и Loewen, 2006), где локализована PKD. Иммунофлуоресцентное окрашивание меченного с помощью Flag CERT в COS7-клетках, в которых одновременно происходила экспрессия меченой с помощью GFP PKD1, продемонстрировало, что эти два белка совместно локализованы в комплексе Гольджи (фиг. 4В). Эксперименты по интерференции РНК позволили предположить, что одновременное "выключение" PKD1 и PKD2 было необходимо для снижения фосфорилирования CERT, что свидетельствует о том, что эти две изоформы в значительной степени ответственны за фосфорилирование CERT, в то время как PKD3, вероятно, играет незначительную роль (данные не представлены). Это согласуется с ранее опубликованными данными о перекрывающейся субстратной специфичности PKD1 и PKD2. Например, установлено, что и PKD1, и PKD2 фосфорилируют PI4KIII $\beta$ , в то время как у PKD3 отсутствует эта способность (Hausser и др., 2005).

При создании изобретения для идентификации распознаваемых pMOTIF сайтов в CERT осуществляли поиск потенциальных консенсусных мотивов для PKD, характеризующихся присутствием остатка лейцина, изолейцина или валина в положении-5 и аргинина в положении-3 относительно остатка серина или треонина. Два остатка серина в положениях 132 и 272, соответствующих консенсусному мотиву для PKD и являющиеся консервативными для разных видов (фиг. 5А), заменяли на остатки аланина с помощью сайт-направленного мутагенеза. Эти мутанты экспрессировали в HEK293T-клетках и оценивали в отношении их распознавания антителом pMOTIF. Важно отметить, что мутация, приводящая к замене серина 132 на аланин, аннулировала выявление CERT с помощью антитела pMOTIF и приводила к повышению электрофоретической подвижности, свидетельствующей о потере фосфорилирования, в то время как мутация S272A не влияла на сигнал pMOTIF (фиг. 5Б). Эти результаты позволяют предположить, что серин в положении 132 является сайтом фосфорилирования PKD, специфически распознаваемым антителом к субстрату PKD. Для подтверждения того факта, что PKD обладает способностью непосредственно фосфорилировать этот остаток серина в CERT, при создании изобретения осуществляли анализы киназной активности *in vitro* с использованием очищенной PKD1 и рекомбинантных слитых белков CERT-GST, которые продуцировались в *E. coli*, содержащих первые 138 аминокислот белка. Когда укороченный слитый белок CERT дикого типа инкубировали с PKD1 в присутствии [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-АТФ, было обнаружено включение радиоактивности (фиг. 5В). Включение существенно нарушалось в случае слитого белка CERT-S132A. *In vitro* фосфорилирование с помощью PKD белка дикого типа, но не мутантного белка CERT-S132A, является дополнительным подтверждением создания сайта, распознаваемого антителом pMOTIF (фиг. 5Г). В сочетании эти результаты доказывают, что CERT является подлинным субстратом PKD *in vitro* и *in vivo*, и свидетельствуют о том, что серин 132 является специфическим сайтом фосфорилирования PKD в CERT.

Серин 132 находится в очень тесной близости к РН-домену CERT (аминокислоты 23-117), что позволяет предположить, что фосфорилирование этого сайта влияет на PI(4)P-связывание в результате уве-

личения местного отрицательного заряда. По этой причине при создании изобретения оценивали PI(4)P-связывание CERT дикого типа и мутантного CERT-S132A, осуществляя перекрывающиеся анализы белков-липидов. Для этой цели цитозоль из клеток линии HEK293T, кратковременно экспрессирующих варианты CERT, инкубировали с мембранами, на которые были точно нанесены градиенты концентраций различных фосфоинозитидов, и связанные белки CERT выявляли с помощью метки GFP. Как описано ранее, полноразмерные белки дикого типа характеризуются слабой способностью к связыванию с некоторыми видами фосфолипидов, но обладают способностью к сильному связыванию с PI(4)P (Hanada и др., 2003; Levine и Munro, 2002). Связывание CERT-S132A с PI(4)P было обнаружено при концентрациях, в 2-4 раза более низких по сравнению с белком дикого типа, что позволяет предположить повышенную аффинность мутанта CERT-S132A к этому фосфолипиду (фиг. 6А). В сочетании эти данные свидетельствуют о том, что CERT, будучи связанным с комплексом Гольджи, фосфорилируется PKD. В результате происходит снижение аффинности CERT к PI(4)P, и это регулирует взаимодействие CERT с мембранами комплекса Гольджи.

Установлено, что белок CERT функционирует в качестве белка-переносчика липидов (Hanada и др., 2003). Поэтому при создании изобретения изучали, влияет ли фосфорилирование CERT на остатке серина 132 на его способность связываться церамидом и переносить его между мембранами. Для этой цели меченные с помощью GFP версии CERT дикого типа и CERT-S132A кратковременно экспрессировали в HEK239T-клетках, и в цитозольной фракции анализировали специфическую для церамида активность в отношении липидного транспорта с помощью FRET (флуоресцентный резонансный перенос энергии)-анализа (фиг. 6Б). В этом анализе применяли небольшие однослойные пузырьки (SUV), содержащие меченный с помощью пирена цирамид в качестве донора флуоресценции, и необходимое для гашения количество TNP-PE (тринитрофенил-фосфатидилэтанолламин) с мечеными головными группами (Olayioye и др., 2005; Somerharju, 2002). Когда эти донорские липосомы смешивали с избытком немеченых акцепторных липосом, то увеличение флуоресценции пирена было незначительным, что свидетельствует о минимальном спонтанном переносе церамида на акцепторные мембраны (данные не представлены). После добавления содержащего CERT дикого типа цитозоля отмечено стабильное увеличение флуоресценции, которое не обнаружено при использовании цитозоля клеток, трансфектированных контрольным вектором (фиг. 6Б). По сравнению с белком дикого типа для CERT-S132A характерна более высокая скорость переноса липидов, о чем свидетельствует более быстрое повышение флуоресценции пирена (фиг. 6Б). Эти результаты позволяют предположить, что фосфорилирование CERT на остатке серина 132 оказывает регулирующее действие по типу отрицательной связи на активность переноса церамида путем снижения ассоциации белка с мембранами. В полученных ранее данных уже установлено, что PKD регулирует уровень PI(4)P в комплексе Гольджи путем опосредуемой фосфорилированием активации PI4KIII $\beta$  (Hausser и др., 2005). Важно отметить, что PI4KIII $\beta$  имеет решающее значение для транспорта церамида между ЭР и комплексом Гольджи (Toth и др., 2006). Таким образом, в сочетании с данными, полученными при создании настоящего изобретения, становится очевидной двойная роль PKD в поддержании липидного гомеостаза в мембранах комплекса Гольджи, заключающаяся в контроле реакции ассоциации (on-rate) (через уровни PI(4)P) и реакции диссоциации (off-rate) (через прямое фосфорилирование) CERT.

Перенос церамида от ЭР к TGN имеет решающее значение для синтеза SM (сфингомиелин) в этом компартменте (Hanada и др., 2003). Локализованная в комплексе Гольджи SM-синтаза 1 (SMS1) использует церамид и PC (фосфатидилхолин) для создания SM и DAG (Perry и Ridgway, 2005), присутствие последнего является предпосылкой для рекрутмента и активации PKD (Baron и Malhotra, 2002). Соединения, которые блокируют производство DAG в TGN, ингибируют связывание PKD с мембранами TGN и влияют на секреторный транспорт (Baron и Malhotra, 2002). Таким образом, повышенный перенос церамида от ЭР в TGN в результате сверхэкспрессии CERT должен приводить к получению увеличенного местного пула DAG и, как следствие, может стимулировать активность PKD и секреторный транспорт. Для оценки этой гипотезы при создании изобретения кратковременно экспрессировали CERT дикого типа и CERT-S132A в клетках линии HEK293T и анализировали автофосфорилирование эндогенной PKD. По сравнению с контролем экспрессия и CERT дикого типа, и CERT-S132A повышала активность PKD, что доказано с помощью анализа с использованием фосфоспецифического антитела к PKD (фиг. 7А). Это свидетельствует о том, что активация PKD регулируется белками CERT, по-видимому, благодаря повышенному транспорту церамида и усиленному синтезу SM/DAG. Аналогичная функция описана в последнее время для белка-переносчика липидов Nir2 в поддержании уровней DAG в аппарате Гольджи путем регуляции пути CDP-холина (Litvak и др., 2005). Опосредуемое РНК-и-"выключение" (нокдаун) Nir2 снижало уровни DAG и PKD в комплексе Гольджи и блокировало секреторный транспорт. Важно отметить, что это явление можно прекращать, добавляя экзогенный C<sub>6</sub>-церамид (Litvak и др., 2005), что доказывает решающую роль церамида в синтезе DAG и рекрутменте PKD в комплексе Гольджи.

Для решения вопроса о том, действительно ли опосредуемая CERT активация PKD приводит к повышенному секреторному транспорту, при создании изобретения использовали плазмиду, кодирующую пероксидазу из хрена, слитую с сигнальной последовательностью (ss). Слитый белок ss-HRP можно применять для конститутивной экспрессии белков (Bard и др., 2006). В контрольных клетках секрецию ss-

HRP можно выявлять через 1 ч и в более поздние моменты времени (фиг. 7Б). Совместная экспрессия PKD1 с выключенным киназным доменом, которая ингибирует секреторный транспорт карго-белка (Hausser и др., 2005; Liljedahl и др., 2001), практически полностью прекращала секрецию ss-HRP в супернатант. Это подтверждает, что в предложенном при создании изобретения анализе секреция HRP зависит от PKD. Совместная экспрессия CERT дикого типа и CERT-S132A значительно повышала уровень секреторируемой HRP (фиг. 7Б). Важно отметить, что при создании изобретения удалось выявить лишь небольшое повышение секреции при использовании мутанта CERT-S132A по сравнению с обнаруженной при использовании белка CERT дикого типа. Это согласуется с сопоставимым уровнем активации PKD с помощью CERT и CERT-S132A (фиг. 7А), но является неожиданным в свете значительного повышения *in vitro* активности мутанта CERT в отношении переноса липидов (фиг. 6Б). Однако повышенные уровни церамида не обязательно могут приводить к эквивалентному повышению уровней DAG, поскольку синтез DAG может быть ограничен доступностью PC и активностью SM-синтазы. Известно, что накопление церамида влияет на стабильность мембран комплекса Гольджи и вызывает расщепление пузырьков (Fukunaga и др., 2000; Weigert и др., 1999). Поэтому при создании изобретения исследовали, может ли сверхэкспрессия мутанта CERT-S132A влиять на его локализацию и/или вызывать морфологические изменения в аппарате Гольджи. Продемонстрирована совместная локализация CERT с маркером цис/промежуточного компартмента аппарата Гольджи GS28 (Hanada и др., 2003).

Иммунофлуоресцентный анализ меченного с помощью GFP CERT, экспрессируемого в COS7-клетках, продемонстрировал, что белок локализован в GS28-положительных областях комплекса Гольджи (фиг. 7В). В противоположность этому, помимо частичной совместной локализации вместе GS28 в комплексе Гольджи, для мутантного белка CERT-S132A характерно рассеянное пятнистое окрашивание. Установлено, что некоторые из этих везикулярных структур содержат карго-белок ss-HRP, что является доказательством того, что эти структуры действительно представляют собой выведенные из комплекса Гольджи осуществляющие перенос носители (фиг. 7Г). Эти результаты согласуются с обнаруженными изменениями в структуре мембран комплекса Гольджи из-за местного повышения уровней церамида (Fukunaga и др., 2000; Weigert и др., 1999).

В целом, при создании изобретения был идентифицирован CERT в качестве субстрата PKD и получено доказательство новой взаимосвязи между биогенезом мембранных липидов и секрецией белка. Было установлено, что CERT играет важную роль в процессах пузырькового транспорта в результате предоставления церамида в качестве субстрата для синтеза активатора PKD DAG на мембранах комплекса Гольджи. При создании изобретения продемонстрировано также, что система строго регулируется с помощью петли по типу обратной связи: активная PKD фосфорилирует CERT на остатке серина 132, снижая тем самым аффинность CERT к его липидной мишени PI(4)P, что гарантирует непрерывный круг переноса липидов из ЭР в компартмент Гольджи.

Данные, полученные при создании настоящего изобретения, четко демонстрируют, что сверхэкспрессия CERT повышает секрецию белка. Для изучения вопроса о том, имеет ли место противоположный процесс, т.е. может ли пониженный уровень экспрессии CERT приводить к снижению уровня секреции, осуществляли эксперименты с использованием siРНК. Активность HRP была выявлена через 3 ч и оказалась сопоставимой по уровню в обеих контрольных линиях клеток. В противоположность этому, резкое снижение активности HRP было обнаружено в клетках, обработанных любым из CERT-специфических олигонуклеотидов siРНК (фиг. 8). Это свидетельствует о том, что снижение уровней CERT приводит также к пониженной секреции HRP из клеток и дополнительно подтверждает важную роль CERT в секреторном транспорте.

Важно отметить, что снижение уровня CERT влияет не только на секрецию белка, но и на уровень трансмембранных белковых рецепторов трансферрина (фиг. 8Б). Когда клетки, представленные на фиг. 8А, объединяли и лизаты зондировали специфическими антителами к рецептору трансферрина в экспериментах методом вестерн-блоттинга, обнаружено значительное снижение количества рецепторов трансферрина, в то время как в обеих линиях контрольных клеток сохранялись близкие уровни рецепторов трансферрина.

Эти данные позволяют предположить, что белок-переносчик CERT принимает участие в транспорте не только секреторируемых, но также и расположенных в мембранах белков клеточной поверхности. Это не является неожиданным, поскольку оба типа белков одинаково транспортируются в липидных пузырьках из ЭР через комплекс Гольджи в плазматическую мембрану и, таким образом, используют одни и те же пути клеточного экспорта, на которые, как это впервые установлено при создании настоящего изобретения, влияет CERT.

Данные и результаты, полученные с помощью новой модели регуляции транспорта секреторных белков из комплекса Гольджи в плазматическую мембрану, представленные в настоящем изобретении, можно применять для получения биофармацевтических белков. Сверхэкспрессия CERT повышает производство различных белков, относящихся к биофармацевтическим белкам, таких как антитела, цитокины, факторы роста, такие как эритропоэтин или инсулин, поверхностные рецепторы, такие как эпителиальный фактор роста, и связанные с мембранами протеазы.

Хотя способ, предлагаемый в настоящем изобретении, в целом можно применять к процессам по-

лучения всех белков, степень успеха этой стратегии, оцененная по увеличению количества полученного белка, может в определенной степени зависеть от конкретной природы представляющего интерес белка. CHO-клетки или другие клетки-продуценты трансфектируют экспрессионной конструкцией, кодирующей белок, несущий START-домен, такой как CERT, StarD4 или StarD5 или их мутант либо производное.

Особенно высокие титры обнаружены в клетках, экспрессирующих нефосфорилируемый мутант CERT S132A. Гетерологичная экспрессия CERT и, прежде всего, мутанта CERT в CHO-клетках может повышать секрецию белков, например моноклонального антитела, при кратковременной трансфекции. Это может быть особенно важным для быстрого производства небольших количеств соединений-кандидатов лекарственных средств или мишеней лекарственных средств, которые необходимы для фармацевтических исследований и разработки.

Согласно другому варианту настоящего изобретения линию клеток-продуцентов трансфектируют указанными выше конструкциями ДНК и затем подвергают отбору с получением стабильных клеточных пулов. После шести пассажей клеточной культуры, следующих за процедурой отбора, собирают клеточный супернатант для анализа содержания представляющего интерес белка. В случае моноклонального антитела концентрацию белкового продукта определяют с помощью ELISA и делят на среднее количество клеток, рассчитывая удельную продуктивность. И в этом случае наиболее высокие показатели обнаружены в клеточных пулах, содержащих мутант CERT. В клетках, которые несут содержащие START-домен конструкции, экспрессия представляющего интерес белка заметно повышается по сравнению с трансфектированным имитатором или нетрансфектированными клетками. Очень сходные результаты можно получать, если стабильных трансфектантов подвергать периодической ферментации или периодической ферментации с подпиткой. В каждом из указанных вариантов сверхэкспрессия несущих START-домен белков приводит к повышенной экспрессии антител, индивидуальных клеточных белков и поверхностных рецепторов в кратковременно, а также стабильно трансфектированных линиях CHO-клеток, что свидетельствует о том, что несущие START-домены белки, такие как CERT или StarD4 и StarD5, обладают способностью повышать уровень удельной продуктивности в условиях ферментации.

#### Определения

В целом, в вариантах осуществления изобретения понятие "содержит" или "содержащий" включает более конкретное понятие "состоящий из". Кроме того, формы в единственном и множественном числе не следует рассматривать как ограничивающие.

Понятия, которые применяют при описании настоящего изобретения, имеют указанные ниже значения.

Понятие "START-домен" относится к домену, родственному домену стероидогенного острого регуляторного белка-(StAR) переносчика липидов, (START). Этот домен, который состоит примерно из 200-210 аминокислот, был впервые идентифицирован в качестве связывающего липиды домена (Soccio и Breslow, 2003; Tsujishita и Hurley, 2000). Длина START-домена может варьироваться от 116 до 250 аминокислот или от 180 до 223 аминокислот или более конкретно от 219 до 223 аминокислот в зависимости от представителя семейства START-доменов. Наиболее выраженной особенностью строения START-домена является, прежде всего, гидрофобный туннель, простирающийся практически по всей длине белка, который используется для связывания одной молекулы крупных липофильных соединений типа холестерина. Структурное исследование представителя семейства START-доменов MLN64-START выявило структуру  $\alpha/\beta$ -типа, состоящую из девятицепочечных скрученных антипараллельных  $\beta$ -складок и четырех  $\alpha$ -спиралей (Tsujishita и Hurley, 2000). Домен, обнаруженный в различных эукариотических белках, относится к "классическому START-домену" (CSD), а аналогичный домен, специфический для растений, обозначают как START-домен аллергена березовой пыльцы (BA-START).

Понятие "CERT" включает обе сплайсинговые формы CERT: CERT (SEQ ID NO: 11) и CERT<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 13). Понятие "CERT" относится также к любым возможным сплайсинговым формам CERT, выведенным из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 12.

Понятие "CERT" относится также к белку hCERT и его рекомбинантам, hCERT, hCERTA, белку PH, белку hCERT A MR и белку hCERTA ST, а также белку PHhCERT, белку MRhCERT и белку SThCERT (см. также EP 1652530 (Hanada, 2006), (Hanada и др., 2003)).

Понятие "производное" в целом включает последовательности, пригодные для реализации целевого применения настоящего изобретения, это подразумевает, что последовательности опосредуют повышение секреторного транспорта в клетке.

Понятие "производное" в контексте настоящего изобретения означает молекулу полипептида или молекулу нуклеиновой кислоты, последовательность которой по меньшей мере на 70% идентична исходной последовательности или комплементарной ей последовательности. Предпочтительно последовательность молекулы полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80% идентична исходной последовательности или комплементарной ей последовательности. Более предпочтительно последовательность молекулы полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% идентична исходной последовательности или комплементарной ей последовательности. Наиболее предпочтительно последовательность молекулы полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты

по меньшей мере на 95% идентична исходной последовательности или комплементарной ей последовательности и характеризуется таким же или подобным воздействием на секрецию, что и исходная последовательность.

Различия последовательностей могут быть связаны с различиями в гомологичных последовательностях различных организмов. Они могут быть обусловлены также целевой модификацией последовательностей с помощью замены, инсерции или делеции одного или нескольких, предпочтительно 1-5, 7-9 или 10, нуклеотидов или аминокислот. Делеционные, инсерционные или полученные в результате замены мутанты можно получать с помощью сайт-направленного мутагенеза и/или основанного на ПЦР мутагенеза. Соответствующие методы являются известными (Lottspeich и Zorbas, 1998), см. дополнительные ссылки в главе 36.1.

Идентичность последовательности с референс-последовательностью (что в контексте настоящего изобретения продемонстрировано на примере START-домена, представленного в SEQ ID NO: 16, 17 или 18, 19) можно определять с помощью стандартных алгоритмов "сравнительного анализа первичной структуры последовательностей", например, с помощью алгоритма "BLAST" ((Altschul и др., 1990); (Madden и др., 1996); (Zhang и Madden, 1997)). Последовательности сопоставляют, когда они соответствуют друг другу по их последовательности и их можно идентифицировать с помощью стандартных алгоритмов "сравнительного анализа первичной структуры последовательностей".

Кроме того, в контексте настоящего изобретения понятие "производное" означает молекулу нуклеиновой кислоты (одно- или двухцепочечную), которая гибридизуется с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 или 26, или ее фрагментом или производными, или с последовательностями, комплементарными SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26. Предпочтительно гибридизацию осуществляют в строгих условиях гибридизации и отмывки (например, гибридизация при 65°C в буфере, содержащем 5×SSC; отмывка при 42°C с использованием 0,2×SSC/0,1% ДСН). Соответствующие методы описаны, например, у Ausubel и др., 2002.

Понятие "производное" включает также делеционные мутанты белка, фосфорилированные мутанты, прежде всего в положении серина, треонина или тирозина, несущие делецию PKD-связывающего сайта или мутацию CERT Ser132A.

Понятие "активность" описывает и количественно характеризует биологические функции белка внутри клетки или в анализах *in vitro*.

Пример метода измерения "активности" описан в заявке на патент EP 1652530 (Hanada и др.), заключающийся в том, что определяют усиливающую высвобождение церамида из мембран активность. Липидную мембрану, содержащую церамид, следует приготавливать так, чтобы она содержала 12,5 нКи (225 пмоль) на образец [пальмитоил-1-<sup>14</sup>C]-N-пальмитоил-D-этиросфигозина (далее может быть обозначен как <sup>14</sup>C-церамид), с использованием смеси липидов, содержащей фосфатидилхолин и фосфатидилэтанолламин в соотношении 4:1, которую получали из куриного желтка. В результате концентрация церамида составляет 2,5 мг/мл. Например, для измерения активности одного образца требуется 20 пл этой липидной мембраны. После переноса липида в пробирку Эппендорфа в требуемом для определения активности количестве его сушат, пропуская газообразный азот. Затем добавляют буфер 1 [20 mM HEPES-NaOH буфер (pH 7,4), который содержит 50 mM NaCl и 1 mM ЭДТК] для сушки липидной мембраны в таком количестве, чтобы концентрация составляла 2,5 мг/мл. Осуществляют осторожную обработку ультразвуком с использованием ультразвукового генератора, снабженного ванной [модель 2210 фирмы Branson, Co., Ltd.]. Ультразвуковую обработку следует осуществлять при 25°C в течение 3 мин. Затем образец следует смешивать (интенсивное перемешивание) в течение 30 с и после этого повторять ультразвуковую обработку в течение 3 мин. Полученную таким образом липидную мембрану применяют для анализа высвобождения церамида. Реакцию высвобождения церамида из липидной мембраны и его выявление осуществляют следующим образом: белок CERT или рекомбинантный белок (в стандартных условиях количество белка соответствует 450 пмоль, что представляет собой 2-кратный молярный эквивалент количества церамида, входящего в используемую отдающую мембрану) смешивают до объема 30 пл, используя буфер 2 [50 mM HEPES-NaOH буфер (pH 7,4), к которому добавлены 100 mM NaCl и 0,5 mM ЭДТК]. Реакцию инициируют, добавляя 20 пл липидной мембраны, содержащей церамид. Конечная концентрация фосфолипидов составляет 1 мг/мл. Содержание церамида составляет примерно 0,3% от общего содержания фосфолипидов. После инкубации смеси при 37°C в течение 30 мин ее центрифугируют при 50000×g в течение 30 мин и липидную мембрану осаждают. В случае, когда в указанных условиях центрифугирования используют белок CERT из *E. coli*, то большая часть белка остается в супернатанте. При этом, когда <sup>14</sup>C-церамид связывается с белком CERT, он высвобождается из липидной мембраны и переносится во фракцию супернатанта. Активность, характеризующую усиление высвобождения церамида с помощью CERT, рассчитывают как радиоактивность 1% фракции супернатанта с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика.

Еще одним путем измерения "активности" является анализ *in vitro* переноса церамида с помощью рекомбинантного продукта или клеточного лизата, содержащего CERT. При этом опосредуемый белком перенос церамида между SUV оценивают согласно известному из литературы методу (Olaiyoye и др.,

2005). Для анализа переноса используют смесь, которая содержит пузырьки-доноры (2 нмоль липида/мл), содержащие липиды головного мозга свиней (фирма Avanti Polar Lipids), меченный пиреном C<sub>16</sub>-церамид и 2,4,6-тринитрофенил-фосфатидилэтанолламин (TNP-PE) (88,6:0,4:11 мол.%), предоставленные P. Somerharju, и 10-кратный избыток пузырьков-акцепторов, состоящих из липидов головного мозга свиней. Интенсивность флуоресценции оценивают при 395 нм (длина волны возбуждения, 345 нм; ширина щели, 4 нм) до и после добавления 75 мкг цитозоля клеток линии HEK293T, кратковременно экспрессирующих меченные с помощью GFP белок CERT дикого типа и мутантный белок S132A (см. выше). Интенсивности флуоресценции стандартизируют относительно (I) максимальной интенсивности, полученной после добавления Triton X-100 (конечная концентрация 0,5%), и (II) максимальной флуоресценции GFP для учета различных уровней экспрессии белков.

Еще одним путем оценки "активности" является анализ состояния фосфорилирования CERT S132A, например, с помощью фосфоспецифического антитела с использованием вестерн-блоттинга. Экстракты целых клеток получают путем солиubilизации клеток в содержащем NP40 буфере для экстракции (NEB) [50 mM трис (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM ортованадат натрия, 10 mM фторид натрия и 20 mM β-глицерофосфат плюс полный набор ингибиторов протеаз]. Лизаты осветляют центрифугированием при 16000×g в течение 10 мин. Экстракты целых клеток или полученные иммунопреципитацией белки кипятят в буфере для образца и подвергают ДСН-ПААГ. Белки блоттируют на мембраны из поливиниленадифторида (фирма Roth). После блокады с помощью 0,5%-ного блокирующего реагента (фирма Roche) в ЗФР, содержащем 0,1% Твин 20, фильтры зондируют фосфоспецифическим антителом, таким как фосфоспецифическое антитело к субстрату, обозначенное pMOTIF, которое образуется против консенсусных мотивов, фосфорилируемых PKD (Doppler и др., 2005). Белки визуализируют с помощью сцепленного с пероксидазой вторичного антитела, используя усовершенствованную систему для определения хемиллюминисценции (фирма Pierce).

И еще один путь оценки "активности" представляет собой анализ секреции, например, модельного белка, антитела или представляющего интерес белка. Клетки совместно трансфектируют плазмидой ss-HRP-Flag и незагруженным вектором, pEGFP-N1-PKD1KD, и плазмидой, кодирующей CERT, вариант CERT любого из несущих START-домен белков в соотношении 1:6,5 соответственно. Через 24 ч после трансфекции клетки отмывают бессывороточными средами и секрецию HRP оценивают количественно через 0, 1, 3 и 6 ч путем инкубации осветленного клеточного супернатанта с ECL-реагентом. Измерения осуществляют с помощью люциметра (Lucy2, фирма Anthos) при 450 нм.

Еще один путь оценки "активности" включает применение флуоресцентного аналога церামида, например меченого Bodipy C5-церамида, осуществление поисковых экспериментов на интактных клетках и определение накопления белка в комплексе Гольджи.

Количественная оценка распределения BODIPY® FL C5-церамида между комплексом Гольджи и ЭР.

Транспорт флуоресцентного церамиды оценивают количественно после сбора данных с использованием функции линейной развертки с помощью программы Metamorph. Линию проводят через клетки на конфокальных изображениях, полученных в различные моменты времени, и интенсивность флуоресценции определяют в цитоплазме и в комплексе Гольджи клетки. "Коэффициент поглощения" рассчитывают по интенсивности флуоресцентного излучения в комплексе Гольджи, деленному на интенсивность, измеренную в цитоплазме. Максимальный коэффициент поглощения определяют в контрольных клетках после 25 мин инкубации при 37°C и эту величину принимают за 100%. Оценивают результаты, полученные в трех независимых экспериментах, в которых конфокальные изображения получают для 12 различных моментов времени и в каждый момент времени анализируют по 7 клеток.

Понятие "продуктивность" или "удельная продуктивность" относится к количеству конкретного белка, которое продуцируется определенным количеством клеток в определенный промежуток времени. Таким образом, удельная продуктивность является количественным показателем способности клеток экспрессировать/синтезировать/продуцировать представляющий интерес белок. При промышленном применении удельную продуктивность, как правило, выражают в виде уровня белка в пикограммах, продуцируемого клеткой в день (пг/клетка×день (pg/cell×day) или "pcd").

Один из методов определения "удельной продуктивности" секретлируемого белка заключается в том, что количественно определяют уровень представляющего интерес белка, секретлируемого в культуральную среду, с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA). Для этой цели клетки высевают на свежую культуральную среду с определенной плотностью.

Через определенный промежуток времени, например через 24, 48 или 72 ч, отбирают образец жидкой клеточной культуры и подвергают оценке с помощью ELISA для определения титра представляющего интерес белка. Удельную продуктивность можно определять путем деления титра на среднее количество клеток и время.

Другой пример определения "удельной продуктивности" клеток включает использование гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF®).

"Продуктивность" клеток в отношении внутриклеточного, ассоциированного с мембраной или

трансмембранного белка можно определять также и оценивать количественно с помощью вестерн-блоттинга. Клетки сначала отмывают и затем лизируют в буфере, содержащем либо детергенты, такие как Triton-X, NP-40 или ДСН, или высокие концентрации солей. Белки в клеточном лизате затем разделяют по размерам с помощью ДСН-ПААГ, переносят на нейлоновую мембрану, на которой затем представляющий интерес белок определяют и визуализируют с помощью специфических антител.

Другим методом определения "удельной продуктивности" клетки является иммунологическое определение представляющего интерес белка с помощью флуоресцентно меченых антител к представляющему интерес белку и количественной оценки сигнала флуоресценции с использованием проточного цитометра. В случае внутриклеточного белка клетки сначала фиксируют, например, в параформальдегидном буфере, а затем повышают клеточную проницаемость для того, чтобы позволять проникать идентифицирующему антителу в клетку. Белки клеточной поверхности можно оценивать на живой клетке, для этого не требуется предварительная фиксация или повышение проницаемости.

"Продуктивность" клетки можно определять также косвенно путем измерения экспрессии репортерного белка, такого как зеленый флуоресцентный белок (GFP), который экспрессируют либо в виде слитого белка с представляющим интерес белком, либо с использованием той же мРНК, что и транслируется в представляющий интерес белок, в качестве состоящей из двух, трех или множества частей экспрессионной единицы.

Для "усиления/повышения продуктивности" применяют методы повышения/увеличения удельной продуктивности специфических клеток-продуцентов. Удельная продуктивность является повышенной или увеличенной, если продуктивность выше в исследуемой клетке по сравнению с соответствующими контрольными клетками, и если это различие является статистически значимым. Исследуемые клетки могут представлять собой гетерогенные популяции или клональные клеточные линии обработанных, трансфектированных или генетически модифицированных клеток; необработанные, нетрансфектированные или немодифицированные клетки могут служить в качестве контрольных клеток.

Понятия "ингибитор" или "супрессор" в контексте настоящего изобретения относятся к любой молекуле, действие которой состоит в ингибировании или подавлении экспрессии или активности несущих START-домен белков типа CERT. Понятие относится к небольшим химическим соединениям, нуклеиновым кислотам, таким как антисмысловая ДНК, антисмысловая РНК или siРНК, одноцепочечные антитела, и белки, которые блокируют транскрипцию и трансляцию CERT, а также пептиды или белки, которые оказывают воздействие на связывание липидов с содержащими START-домен белками, такими как CERT.

Понятие "клетка-хозяин" согласно настоящему изобретению относится к клеткам, таким как клетки хомячка, предпочтительно к клеткам ВНК21, ВНК ТК, CHO, CHO-K1, CHO-DUKX, CHO-DUKX B1 и CHO-DG44, или производным/потомству любой из указанных клеточных линий. Наиболее предпочтительными являются клетки CHO-DG44, CHO-DUKX, CHO-K1 и ВНК21 и еще более предпочтительно клетки CHO-DG44 и CHO-DUKX. В другом варианте осуществления настоящего изобретения понятие "клетки-хозяева" относится также к клеткам мышинной миеломы, предпочтительно клеткам NS0 и Sp2/0, или производным/потомству любой из указанных клеточных линий. Примеры мышинных клеток и клеток хомячка, которые можно применять согласно изобретению, обобщены также в табл. 1. Однако согласно настоящему изобретению, прежде всего для получения биофармацевтических белков, можно применять также производные/потомство этих клеток, других клеток млекопитающих, включая, но не ограничиваясь только ими, клеточные линии человека, мышей, крыс, обезьян и грызунов, или эукариотические клетки, включая, но не ограничиваясь только ими, клетки дрожжей, насекомых и растений.

Линии эукариотических клеток-продуцентов

Клеточная линия	Порядковый номер
NS0	ECACC No. 85110503
Sp2/0-Ag14	ATCC CRL-1581
ВНК21	ATCC CCL-10
ВНК ТК	ECACC No. 85011423
HaK	ATCC CCL-15
2254-62.2 (производная ВНК-21)	ATCC CRL-8544
CHO	ECACC No. 8505302
CHO дикого типа	ECACC 00102307
CHO-K1	ATCC CCL-61
CHO-DUKX (= CHO duk, CHO/dhfr)	ATCC CRL-9096
CHO-DUKX B11	ATCC CRL-9010
CHO-DG44	(Urlaub и др., 1983)
CHO Pro-5	ATCC CRL-1781
V79	ATCC CCC-93
B14AF28-G3	ATCC CCL-14
HEK 293	ATCC CRL-1573
COS-7	ATCC CRL-1651
U266	ATCC TIB-196
HuNSI	ATCC CRL-8644
CHL	ECACC No. 87111906

Наиболее предпочтительными являются клетки-хозяева, которые созданы так, что они адаптированы и их можно полностью культивировать в бессывороточных условиях и необязательно в средах, которые не содержат каких-либо белков/пептидов животного происхождения. В продажу поступают такие среды, как среда Хэма F12 (фирма Sigma, Дейзенхофен, Германия), RPMI-1640 (фирма Sigma), модифицированная по методу Дульбекко среда Игла (DMEM; фирма Sigma), минимальная поддерживающая среда (MEM; фирма Sigma), среда Дульбекко, модифицированная по методу Исков (IMDM; Sigma), CD-CHO (фирма Invitrogen, Карлсбад, шт. Калифорния), CHO-S-Invitrogen, бессывороточная CHO-среда (фирма Sigma) и не содержащая белки CHO-среда (фирма Sigma), которые являются примерами питательных растворов. Любую из сред можно дополнять при необходимости различными соединениями, примерами которых являются гормоны и/или другие факторы роста (такие как инсулин, трансферрин, эпидермальный фактор роста, инсулиноподобный фактор роста), соли (такие как хлорид натрия, фосфат кальция, магния), буферы (такие как HEPES), нуклеозиды (такие как аденозин, тимидин), глутамин, глюкоза или другие эквивалентные источники энергии, антибиотики, микроэлементы. Можно включать также любые другие необходимые добавки в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. В настоящем изобретении предпочтительно применяют бессывороточную среду, но для культивирования клеток-хозяев можно применять также среды, дополненные приемлемым количеством сыворотки. Для выращивания и селекции генетически модифицированных клеток, экспрессирующих селективируемый ген, в культуральную среду добавляют приемлемый селектирующий агент.

Понятие "белок" применяют взаимозаменяемо с понятием "аминокислотные последовательности" или "полипептид", и оно относится к полимерам аминокислот любой длины. Эти понятия включают также белки, которые подвергнуты посттрансляционным модификациям с помощью реакций, которые включают, но не ограничиваясь только ими, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование или процессинг белков. Модификации и изменения, например слияния с другими белками, замены, делеции или инсерции в аминокислотной последовательности, можно осуществлять в структуре полипептида так, чтобы молекула сохраняла при этом ее биологическую функциональную активность. Например, можно осуществлять определенные замены в аминокислотной последовательности в полипептиде или в кодирующей его нуклеотидной последовательности и получать белок с аналогичными свойствами.

Понятие "полипептид" относится к последовательности, состоящей более чем из 10 аминокислот, а понятие "пептид" относится к последовательностям, состоящим вплоть до 10 аминокислот.

Настоящее изобретение можно применять для создания клеток-хозяев, предназначенных для производства биофармацевтических полипептидов/белков. Прежде всего, изобретение можно применять для экспрессии высоких уровней многочисленных различных представляющих интерес генов клетками, для которых выявлена повышенная клеточная продуктивность.

"Представляющий интерес ген (GOI)", "выбранная последовательность" или "генный продукт" имеют одинаковое значение в контексте настоящего описания и относятся к полинуклеотидной последовательности любой длины, которая кодирует представляющий интерес продукт или "представляющий интерес белок", под это понятие подпадает также "требуемый продукт". Выбранная последовательность может представлять собой полноразмерный или укороченный ген, слитый или меченый ген и может представлять собой кДНК, геномную ДНК или фрагмент ДНК, предпочтительно представляет собой

кДНК. Она может иметь нативную последовательность, т.е. встречающуюся(иеся) в естественных условиях форму(ы), или может быть при необходимости мутантной или иным образом модифицированной. Эти модификации представляют собой усовершенствование кодонов с целью оптимизации наиболее часто встречающихся кодонов в отобранной клетке-хозяине, гуманизацию или мечение. Выбранная последовательность может кодировать секретируемый, цитоплазматический, ядерный, связанный с мембраной или находящийся на клеточной поверхности полипептид.

"Представляющий интерес белок" включает белки, полипептиды, их фрагменты, пептиды, которые все могут экспрессироваться в отобранной клетке-хозяине. Требуемые белки могут представлять собой, например, антитела, ферменты, цитокины, лимфокины, адгезионные молекулы, рецепторы и их производные или фрагменты и любые другие полипептиды, которые могут служить агонистами или антагонистами и/или которые можно применять в терапевтических или диагностических целях. Примеры требуемого белка/полипептида представлены также ниже.

В случае более сложных молекул, таких как моноклональные антитела, GOI кодирует одну или обе цепи антитела.

"Представляющий интерес продукт" может являться также антисмысловой РНК.

"Представляющие интерес белки" или "требуемые белки" указаны выше. Прежде всего, требуемые белки/представляющие интерес полипептиды или белки включают, но не ограничиваясь только ими, инсулин, инсулиноподобный фактор роста, hGH, tPA, цитокины, такие как интерлейкины (IL), например IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, интерферон (IFN) альфа, IFN-бета, IFN-гамма, IFN-омега или IFN- $\gamma$ , фактор некроза опухоли (TNF), такой как TNF-альфа и TNF-бета, TNF-гамма, TRAIL; G-CSF, GM-CSF, M-CSF, MCP-1 и VEGF. Под объем изобретения подпадает также производство эритропоэтина или любых других гормональных ростовых факторов. Способ, предлагаемый в изобретении, целесообразно применять также для производства антител или их фрагментов. Такие фрагменты представляют собой, например, Fab-фрагменты (Fragment antigen-binding (антигенсвязывающий фрагмент)=Fab). Fab-фрагменты состоят из переменных областей обеих цепей, которые удерживаются вместе примыкающей константной областью. Их можно получать путем расщепления протеазами, например папаином, из обычных антител, но, кроме того, Fab-фрагменты можно получать также с помощью генетической инженерии. К фрагментам антител относятся также F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, которые можно получать протеолитическим расщеплением пепсином.

Представляющий интерес белок предпочтительно выделяют из культуральной среды в виде секретируемого полипептида или его можно выделять из лизатов клеток-хозяев, если его экспрессия происходит без секреторного сигнала. Необходимо очищать представляющий интерес белок от других рекомбинантных белков и белков клетки-хозяина так, чтобы получать практически гомогенные препараты представляющего интерес белка. На первой стадии клетки и/или состоящий из частиц клеточный дебрис удаляют из культуральной среды или лизата. Затем представляющий интерес продукт очищают от загрязнителей в виде растворимых белков, полипептидов и нуклеиновых кислот, например, путем фракционирования на иммуноаффинной или ионообменной колонках, путем осаждения этанолом, ЖХВР с обращенной фазой, хроматографии на сефадексе, хроматографии на силикагеле или на катионообменной смоле, такой как ДЭАЭ ((диацетиламино)этилцеллюлоза). В целом, в данной области хорошо известны методы очистки гетерологично экспрессируемых в клетке-хозяине белков. Такие методы описаны, например, у (Harris и Angal, 1995) или (Robert Scopes, 1988).

С помощью методов генной инженерии можно получать укороченные фрагменты антител, которые состоят только из переменных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепи. Их обозначают как Fv-фрагменты (Fragment variable, т.е. фрагмент переменных областей). Поскольку у этих Fv-фрагментов отсутствует ковалентное связывание двух цепей остатками цистеина константных областей цепей, то Fv-фрагменты часто стабилизируют. Целесообразно связывать переменные области тяжелой и легкой цепи коротким пептидным фрагментом, например, состоящим из 10-30 аминокислот, предпочтительно 15 аминокислот. Таким образом, получают одну пептидную цепь, состоящую VH и VL, которые связаны пептидным линкером. Белок антитела такого типа обозначают как одноцепочечный Fv (scFv). Примеры белков scFv-антител такого типа известны в данной области, см., например Huston и др., 1988.

В последние годы разработаны различные стратегии получения scFv в виде мультимерного производного. Это должно приводить, в частности, к получению рекомбинантных антител с улучшенными фармакокинетическими свойствами и особенностями биораспределения, а также обладающих повышенной авидностью к связыванию. Для достижения мультимеризации scFv получали scFv в виде слитых белков с мультимеризованными доменами. Мультимеризованные домены могут представлять собой, например, СНЗ-участок IgG или структуру типа свернутой спирали (coiled coil) (спиралевидная структура), такие как домены типа лейциновой "молнии". Однако известны также стратегии, при использовании которых для мультимеризации применяют взаимодействие между VH/VL-областями scFv (например, двойные, тройные антитела и пентаантитела). Под двойными антителом специалист в данной области подразумевает двухвалентное гомодимерное производное scFv. Укорочение линкера в молекуле scFv до 5-10 аминокислот приводит к образованию гомодимеров, в которых имеет место межцепочечное VH/VL-наложение. Двойные антитела можно дополнительно стабилизировать путем введения дисульфидных

мостиков. Примеры белков двойных антител, известных из существующего уровня техники, представлены у Perisic и др., 1994.

Под миниантителом специалист в данной области подразумевает двухвалентное гомодимерное производное scFv. Оно состоит из слитого белка, который содержит СН3-участок иммуноглобулина, предпочтительно IgG, наиболее предпочтительно IgG1, в качестве области димеризации, которая соединена с scFv через шарнирную область (например, также из IgG1) и линкерную область. Примеры белков антител в виде миниантител можно найти у Hu и др., 1996.

Под тройным антителом специалист в данной области подразумевает трехвалентное гомотримерное производное scFv (Kortt и др., 1997). Производные scFv, в которых VH-VL слиты непосредственно без линкерной последовательности, позволяют получать тримеры.

Под "каркасными белками" специалист в данной области подразумевает любой функциональный домен белка, который связывают с помощью генетического клонирования или методов котрансляции с другим белком или фрагментом белка, имеющего другую функцию.

Специалисту в данной области известны также так называемые миниантитела, которые имеют двух-, трех- или четырехвалентную структуру и которые выведены из scFv. Мультимеризацию осуществляют с помощью двух-, трех- или четырехмерных структур типа свернутой спирали (Lovejoy и др., 1993; Pack и др., 1993; Pack и др., 1995).

Любые последовательности или гены, интродуцированные в клетку-хозяина, обозначают как "гетерологичные последовательности" или "гетерологичные гены" или "трансгены" относительно клетки-хозяина, даже в том случае, если интродуцированная последовательность или ген идентичны эндогенной последовательности или гену клетки-хозяина.

Таким образом, "гетерологичный" белок представляет собой белок, экспрессируемый гетерологичной последовательностью.

Гетерологичные генные последовательности можно интродуцировать в клетку-мишень с помощью "экспрессионного вектора", предпочтительно эукариотического, и еще более предпочтительно экспрессионного вектора млекопитающих. Методы, применяемые для конструирования векторов, хорошо известны специалистам в данной области и описаны в различных публикациях. Конкретные методики создания приемлемых векторов, включая описание функциональных компонентов, таких как промоторы, энхансеры, сайты терминации и сигналы полиаденилирования, маркеры для селекции, сайты инициации репликации и сигналы сплайсинга, обобщены более конкретно у (Sambrook и др., 1989) и в приведенных в этом руководстве ссылках. Векторы могут представлять собой, но не ограничиваясь только ими, плазмидные векторы, фагмиды, космиды, искусственные/минихромосомы (например, ACE), или вирусные векторы, такие как векторы на основе бакуловируса, ретровируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса, вируса герпеса простого, ретровируса, бактериофагов. Эукариотические экспрессионные векторы должны, как правило, содержать также прокариотические последовательности, которые облегчают размножение вектора в бактерии, такие как сайт инициации репликации и гены, обуславливающие устойчивость к антибиотикам, для селекции в бактериях. Различные эукариотические экспрессионные векторы, содержащие сайт клонирования, в котором можно функционально связывать полинуклеотид, хорошо известны в данной области и некоторые из них поступают в продажу от таких компаний, как фирма Stratagene, Ла-Джолла, шт. Калифорния; фирма Invitrogen, Карлсбад, шт. Калифорния; фирма Promega, Мэдисон, шт. Висконсин или фирма BD Biosciences Clontech, Пало-Альто, шт. Калифорния.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения экспрессионный вектор содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая представляет собой регуляторную последовательность, необходимую для транскрипции и трансляции нуклеотидных последовательностей, которые кодируют представляющий интерес пептид/полипептид/белок.

Понятие "экспрессия" в контексте настоящего описания относится к транскрипции и/или трансляции гетерологичной нуклеотидной последовательности внутри клетки-хозяина. Уровень экспрессии требуемого продукта/представляющего интерес белка в клетке-хозяине можно определять на основе либо уровня соответствующей мРНК, присутствующей в клетке, либо уровня требуемого полипептида/представляющего интерес белка, кодируемого выбранной последовательностью, как описано в примерах, представленных в настоящем описании. Например, мРНК, транскрибируемую с выбранной последовательности, можно оценивать количественно гибридизацией нозерн-блоттингом, защитой РНК от рибонуклеазы, гибридизацией *in situ* с клеточной РНК или ПЦР (см. Sambrook и др., 1989; Ausubel и др., 1987, пересмотренное и доп. изд.). Белок, кодируемый выбранной последовательностью, можно количественно оценивать различными методами, например с помощью ELISA, вестерн-блоттинга, радиоиммуноанализов, иммунопреципитации, путем оценки биологической активности белка, с помощью иммуноокрашивания белка с последующим FACS-анализом (см. Sambrook и др., 1989; Ausubel и др., 1987, пересмотренное и доп. изд.) или путем анализов гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF).

"Трансфекцию" эукариотических клеток-хозяев полинуклеотидом или экспрессионным вектором, приводящую к получению генетически модифицированных клеток или трансгенных клеток, можно осуществлять любым методом, хорошо известным в данной области и описанным, например, у Sambrook и

др., 1989 или Ausubel и др., 1987 (пересмотренное и доп. изд.). Методы трансфекции включают, но не ограничиваясь только ими, опосредуемую липосомой трансфекцию, совместное осаждение с фосфатом кальция, электропорацию, опосредуемую поликатионом (таким как ДЭАЭ-декстран) трансфекцию, слияние протопластов, вирусные заражения и микроинъекцию. Предпочтительно трансфекция представляет собой стабильную трансфекцию. Предпочтительным является такой метод трансфекции, который обеспечивает оптимальную частоту трансфекции и экспрессию гетерологичных генов в конкретной линии клеток-хозяев. Приемлемые методы можно определять общепринятыми путями. Для получения стабильных трансфектантов конструкции либо интегрируют в геном клетки-хозяина, либо в искусственную хромосому/минихромосому, либо локализуют эписомально, так чтобы они стабильно поддерживались в клетке-хозяине.

Для воплощения настоящего изобретения на практике можно применять, если не указано иное, общепринятые методики клеточной биологии, молекулярной биологии, клеточного культивирования, иммунологии и т.п., известные в данной области. Эти методики полностью описаны в современной литературе (см., например, Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel и др., *Current Protocols in Molecular Biology*, 1987 (пересмотренное и доп. изд.); *Essential Molecular Biology*, под ред. Brown, изд-во IRL Press, 1991; *Gene Expression Technology*, под ред. Goeddel, изд-во Academic Press, 1991; *Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes*, под ред. Bothwell и др., изд-во Bartlett Publ., 1990; *Recombinant DNA Methodology*, под ред. Wu и др., изд-во Academic Press, 1989; Kriegler, *Gene Transfer and Expression*, изд-во Stockton Press, 1990; McPherson и др., *PCR: A Practical Approach*, изд-во IRL Press at Oxford University Press, 1991; *Oligonucleotide Synthesis*, под ред. Gait, 1984; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, под ред. Miller и Calos, 1987; *Mammalian Cell Biotechnology*, под ред. Butler, 1991; *Animal Cell Culture*, под ред. Pollard и др., изд-во Human Press, 1990; *Culture of Animal Cells*, под ред. Freshney и др., изд-во Alan R. Liss, 1987; *Cell Growth and Apoptosis, A Practical Approach*, под ред. Studzinski, изд-во IRL Press at Oxford University Press, 1995; *Flow Cytometry and Sorting*, под ред. Melamed и др., изд-во Wiley-Liss, 1990; *Current Protocols in Cytometry*, изд-во John Wiley & Sons, Inc. (пересмотренное и доп. изд.); Wirth и Hauser, *Genetic Engineering of Animals Cells*, в: *Biotechnology*, т. 2, под ред. Pühler, VCH, Weinheim 663-744; серии *Methods of Enzymology*, изд-во Academic Press, Inc., и *Antibodies: A Laboratory Manual*, под ред. Harlow и др., 1987).

#### **Варианты осуществления изобретения**

Настоящее изобретение относится к способу получения гетерологичного представляющего интерес белка в клетке, заключающемуся в том, что повышают экспрессию или активность белка, который имеет аминокислотную последовательность, содержащую домен, родственную домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производное либо мутант, и осуществляют экспрессию указанного представляющего интерес белка. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что гетерологичный белок представляет собой мембранный или секретируемый белок.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что несущий START-домен белок является представителем семейства несущих START-домен белков млекопитающих, таким как PCTP (SEQ ID NO: 27), StarD7, GPBP, StarD10, StarD8, StarD13, DLC-1, StarD4 (SEQ ID NO: 21), StarD6 (SEQ ID NO: 25), StarD5 (SEQ ID NO: 23), MLN64, StAR, THEA-2, CACH или StarD9, или его производным либо мутантом.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что несущий START-домен белок отличается тем, что он индуцируется стрессом ЭР, и/или структурно отличается тем, что состоит только из START-домена, как в случае StarD4 (SEQ ID NO: 21), StarD5 (SEQ ID NO: 23), StarD6 (SEQ ID NO: 25) или белка-переносчика фосфатидилхолина (PCTP) (SEQ ID NO: 27).

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что несущий START-домен белок выбирают из группы, включающей CERT (SEQ ID NO: 11 или 13), StarD4 (SEQ ID NO: 21) и StarD5 (SEQ ID NO: 23).

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что несущий START-домен белок представляет собой StarD6 (SEQ ID NO: 25). В предпочтительном варианте осуществления изобретения StarD6 кодируется нуклеотидом, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 24.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что START-домен содержит по меньшей мере 219 аминокислот START-домена CERT<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 19), или по меньшей мере 223 аминокислоты START-домена CERT и CERT S132A (SEQ ID NO: 17), или по меньшей мере START-домен StarD4 (SEQ ID NO: 21), или по меньшей мере START-домен StarD5 (SEQ ID NO: 23), или его производное либо мутант.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что несущий START-домен белок представляет собой белок-переносчик церамида CERT (CERT, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 11, или CERT<sub>L</sub>, последовательность которого представлена SEQ ID NO: 13) или его производное либо мутант.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что несущий START-домен белок представляет собой мутантный белок-переносчик керамида CERT и указанная мутация нарушает и/или удаляет сайт фосфорилирования в любом из положений серина, треонина или тирозина CERT.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что несущий START-домен белок представляет собой мутантный белок-переносчик керамида CERT и указанная мутация нарушает и/или удаляет сайт фосфорилирования протеинкиназой D (PKD) в положении 132 CERT.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что мутантный CERT представляет собой CERT<sub>S132A</sub> (SEQ ID NO: 15).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанный способ приводит к повышенной удельной продуктивности в клетке указанного представляющего интерес белка по сравнению с экспрессией указанного представляющего интерес белка в контрольной клетке, но при этом контрольная клетка не имеет повышенный уровень экспрессии или активности белка, который имеет аминокислотную последовательность, содержащую домен, родственную домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производного либо мутанта.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что повышение продуктивности составляет от примерно 5 до примерно 10%, от примерно 11 до примерно 20%, от примерно 21 до примерно 30%, от примерно 31 до примерно 40%, от примерно 41 до примерно 50%, от примерно 51 до примерно 60%, от примерно 61 до примерно 70%, от примерно 71 до примерно 80%, от примерно 81 до примерно 90%, от примерно 91 до примерно 100%, от примерно 101 до примерно 149%, от примерно 150 до примерно 199%, от примерно 200 до примерно 299%, от примерно 300 до примерно 499% или от примерно 500 до примерно 1000%.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанная клетка представляет собой эукариотическую клетку, такую как клетка дрожжей, растений, червей, насекомых, птиц, рыб, рептилий или млекопитающих. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанная клетка представляет собой клетку животного. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанная клетка представляет собой клетку многоклеточного животного, такого как *C. elegans*. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанная клетка представляет собой клетку билатерально-симметричного животного, например *Drosophila melanogaster*. В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанная клетка представляет собой клетку позвоночного животного, например клетку птиц, рыб, рептилий или млекопитающих. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанная клетка представляет собой человеческую клетку, например линию клеток человеческой миеломы U266, HEK293, HeLa, HepG2 или HT1080. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанная клетка представляет собой клетку грызунов, например мышиную клетку линии NSO, Sp2/0 или Ag8653, YO или YB2.0.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанная эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанная клетка млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO), почки обезьяны CV1, почки обезьяны COS, хрусталика глаза человека PER.C6TM, человеческого эмбриона, HEK293, детеныша китайского хомячка, почки африканской зеленой мартышки, человеческой карциномы шейки матки, почки собаки, печени крысы линии Буффало, человеческого легкого, человеческой печени, мышинной опухоли молочной железы или миеломы, клетку собаки, свиньи или макака, кролика, кошки, козы, предпочтительно CHO-клетку.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанная CHO-клетка представляет собой CHO-клетку дикого типа, CHO K1, CHO DG44, CHO DUKX-B11, CHO Pro-5, предпочтительно CHO DG44.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что представляющий интерес белок является мембранным или секретуемым белком. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что представляющий интерес белок является антителом или фрагментом антитела.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что антитело представляет собой моноклональное, поликлональное антитело, антитело млекопитающих, мышинное, химерное, гуманизированное, приматизированное антитело, антитело приматов, человеческое антитело или фрагмент антитела или его производное, например антитело, легкую цепь иммуноглобулина, тяжелую цепь иммуноглобулина, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fc, слитые белки Fc-Fc, Fv, одноцепочечный Fv, содержащий один домен Fv, тетравалентный одноцепочечный Fv, связанный дисульфидным мостиком Fv, делеционный домен, минитело или полипептид одного из указанных выше фрагментов, слитый с другим пептидом или полипептидом, слияние Fc-пептид, слияние Fc-токсин, кар-

касные белки.

Изобретение относится также к способу повышения секреции мембранного или секретлируемого представляющего интерес белка в клетке, заключающемуся в том, что экспрессируют представляющий интерес белок и экспрессируют белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производное либо мутант.

Изобретение относится также к способу получения мембранного или секретлируемого представляющего интерес белка в клетке, заключающемуся в том, что а) повышают уровень экспрессии белка, имеющего аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производного или мутанта, и б) осуществляют экспрессию представляющего интерес белка, при этом порядок осуществления стадий а) и б) может быть обратным.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается также тем, что стадии а) осуществляют до стадии б). В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается также тем, что стадии а) и б) осуществляют одновременно. В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается также тем, что стадию б) осуществляют до стадии а).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ заключается также в том, что осуществляют дополнительную стадию выделения представляющего интерес белка.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ заключается также в том, что осуществляют дополнительную стадию выделения и очистки представляющего интерес белка.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ заключается в том, что повышают уровень экспрессии белка, имеющего аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производного или мутанта путем трансфекции клетки полинуклеотидом, который кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производное или мутант.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ заключается в том, что трансфектируют клетку первым полинуклеотидом, который кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производное или мутант, и трансфектируют клетку вторым полинуклеотидом, который кодирует представляющий интерес белок.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения несущий START-домен белок, применяемый в способе, отличается тем, что он индуцируется стрессом ЭР и/или структурно отличается тем, что не имеет никаких других структурных мотивов помимо START-домена, такой как например, StarD4 (SEQ ID NO: 21), StarD5 (SEQ ID NO: 23), StarD6 (SEQ ID NO: 25) или PCTP (SEQ ID NO: 27).

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ заключается в том, что а) повышают уровень экспрессии белка, имеющего аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производного либо мутанта, предпочтительно путем трансфекции клетки первым полинуклеотидом, который кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производное либо мутант, при этом повышение уровня оценивают в сравнении с не-трансфектированной клеткой, б) трансфектируют клетку вторым полинуклеотидом, который кодирует представляющий интерес белок.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что белки, экспрессируемые на стадиях а) и б), не являются идентичными.

Изобретение относится также к способу получения представляющего интерес мембранного или секретлируемого белка в клетке, заключающемуся в том, что повышают экспрессию белка, имеющего аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производного либо мутанта в указанной клетке и оказывают воздействие на уровень экспрессии указанного представляющего интерес белка в указанной клетке.

Изобретение относится также к способу получения представляющего интерес мембранного или секретлируемого белка в клетке, заключающемуся в том, что повышают экспрессию белка, имеющего аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производного либо мутанта в указанной клетке и экспрессируют указанный представляющий интерес белок в указанной клетке.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанный способ приводит к повешенной удельной продуктивности в клетке указанного представляющего

интерес белка по сравнению с контрольной клеткой, ранее трансфектированной полинуклеотидом, который кодирует представляющий интерес белок, но в котором указанная контрольная клетка не отличается повышенным уровнем экспрессии белка, имеющего аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производного либо мутанта.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что представляющий интерес белок является белком, который проходит через комплекс Гольджи.

Изобретение относится также к способу повышения удельной продуктивности в клетке представляющего интерес мембранного или секретируемого белка, заключающемуся в том, что интродуцируют в клетку одну или несколько векторных систем, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере два полипептида, при этом первый полинуклеотид кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производное либо мутант, а второй полинуклеотид кодирует представляющий интерес белок, и при этом представляющий интерес белок и белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производное либо мутант экспрессируется указанной клеткой.

Изобретение относится также к способу повышения эффективности трансфекции клетки, экспрессирующей представляющий интерес мембранный или секретируемый белок в клетке, заключающемуся в том, что трансфектируют указанную клетку первым полинуклеотидом, который кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производное либо мутант, после чего трансфектируют указанную клетку вторым полинуклеотидом, который кодирует представляющий интерес белок, при этом первый и второй полинуклеотиды локализованы в различных векторных системах.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ повышения эффективности трансфекции клетки, заключающийся в том, что осуществляют дополнительную стадию трансфекции репортерным геном, таким как GFP, YFP, HRP, SEAP или LacZ, который может быть слит с представляющим интерес белком, локализован в одной и той же экспрессионной конструкции или на другой плазмиде.

Предпочтительным вариантом осуществления изобретения является способ повышения эффективности трансфекции клетки, заключающийся в том, что осуществляют дополнительную стадию выявления и/или измерения эффективности трансфекции либо путем выявления представляющего интерес белка, либо экспрессии репортерного гена.

Изобретение относится также к экспрессионному вектору, содержащему два полинуклеотида, где первый полинуклеотид кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственный домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производное либо мутант, а второй полинуклеотид кодирует представляющий интерес белок.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессионный вектор отличается тем, что несущий START-домен белок является представителем семейства несущих START-домен белков млекопитающих, таким как PCTP (SEQ ID NO: 27), StarD7, GPBP, StarD10, StarD8, StarD13, DLC-1, StarD4 (SEQ ID NO: 21), StarD6 (SEQ ID NO: 25), StarD5 (SEQ ID NO: 23), MLN64, StAR, THEA-2, CACH или StarD9, или его производным либо мутантом.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения экспрессионный вектор отличается тем, что несущий START-домен белок представляет собой белок-переносчик керамида CERT (CERT, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 11, или CERT<sub>L</sub>, последовательность которого представлена SEQ ID NO: 13) или его производное либо мутант.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессионный вектор отличается тем, что мутантный CERT представляет собой CERT<sub>S132A</sub> (SEQ ID NO: 15).

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессионный вектор отличается тем, что указанный первый полинуклеотид повышает белковый транспорт в клетке через секреторный путь.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессионный вектор отличается тем, что несущий START-домен белок представляет собой мутантный белок-переносчик керамида CERT, и эта мутация нарушает и/или удаляет сайт фосфорилирования в любом из положений серина, треонина или тирозина CERT.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессионный вектор отличается тем, что несущий START-домен белок представляет собой мутантный белок-переносчик керамида CERT, и указанная мутация нарушает и/или удаляет сайт фосфорилирования протеинкиназой D (PKD) в положении 132 CERT.

Настоящее изобретение относится также к клетке, содержащей экспрессионный вектор, предлагае-

мый в изобретении. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения клетка отличается тем, что указанная клетка представляет собой эукариотическую клетку, такую как клетка дрожжей, растений, червей, насекомых, птиц, рыб, рептилий или млекопитающих. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения клетка отличается тем, что указанная эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения клетка отличается тем, что указанная клетка млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO), почки обезьяны CV1, почки обезьяны COS, хрусталика глаза человека PER.C6TM, человеческого эмбриона, HEK293, детеныша китайского хомячка, почки африканской зеленой мартышки, человеческой карциномы шейки матки, почки собаки, печени крысы линии Буффало, человеческого легкого, человеческой печени, клетку мышины опухоли молочной железы или миеломы, клетку собаки, свиньи или макака, кролика, кошки, козы, предпочтительно CHO-клетку. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ отличается тем, что указанная CHO-клетка представляет собой CHO-клетку дикого типа, CHO K1, CHO DG44, CHO DUKX-B111, CHO Pro-5, предпочтительно CHO DG44.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения клетка отличается тем, что указанная клетка представляет собой клетку многоклеточного животного, такого как *C. elegans*. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения клетка отличается тем, что указанная клетка представляет собой клетку билатерально-симметричного животного, например *Drosophila melanogaster*, предпочтительно клетку позвоночного животного, например клетку птиц, рыб, рептилий или млекопитающих. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения клетка отличается тем, что указанная клетка представляет собой человеческую клетку, например линию клеток человеческой миеломы U266, HEK293, HeLa, HepG2 или HT1080, более предпочтительно клетку грызунов, например мышиную клетку линии NSO, Sp2/0 или Ag8653, YO или YB2.0.

Изобретение относится также к представляющему интерес белку, предпочтительно антителу, полученному с помощью любого из описанных способов.

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, содержащей полинуклеотидную последовательность, которую можно применять для блокады или снижения экспрессии белка, имеющего аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственной домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производного либо мутанта. Изобретение относится также к фармацевтической композиции, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая блокирует или снижает экспрессию белка, имеющего аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственной домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), или его производного либо мутанта.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция отличается тем, что последовательность START-домена представляет собой последовательность белка-переносчика церамида CERT (CERT, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 11, или CERT<sub>L</sub>, последовательность которого представлена SEQ ID NO: 13) или его производного либо мутанта.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция отличается тем, что START-домен имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 или 19, или ее производное либо мутант.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция отличается тем, что полинуклеотидная последовательность представляет собой агент для РНКi, siРНК или антисмысловую РНК.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция отличается тем, что несущий START-белок является представителем семейства несущих START-домен белков млекопитающих, таким как PCTP (SEQ ID NO: 27), StarD7, GPBP, StarD10, StarD8, StarD13, DLC-1, StarD4 (SEQ ID NO: 21), StarD6 (SEQ ID NO: 25), StarD5 (SEQ ID NO: 23), MLN64, StAR, THEA-2, CACH или StarD9, или его производным либо мутантом.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция отличается тем, что указанный полинуклеотид комплементарен нуклеотидной последовательности CERT или ее фрагменту, прежде всего START-домену.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция отличается тем, что указанный полинуклеотид связывается либо с геном CERT, либо с промотором CERT.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция отличается тем, что указанный полинуклеотид представляет собой антисмысловой олигонуклеотид к гену CERT или его фрагменту.

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, которая содержит ингибитор или супрессор белка, имеющего аминокислотную последовательность, которая содержит домен, родственной домену стероидогенного острого регуляторного белка-переносчика липидов (START), предпочтительно CERT (SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13), или его производного либо мутанта.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция от-



вариантов осуществления настоящего изобретения. Приведенные ниже примеры не направлены на ограничение объема изобретения. В них описаны только возможные варианты осуществления изобретения. Специалист в данной области легко может регулировать условия, которые можно применять в других вариантах осуществления изобретения.

#### Экспериментальный раздел

Материалы и методы.

Антитела и реагенты.

Применяют следующие антитела: кроличье поликлональное антитело к субстрату PKD (фирма Cell Signaling), мышинное моноклональное антитело к Flag (фирма Sigma-Aldrich), мышинное моноклональное антитело к GFP (фирма Roche), кроличье поликлональное антитело к PKD (C-20, фирма Santa Cruz Biotechnology), мышинное антитело к GS28 (фирма BD Biosciences) и мышинное антитело к тубулину (фирма Neomarkers). Фосфоспецифическое антитело к pS916 PKD, которое используют для осуществления мониторинга автофосфорилирования PKD, описано ранее (Hausser и др., 2002). Меченные пероксидазой вторичные антитела к мышинному и кроличьему IgG получают от фирмы Amersham; меченное щелочной фосфатазой вторичное антитело к мышинному IgG получают от фирмы Sigma; меченные Alexa Fluor 488- и 546 вторичные антитела к крысиному и кроличьему IgG получают от фирмы Molecular Probes.

Конструкции ДНК.

Полноразмерную кДНК CERT амплифицируют с помощью ПЦР, используя pсDNA3-Flag-CERT в качестве матрицы с праймерами, которые содержат сайт рестрикции EcoRI, и клонируют в векторе pEGFPc1. Создают точечные мутации CERT с помощью сайт-направленного ПЦР-мутагенеза с использованием набора типа Quikchange согласно инструкциям производителя (фирма Stratagene). Укороченные варианты CERT создают путем инсерции стоп-кодонов.

Применяют следующие олигонуклеотиды:

CERT-S132A (SEQ ID NO.1: 5'-  
cgtcgacatggcgcaatggtgtccctgg-3'), CERT-S132A rev (SEQ ID NO.2: 5'-  
ccagggacaccattgcgccatgtcgacg-3'), CERT-S272A (SEQ ID NO.3: 5'-  
ggttaaacgtgaggacgcctggcagaagagactgg-3'); CERT-S272Arev (SEQ ID NO.4: 5'-  
ccagtccttctgccaggcgtcctcacgtttaacc-3'), CERT, имеющий укорочение на  
аминокислоте 138 (CERT-138truncation) ((SEQ ID NO.5: 5'-  
gggtgccctgggtgtcttgagcaagtggctactc-3'); CERT-138truncation rev (SEQ ID NO.6: 5'-  
gagtagccacttgctcaagacaccaggacacc-3').

кДНК Flag-CERT субклонируют в pGEX6P1, используя сайты рестрикции EcoRI. pEGFP-N1-PKD и pEGFP-N1-PKD<sub>K612W</sub> описаны ранее (Hausser и др., 2005). Плазмида, кодирующая ss-HRP-Flag, любезно предоставлена Vivek Malhotra (UCSD).

кДНК и белки.

Человеческая: кДНК CERT (SEQ ID NO: 10)

atgtcggata atcagagctg gaactcgtcg ggctcggagg aggatccaga gacggagtct 60  
 gggccgcctg tggagcctg cggggtcctc agtaagtga caaactacat tcatgggtgg 120  
 caggatcgtt gggtagttt gaaaaataat gctctgagtt actacaaatc tgaagatgaa 180  
 acagagtatg gctgcagagg atccatctgt cttagcaagg ctgtcatcac acctcagat 240  
 ttgatgaat gtcgattga tattagtga aatgatagtg ttggtatct tctgctcag 300  
 gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga 360  
 tatggatctg aatccagctt gcgtcgacat ggctcaatgg tgctcctggf gctcggagca 420  
 agtggctact ctgcaacatc cactcttca ttaagaaaag gccacagttt acgtgagaag 480  
 ttggctgaaa tggaaacatt tagagacatc ttatgtagac aagttgacac gctacagaag 540  
 tactttgatg cctgtgctga tgctgtctct aaggatgaac ttcaaaggga taaagtggta 600  
 gaagatgatg aagatgactt lctacaacg cgttctgatg gtgacttctt gcatagtacc 660  
 aacggcaata aagaaaagtt atttccatc gtgacaccaa aaggaattaa tggatagac 720  
 tttaaagggg aagcgataac tttaaagca actactgctg gaatccttgc aacactttct 780  
 cattgtattg aactaatgtt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa 840  
 actgagaaga aaagaagaac agaggaagca tataaaaatg caatgacaga acttaagaaa 900  
 aatcccactt ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa 960  
 gagttctttg atgctgttga agctgtctct gacagacaag ataaataga agaacagtca 1020  
 cagagtgaaa aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgcctttct 1080  
 tctgtgggga cacatagatt tctccaaaag gttgaagaga tggtcagaa ccatatgact 1140  
 tactcattac aggatgtagg cggagatgcc aattggcagt tggttgaga agaaggagaa 1200  
 atgaaggat acagaagaga agtagaagaa aatgggattg ttctggatcc tttaaagct 1260  
 acctatgacg ttaaaggcgt cacaggacat gaagtctgca attattctg gaatgtagac 1320  
 gttcgaatg actgggaaac aactatagaa aactttcatg tggtggaac attagctgat 1380  
 aatgcaatca tcatatca aacacacaag aggggtgtgc ctgcttca gogagacgta 1440  
 ttatatctt ctgtcattc aaagatacca gccttgactg aaaatgacct tgaacttgg 1500  
 atagtttga attttctgt ggatcatgac agtctctc taaacaaccg atgtgtccgt 1560  
 gccaaaata atgttctat gattgtcaa acctggtaa gccaccaga gggaaaccag 1620  
 gaaattagca gggacaacat tctatgcaag attacatag tagctaatg gaacctgga 1680  
 ggatgggac cagcctcagt gttaaaggca gtggcaaagc gagagtatcc taaattcta 1740  
 aaacgttta ctcttactg ccaagaaaa actgcaggaa agcctattt gtctag 1797

человеческий: белок CERT (SEQ ID NO: 11)

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro  
 Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys  
 Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys  
 Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly  
 Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp  
 Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr  
 Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile  
 Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg  
 Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser  
 Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys  
 Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp  
 Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp  
 Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro  
 Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys  
 Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp  
 Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu  
 Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser  
 Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu  
 Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe  
 Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu  
 Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile  
 Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser  
 Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val  
 Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln  
 Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu  
 Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp  
 Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val  
 Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr  
 Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile  
 Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val  
 Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp  
 Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala  
 Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile  
 Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg  
 Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly  
 Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr  
 Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala  
 Gly Lys Pro Ile Leu Phe

человеческая: κДНК CERT<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 12)

gcaggaagat ggcggcggtg ggcgagggtg gagtggacgc gggactcagc ggccggattt 60  
 tctcttccct tcttttccct ttctctccc tatttgaat tggcatcgag ggggctaagt 120  
 tcgggtggca ggcggggcgc caacgcaggg gtcacggcga cggcggcggc ggctgacggc 180  
 tggaagggtg ggettcattc accgctctc ctctctctc gctccgctcg ggtcagggc 240  
 cggcggcggc gggcggggcg gactctctc ctctctctc tccccccac accggagcgg 300  
 gcactcttcc ctccgccat ccccgcacct taccgccag gactggggc ctctctcggc 360  
 gcagctgagg gagcgggggc cggctctctg ctcggttgc gagctccat gtcggataat 420  
 cagagctgga actcgtcggg ctccggaggag gatccagaga cggagtctgg gccgcctgtg 480  
 gagcgtctcg gggctctcag taagtggaca aactacattc atgggtggca ggatcgttgg 540  
 gtagtttga aaaataatgc tctgagttac tacaatctg aagatgaac agagtatggc 600  
 tgcagaggat ccatctgtct tagcaaggct gtcacacac ctcacgattt tgatgaatgt 660  
 cgatttgata ttagtgaata tgatagtgtt tggatcttc gtgctcagga tccagatcat 720  
 agacagcaat ggatagatgc cattgaacag cacaagactg aatctggata tggatctgaa 780  
 tccagcttgc gtcgacatgg ctcaatggtg tccctgggtg ctggagcaag tggctactct 840  
 gcaacatcca cctctcatt caagaaggc cacagttac gtgagaagtt ggctgaaatg 900  
 gaaacattta gagacatctt atgtagacaa gttgacacgc tacagaagta cttttagtcc 960  
 tgtgctgatg ctgtctctaa ggatgaactt caaagggata aagtggtaga agatgatgaa 1020  
 gatgacttcc ctacaacgcg ttctgatggt gacttcttgc atagtaccaa cggcaataaa 1080  
 gaaaagtatt tccacatgt gacacaaaa ggaattaatg gtatagactt taaaggggaa 1140  
 gcgataactt taaagcaac tactgctgga atccttgcaa cactttctca ttgtattgaa 1200  
 ctaatggta aacgtgagga cagctggcag aagagactgg ataaggaaac tgagaagaaa 1260  
 agaagaacag aggaagcata taaaatgca atgacagaac ttaagaaaaa atcccacttt 1320  
 ggaggaccag attatgaaga aggccctaac agtctgatta atgaagaaga gttctttgat 1380  
 gctgttgaag ctgtcttga cagacaagat aaaatagaag aacagtcaca gagtgaaaag 1440  
 gtgagattac attggcctac atccttgccc tctggagatg ccttttcttc tgtggggaca 1500  
 catagatttg tccaaaagcc ctatagtcgc tctctctcca tgtcttccat tgatctagtc 1560  
 agtgcctctg atgatgtca cagattcagc tcccagggtg aagagatggt gcagaaccac 1620  
 atgacttact cattacagga ttagggcggg gatgccaatt ggcagttggt ttagaagaaa 1680  
 ggagaaatga aggtatacag aagagaagta gaagaaatg ggattgttct ggatccttta 1740  
 aaagctacc cagcagttaa agcgtcaca ggacatgaag tctgcaatta ttcttggaat 1800  
 gttgacgttc gcaatgactg ggaacaact atagaaaact tcatgtggtt ggaaacatta 1860  
 gctgataatg caatcatcat ttatcaaaa cacaagaggg tgtggcctgc ttctcagcga 1920  
 gacgtattat atcttctgt cattcgaag ataccagcct tgactgaaaa tgaccctgaa 1980  
 acttgatag ttgtaatit ttctgtggat catgacagtg ctctctaaa caaccgatgt 2040  
 gfcctgcca aataaatgt tgctatgatt tgcacaacct tggtaagccc accagaggga 2100  
 aaccaggaaa ttagcaggga caacattcta tgcaagatta catatgtagc taatgtgaac 2160  
 cctggaggat gggcaccagc ctcaagtta agggcagttg caaagcgaga gtatcctaaa 2220  
 ttctaaaac gtttacttc ttacttcaa gaaaaactg caggaaagcc tattttgttc 2280  
 tagtattaac aggtactaga agatatttt tatcttttt taactttatt tgactaatat 2340  
 gactgcaat actaaaattt agttgtgaa agtatttact atgttttt 2389

человеческий: белок CERT<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 13)

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro  
 Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys  
 Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys  
 Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly  
 Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp  
 Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr  
 Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile  
 Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg  
 Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser  
 Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys  
 Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp  
 Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp  
 Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro  
 Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys  
 Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp  
 Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu  
 Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser  
 Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu  
 Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe  
 Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu  
 Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile  
 Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser  
 Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val  
 Gln Lys Pro Tyr Ser Arg Ser Ser Ser Met Ser Ser Ile Asp Leu Val  
 Ser Ala Ser Asp Asp Val His Arg Phe Ser Ser Gln Val Glu Glu Met  
 Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln Asp Val Gly Gly Asp Ala  
 Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu Met Lys Val Tyr Arg Arg  
 Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp Pro Leu Lys Ala Thr His  
 Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val Cys Asn Tyr Phe Trp Asn  
 Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr Ile Glu Asn Phe His Val  
 Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile Ile Tyr Gln Thr His Lys  
 Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val Leu Tyr Leu Ser Val Ile  
 Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp Pro Glu Thr Trp Ile Val  
 Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala Pro Leu Asn Asn Arg Cys  
 Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile Cys Gln Thr Leu Val Ser  
 Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg Asp Asn Ile Leu Cys Lys  
 Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly Gly Trp Ala Pro Ala Ser  
 Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr Pro Lys Phe Leu Lys Arg  
 Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala Gly Lys Pro Ile Leu Phe

человеческая: кДНК CERT S132A (SEQ ID NO: 14)

atgtcggata atcagagctg gaactcgtcg ggetcggagg aggatccaga gacggagtct 60  
 gggecgctg tggagecctg cggggctctc agtaagtgga caaactacat tcatgggtgg 120  
 caggatcgtt gggtagittt gaaaaataat gctctgagtt actcaaatc tgaagatgaa 180

acagagtatg gctgcagagg atccatctgt cttagcaagg ctgtcatcac acctcacgat 240  
 ttigtatgaat gtcgatttga tattagtgt aatgatagtg tttggtatct tctgtctcag 300  
 gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga 360  
 tatggatctg aatccagctt gcgtcgacat ggcgcaatgg tgctccctggt gtctggagca 420  
 agtggctact ctgcaacatc cacctcttca ttcaagaaag gccacagttt acgtgagaag 480  
 ttggctgaaa tggaaacatt tagagacatc ttatgtagac aagttgacac gctacagaag 540  
 tactttgatg cctgtgctga tgcgtctct aaggatgaac ttcaaaggga taaagtgtga 600  
 gaagatgatg aagatgactt tctacaacg cgttcigtat gtgacttctt gcatagtacc 660  
 aacggcaata aagaaaagtt attccacat gtgacacca aaggaattaa tggatatagac 720  
 tttaaagggg aagcgataac tttaaagca actactgctg gaatccttcg aacactttct 780  
 cattgtattg aactaatggt taaactgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa 840  
 actgagaaga aaagaagaac agaggaagca tataaaaatg caatgacaga acttaagaaa 900  
 aaatcccact ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa 960  
 gagtctttg atgctgttga agctgctctt gacagacaag ataaaataga agaacagtca 1020  
 cagagtgaaa aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgcctttct 1080  
 tctgtgggga cacatagatt tctccaaaag gttgaagaga tggtcagaa ccatagact 1140  
 tactcattac aggatgtagg cggagatgcc aattggcagt tggttgaga agaaggagaa 1200  
 atgaaggat acagaagaga agtagaagaa aatgggattg ttctggatcc tttaaaagct 1260  
 acccatgcag ttaaaggcgt cacaggacat gaagtctgca attattctg gaatgtgac 1320  
 gttcgcaatg actgggaaac aactatagaa aacttcatg tggtggaac attagctgat 1380  
 aatgcaatca tcattatca aacacacaag aggggtgtggc ctgcttctca gcgagacgta 1440  
 ttatatctt ctgctattcg aaagatacca gccttgactg aaaatgacc tgaacttgg 1500  
 atagtttga attttctgt ggatcatgac agtgctctc taacaaccg atgtgtccgt 1560  
 gccaaaataa atgtgctat gatitgtcaa accttggtaa gccaccaga gggaaccag 1620  
 gaaattagca gggacaacat tctatgcaag attacatag tagctaatgt gaacctgga 1680  
 ggatgggcac cagcctcagt gtttaaggca gtggcaaac gagagatcc taaattcta 1740  
 aaactttta ctcttactg ccaagaaaa actgcaggaa agcctatttt gttctag 1797

человеческий: белок CERT S132A (SEQ ID NO: 15)

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro  
 Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys  
 Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys  
 Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly  
 Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr  
 Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile  
 Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg  
 Arg His Gly Ala Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser  
 Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys  
 Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp  
 Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp  
 Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro  
 Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys  
 Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp  
 Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu  
 Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser  
 Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu  
 Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe  
 Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu  
 Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile  
 Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser  
 Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val  
 Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln  
 Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu  
 Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp  
 Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val  
 Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr  
 Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile  
 Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val  
 Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp  
 Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala  
 Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile  
 Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg  
 Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly  
 Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr  
 Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala  
 Gly Lys Pro Ile Leu Phe

человеческая: кДНК START-домена CERT (SEQ ID NO: 16)

agatttgcc aaaaggtga agatgggtg cagaaccaca tgacttactc attacaggat 60  
 gtagggggag atgccaattg gcagttgggt gtagaagaag gagaaatgaa ggtatacaga 120  
 agagaagtag aagaaaatgg gattgtctg gatccttaa aagetacca tgcagttaa 180  
 ggcgtcacag gacatgaagt ctgcaattat ttctggaatg ttgacgttcg caatgactgg 240  
 gaaacaacta tagaaaactt tcatgtggtg gaaacattag ctgataatgc aatcatcatt 300  
 tatcaaacac acaagagggt gtggcctgct tctcagcgag acgtattata tctttctgtc 360  
 atcgaaga taccagcctt gactgaaat gaccctgaaa ctggatagt ttgtaatttt 420  
 tctgtggatc atgacagtgc tcctctaac aaccgatgtg tccgtgcaa aataaatgtt 480  
 gctatgattt gtcaaacctt ggtaagccca ccagagggaa accaggaaat tagcaggggac 540  
 aacattctat gcaagattac atatgtagct aatgtgaacc ctggaggatg ggcaaccagcc 600  
 tcagtgttaa gggcagtggc aaagcgagag tatcctaaat ttctaaaacg ttttacttct 660  
 tacgtccaa 669

человеческий: несущий START-домен белок CERT (SEQ ID NO: 17)

Arg Phe Val Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr  
 Ser Leu Gln Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu  
 Glu Gly Glu Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile  
 Val Leu Asp Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly  
 His Glu Val Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp  
 Glu Thr Thr Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn  
 Ala Ile Ile Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln  
 Arg Asp Val Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr  
 Glu Asn Asp Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His  
 Asp Ser Ala Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val  
 Ala Met Ile Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu  
 Ile Ser Arg Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val  
 Asn Pro Gly Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys  
 Arg Glu Tyr Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln

человеческая: кДНК несущего START-домен CERT<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 18)

cagggtgaag agatggtgca gaaccacatg acttactcat tacaggatgt aggcggagat 60  
 gccaatggc agttggtgt agaagaagga gaaatgaagg tatacagaag agaagtagaa 120  
 gaaaatggga ttgtctgga tccttaaaa gctaccatg cagttaaagg cgtcacagga 180  
 catgaagtct gcaattattt ctggaatgtt gacgttcgca atgactggga aacaactata 240  
 gaaaacttct atgtgggtgga aacattagct gataatgcaa tcatcattta tcaaacacac 300  
 aagagggtgt ggcctgcttc tcagcgagac gtattatate ttctgtcat tcgaaagata 360  
 ccagccttga ctgaaaatga cctgaaact tggatagttt gtaattttc tgtggatcat 420  
 gacagtgtct ctctaaaca cccatgtgtc cgtgccaaaa taaatgtgc tatgattgt 480  
 caaaccttgg taagcccacc agagggaaac caggaaatta gcagggacaa cattctatgc 540  
 aagattacat atgtagctaa tgtgaacct ggaggatggg caccagcctc agtgttaagg 600  
 gcagtggcaa agcgagagta tctaaattt ctaaaccgtt ttacttctta cgtccaag 658

человеческий: несущий START-домен белок CERT<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 19)

Gln Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln Asp  
 Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu Met  
 Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp Pro  
 Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val Cys  
 Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr Ile  
 Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile Ile  
 Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val Leu  
 Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp Pro  
 Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala Pro  
 Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile Cys  
 Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg Asp  
 Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly Gly  
 Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr Pro  
 Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln

человеческая: кДНК StarD4 (SEQ ID NO: 20)

actggtgaga gcggtgtgag gtgcttgga ggcgcgcgta gctgctcca cgtccttgc 60  
 tcacctcagg taaagagaga agtaatggaa ggcctgtctg atgttgcttc ttttgcact 120  
 aaacttaaaa acactctcat ccagtaccat agcattgaag aagataagtg gcgagttgct 180  
 aagaaaaaga aagatgtaac tgtttggaga aaacctcag aagaatttaa tggatatctc 240  
 tacaagccc aaggtgttat agatgacctt gtctatagta taatagacca tatacgccea 300  
 gggccttgc gtttgattg ggacagcttg atgacttctt tggatattct ggagaacttt 360  
 gaagagaatt gctgtgtgat gcgttacct actgctgctc agctttggaa tataatttcc 420  
 ccaagagaat ttgttgattt ctctatact gtgggctata aagaaggctc tttatctgt 480  
 ggaataagtc ttgactggga tgaagaaga ccagaatttg ttcaggata taacctccc 540  
 tgtggttgg tttgttctc acttaagac aaccctaac agagctttt gacaggat 600

attcagacag atctgcgtgg gatgattcct cagtctgagg tagatacagc catggcaagc 660  
 actttaacca acttctatgg tgatttacga aaagctttat gagaggcaaa atacattcaa 720  
 actttagta ctacagatca actctctcag ctacatggcc tgtaaaaatc attgattcca 780  
 ctttctgca tagccggtag aaaaattga aatgttttg gttcactagt acaatgtttg 840  
 gttttatcc taaagtaaat agctatctaa gagaggcat ttcacittt tttttttaa 900  
 atttgagac aggcctcacc tctgtgccc atgctggagg gcagtggtat gatcacagct 960  
 cactcagct ttgatctgac cgctcaagg gttattctac ctcagcctcc tgaatagctg 1020  
 ggaatacagg tgcaogccac tatgcatggc taattttgt ttaattttt gtagagatgt 1080  
 ggtcacactg tgttgcccag gctggtcttg aactcctggc ctcaagtcat tccccactt 1140  
 agcctcccaa agtgttggga ttataagcgt gagccacat gcctggcccc aatttaaat 1200  
 gtggaattca gttggtgccc aagacttacc ttgagactct taaaagcacc agtctgtaac 1260  
 tagaacaat acagtcttag atttaccctaa gtgcctagat atcattttt aatgattaga 1320  
 attgagtatt gtgggtcccc taattctgtg ggtgccttaa gtgagaattt ctaaagtatt 1380  
 ttcacattct aaatgactit gggttttgaa ctctccatct agtttacttc taaaatggga 1440  
 acttgaggca attcaggtat ccaggcaaat cttgtatata atttttttg gtacatgcac 1500  
 acatctcgaa atccatttcc gtgttaatg ttagttgttt atgtgttagt atcctgtgt 1560  
 ctactgtttt gttgttfta atatgggtaa agtgagccct gaaatacatg ctaaacaaga 1620  
 catgaaatc agaaaggtac atagtgttc aagtgcattg tagtttgatc tgtgttttac 1680  
 tttattgtgt tttctgagt gtaaagaag aataaatcaa agttcttcat acccattttg 1740  
 acaaagtga acagtggagc tgtttttgc tttgttttt atttatttt tgccactggt 1800  
 gatgatagat ttcaaaaaac aaaaggtggc agcagcacia tgttcatggt gaattatctc 1860  
 atagtatcta gattgatcaa gatctgacag aaggaatgca caaaggattc tatattctta 1920  
 atgatttatt aattaccagg atccttttct aaattgaatg tactttttaa ttactaggtt 1980  
 tcttctttt tttgttctg caatagttaa agaaaactca gtagtttagt ttcagtttct 2040  
 catggaatg ggtaaatgtt agttttgact tcatctattt tttattgtt tttattagcg 2100  
 tagagtagga agtctcatat tctactgttc tatctaggat ggtgaaatc caaaggtgcc 2160  
 taacttgagt aagggatttg tgacaagata gtacacatta ctataagggc tattatttcc 2220  
 tgaactggat gtcctaaaa gcaataaac tgcccactat ctct 2264

человеческий: белок StarD4 (SEQ ID NO: 21)

Met Glu Gly Leu Ser Asp Val Ala Ser Phe Ala Thr Lys Leu Lys Asn  
 Thr Leu Ile Gln Tyr His Ser Ile Glu Glu Asp Lys Trp Arg Val Ala  
 Lys Lys Thr Lys Asp Val Thr Val Trp Arg Lys Pro Ser Glu Glu Phe  
 Asn Gly Tyr Leu Tyr Lys Ala Gln Gly Val Ile Asp Asp Leu Val Tyr  
 Ser Ile Ile Asp His Ile Arg Pro Gly Pro Cys Arg Leu Asp Trp Asp  
 Ser Leu Met Thr Ser Leu Asp Ile Leu Glu Asn Phe Glu Glu Asn Cys  
 Cys Val Met Arg Tyr Thr Thr Ala Gly Gln Leu Trp Asn Ile Ile Ser  
 Pro Arg Glu Phe Val Asp Phe Ser Tyr Thr Val Gly Tyr Lys Glu Gly  
 Leu Leu Ser Cys Gly Ile Ser Leu Asp Trp Asp Glu Lys Arg Pro Glu  
 Phe Val Arg Gly Tyr Asn His Pro Cys Gly Trp Phe Cys Val Pro Leu  
 Lys Asp Asn Pro Asn Gln Ser Leu Leu Thr Gly Tyr Ile Gln Thr Asp  
 Leu Arg Gly Met Ile Pro Gln Ser Ala Val Asp Thr Ala Met Ala Ser  
 Thr Leu Thr Asn Phe Tyr Gly Asp Leu Arg Lys Ala Leu

человеческая: κДНК StarD5 (SEQ ID NO: 22)

gagctccagc ctccaggcac ccgggatcca gcgccgccgc tcataacacc cgcgaccccg 60  
 cagctaagcg cagctccccg cgcaatggac ccggcgctgg cagcccagat gagcgaggct 120  
 gtggccgaga agatgtctca gtaccggcgg gacacagcag gctggaagat ttgccgggaa 180  
 ggcaatggag ttccagtctc ctggaggcca tctgtggagt tccagggaa cctgtaccga 240  
 ggagaagca ttgtatatgg gacactagag gaggtgtggg actgtgtgaa gccagctgtt 300  
 ggaggcctac gagtgaagtg ggalgagaat gtgaccggtt ttgaaattat ccaaagcacc 360  
 actgacaccc tgtgtglaag cagaacctcc actccctccg ctgcatgaa gctcatttct 420  
 cccagagatt ttgtggactt ggtgctagtc aagagatafg aggatgggac catcagttcc 480  
 aacgccacc atgtggagca tccgttatgt cccccgaagc caggttttgt gagaggattt 540  
 aaccatcctt gtggttctt ctgtgaacct cttccagggg aaccaccaa gaccaacctg 600  
 gtcacattt tccataccga cctcagcgtt tactccccc agaactggtt ggactccttc 660  
 tcccccgca gcatgacccg gttttatgcc aaccttcaga aagcagtga gcaattccat 720  
 gtagaatgct atcgttactt cttggcaaag aactccctg actcatcgag gagctccagc 780  
 tgttgggaca ccaaggagcc tgggagcacg cagaggcctg tgttactct ttggaacaag 840  
 ctgatggact gcgcatctct gagaatgcca accagaggcg gcagcccacc cttcctgctt 900  
 cctgcccacc tcagggttg cgtgtgatga gccattcatg tgttccaaac tccatctgcc 960  
 tgttacccaa acacgctct cctggcaggg tagaccagg cctetaacca tctgacagag 1020  
 actcggcctg gacacatgc gatgactct ggcaccaagg ctttatgtc ccatcactct 1080  
 cagagaccac gtttccctga ctgtcataga gaatcatcat cgcactgaa aaccaggccc 1140  
 tgttgccttt taagcatgta ccgtccctc agtctgtgc tgcagcccc caaatatatt 1200  
 tttctgatat agaccttcta tatggcttta atgccgaaa atattattt ttcctaaaa 1260  
 aagggtgcaa cttgaaata atggtttaa aacaggataa gcattaagga aaaacaaaaa 1320  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1344

человеческий: белок StarD5 (SEQ ID NO: 23)

Met Asp Pro Ala Leu Ala Ala Gln Met Ser Glu Ala Val Ala Glu Lys  
 Met Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Thr Ala Gly Trp Lys Ile Cys Arg Glu  
 Gly Asn Gly Val Ser Val Ser Trp Arg Pro Ser Val Glu Phe Pro Gly  
 Asn Leu Tyr Arg Gly Glu Gly Ile Val Tyr Gly Thr Leu Glu Glu Val  
 Trp Asp Cys Val Lys Pro Ala Val Gly Gly Leu Arg Val Lys Trp Asp  
 Glu Asn Val Thr Gly Phe Glu Ile Ile Gln Ser Ile Thr Asp Thr Leu  
 Cys Val Ser Arg Thr Ser Thr Pro Ser Ala Ala Met Lys Leu Ile Ser  
 Pro Arg Asp Phe Val Asp Leu Val Leu Val Lys Arg Tyr Glu Asp Gly  
 Thr Ile Ser Ser Asn Ala Thr His Val Glu His Pro Leu Cys Pro Pro  
 Lys Pro Gly Phe Val Arg Gly Phe Asn His Pro Cys Gly Cys Phe Cys  
 Glu Pro Leu Pro Gly Glu Pro Thr Lys Thr Asn Leu Val Thr Phe Phe  
 His Thr Asp Leu Ser Gly Tyr Leu Pro Gln Asn Val Val Asp Ser Phe  
 Phe Pro Arg Ser Met Thr Arg Phe Tyr Ala Asn Leu Gln Lys Ala Val  
 Lys Gln Phe His Glu

человеческая: κДНК StarD6 (SEQ ID NO: 24)

atggactca aggcaattgc ccaacaaact gcccaagaag tttaggta taatcgagat 60  
 acatcaggct ggaaagtgt taaaactca aaaaagataa ctgttccag taaggcttct 120  
 agaaaattcc atggaatct atatcgtgtt gaagggataa tccagaatc accagctaaa 180  
 ctatctgatt tecttacca aactggagac agaattacat gggataaatc attgcaagtg 240  
 tataatattg tacacaggat tgattcggac acattcatat gtcataccat tacacaaagt 300  
 ttgccgtgg gctccattc ccctcgagac ttatcgact tagtgtacat caagegctac 360  
 gaaggaaata tgaacattat cagttctaaa agtgtggatt tccagaata tectccatct 420  
 tcaaattata tccgcggta taaccatcct tgtggettg tatgttacc aatggaagaa 480  
 aaccagcat atccaact agtgategtt gtccagacag aatgagagg aaaattgtcc 540  
 ccatcaataa ttgaaaaac catgccttc aacttagtaa acttcatct caatgcaaaa 600  
 gatggaataa aggcacacag aactcatca agacgtggat tcatcataa tagtcattca 660  
 tga 663

человеческий: белок StarD6 (SEQ ID NO: 25)

Met Asp Phe Lys Ala Ile Ala Gln Gln Thr Ala Gln Glu Val Leu Gly  
 Tyr Asn Arg Asp Thr Ser Gly Trp Lys Val Val Lys Thr Ser Lys Lys  
 Ile Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Arg Lys Phe His Gly Asn Leu Tyr  
 Arg Val Glu Gly Ile Ile Pro Glu Ser Pro Ala Lys Leu Ser Asp Phe  
 Leu Tyr Gln Thr Gly Asp Arg Ile Thr Trp Asp Lys Ser Leu Gln Val  
 Tyr Asn Met Val His Arg Ile Asp Ser Asp Thr Phe Ile Cys His Thr  
 Ile Thr Gln Ser Phe Ala Val Gly Ser Ile Ser Pro Arg Asp Phe Ile  
 Asp Leu Val Tyr Ile Lys Arg Tyr Glu Gly Asn Met Asn Ile Ile Ser  
 Ser Lys Ser Val Asp Phe Pro Glu Tyr Pro Pro Ser Ser Asn Tyr Ile  
 Arg Gly Tyr Asn His Pro Cys Gly Phe Val Cys Ser Pro Met Glu Glu  
 Asn Pro Ala Tyr Ser Lys Leu Val Met Phe Val Gln Thr Glu Met Arg  
 Gly Lys Leu Ser Pro Ser Ile Ile Glu Lys Thr Met Pro Ser Asn Leu  
 Val Asn Phe Ile Leu Asn Ala Lys Asp Gly Ile Lys Ala His Arg Thr  
 Pro Ser Arg Arg Gly Phe His His Asn Ser His Ser

человеческая: κДНК PCTP (SEQ ID NO: 26)

ccggactgcg gaaggatgga gctggccgcc ggaagcttct cggaggagca gttctgggag 60  
 gcctgcgccg agctccagca gcccctctg gccggggccg actggcagct cctagtggag 120  
 acctcgggca tcagcatcta ccggctgctg gacaagaaga ctggacttca tgagtataaa 180  
 gcttttggtg ttctggagga ctgctacca actctactgg cagacatcta tatggactca 240  
 gattacagaa aacaatggga ccagatggtt aaagaactct atgaacaaga atgcaacgga 300  
 gagactgtgg tctactggga agtgaagtac ctttttccca tgccaacag agactatgtc 360  
 tacctctggc agcggcgaga cctggacatg gaagggagga agatccatgt gatcctggcc 420  
 cggagcacct ccatgcctca gcttggcgag aggtctgggg tgatccgggt gaagcaatac 480  
 aagcagagcc tggcgattga gagtgacggc aagaagggga gcaaagtttt catgtattac 540  
 ttogataacc cgggtggcca aattccgtcc tggtcatta actgggcccgc caagaatgga 600  
 gttcctaact tctgaaaga catggcaaga gcctgtcaga actacctcaa gaaaacctaa 660  
 gaaagagaac tgggaacatt gcatccatgg gttgatgtct ctggaagtgc aaccacccaa 720  
 tgtctctgga agtgccacct ggaagtggca cctggaagtg tctctggaag agcaccacc 780  
 actgttcagc cttcccctgc tgtttctgic ttcagaggcc tacacactac cacatccttt 840  
 ctaagcatgt ttgcctgaca tccagctcac tegtctgctt cttttctcgc tccccccatc 900  
 ctgggctggg ctgccttctt ctacagttca atatggggca gactagggaa acctttgctt 960  
 gcttactatt aggaggggaa gtcttcagta gggaacacga tcatccatt gtgcaatttt 1020  
 acggggatgg gtggcgggag ggacacaaca aaatthaaga atgactattt gggcgggctg 1080  
 gctcttttgc agcttgtgat ttcttcagc ttgggagggg ctgctggaag tggcatttgc 1140  
 ttcagagctg actttcagtg caccctaaact ggatgacgtg ccaatgtcca tttgccttat 1200  
 gcctttgga gctgattagg ctgggatttg aggtgataat ccagtaagtc ttctctggtt 1260  
 cctactgtg gaggatcagt agctgttatg atgccagacc atttggagaa gtatcagagg 1320  
 cctgaccgga cacataatac gacaaccaca tttttctca tcatccatga gaaatggat 1380  
 gatttctett ttccatagt cactggggga aaggctgctt gtaccttca agctttgcat 1440  
 ttactggaa actgaggcgt caagatggct gtggcagcta gcaaaagca agatgctttg 1500  
 tgcatagctt tgtgaaaag tatctttcta tgcataaaga tgaatttcc tcccagaata 1560  
 tttagaaatg tagaagggat aacagttcac agccaggtaa aatthaactg gttgcttaat 1620  
 gactctgcac ctttttctca ggaattctgc ctaagttgic tgccttttct accaccaaaa 1680  
 agacttttag tttctatgc tttctcctga atttggtag ggtaagtatt tctatgcaa 1740  
 aggcacagcc ttgatgatct cagggaaaaa ttttaacac tgtgtataat gatactgaac 1800  
 cttgattaat aacagaaatt caggatgtaa agccacagaa tgggatttat taatgtggga 1860  
 tacctcagac tgtttgtttt ctttctggga agaaaagtgt gttctataat gaataaatat 1920  
 agagtgtttt tt 1932

человеческий: белок PCTP (SEQ ID NO: 27)

Met Glu Leu Ala Ala Gly Ser Phe Ser Glu Glu Gln Phe Trp Glu Ala  
 Cys Ala Glu Leu Gln Gln Pro Ala Leu Ala Gly Ala Asp Trp Gln Leu  
 Leu Val Glu Thr Ser Gly Ile Ser Ile Tyr Arg Leu Leu Asp Lys Lys  
 Thr Gly Leu His Glu Tyr Lys Val Phe Gly Val Leu Glu Asp Cys Ser  
 Pro Thr Leu Leu Ala Asp Ile Tyr Met Asp Ser Asp Tyr Arg Lys Gln  
 Trp Asp Gln Tyr Val Lys Glu Leu Tyr Glu Gln Glu Cys Asn Gly Glu  
 Thr Val Val Tyr Trp Glu Val Lys Tyr Pro Phe Pro Met Ser Asn Arg  
 Asp Tyr Val Tyr Leu Arg Gln Arg Arg Asp Leu Asp Met Glu Gly Arg  
 Lys Ile His Val Ile Leu Ala Arg Ser Thr Ser Met Pro Gln Leu Gly  
 Glu Arg Ser Gly Val Ile Arg Val Lys Gln Tyr Lys Gln Ser Leu Ala  
 Ile Glu Ser Asp Gly Lys Lys Gly Ser Lys Val Phe Met Tyr Tyr Phe  
 Asp Asn Pro Gly Gly Gln Ile Pro Ser Trp Leu Ile Asn Trp Ala Ala  
 Lys Asn Gly Val Pro Asn Phe Leu Lys Asp Met Ala Arg Ala Cys Gln  
 Asn Tyr Leu Lys Lys Thr

Культивирование и трансфекция клеток.

Клетки линий HEK293T и COS7 выращивают в среде RPMI, дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS), в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Клетки линии HEK293T трансфектируют с помощью реагента TransIT293 (фирма Minis) согласно инструкциям производителя. Для анализа иммунофлуоресценции COS7-клетки выращивают на стеклянных покровных стеклах в течение 24 ч и трансфектируют реагентом Lipofectamine 2000 (фирма Invitrogen).

CHO-клетки, а также выведенные из CHO линии клеток, продуцирующие человеческий сывороточный альбумин (HSA) или человеческое моноклональное антитело типа IgG, культивируют в суспензии в бессывороточной среде в Т-колбах с поверхностной аэрацией (фирма Nunc, Дания) в инкубаторах (фирма Thermo, Германия) или встряхиваемых колбах (фирма Nunc, Дания) при температуре 37°C и в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Маточные посевные культуры пересевают каждые 2-3 дня с плотностью посева 2-3E5 клеток/мл. Концентрацию клеток определяют во всех культурах с помощью гемоцитометра. Жизнеспособность оценивают методом исключения трипанового синего. Все CHO-клетки-продуценты культивируют в являющихся собственностью фирмы-заявителя (VI) средах и их состав не имеет решающего значения.

Выведенные из CHO клетки трансфектируют, используя реагенты Lipofectamine™ и PLUS™ (оба от фирмы Invitrogen, Германия), согласно руководству, представленному производителем.

Культивирование методом периодической подпитки.

Клетки высевают из расчета  $3 \times 10^5$  клеток/мл в 125-мл встряхиваемые колбы в 30 мл являющейся собственностью VI среды для получения продукта без антибиотиков или среды с добавленным метотрексатом (MTX) (фирма Sigma-Aldrich, Германия). Культуры перемешивают при 120 об/мин при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, содержание которого снижается до 2% по мере увеличения количества клеток. Параметры культивирования, такие как pH, концентрации глюкозы и лактата, определяют ежедневно и при необходимости доводят значение pH до 7,0 с помощью NaCO<sub>3</sub>. Являющийся собственностью фирмы VI подпитывающий раствор добавляют каждые 24 ч. Плотность и жизнеспособность клеток определяют методом исключения трипанового синего с помощью автоматической системы для подсчета клеток CEDEX (фирма Innovatis). Образцы из жидкой культуры клеток собирают в дни 3, 5 и 7 и оценивают титры с помощью ELISA.

ELISA.

Количественную оценку молекул IgG в супернатанте клеточных клонов осуществляют методом "сэндвич"-ELISA. Планшеты для ELISA сенсibiliзируют козьим антителом к человеческому Fc-фрагменту IgG (фирма Dianova, Германия) при 4°C в течение ночи. После отмывки и блокады планшетов с помощью 1%-ного раствора БСА добавляют образцы и инкубируют в течение 1,5 ч. После отмывки добавляют идентифицирующее антитело (конъюгированное с щелочной фосфатазой козье антитело к человеческой легкой каппа-цепи) и осуществляют колориметрическое выявление путем инкубации с гексагидратом двуназриевой соли 4-нитрофенилфосфата (фирма Sigma, Германия) в качестве субстрата. После инкубации в течение 20 мин в темноте реакцию прекращают и немедленно оценивают абсорбцию с помощью ридера абсорбции (фирма Tecan, Германия) при 405/492 нм. Концентрацию рассчитывают с помощью стандартной кривой, определенной для каждого планшета.

Аналогично осуществляют количественную оценку секретируемого HSA в образцах культуры, используя антитела, входящие в набор Human Albumin ELISA Quantitation (фирма Bethyl Labs, шт. Texas, США), в соответствии с инструкциями производителя.

Иммунофлуоресцентная микроскопия.

Клетки отмывают ЗФР, который содержит магний и кальций, фиксируют в 4% параформальдегиде в течение 10 мин при комнатной температуре, промывают ЗФР, содержащим 0,1 М глицин, в течение 15 мин. Затем повышают проницаемость клеток с помощью ЗФР, содержащего 0,1% Triton, в течение 5 мин и затем блокируют 5%-ным раствором козьей сыворотки в ЗФР, который содержит 0,1% Tween-20, в течение 30 мин. Клетки инкубируют с первичным антителом, разведенным в блокирующем буфере, в течение 2 ч, затем инкубируют с вторичными антителами, разведенными в блокирующем буфере, в течение 1 ч. Покровные стекла помещают в Fluogomount G (фирма Southern Biotechnology) и анализируют клетки с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (TCS SL, фирма Leica) при длине волны возбуждения 488 и 543 нм с использованием линз объектива типа 40.0/1.25 HCX PL APO. Обработку изображений осуществляют с помощью программы Adobe Photoshop.

Экстракция, иммунопреципитация и вестерн-блоттинг белков.

Экстракты целых клеток получают солиubilизацией в содержащем NP40 буфере для экстракции (NEB) [50 mM трис (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM ортованадат натрия, 10 mM фторид натрия и 20 mM β-глицерофосфат плюс полный набор ингибиторов протеаз]. Лизаты осветляют центрифугированием при 16000×g в течение 10 мин. Для иммунопреципитации одинаковые количества белков инкубируют со специфическими антителами в течение 2 ч на льду. Иммуные комплексы собирают с использованием протеин G-сепарозы (фирма GE Healthcare) и отмывают NEB (см. выше). Экстракты целых клеток или полученные иммунопреципитацией белки кипятят в буфере для образцов и подвергают ДСН-ПААГ.

Белки блоттируют на мембраны из поливинилдифторида (фирма Roth). После блокады с помощью 0,5%-ного раствора блокирующего реагента (фирма Roche) в ЗФР, содержащем 0,1% Твин 20, фильтры зондируют специфическими антителами. Белки визуализируют сшитым с пероксидазой вторичным антителом, используя усовершенствованную систему определения хемилуминисценции (фирма Pierce). Расщепление мембран осуществляют в содержащем ДСН-буфере [62,5 мМ трис (рН 6,8), 2% ДСН и 100 мМ β-меркаптоэтанол] в течение 30 мин при 60°C. Затем мембраны повторно зондируют указанными антителами.

Очистка рекомбинантных белков и анализ киназ *in vitro*.

Бактериальный штамм BL21 трансформируют векторами pGEX6P-Flag-CERT(1-138) и CERT-S132A(1-138). Экспрессию индуцируют 0,5 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом в течение 4 ч при 30°C. Бактерии собирают и ресуспендируют в ЗФР, содержащем 50 мкг/мл лизоцима, полный набор ингибиторов протеаз (фирма Roche), 10 мМ фторид натрия и 20 мМ β-глицерофосфат. Добавляют Triton X-100 до конечной концентрации 1% перед облучением ультразвуком. Слитые белки GST-CERT очищают из осветленного лизата с помощью глутатионовой смолы (фирма GE Healthcare). Чистоту белковых препаратов подтверждают с помощью ДСН-ПААГ и окрашивания кумасси бриллиантовым голубым. Рекомбинантные белки инкубируют с очищенной PKD1 в киназном буфере [50 мМ трис, рН 7,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ ДТТ] в присутствии либо 2 мКи [γ-<sup>32</sup>P]-АТФ или 75 мкМ немеченой АТФ в течение 30 мин. Образцы разделяют с помощью ДСН-ПААГ, блоттируют на мембрану и анализируют с помощью PhosphorImager (фирма Molecular Dynamics) или вестерн-блоттингом с использованием антитела к субстрату PKD.

Анализ с использованием PIP-массивов.

Клетки линии HEK293T, кратковременно экспрессирующие меченные с помощью GFP CERT, собирают в гипотоническом буфере [50 мМ трис, рН 7,4, содержащем полный набор ингибиторов протеаз (фирма Roche), 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 5 мМ β-глицерофосфат и 5 мМ фторид натрия] и фрагментируют, пропуская через иглу калибра 25G/16. Получают цитозольную фракцию путем центрифугирования при 100000×g в течение 1 ч и оценивают количество экспрессируемого белка, измеряя пик испускания GFP при 480-550 нм (длина волны возбуждения 466 нм). PIP-массивы (фирма Echelon) блокируют в TBS-T [10 мМ трис, рН 8, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин-20], содержащем 3% БСА без жирных кислот (фирма Roth), после чего инкубируют с 500 мкг цитозоля, который содержит одинаковые количества белков GFP (регулируются с помощью цитозоля нетрансфектированных клеток) в 5 мл блокирующего буфера в течение 1 ч при комнатной температуре. Связанные белки выявляют инкубацией с антителом к GFP, а затем с конъюгированным с HRP вторичным антителом.

Анализ переноса церамида *in vitro*.

Опосредуемый белком перенос церамида между SUV оценивают согласно описанному ранее методу (Olayioye и др., 2005). Для анализа используют смесь, которая содержит пузырьки-доноры (2 нмоль липида/мл), содержащие липиды головного мозга свиней (фирма Avanti Polar Lipids), меченный пиреном C<sub>16</sub>-церамид и 2,4,6-тринитрофенил-фосфатидилэтаноламин (TNP-PE) (88,6:0,4:11 мол.%), предоставленные P. Somerhaug, и 10-кратный избыток пузырьков-акцепторов, состоящих из липидов головного мозга свиней. Интенсивность флуоресценции оценивают при 395 нм (длина волны возбуждения, 345 нм; ширина щели, 4 нм) до и после добавления 75 мкг цитозоля клеток линии HEK293T, кратковременно экспрессирующих меченные с помощью GFP белок CERT дикого типа и мутантный белок S132A (см. выше). Интенсивности флуоресценции стандартизируют относительно (I) максимальной интенсивности, полученной после добавления Triton X-100 (конечная концентрация 0,5%), и (II) максимальной флуоресценции GFP для учета различных уровней экспрессии белков.

Анализ транспорта HRP.

Клетки линии HEK293T совместно трансфектируют плазмидой ss-HRP-Flag и незагруженным вектором, pEGFP-N1-PKD1KD, pcDNA3-Flag-CERT wt и pcDNA3-Flag-CERT-S132A в соотношении 1:6,5 соответственно. Через 24 ч после трансфекции клетки отмывают бессывороточными средами и секрецию HRP оценивают количественно через 0, 1, 3 и 6 ч путем инкубации осветленного клеточного супернатанта с ECL-реагентом. Для измерения применяют люцинометр (тип Lucy2, фирма Anthos) при 450 нм.

Анализ siPHK.

Клетки линии COS7 трансфектируют вектором, кодирующим ssHRP-Flag, собирают через 8 ч, помещают в лунки в трех повторностях и затем трансфектируют специфическими для CERT олигонуклеотидами siPHK (siCERT № 1, SEQ ID NO: 7: 5'-ccacaugacuuacucuuatt-3'; siCERT № 2, SEQ ID NO: 8: 5'-gaacagaggaagcauaaatt-3') с использованием реагента Oligofectamine™ (фирма Invitrogen) согласно инструкциям производителя. Контрольные клетки трансфектируют либо имитатором, либо специфической для lacZ siPHK (SEQ ID NO: 9: 5'-gcggcugccggaauuuacstt-3'). Через 48 ч клетки отмывают и добавляют свежую среду. Уровень HRP, секретируемой в супернатант, оценивают путем анализа хемилуминисценции, который описан выше. И, наконец, клетки лизируют, объединяют по три повторности лизата и анализируют иммуноблоттингом, используя специфические антитела к рецептору тубулина и трансферрина.

### Примеры

Пример 1. Внутриклеточное накопление продукта является узким местом секреции.

Периодический процесс с подпиткой осуществляли с использованием трех различных клонов СНО-клеток-продуцентов, которые экспрессируют человеческое антитело типа IgG (процесс А, В и М соответственно, см. фиг. 1). Отбирали образцы клеток через день и определяли уровень внутриклеточного антитела с помощью FACS-анализа. В целом, метод состоял в следующем: клетки фиксировали с использованием 3ФР/4% ПФА (парафторфенилаланин), повышали их проницаемость и окрашивали конъюгированным с ФИТЦ антителом к человеческой легкой каппа-цепи. В течение первых четырех дней содержание внутриклеточного IgG оставалось на постоянном уровне. Однако в период с 5 до 9 день уровень внутриклеточного продукта постоянно возрастал, что свидетельствует о накоплении в клетке либо неправильно уложенной легкой цепи, либо даже продукта в виде полного антитела. Эти данные являются результатом трех независимых процессов получения с использованием различных клонов клеток-продуцентов, и они с большой долей уверенности позволяют предположить, что в клетке происходит транскрипция большего числа копий РНК антитела, чем белков, секретируемых в среду, и это в результате создает узкое место для посттрансляционных процессов, что препятствует полной секреции продуцируемого антитела (фиг. 1).

Пример 2. CERT выявляется антителом к субстрату PKD.

PKD является имеющим решающее значение регулятором в комплексе Гольджи, при этом PI4KIII $\beta$  представляет собой единственный идентифицированный к настоящему времени ее субстрат. Для решения вопроса о том, может ли локализованный в комплексе Гольджи белок CERT (SEQ ID NO: 11 и 13) служить субстратом для PKD, при создании изобретения применяли фосфоспецифическое антитело к субстрату, обозначенное как pMOTIF, которое образуется к консенсусным мотивам фосфорилируемым PKD (Dorfler и др., 2005). Клетки линии HEK293T трансфектировали экспрессионными векторами, кодирующими меченные с помощью Flag CERT (SEQ ID NO: 10) и CERT<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 12). Изоформы CERT подвергали иммунопреципитации с использованием специфических антител к Flag и анализировали методом вестерн-блоттинга с использованием антитела pMOTIF (фиг. 4А). Обнаружен сигнал pMOTIF, соответствующий молекулярной массе CERT (SEQ ID NO: 11), и более слабый, соответствующий CERT<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 13). Более слабое выявление фосфорилированной изоформы CERT<sub>L</sub> может быть связано с известной способностью этой изоформы образовывать агрегаты, которые могут влиять на доступность фосфосайта для киназ (Raya и др., 2000).

Для исследования, зависит ли распознавание CERT антителом pMOTIF от PKD, при создании изобретения экспрессировали CERT в сочетании с вариантом PKD1 с выключенным киназным доменом (K621W) в клетках линии HEK293T. Было установлено, что этот мутант локализован в комплексе Гольджи и подавляет фосфорилирование PI4KIII $\beta$  по доминантно-негативному типу (Hausser и др., 2005). Совместная экспрессия неактивной PKD приводила к тому, что CERT больше не выявлялся с помощью pMOTIF, это позволяет предположить, что сигнал pMOTIF действительно является результатом опосредуемого PKD фосфорилирования CERT (фиг. 4Б).

Белки-переносчики липидов, вероятно, проявляют активность в сайтах мембранного контакта (MCS), которые образуются между ЭР и TGN (Levine и Loewen, 2006), где локализована PKD. Иммунофлуоресцентное окрашивание меченного с помощью Flag CERT в COS7-клетках, в которых одновременно происходит экспрессия меченной с помощью GFP PKD1, продемонстрировало, что эти два белка совместно локализованы в комплексе Гольджи (фиг. 4В). В сочетании эти данные подтверждают, что CERT является субстратом PKD в аппарате Гольджи.

Пример 3. PKD фосфорилирует CERT на серине 132.

Для идентификации распознаваемых pMOTIF сайтов в CERT при создании изобретения осуществляли поиск потенциальных консенсусных мотивов для PKD, характеризующихся присутствием остатка лейцина, изолейцина или валина в положении-5 и аргинина в положении-3 относительно остатка серина или треонина. Два остатка серина в положении 132 и 272, соответствующих консенсусному мотиву для PKD и являющихся консервативными для разных видов (фиг. 5А), заменяли на остатки аланина с помощью сайт-направленного мутагенеза. Эти мутанты экспрессировали в HEK293T-клетках и оценивали в отношении их распознавания антителом pMOTIF. Важно отметить, что мутация, приводящая к замене серина 132 на аланин, аннулировала выявление CERT с помощью антитела pMOTIF и приводила к повышению электрофоретической подвижности, свидетельствующей о потере фосфорилирования, в то время как мутация S272A не влияла на сигнал pMOTIF (фиг. 5Б). Эти результаты позволяют предположить, что серин в положении 132 является сайтом фосфорилирования PKD, специфически распознаваемым антителом к субстрату PKD. Для подтверждения того факта, что PKD обладает способностью непосредственно фосфорилировать этот остаток серина в CERT, при создании изобретения осуществляли анализы киназной активности *in vitro* с использованием очищенной PKD1 и рекомбинантных слитых белков CERT-GST, которые продуцировались в *E. coli*, содержащих первые 138 аминокислот белка. Когда укороченный слитый белок CERT дикого типа инкубировали с PKD1 в присутствии [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-АТФ, было обнаружено включение радиоактивности (фиг. 5В). Включение существенно нарушалось в случае

слитого белка CERT-S132A. *In vitro* фосфорилирование с помощью PKD белка дикого типа, но не мутантного белка CERT-S132A, является дополнительным подтверждением создания сайта, распознаваемого антителом pMOTIF (фиг. 5Г). В сочетании эти результаты доказывают, что CERT является подлинным субстратом PKD *in vitro* и *in vivo* и свидетельствуют о том, что серин 132 является специфическим сайтом фосфорилирования PKD в CERT.

Пример 4. Фосфорилирование CERT на серине 132 модулирует PI(4)P-связывание и активность в отношении переноса церамида.

Серин 132 находится в очень тесной близости к PH-домену CERT (аминокислоты 23-117), что позволяет предположить, что фосфорилирование этого сайта влияет на PI(4)P-связывание в результате увеличения местного отрицательного заряда. По этой причине при создании изобретения оценивали PI(4)P-связывание CERT дикого типа и мутантного CERT-S132A (SEQ ID NO: 15), осуществляя перекрывающиеся анализы белков-липидов. Для этой цели цитозоль из клеток линии HEK293T, кратковременно экспрессирующих варианты CERT, инкубировали с мембранами, на которые были точно нанесены градиенты концентраций различных фосфоинозитидов, и связанные белки CERT выявляли с помощью метки GFP. Как описано ранее, полноразмерные белки дикого типа характеризуются слабой способностью к связыванию с некоторыми видами фосфолипидов, но обладают способностью к сильному связыванию с PI(4)P (Hanada и др., 2003; Levine и Munro, 2002). Связывание CERT-S132A с PI(4)P было обнаружено при концентрациях в 2-4 раза более низких по сравнению с белком дикого типа, что позволяет предположить повышенную аффинность мутанта CERT-S132A к этому фосфолипиду (фиг. 6А).

В сочетании эти данные свидетельствуют о том, что CERT, будучи связанным с комплексом Гольджи, фосфорилируется PKD. В результате происходит снижение аффинности CERT к PI(4)P, и это регулирует взаимодействие CERT с мембранами комплекса Гольджи.

Установлено, что белок CERT функционирует в качестве белка-переносчика липидов (Hanada и др., 2003). Поэтому при создании изобретения было изучено, влияет ли фосфорилирование CERT на остатке серина 132 на его способность связываться с церамидом и переносить его между мембранами. Для этой цели меченные с помощью GFP версии CERT дикого типа и CERT-S132A кратковременно экспрессировали в HEK293T-клетках и в цитозольной фракции анализировали специфическую для церамида активность в отношении липидного транспорта с помощью FRET-анализа (фиг. 6Б). В этом анализе применяли небольшие однослойные пузырьки, содержащие меченный с помощью пирена церамид в качестве донора флуоресценции, и необходимое для гашения количество TNP-PE с мечеными головными группами (Olajoye и др., 2005; Somerharju, 2002). Когда эти донорские липосомы смешивали с избытком немеченых акцепторных липосом, то увеличение флуоресценции пирена было незначительным, что свидетельствует о минимальном спонтанном переносе церамида на акцепторные мембраны (данные не представлены). После добавления содержащего CERT дикого типа цитозоля отмечено стабильное увеличение флуоресценции, которое не обнаружено при использовании цитозоля клеток, трансфектированных контрольным вектором (фиг. 6Б). По сравнению с белком дикого типа для CERT-S132A характерна более высокая скорость переноса липидов, что свидетельствует о более быстром повышении флуоресценции пирена. Эти результаты позволяют предположить, что фосфорилирование CERT на серине 132 оказывает регулирующее действие по типу отрицательной связи на активность переноса церамида путем снижения ассоциации белка с мембранами.

В полученных ранее данных уже установлено, что PKD регулирует уровень PI(4)P в комплексе Гольджи путем опосредуемой фосфорилированием активации PI4KIII $\beta$  (Hausser и др., 2005). Важно отметить, что PI4KIII $\beta$  имеет решающее значение для транспорта церамида между ЭР и комплексом Гольджи (Toth и др., 2006). Таким образом, в сочетании с данными, полученными при создании настоящего изобретения, становится очевидной двойная роль PKD в поддержании липидного гомеостаза в мембранах комплекса Гольджи, заключающаяся в контроле реакции ассоциации (on-rate) (через уровни PI(4)P) и реакции диссоциации (off-rate) (через прямое фосфорилирование) CERT.

Пример 5. CERT регулирует активацию PKD и секреторный транспорт.

При создании изобретения была высказана гипотеза о том, что сверхэкспрессия CERT в результате переноса церамида должна приводить к получению увеличенного местного уровня DAG и, как следствие, может стимулировать активность PKD. Для решения этого вопроса меченные Flag CERT дикого типа (SEQ ID NO: 10) и CERT-S132A (SEQ ID NO: 14) кратковременно экспрессировали в клетках линии HEK293T. Лизаты целых клеток приготавливали через 24 ч после трансфекции и подвергали ДСН-ПААГ. Активацию PKD анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием фосфоспецифического антитела к pS916 PKD (фиг. 7А, верхняя панель). Одинаковую загрузку подтверждали повторным зондированием специфическим для PKD антителом (фиг. 7А, средняя панель). Экспрессию белков CERT подтверждали иммуноблоттингом с использованием специфического для Flag антитела (фиг. 7А, нижняя панель). По сравнению с контролем экспрессия и CERT дикого типа, и CERT-S132A повышала активность PKD, что доказано с помощью анализа фосфоспецифического антитела к PKD. Это свидетельствует о том, что активация PKD регулируется белками CERT, вероятно, благодаря повышенному транспорту церамида и усиленному синтезу SM/DAG.

Для решения вопроса о том, может ли опосредуемая CERT активация PKD действительно приводить к повышенному секреторному транспорту, при создании изобретения использовали плазмиду, кодирующую секретируемую пероксидазу из хрена (HRP-ss), которую можно применять в качестве репортера для конститутивной секреции белка. Клетки линии НЕК293Т совместно трансфектировали экспрессионной плазмидой, кодирующей Flag-ss-HRP, или незагруженным вектором, и меченой GFP PKD1 с выключенным киназным доменом (KD), Flag-CERT дикого типа (WT) и Flag-CERT-S132A соответственно. Через 24 ч после трансфекции клетки отмывали и добавляли свежую среду. В супернатанте анализировали пероксидазную активность через 0, 1, 3 и 6 ч с помощью хемилюминисценции. В контрольных клетках секреция ss-HRP могла быть обнаружена через 1 ч, и она повышалась с течением времени (фиг. 7Б). Совместная экспрессия с GFP с выключенным киназным доменом, которая ингибирует секреторный транспорт карго-белка, полностью аннулировала секрецию ss-HRP в супернатант. Результат этого анализа подтвердил, что секреция HRP зависит от PKD. В противоположность этому коэкспрессия CERT дикого типа и CERT-S132A заметно снижала уровень секретируемой HRP (фиг. 7Б), при этом у мутанта обнаружена даже несколько более высокая активность по сравнению с CERT дикого типа. В этом эксперименте продемонстрировано, что сверхэкспрессия CERT стимулирует фосфорилирование PKD и при применении функционального анализа повышает секрецию внеклеточного белка в культуральную среду примерно в 2 раза.

При создании изобретения определяли также, может ли сверхэкспрессия мутанта CERT-S132A влиять на его локализацию и/или вызывать морфологические изменения в аппарате Гольджи. Продемонстрирована совместная локализация CERT с маркером цис/промежуточного компартмента аппарата Гольджи GS28 (Hanada и др., 2003).

Иммунофлуоресцентный анализ меченого с помощью GFP CERT, экспрессируемого в COS7-клетках, продемонстрировал, что белок локализован в GS28-позитивных областях комплекса Гольджи (фиг. 7В). В противоположность этому, помимо частичной совместной локализации вместе с GS28 в комплексе Гольджи, для мутантного белка CERT-S132A характерно рассеянное пятнистое окрашивание. Установлено, что некоторые из этих везикулярных структур содержат карго-белок ss-HRP, что является доказательством того, что эти структуры действительно представляют собой выведенные из комплекса Гольджи транспортные носители (фиг. 7Г). Эти результаты согласуются с обнаруженными изменениями в структуре мембран комплекса Гольджи из-за местного повышения уровней церамида (Fukunaga и др., 2000; Weigert и др., 1999).

Пример 6. Регуляция по типу отрицательной связи CERT с помощью РНК-интерференции ингибирует секреторный транспорт.

Полученные при создании настоящего изобретения данные убедительно демонстрируют, что сверхэкспрессия CERT повышает секрецию белков. Для решения вопроса о наличии противоположного действия, т.е. что пониженная экспрессия CERT должна приводить к снижению секреции, осуществляли эксперименты с использованием siРНК. Клетки линии COS7 трансфектировали вектором, кодирующим ssHRP-Flag, собирали через 8 ч, помещали в лунки в трех повторностях и затем трансфектировали специфическими для CERT олигонуклеотидами siРНК (SEQ ID NO: 7 и 8) или либо имитатором, либо специфической для lacZ siРНК (SEQ ID NO: 9) в качестве контролей. Через 48 ч клетки отмывали, покрывали свежей средой и оценивали уровень HRP, секретируемой в супернатант, после определенных промежутков времени.

Как видно из фиг. 8А, активность HRP была обнаружена через 3 ч и находилась практически на одинаковом уровне в обеих линиях контрольных клеток. В отличие от этого обнаружено резкое снижение HRP-активности в клетках, обработанных специфическими для CERT олигонуклеотидами siРНК. Это свидетельствует о том, что пониженные уровни CERT приводят к пониженной секреции HRP из клеток и, кроме того, подтверждает важную роль CERT в секреторном транспорте.

Важно отметить, что снижение CERT влияет не только на секрецию белков, но также и на уровень трансмембранного белка рецептора трансферрина (фиг. 8Б). Когда клетки, представленные на фиг. 8А, объединяли и лизаты зондировали специфическими антителами к рецептору трансферрина в экспериментах методом вестерн-блоттинга, то было обнаружено значительное снижение количества рецепторов трансферрина, в то время как в обеих линиях контрольных клеток сохранялись близкие уровни рецепторов трансферрина.

Эти данные позволяют предположить, что белок-переносчик CERT принимает участие в транспорте не только секретируемых, но также и расположенных в мембранах белков клеточной поверхности. Это не является неожиданным, поскольку оба типа белков одинаково транспортируются в липидных пузырьках из ЭР через комплекс Гольджи в плазматическую мембрану и таким образом используют одни и те же пути клеточного экспорта, на которые, как впервые установлено при создании настоящего изобретения, влияет CERT.

Пример 7. Сверхэкспрессия CERT повышает производство биофармацевтического белка, такого как антитело.

а. Продуцирующую антитело линию CHO-клеток (CHO DG44), которая секретирует антитело к CD44v6 типа IgG (BIWA 4), трансфектировали незагруженным вектором (контроль-имитатор) или экс-

прессионными конструкциями, которые кодируют CERT дикого типа (SEQ ID NO: 10 и 12) или мутантный CERT, несущий точечную мутацию Ser132A (SEQ ID NO: 14), и затем подвергали отбору для получения стабильных клеточных пулов. При осуществлении шести последовательных пассажей отбирали образцы супернатантов из маточных посевных культур всех стабильных клеточных пулов, определяли титр IgG с помощью ELISA и делили на среднее количество клеток, рассчитывая удельную продуктивность (фиг. 10А). Наиболее высокие значения обнаружены в клеточных пулах, содержащих мутант CERT (SEQ ID NO: 14), далее в порядке уменьшения следовали клетки, содержащие CERT дикого типа (SEQ ID NO: 10 или 12). В обоих случаях экспрессия IgG оказалась существенно более высокой по сравнению с содержащими имитатор или нетрансфектированными клетками. Очень близкие результаты можно получать, если стабильных трансфектантов подвергать периодической ферментации или периодической ферментации с подпиткой (фиг. 10Б). В каждом из этих вариантов сверхэкспрессия и дикого типа, и мутантного CERT приводила к повышенной секреции антитела, что свидетельствует о том, что CERT может повышать характеристики удельной продуктивности при выращивании клеток в виде серийных культур или в биореакторе в виде периодических культур или периодических культур с подпиткой.

б. CHO-клетки-хозяева (CHO DG44) сначала трансфектировали векторами, которые кодируют CERT дикого типа (SEQ ID NO: 10 или 12) или мутантный CERT, который несет точечную мутацию Ser132A (SEQ ID NO: 14). Клетки подвергали давлению отбора и отбирали клеточные линии, для которых характерна гетерологичная экспрессия CERT или мутанта CERT. Затем эти клеточные линии и параллельно клетки CHO DG 44 дикого типа трансфектировали векторами, кодирующими гуманизированное антитело к CD44v6 типа IgG BIWA 4, в качестве представляющего интерес гена. После второго цикла отбора при осуществлении шести последовательных пассажей отбирали образцы супернатантов из маточных посевных культур всех стабильных клеточных пулов, определяли титр IgG с помощью ELISA и делили на среднее количество клеток, рассчитывая удельную продуктивность. Наиболее высокие значения обнаружены в клеточных пулах, содержащих мутант CERT (SEQ ID NO: 14), далее в порядке уменьшения следовали клетки, содержащие CERT дикого типа (SEQ ID NO: 10 или 12). В обоих случаях экспрессия IgG оказалась существенно более высокой по сравнению с клетками, в которых отсутствовала гетерологичная экспрессия CERT или мутанта CERT. Очень близкие результаты можно получать, если стабильных трансфектантов подвергать периодической ферментации или периодической ферментации с подпиткой. В каждом из этих вариантов сверхэкспрессия и дикого типа, и мутантного CERT приводила к повышенной секреции антитела, что свидетельствует о том, что CERT может повышать характеристики удельной продуктивности при выращивании клеток в виде серийных культур или в биореакторе в виде периодических культур или периодических культур с подпиткой.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гетерологичная экспрессия CERT и, прежде всего, мутанта CERT может повышать секрецию антитела в кратковременно трансфектированных, а также стабильно трансфектированных линиях CHO-клеток.

Пример 8. Сверхэкспрессия CERT повышает производство биофармацевтического белка, такого как хемоаттрактивный белок 1 моноцитов (MCP-1).

а. Линию CHO-клеток (CHO DG44), которая секретирует хемоаттрактивный белок 1 моноцитов (MCP-1), трансфектировали незагруженным вектором (контроль-имитатор) или экспрессионными конструкциями, которые кодируют CERT дикого типа (SEQ ID NO: 10 и 12) или мутантный CERT, несущий точечную мутацию Ser132A (SEQ ID NO: 14), и затем подвергали отбору для получения стабильных клеточных пулов. При осуществлении шести последовательных пассажей отбирали образцы супернатантов из маточных посевных культур всех стабильных клеточных пулов, определяли титр MCP-1 с помощью ELISA и делили на среднее количество клеток, рассчитывая удельную продуктивность. Наиболее высокие значения обнаружены в клеточных пулах, содержащих мутант CERT, далее в порядке уменьшения следовали клетки, содержащие CERT дикого типа. В обоих случаях экспрессия MCP-1 оказалась существенно более высокой по сравнению с содержащими имитатор или нетрансфектированными клетками. Очень близкие результаты можно получать, если стабильных трансфектантов подвергать периодической ферментации или периодической ферментации с подпиткой. В каждом из этих вариантов сверхэкспрессия и дикого типа, и мутантного CERT приводила к повышенной секреции MCP-1, что свидетельствует о том, что CERT может повышать характеристики удельной продуктивности при выращивании клеток в виде серийных культур или в биореакторе в виде периодических культур или периодических культур с подпиткой.

б. CHO-клетки-хозяева (CHO DG44) сначала трансфектировали векторами, которые кодируют CERT дикого типа (SEQ ID NO: 10 или 12) или мутантный CERT, который несет точечную мутацию Ser132A (SEQ ID NO: 14). Клетки подвергали давлению отбора и отбирали клеточные линии, для которых характерна гетерологичная экспрессия CERT или мутанта CERT. Затем эти клеточные линии и параллельно клетки CHO DG 44 дикого типа трансфектировали вектором, кодирующим хемоаттрактивный белок 1 моноцитов (MCP-1), в качестве представляющего интерес гена. После второго цикла отбора при осуществлении шести последовательных пассажей отбирали образцы супернатантов из маточных посевных культур всех стабильных клеточных пулов, определяли титр MCP-1 с помощью ELISA и делили на среднее количество клеток, рассчитывая удельную продуктивность. Наиболее высокие значения обнару-

жены в клеточных пулах, содержащих мутант CERT, далее в порядке уменьшения следовали клетки, содержащие CERT дикого типа. В обоих случаях экспрессия MCP-1 оказалась существенно более высокой по сравнению с клетками, в которых отсутствовала гетерологичная экспрессия CERT или мутанта CERT. Очень близкие результаты можно получать, если стабильных трансфектантов подвергать периодической ферментации или периодической ферментации с подпиткой. В каждом из этих вариантов сверхэкспрессия и дикого типа, и мутантного CERT приводила к повышенной секреции MCP-1, что свидетельствует о том, что CERT может повышать характеристики удельной продуктивности при выращивании клеток в виде серийных культур или в биореакторе в виде периодических культур или периодических культур с подпиткой.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гетерологичная экспрессия CERT и, прежде всего, мутанта CERT, может повышать секрецию отдельных клеточных белков в кратковременно трансфектированных, а также стабильно трансфектированных линиях CHO-клеток.

Пример 9. Сверхэкспрессия CERT повышает производство биофармацевтического белка, такого как трансмембранный белок рецептора эпителиального фактора роста (EGFR).

а. Линию CHO-клеток (CHO DG44), которая секретирует трансмембранный белок рецептора эпителиального фактора роста (EGFR), трансфектировали незагруженным вектором (контроль-имитатор) или экспрессионными конструкциями, которые кодируют CERT дикого типа (SEQ ID NO: 10 и 12) или мутантный CERT, несущий точечную мутацию Ser132A (SEQ ID NO: 14), и затем подвергали отбору для получения стабильных клеточных пулов. При осуществлении шести последовательных пассажей отбирали образцы супернатантов из маточных посевных культур всех стабильных клеточных пулов, определяли уровень EGFR с помощью FACS или вестерн-блоттинга. Наиболее высокие значения обнаружены в клеточных пулах, содержащих мутант CERT, далее в порядке уменьшения следовали клетки, содержащие CERT дикого типа. В обоих случаях экспрессия EGFR оказалась существенно более высокой по сравнению с содержащими имитатор или нетрансфектированными клетками. Очень близкие результаты можно получать, если стабильных трансфектантов подвергать периодической ферментации или периодической ферментации с подпиткой. В каждом из этих вариантов сверхэкспрессия и дикого типа, и мутантного CERT приводила к повышенной экспрессии EGFR, что свидетельствует о том, что CERT может повышать характеристики удельной продуктивности при выращивании клеток в виде серийных культур или в биореакторе в виде периодических культур или периодических культур с подпиткой.

б. CHO-клетки-хозяева (CHO DG44) сначала трансфектировали векторами, которые кодируют CERT дикого типа (SEQ ID NO: 10 или 12) или мутантный CERT, который несет точечную мутацию Ser132A (SEQ ID NO: 14). Клетки подвергали давлению отбора и отбирали клеточные линии, для которых характерна гетерологичная экспрессия CERT или мутанта CERT. Затем эти клеточные линии и параллельно клетки CHO DG 44 дикого типа трансфектировали вектором, кодирующим EGFR, в качестве представляющего интерес гена. После второго цикла отбора при осуществлении шести последовательных пассажей отбирали образцы супернатантов из маточных посевных культур всех стабильных клеточных пулов, определяли уровень экспрессии EGFR с помощью FACS или вестерн-блоттинга. Наиболее высокие значения обнаружены в клеточных пулах, содержащих мутант CERT, далее в порядке уменьшения следовали клетки, содержащие CERT дикого типа. В обоих случаях экспрессия EGFR оказалась существенно более высокой по сравнению с клетками, в которых отсутствовала гетерологичная экспрессия CERT или мутанта CERT. Очень близкие результаты можно получать, если стабильных трансфектантов подвергать периодической ферментации или периодической ферментации с подпиткой. В каждом из этих вариантов сверхэкспрессия и дикого типа, и мутантного CERT приводила к повышенной экспрессии EGFR, что свидетельствует о том, что CERT может повышать характеристики удельной продуктивности при выращивании клеток в виде серийных культур или в биореакторе в виде периодических культур или периодических культур с подпиткой.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гетерологичная экспрессия CERT и, прежде всего, мутанта CERT, может повышать экспрессию поверхностных рецепторов в кратковременно трансфектированных, а также стабильно трансфектированных линиях CHO-клеток.

Пример 10. Сверхэкспрессия StarD4 повышает производство биофармацевтического белка, такого как антитело.

а. Продуцирующую антитело линию CHO-клеток (CHO DG44), которая секретирует гуманизованное антитело к CD44v6 типа IgG BIWA 4, трансфектировали незагруженным вектором (контроль-имитатор) или экспрессионными конструкциями, которые кодируют StarD4 (SEQ ID NO: 20), и затем подвергали отбору для получения стабильных клеточных пулов. При осуществлении шести последовательных пассажей отбирали образцы супернатантов из маточных посевных культур всех стабильных клеточных пулов, определяли титр IgG с помощью ELISA и делили на среднее количество клеток, рассчитывая удельную продуктивность. Наиболее высокие значения обнаружены в клеточных пулах, содержащих StarD4. При этом экспрессия IgG оказалась существенно более высокой по сравнению с содержащими имитатор или нетрансфектированными клетками. Очень близкие результаты можно получать, если стабильных трансфектантов подвергать периодической ферментации или периодической ферментации с подпиткой. В каждом из этих вариантов сверхэкспрессия StarD4 приводила к повышению

характеристики удельной продуктивности при выращивании клеток в виде серийных культур или в биореакторе в виде периодических культур или периодических культур с подпиткой.

б. CHO-клетки-хозяева (CHO DG44) сначала трансфектировали векторами, которые кодируют StarD4. Клетки подвергали давлению отбора и отбирали клеточные линии, для которых характерна гетерологичная экспрессия StarD4. Затем эти клеточные линии и параллельно клетки CHO DG 44 дикого типа трансфектировали векторами, кодирующими гуманизированное антитело к CD44v6 типа IgG BIWA 4, в качестве представляющего интерес гена. После второго цикла отбора при осуществлении шести последовательных пассажей отбирали образцы супернатантов из маточных посевных культур всех стабильных клеточных пулов, определяли титр IgG с помощью ELISA и делили на среднее количество клеток, рассчитывая удельную продуктивность. Наиболее высокие значения обнаружены в клеточных пулах, содержащих StarD4. При этом экспрессия IgG оказалась существенно более высокой по сравнению с клетками, в которых отсутствовала гетерологичная экспрессия StarD4. Очень близкие результаты можно получать, если стабильных трансфектантов подвергать периодической ферментации или периодической ферментации с подпиткой. В каждом из этих вариантов сверхэкспрессия StarD4 приводила к повышенной секреции антитела, что свидетельствует о том, что StarD4 может повышать характеристики удельной продуктивности при выращивании клеток в виде серийных культур или в биореакторе в виде периодических культур или периодических культур с подпиткой.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гетерологичная экспрессия StarD4 может повышать секрецию антитела в кратковременно трансфектированных, а также стабильно трансфектированных линиях CHO-клеток.

Пример 11. Сверхэкспрессия CERT повышает производство биофармацевтического белка, такого как человеческий сывороточный альбумин (HSA).

а. Линию CHO-клеток (CHO DG44), секретирующую одноцепочечный белок HSA, трансфектировали незагруженным вектором (контроль-имитатор) или экспрессионными конструкциями, которые кодируют CERT дикого типа (SEQ ID NO: 10 и 12) или мутантный CERT, несущий точечную мутацию Ser132A (SEQ ID NO: 14), и затем подвергали отбору для получения стабильных клеточных пулов. При осуществлении четырех последовательных пассажей отбирали образцы супернатантов из маточных посевных культур всех стабильных клеточных пулов, определяли титр HSA с помощью ELISA и делили на среднее количество клеток, рассчитывая удельную продуктивность (фиг. 11А).

Как титры HSA, так и удельная продуктивность HSA-продуцирующих клеток существенно повышались в результате гетерологичной экспрессии обоих вариантов CERT по сравнению с трансфектированным имитатором контролем. Наиболее высокие значения обнаружены в клеточных пулах, несущих мутант CERT, при этом удельная продуктивность повышалась на 51%, а титр HSA повышался на 46% по сравнению с контролем, далее в порядке уменьшения следовали клетки, содержащие CERT дикого типа, в которых удельная продуктивность повышалась на 49%.

Очень близкие результаты можно получать, если стабильных трансфектантов подвергать периодической ферментации или периодической ферментации с подпиткой (фиг. 11Б). В каждом из этих вариантов сверхэкспрессии и дикого типа, и мутантного CERT приводила к повышенной экспрессии HSA, что свидетельствует о том, что CERT может повышать характеристики удельной продуктивности при выращивании клеток в виде серийных культур или в промышленных условиях, например выращиваемых в биореакторе периодических культур или периодических культур с подпиткой.

б и в. CHO-клетки-хозяева (CHO DG44) сначала трансфектировали векторами, которые кодируют CERT дикого типа (SEQ ID NO: 10 или 12) или мутантный CERT, который несет точечную мутацию Ser132A (SEQ ID NO: 14). Клетки подвергали давлению отбора и отбирали клеточные линии, для которых характерна гетерологичная экспрессия CERT или мутанта CERT. Затем эти клеточные линии и параллельно клетки CHO DG 44 дикого типа трансфектировали вектором, кодирующим человеческий сывороточный альбумин, в качестве представляющего интерес гена. После второго цикла отбора при осуществлении шести последовательных пассажей отбирали образцы супернатантов из маточных посевных культур всех стабильных клеточных пулов, определяли титр HSA с помощью ELISA (фиг. 11В) и делили на среднее количество клеток, рассчитывая удельную продуктивность (фиг. 11Б).

Наиболее высокие значения обнаружены в клеточных пулах, содержащих мутант CERT, далее в порядке уменьшения следовали клетки, содержащие CERT дикого типа. В обоих случаях экспрессия HSA оказалась существенно более высокой по сравнению с клетками, в которых отсутствовала гетерологичная экспрессия CERT или мутанта CERT. Очень близкие результаты можно получать, если стабильных трансфектантов подвергать периодической ферментации или периодической ферментации с подпиткой. В каждом из этих вариантов сверхэкспрессии и дикого типа, и мутантного CERT приводила к повышенной секреции HSA, что свидетельствует о том, что CERT может повышать характеристики удельной продуктивности при выращивании клеток в виде серийных культур или в биореакторе в виде периодических культур или периодических культур с подпиткой.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гетерологичная экспрессия CERT и, прежде всего, мутанта CERT может повышать секрецию одноцепочечных белков в кратковременно трансфектированных, а также в стабильно трансфектированных линиях CHO-клеток.

## Ссылки.

1. al-Rubeai M. and Singh R.P., Apoptosis in cell culture, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 1998, с. 152-156.
2. Alpy F. и Tomasetto C., Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals, *J. Cell Sci.*, 118, 2005, с. 2791-2801.
3. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. и Lipman D.J., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215, 1990, с. 403-410.
4. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. и Struhl K., *Current Protocols in Molecular Biology*, изд-во John Wiley & Sons, Inc., 2002.
5. az Anel A.M. и Malhotra V., PKC $\epsilon$  is required for beta1gamma2/beta3gamma2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus, *J. Cell Biol.*, 169, 2005, с. 83-91.
6. Bard F., Casano L., Mallabiabarrena A., Wallace E., Saito K., Kitayama H., Guizzunti G., Hu Y., Wendler F., Dasgupta R., Perrimon N. и Malhotra V., Functional genomics reveals genes involved in protein secretion and Golgi organization, *Nature*, 439, 2006, с. 604-607.
7. Barnes L.M., Bentley C.M., Moy N. и Dickson A.J., Molecular analysis of successful cell line selection in transfected GS-NS0 myeloma cells. *Biotechnol., Bioeng.*, 96, 2007, с. 337-348.
8. Barnes L.M. и Dickson A.J., Mammalian cell factories for efficient and stable protein expression, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17, 2006, с. 381-386.
9. Baron C.L. и Malhotra V., Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane, *Science*, 295, 2002, с. 325-328.
10. Blobel C.P., ADAMs: key components in EGFR signalling and development, *Nat Rev Mol. Cell Biol.*, 6, 2005, с. 32-43.
11. Borth N., Mattanovich D., Kunert R. и Katinger H., Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line, *Biotechnol. Prog.*, 21, 2005, с. 106-111.
12. Brewer J.W. и Hendershot L.M., Building an antibody factory: a job for the unfolded protein response, *Nat. Immunol.*, 6, 2005, с. 23-29.
13. Chen-Kiang S., Cell-cycle control of plasma cell differentiation and tumorigenesis, *Immunol. Rev.*, 194, 2003, с. 39-47.
14. Chiang G.G. и Sisk W.P., Bcl-x(L) mediates increased production of humanized monoclonal antibodies in Chinese hamster ovary cells, *Biotechnol. Bioeng.*, 91, 2005, с. 779-792.
15. Davis R., Schooley K., Rasmussen B., Thomas J. и Reddy P., Effect of PDI overexpression on recombinant protein secretion in CHO cells, *Biotechnol. Prog.*, 16, 2000, с. 736-743.
16. Doppler H., Storz P., Li J., Comb M.J. и Toker A., A phosphorylation state-specific antibody recognizes Hsp27, a novel substrate of protein kinase D, *J. Biol. Chem.*, 280, 2005, с. 15013-15019.
17. Dorner A.J. и Kaufman R.J., The levels of endoplasmic reticulum proteins and ATP affect folding and secretion of selective proteins, *Biologicals*, 22, 1994, с. 103-112.
18. Egeblad M. и Werb Z., New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, *Nat Rev Cancer* 2, 2002, с. 161-174.
19. Fukunaga T., Nagahama M., Hatsuzawa K., Tani K., Yamamoto A. и Tagaya M., Implication of sphingolipid metabolism in the stability of the Golgi apparatus, *J. Cell Sci.*, 113 (ч. 18), 2000, с. 3299-3307.
20. Hanada K., Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking of ceramide, *Mol. Cell Biochem.*, 286, 2006, с. 23-31.
21. Hanada K., Kumagai K., Yasuda S., Miura Y., Kawano M.L., Fukasawa M. и Nishijima M., Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide, *Nature*, 426, 2003, с. 803-809.
22. Hanahan D. и Weinberg R.A., The hallmarks of cancer, *Cell*, 100, 2000, с. 57-70.
23. Harris и Angal, *Protein Purification Methods*, изд-во IRL Press, 1995.
24. Hausser A., Link G., Bamberg L., Burzlaff A., Lutz S., Pfizenmaier K. и Johannes F.J., Structural requirements for localization and activation of protein kinase C mu (PKC mu) at the Golgi compartment, *J. Cell Biol.*, 156, 2002, с. 65-74.
25. Hausser A., Storz P., Martens S., Link G., Toker A. и Pfizenmaier K., Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex, *Nat. Cell Biol.*, 7, 2005, с. 880-886.
26. Hooker A.D., Green N.H., Baines A.J., Bull A.T., Jenkins N., Strange P.G. и James D.C., Constraints on the transport and glycosylation of recombinant IFN-gamma in Chinese hamster ovary and insect cells, *Biotechnol. Bioeng.*, 63, 1999, с. 559-572.
27. Hu S., Shively L., Raubitschek A., Sherman M., Williams L.E., Wong J.Y., Shively J.E. и Wu A.M., Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts, *Cancer Res.*, 56, 1996, с. 3055-3061.
28. Huston J.S., Levinson D., Mudgett-Hunter M., Tai M.S., Novotny J., Margolies M.N., Ridge R.J., Brucoleri R.E., Haber E., Crea R., Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1988, с. 5879-5883.

29. Iglesias T., Cabrera-Poch N., Mitchell M.P., Naven T.J., Rozengurt E. и Schiavo G., Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D, *J. Biol. Chem.*, 275, 2000, с. 40048-40056.
30. Iwakoshi N.N., Lee A.H. и Glimcher L.H., The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response, *Immunol Rev.*, 194, 2003, с. 29-38.
31. Jaggi M., Rao P.S., Smith D.J., Wheelock M.J., Johnson K.R., Hemstreet G.P. и Balaji K.C., E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C $\{\mu\}$  is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer, *Cancer Res.*, 65, 2005, с. 483-492.
32. Kaufmann и Fussenegger, *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*, 2003.
33. Kawano M., Kumagai K., Nishijima M. и Hanada K., Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT, *J. Biol. Chem.*, 281, 2006, с. 30279-30288.
34. Kortt A.A., Lah M., Oddie G.W., Gruen C.L., Burns J.E., Pearce L.A., Atwell J.L., McCoy A.J., Howlett G.J., Metzger D.W., Webster R.G. и Hudson P.J., Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer, *Protein Eng.*, 10, 1997, с. 423-433.
35. Levine T. и Loewen C., Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 18, 2006, с. 371-378.
36. Levine T.P. и Munro S., Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components, *Curr. Biol.*, 12, 2002, с. 695-704.
37. Liljedahl M., Maeda Y., Colanzi A., Ayala I., Van L.J. и Malhotra V., Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network, *Cell*, 104, 2001, с. 409-420.
38. Litvak V., Dahan N., Ramachandran S., Sabanay H. и Lev S., Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function, *Nat. Cell Biol.*, 7, 2005, с. 225-234.
39. Loewen C.J., Roy A. и Levine T.P., A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opilp binds VAP, *EMBO J.*, 22, 2003, с. 2025-2035.
40. Lottspeich и Zorbas, 1998.
41. Lovejoy B., Choe S., Cascio D., McRorie D.K., DeGrado W.F. и Eisenberg D., Crystal structure of a synthetic triple-stranded alpha-helical bundle, *Science*, 259, 1993, с. 1288-1293.
42. Madden T.L., Tatusov R.L. и Zhang J., Applications of network BLAST server, *Methods Enzymol.*, 266, 1996, с. 131-141.
43. Maeda Y., Bezoussenko G.V., Van L.J., Mironov A.A. и Malhotra V., Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain, *EMBO J.*, 20, 2001, с. 5982-5990.
44. Olayioye M.A., Vehring S., Muller P., Herrmann A., Schiller J., Thiele C, Lindeman G.J., Visvader J.E. и Pomorski T., StarD10, a START domain protein overexpressed in breast cancer, functions as a phospholipid transfer protein, *J. Biol. Chem.*, 280, 2005, с. 27436-27442.
45. Overall C.M. и Kleifeld O., Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy, *Nat Rev Cancer*, 6, 2006, с. 227-239.
46. Pack P., Kujau M., Schroeckh V., Knupfer U., Wenderoth R., Riesenberger D. и Pluckthun A., Improved bivalent miniantibodies, with identical avidity as whole antibodies, produced by high cell density fermentation of *Escherichia coli*, *Biotechnology (N.Y.)*, 11, 1993, с. 1271-1277.
47. Pack P., Muller K., Zahn R. и Pluckthun A., Tetraivalent miniantibodies with high avidity assembling in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 246, 1995, с. 28-34.
48. Pak C.O., Hunt M.N., Bridges M.W., Sleigh M.J. и Gray P.P., Super-CHO-A cell line capable of autocrine growth under fully defined protein-free conditions, *Cytotechnology*, V22, 1996, с. 139-146.
49. Perisic O., Webb P.A., Holliger P., Winter G. и Williams R.L., Crystal structure of a diabody, a bivalent antibody fragment, *Structure*, 2, 1994, с. 1217-1226.
50. Perry R.J. и Ridgway N.D., Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport, *Biochim. Biophys. Acta*, 1734, 2005, с. 220-234.
51. Raya A., Revert-Ros F., Martinez-Martinez P., Navarro S., Rosello E., Vieites B., Granero F., Forteza J. и Saus J., Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis, *J. Biol. Chem.*, 275, 2000, с. 40392-40399.
52. Robert Scopes, *Protein Purification*, изд-во Springer-Verlag, 1988.
53. Rykx A., De K.L., Mikhalap S., Vantus T., Seufferlein T., Vandenheede J.R. и Van L.J., Protein kinase D: a family affair, *FEBS Lett.*, 546, 2003, с. 81-86.
54. Sambrook J., Fritsch D.F. и Maniatis T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
55. Schroder M., The unfolded protein response, *Mol. Biotechnol.*, 34, 2006, с. 279-290.
56. Seth G., Hossler P., Yee J.C. и Hu W.S., Engineering cells for cell culture bioprocessing-physiological fundamentals, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 101, 2006, с. 119-164.
57. Shaffer A.L., Shapiro-Shelef M., Iwakoshi N.N., Lee A.H., Qian S.B., Zhao H., Yu X., Yang L., Tan B.K., Rosenwald A., Hurt E.M., Petroulakis E., Sonenberg N., Yewdell J.W., Calame K., Glimcher L.H. и

Staudt L.M., XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation, *Immunity*, 21, 2004, с. 81-93.

58. Soccio R.E. и Breslow J.L., StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism, *J. Biol. Chem.*, 278, 2003, с. 22183-22186.

59. Somerharju P., Pyrene-labeled lipids as tools in membrane biophysics and cell biology, *Chem. Phys. Lipids*, 116, 2002, с. 57-74.

60. Tigges M. и Fussenegger M., Xbp1-based engineering of secretory capacity enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells, *Metab Eng.*, 2006.

61. Toth B., Balla A., Ma H., Knight Z.A., Shokat K.M. и Balla T., Phosphatidylinositol 4-kinase IIIbeta regulates the transport of ceramide between the endoplasmic reticulum and Golgi, *J. Biol. Chem.*, 281, 2006, с. 36369-36377.

62. Tsujishita Y. и Hurley J.H., Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain, *Nat. Struct. Biol.*, 7, 2000, с. 408-414.

63. Urlaub G., Kas E., Carothers A.M. и Chasin L.A., Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells, *Cell*, 33, 1983, с. 405-412.

64. Vega R.B., Harrison B.C., Meadows E., Roberts C.R., Papst P.J., Olson E.N. и McKinsey T.A., Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5, *Mol. Cell Biol.*, 24, 2004, с. 8374-8385.

65. Wang Q.J., PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling, *Trends Pharmacol. Sci.*, 27, 2006, с. 317-323.

66. Wang Y., Waldron R.T., Dhaka A., Patel A., Riley M.M., Rozengurt E. и Colicelli J., The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins, *Mol. Cell Biol.*, 22, 2002, с. 916-926.

67. Weigert R., Silletta M.G., Spano S., Turacchio G., Cericola C., Colanzi A., Senatore S., Mancini R., Polishchuk E.V., Salmona M., Facchiano F., Burger K.N., Mironov A., Luini A. и Corda D., CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid, *Nature*, 402, 1999, с. 429-433.

68. Werner R.G., Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals, *J. Biotechnol.*, 113, 2004, с. 171-182.

69. Wirtz K.W., Phospholipid transfer proteins in perspective, *FEBS Lett.*, 580, 2006, с. 5436-5441.

70. Wurm F.M., Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, *Nat. Biotechnol.*, 22, 2004, с. 1393-1398.

71. Yeaman C., Ayala M.I., Wright J.R., Bard F., Bossard C., Ang A., Maeda Y., Seufferlein T., Mellman I., Nelson W.J. и Malhotra V., Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network, *Nat. Cell Biol.*, 6, 2004, с. 106-112.

72. Zhang J. и Madden T.L., PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation, *Genome Res.*, 7, 1997, с. 649-656.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения гетерологичного белка в клетке, заключающийся в том, что:

а) повышают экспрессию или активность белка, имеющего аминокислотную последовательность, которая содержит белок-переносчик церамида CERT или его производное либо мутант;

б) оказывают воздействие на экспрессию белка;

в) извлекают белок из клеточной культуральной среды,

где указанное производное является молекулой полипептида, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности с оригинальной последовательностью CERT или комплементарна этой последовательности, или указанное производное является гомологом последовательности CERT из другого организма и, таким образом, указанный мутант основан на модификации последовательности мишени CERT в результате замены, встраивания или делеции от одной до 10 аминокислот.

2. Способ по п.1, в котором белок-переносчик церамида CERT представляет собой белок-переносчик церамида CERT (SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13) или его производное либо мутант, где указанное производное является молекулой полипептида, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности с оригинальной последовательностью CERT или комплементарна этой последовательности, или указанное производное является гомологом последовательности CERT из другого организма и, таким образом, указанный мутант основан на модификации последовательности мишени CERT в результате замены, встраивания или делеции от одной до 10 аминокислот.

3. Способ по п.2, в котором белок-переносчик церамида CERT представляет собой мутантный белок-переносчик церамида CERT и в котором указанная мутация нарушает и/или удаляет сайт фосфорилирования в любом из положений серина, треонина или тирозина CERT.

4. Способ по п.3, в котором CERT представляет собой мутантный белок-переносчик церамида CERT и в котором указанная мутация нарушает и/или удаляет сайт фосфорилирования протеинкиназой D (PKD) белка CERT в положении 132.

5. Способ по п.4, в котором мутантный CERT представляет собой CERT<sub>S132A</sub> (SEQ ID NO: 15).

6. Способ по пп.1-5, в котором способ приводит к повышенной удельной клеточной продуктивности указанного белка в указанной клетке по сравнению с экспрессией указанного белка в контрольной клетке, но при этом контрольная клетка не характеризуется повышенной экспрессией или активностью белка, имеющего аминокислотную последовательность, которая содержит белок-переносчик церамида CERT или его производное либо мутант.

7. Способ повышения удельной клеточной продуктивности мембранного или секретируемого белка в клетке, заключающийся в том, что интродуцируют в клетку одну или несколько векторных систем, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере два полипептида, где:

а) первый полинуклеотид кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит белок-переносчик церамида CERT или его производное либо мутант;

б) второй полинуклеотид кодирует белок и где

в) белок и белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит белок-переносчик церамида CERT или его производное либо мутант, экспрессируются клеткой,

где указанное производное является молекулой полипептида, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности с оригинальной последовательностью CERT или комплементарна этой последовательности, или указанное производное является гомологом последовательности CERT из другого организма и, таким образом, указанный мутант основан на модификации последовательности мишени CERT в результате замены, встраивания или делеции от одной до 10 аминокислот.

8. Способ повышения удельной клеточной продуктивности мембранного или секретируемого белка в клетке, заключающийся в том, что интродуцируют в клетку одну или несколько векторных систем, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере два полипептида, где:

а) трансфектируют указанную клетку первым полинуклеотидом, который кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит белок-переносчик церамида CERT или его производное либо мутант;

б) последовательно трансфектируют указанную клетку вторым полинуклеотидом, локализованным на других векторных системах; и где

в) белок и белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит белок-переносчик церамида CERT или его производное либо мутант, экспрессируются клеткой,

где указанное производное является молекулой полипептида, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности с оригинальной последовательностью CERT или комплементарна этой последовательности, или указанное производное является гомологом последовательности CERT из другого организма и, таким образом, указанный мутант основан на модификации последовательности мишени CERT в результате замены, встраивания или делеции от одной до 10 аминокислот.

9. Экспрессионный вектор для повышения уровня экспрессии целевого гетерологического белка в клетке, содержащий два полинуклеотида, где:

а) первый полинуклеотид кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, которая содержит белок-переносчик церамида CERT или его производное либо мутант;

б) второй полинуклеотид кодирует белок,

где указанное производное является молекулой полипептида, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности с оригинальной последовательностью CERT или комплементарна этой последовательности, или указанное производное является гомологом последовательности CERT из другого организма и, таким образом, указанный мутант основан на модификации последовательности мишени CERT в результате замены, встраивания или делеции от одной до 10 аминокислот.

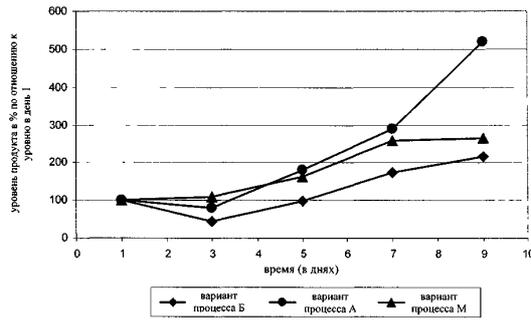
10. Экспрессионный вектор по п.9, в котором белок-переносчик церамида CERT имеет SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13.

11. Экспрессионный вектор по п.9, в котором мутантный CERT представляет собой CERT<sub>S132A</sub> (SEQ ID NO: 15).

12. Клетка, содержащая экспрессионный вектор по пп.9-11.

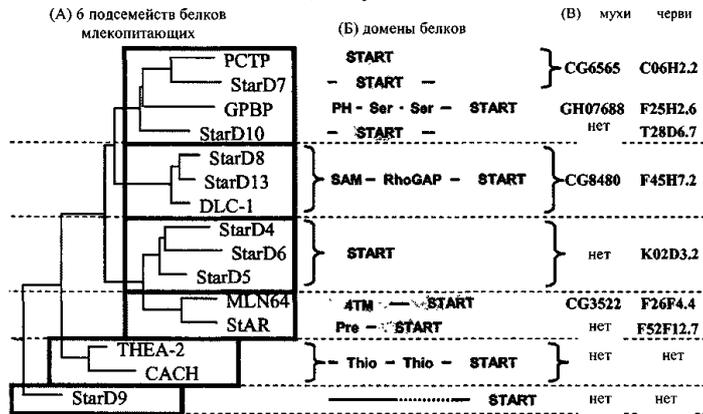
13. Применение белка-переносчика церамида CERT или полинуклеотида, кодирующего белок-переносчик церамида CERT, для повышения секреции и/или продукции белка.

Уровень внутриклеточного продукта, измеренный с помощью FACS-анализа  
(в % по отношению к уровню в день 1)

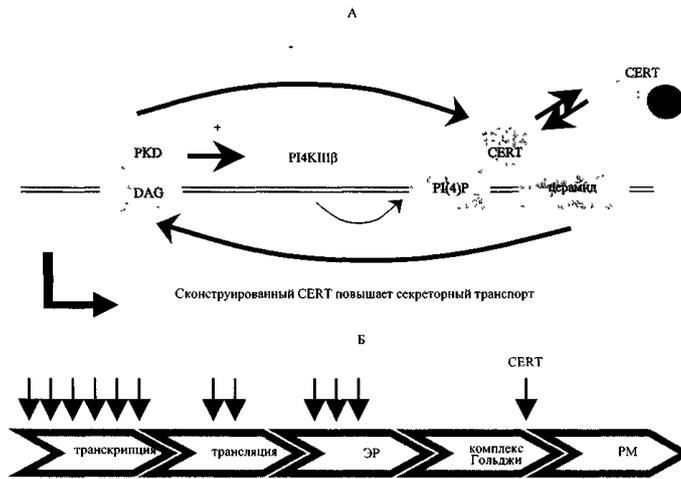


Фиг. 1

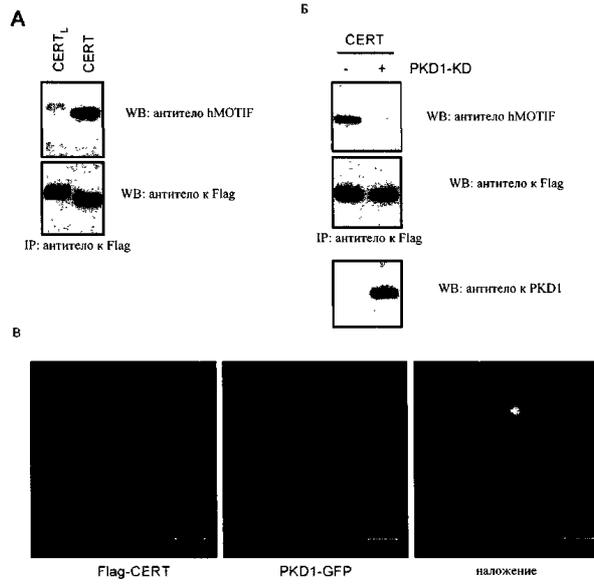
Семейство белков, несущих START-домен



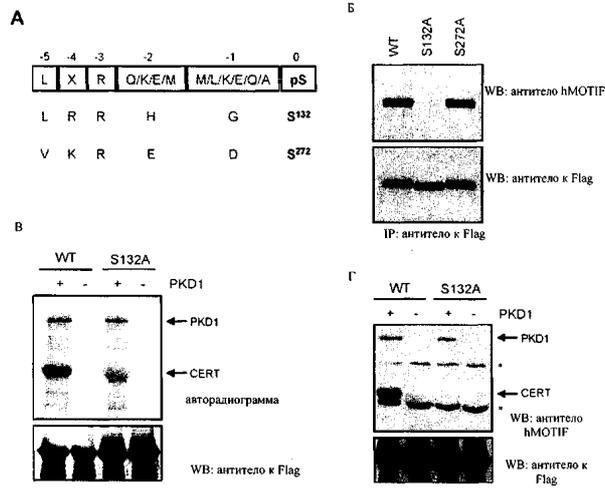
Фиг. 2



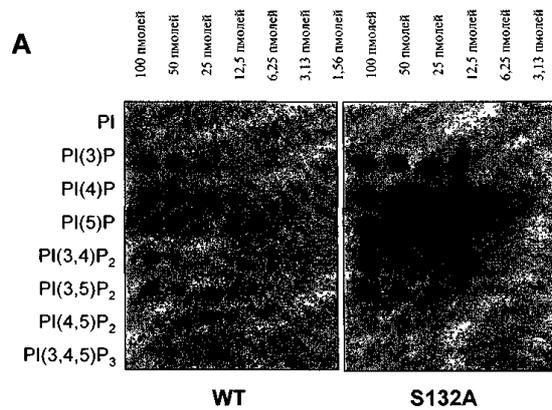
Фиг. 3

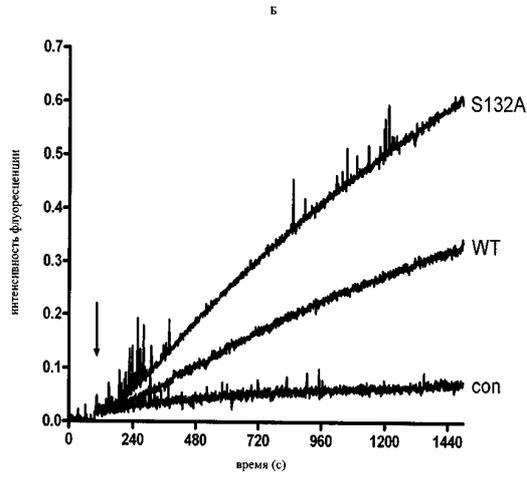


Фиг. 4



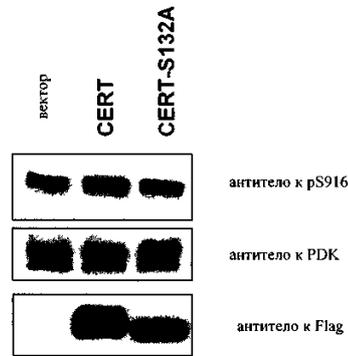
Фиг. 5



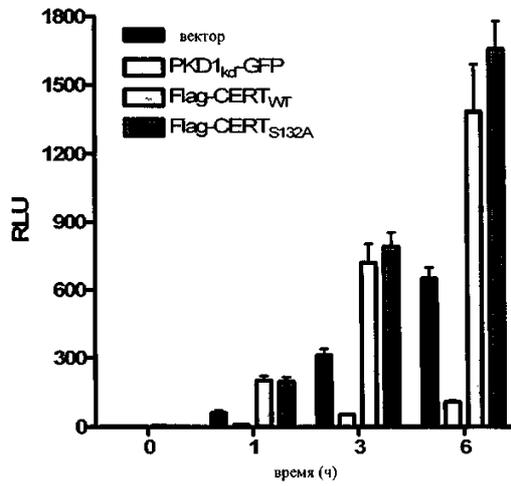


Фиг. 6

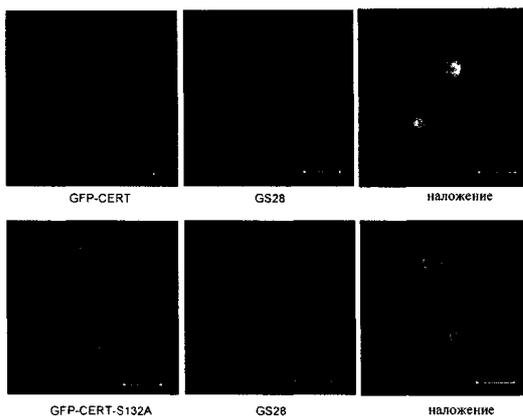
А



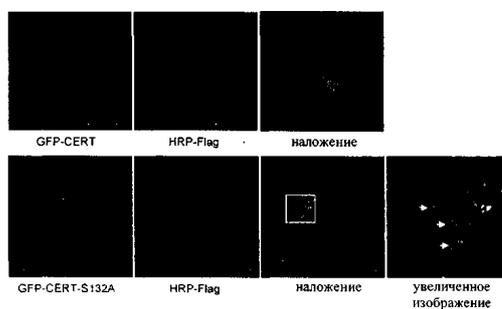
Б



В

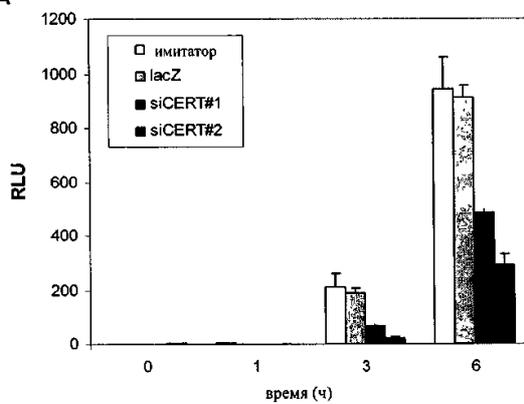


Г

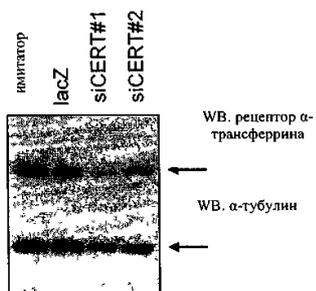


Фиг. 7

А

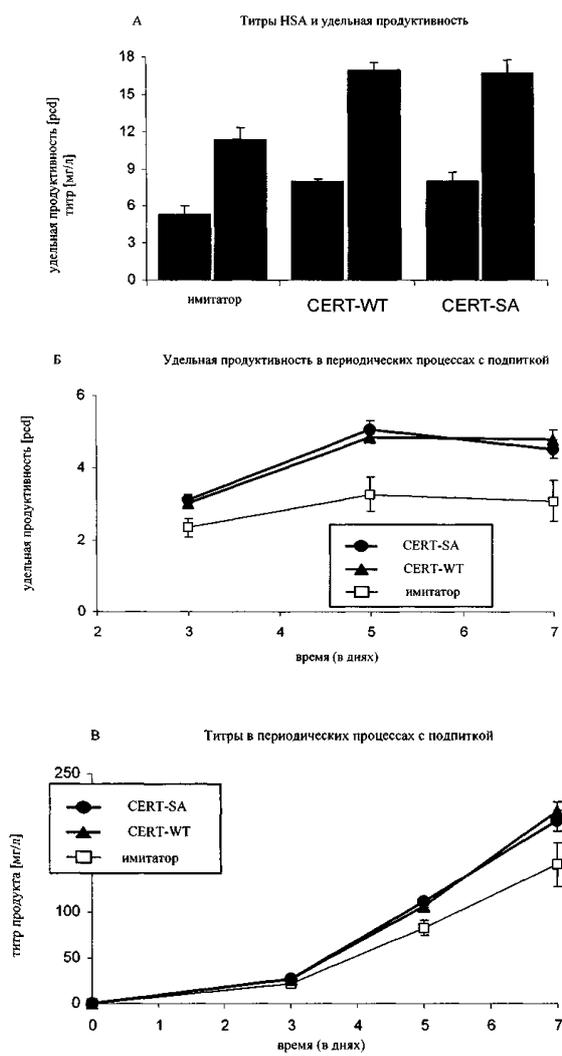


Б



Фиг. 8





Фиг. 11

## Перечень последовательностей

<110> Бёрингер Ингельхйм Фарма ГМБХ Унд Ко. КГ

<120> Улучшение производства белков

<130> P01-2188

<160> 28

<170> PatentIn версия 3.3

<210> 1

<211> 28

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> ПЦР-праймер для человеческой ДНК CERT-S132A

<400> 1  
cgtcgacatg gcgcaatggt gtcscctgg 28

<210> 2

<211> 28

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> ПЦР-праймер для человеческой ДНК CERT-S132Arev

<400> 2  
ccaagggacac cattgcgcca tgtcgacg 28

<210> 3

<211> 35

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> ПЦР-праймер для человеческой ДНК CERT-S272A

<400> 3  
ggttaaacgt gaggacgcct ggcagaagag actgg 35

<210> 4

<211> 35

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для человеческой ДНК CERT-S272Arev  
  
 <400> 4  
 ccagtctctt ctgccaggcg tcttcacggt taacc 35  
  
 <210> 5  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> ПЦР-праймер для человеческой ДНК CERT-138truncation  
  
 <400> 5  
 ggtgtccctg gtgtcttgag caagtggcta ctc 33  
  
 <210> 6  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> ПЦР-праймер для человеческой ДНК CERT-138truncationrev  
  
 <400> 6  
 gactagccac ttgctcaaga caccaggac acc 33  
  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> siРНК/ДНК siCERT-1  
  
 <400> 7  
 ccacaagacu uacucauuat t 21  
  
 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> siРНК/ДНК siCERT-2

<400> 8  
гаасаgаgga агсаииаааt t 21

<210> 9  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Искусственная

<220>  
<223> s1PНК/ДНК s1LacZ

<400> 9  
gсgгсгсгсг гааииааассt t 21

<210> 10  
<211> 1797  
<212> ДНК  
<213> человеческая: «ДНК CERT

<400> 10  
atgtcggata atcagagctg gaactcgtcg ggctcggagg aggatccaga gacggagtct 60  
gggccgctg tggagcgtg cggggctctc agtaagtga caaactacat tcatgggtgg 120  
caggatcgtt gggtagtttt gaaaaataat gctctgagtt actacaaatc tgaagatgaa 180  
acagagtatg gctgcagagg atccatctgt cttagcaagg ctgtcatcac acctcacgat 240  
tttgatgaat gtcgatttga tattagtgt aatgatagtg ttgggtatct tegtgtctag 300  
gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga 360  
tatggatctg aatccagctt gcgtcgacat ggctcaatgg tgtcctcgtt gtctggagca 420  
agtggctact ctgcaacatc cacctcttca ttcaagaaag gccacagttt acgtgagaag 480  
ttggctgaaa tggaaacatt tagagacatc ttatgtagac aagttgacac gctacagaag 540  
tactttgatg cctgtgctga tgctgtctct aaggatgaac ttcaaagga taaagtggta 600  
gaagatgatg aagatgactt tcctacaacg cgttctgatg gtgacttctt gcatagtacc 660  
aacggcaata aagaaaagtт аттссаатс gtgacaccaa aaggaattaa tggtatagac 720  
tttaaagggg aagcgataac tttaaagca actactgctg gaatccttgc aacactttct 780  
cattgtattg aactaatggt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa 840  
actgagaaga aaagaagaac agaggaagca tataaaaatg caatgacaga acttaagaaa 900

## 018190

```

aaatcccact ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa 960
gagttctttg atgctggtga agctgctctt gacagacaag ataaaataga agaacagtca 1020
cagagtgaaa aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgccttttct 1080
tctgtgggga cacatagatt tgtccaaaag gttgaagaga tgggtcagaa ccacatgact 1140
tactcattac aggatgtagg cggagatgcc aattggcagt tggttgtaga agaaggagaa 1200
atgaaggtat acagaagaga agtagaagaa aatgggattg ttctggatcc tttaaaagct 1260
acctatgcag ttaaaggcgt cacaggacat gaagtctgca attatttctg gaatgttgac 1320
gttcgcaatg actgggaaac aactatagaa aactttcatg tggtggaac attagctgat 1380
aatgcaatca tcatttatca aacacacaag aggggtgtggc ctgcttctca gcgagacgta 1440
ttatatcttt ctgtcattcg aaagatacca gccttgactg aaaatgacct tgaacttgg 1500
atagtttgta atttttctgt ggatcatgac agtgcctctc taaacaaccg atgtgtccgt 1560
gccaaaataa atgttgctat gatttgtaa accttggtaa gccaccaga gggaaaccag 1620
gaaattagca gggacaacat tctatgcaag attacatatg tagctaattgt gaaccttgg 1680
ggatgggac cagcctcagt gttaagggca gtggcaaagc gagagtatcc taaatttcta 1740
aaacgtttta cttcttacgt ccaagaaaaa actgcaggaa agcctatttt gttctag 1797

```

<210> 11

<211> 598

<212> PRT

<213> человеческий: белок CERT

<400> 11

```

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
1           5           10           15

```

```

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
          20           25           30

```

```

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
          35           40           45

```

```

Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
          50           55           60

```

## 018190

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp  
65 70 75 80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr  
85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile  
100 105 110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg  
115 120 125

Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser  
130 135 140

Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys  
145 150 155 160

Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp  
165 170 175

Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp  
180 185 190

Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro  
195 200 205

Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys  
210 215 220

Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp  
225 230 235 240

Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu  
245 250 255

Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser  
260 265 270

## 018190

Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu  
 275 280 285

Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe  
 290 295 300

Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu  
 305 310 315 320

Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile  
 325 330 335

Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser  
 340 345 350

Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val  
 355 360 365

Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln  
 370 375 380

Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu  
 385 390 395 400

Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp  
 405 410 415

Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val  
 420 425 430

Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr  
 435 440 445

Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile  
 450 455 460

Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val  
 465 470 475 480

018190

Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp  
 485 490 495

Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala  
 500 505 510

Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile  
 515 520 525

Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg  
 530 535 540

Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly  
 545 550 555 560

Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr  
 565 570 575

Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala  
 580 585 590

Gly Lys Pro Ile Leu Phe  
 595

<210> 12  
 <211> 2389  
 <212> ДНК  
 <213> человеческая: κДНК CERTL

<400> 12  
 gcaggaagat ggcggcggta gcggaggtgt gagtggacgc gggactcagc ggccggattt 60  
 tctcttcct tcttttccct tttccttccc tatttgaat tggcatcgag ggggctaagt 120  
 tcgggtggca ggcgccggcg caacgcaggg gtcacggcga cggcggcggc ggctgacggc 180  
 tggaagggta ggcttcattc accgctcgtc ctcttctctc gctccgctcg gtgtcaggcg 240  
 cggcggcggc ggcggcggcg gacttcgtcc ctctctctgc tccccccac accggagcgg 300  
 gcactcttctg ctctgccatc ccccgaccct tcaccccgag gactgggcgc ctctctcggc 360  
 gcagctgagg gacggggggc cggctctctg ctcggttgtc gagcctccat gtcggataat 420

cagagctgga actcgtcggg ctcgaggag gatccagaga cggagtctgg gccgcctgtg 480  
gagcgctgcg gggcctcag taagtggaca aactacattc atgggtggca ggatcgttgg 540  
gtagttttga aaaataatgc tctgagttac tacaatctg aagatgaaac agagtatggc 600  
tgcagaggat ccactctgtct tagcaaggct gtcacacac ctcacgattt tgatgaatgt 660  
cgatttgata ttagtgtaaa tgatagtgtt tggatatctc gtgctcagga tccagatcat 720  
agacagcaat ggatagatgc cattgaacag cacaagactg aatctggata tggatctgaa 780  
tccagcttgc gtcgacatgg ctcaatgggt tccctgggtg ctggagcaag tggtactctt 840  
gcaacatcca cctcttcatt caagaaaggc cacagtctac gtgagaagtt ggtgaaatg 900  
gaaacattta gagacatctt atgtagacaa gttgacacgc tacagaagta ctttgatgcc 960  
tgtgctgatg ctgtctctaa ggatgaactt caaaggata aagtggtaga agatgatgaa 1020  
gatgacttct ctacaacgcg ttctgatggg gacttcttgc atagtaccaa cggcaataaa 1080  
gaaaagtat tccacatgt gacacaaaa ggaattaatg gtatagactt taaaggggaa 1140  
gcgataactt ttaaagcaac tactgctgga atccttgcaa cactttctca ttgtattgaa 1200  
ctaattggtta aacgtgagga cagctggcag aagagactgg ataaggaaac tgagaagaaa 1260  
agaagaacag aggaagcata taaaaatgca atgacagaaac ttaagaaaa atcccacttt 1320  
ggaggaccag attatgaaga aggccctaac agtctgatta atgaagaaga gttctttgat 1380  
gctgttgaag ctgctcttga cagacaagat aaaatagaag aacagtcaca gagtgaaaag 1440  
gtgagattac attggcctac atccttgcct tctggagatg ccttttcttc tgtggggaca 1500  
catagatttg tccaaaagcc ctatagtcgc tcttctcca tgtcttccat tgatctagtc 1560  
agtgcctctg atgatgttca cagattcagc tcccaggttg aagagatggg gcagaaccac 1620  
atgacttact cattacagga tgtaggcgga gatgccaat ggagttggg tgtagaagaa 1680  
ggagaaatga aggtatacag aagagaagta gaagaaaatg ggattgttct ggatccttta 1740  
aaagctaccc atgcagttaa aggcgtcaca ggacatgaag tctgcaatta tttctggaat 1800  
gttgacgttc gcaatgactg gaaaacaact atagaaaact ttcattgtgtt ggaaacatta 1860  
gctgataatg caatcatcat ttatcaaaca cacaagaggg tgtggcctgc ttctcagcga 1920  
gacgtattat atctttctgt cattogaaag ataccagcct tgactgaaaa tgaccctgaa 1980

## 018190

acttgatag ttgttaattt ttctgtggat catgacagtg ctctctctaaa caaccgatgt 2040  
gtccgtgcca aaataaatgt tgctatgatt tgtcaaacct tggtaagccc accagagggg 2100  
aaccaggaaa tttagcagga caacattcta tgcaagatta catatgtagc taatgtgaac 2160  
cctggaggat gggcaccagc ctctagtgtta agggcagtg gaaagcgaga gtatcctaaa 2220  
tttctaaaac gttttacttc ttactgtcaa gaaaaaactg caggaaagcc tattttgttc 2280  
tagtattaac aggtactaga agatatgttt tatctttttt taactttatt tgactaatat 2340  
gactgtcaat actaaaattt agttgttgaa agtatttact atgtttttt 2389

<210> 13  
<211> 624  
<212> PRT  
<213> человеческий: белок CERTL

<400> 13

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro  
1 5 10 15

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys  
20 25 30

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys  
35 40 45

Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly  
50 55 60

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp  
65 70 75 80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr  
85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile  
100 105 110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg

## 018190

115	120	125
Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser		
130	135	140
Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys		
145	150	155 160
Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp		
	165	170 175
Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp		
	180	185 190
Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro		
	195	200 205
Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys		
	210	215 220
Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp		
	225	230 235 240
Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu		
	245	250 255
Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser		
	260	265 270
Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu		
	275	280 285
Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe		
	290	295 300
Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu		
	305	310 315 320
Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile		





018190

tttaaagggg aagcgataac ttttaaagca actactgctg gaatccttgc aacactttct 780  
 cattgtattg aactaatggt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa 840  
 actgagaaga aaagaagaac agaggaagca tataaaaatg caatgacaga acttaagaaa 900  
 aaatcccact ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa 960  
 gagttctttg atgctgttga agctgctctt gacagacaag ataaaataga agaacagtca 1020  
 cagagtgaaa aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgccttttct 1080  
 tctgtgggga cacatagatt tgtccaaaag gttgaagaga tgggtgcagaa ccacatgact 1140  
 tactcattac aggatgtagg cggagatgcc aattggcagt tggttgtaga agaaggagaa 1200  
 atgaaggat acagaagaga agtagaagaa aatgggattg ttctggatcc tttaaaagct 1260  
 acccatgcag ttaaaggcgt cacaggacat gaagtctgca attatttctg gaatgttgac 1320  
 gttcgcaatg actgggaaac aactatagaa aactttcatg tggtggaac attagctgat 1380  
 aatgcaatca tcatttatca aacacacaag aggggtgtggc ctgcttctca gcgagacgta 1440  
 ttatatcttt ctgtcattcg aaagatacca gccttgactg aaaatgacc tgaaacttgg 1500  
 atagtttgta atttttctgt ggatcatgac agtgctctc taaacaaccg atgtgtccgt 1560  
 gccaaaataa atgttgctat gatttgtaa accttggtaa gccaccaga gggaaaccag 1620  
 gaaattagca gggacaacat tctatgcaag attacatatg tagctaattg gaaccctgga 1680  
 ggatgggca cagcctcagt gtttaaggca gtggcaaagc gagagtatcc taaatttcta 1740  
 aaacgtttta cttcttacgt ccaagaaaaa actgcaggaa agcctatctt gttctag 1797

<210> 15  
 <211> 598  
 <212> PRT  
 <213> человеческий: белок CERT S132A

<400> 15

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro  
 1 5 10 15

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys  
 20 25 30

018190

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys  
 35 40 45

Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly  
 50 55 60

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp  
 65 70 75 80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr  
 85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile  
 100 105 110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg  
 115 120 125

Arg His Gly Ala Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser  
 130 135 140

Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys  
 145 150 155 160

Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp  
 165 170 175

Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp  
 180 185 190

Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro  
 195 200 205

Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys  
 210 215 220

Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp  
 225 230 235 240



018190

Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile  
 450 455 460

Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val  
 465 470 475 480

Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp  
 485 490 495

Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala  
 500 505 510

Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile  
 515 520 525

Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg  
 530 535 540

Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly  
 545 550 555 560

Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr  
 565 570 575

Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala  
 580 585 590

Gly Lys Pro Ile Leu Phe  
 595

<210> 16  
 <211> 669  
 <212> ДНК  
 <213> человеческая: κДНК START-домена CERT

<400> 16  
 agattttgtcc aaaagggttg agagatgggtg cagaaccaca tgacttactc attacaggat 60  
 gtaggcggag atgccaattg gcagttgggtt gtagaagaag gagaaatgaa ggtatacaga 120  
 agagaagtag aagaaaaatgg gattgttctg gatcctttaa aagctaccca tgcagttaaa 180

018190

```

ggcgtcacag gacatgaagt ctgcaattat ttctggaatg ttgacgttcg caatgactgg      240
gaaacaacta tagaaaactt tcattgtggtg gaaacattag ctgataatgc aatcatcatt      300
tatcaaacac acaagagggg gtggcctgct tctcagcgag acgtattata tctttctgtc      360
attcgaaaaga taccagcctt gactgaaaat gaccctgaaa cttggatagt ttgtaathtt      420
tctgtggatc atgacagtgc tctctctaac aaccgatgtg tccgtgcca aataaatggt      480
gctatgattt gtcaaacctt ggtaagccca ccagagggaa accaggaat tagcagggac      540
aacattctat gcaagattac atatgtagct aatgtgaacc ctggaggatg ggaccagcc      600
tcagtgttaa gggcagtggc aaagcgagag tctcctaat ttctaaaacg ttttacttct      660
tacgtccaa                                                                    669

```

```

<210> 17
<211> 223
<212> PRT
<213> человеческий: белок START-домена CERT

```

```

<400> 17

```

```

Arg Phe Val Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr
1          5          10          15

```

```

Ser Leu Gln Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu
          20          25          30

```

```

Glu Gly Glu Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile
          35          40          45

```

```

Val Leu Asp Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly
          50          55          60

```

```

His Glu Val Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp
65          70          75          80

```

```

Glu Thr Thr Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn
          85          90          95

```

```

Ala Ile Ile Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln

```

018190

100	105	110
Arg Asp Val Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr		
115	120	125
Glu Asn Asp Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His		
130	135	140
Asp Ser Ala Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val		
145	150	155
Ala Met Ile Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu		
165	170	175
Ile Ser Arg Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val		
180	185	190
Asn Pro Gly Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys		
195	200	205
Arg Glu Tyr Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln		
210	215	220

<210> 18  
 <211> 658  
 <212> ДНК  
 <213> человеческая: кДНК START-домена CERTL

<400> 18		
cagggttgaag agatgggtgca gaaccacatg acttactcat tacaggatgt aggcggagat		60
gccaattggc agttggttgt agaagaagga gaaatgaagg tatacagaag agaagtagaa		120
gaaaatggga ttgttctgga tcttttaaaa gctacccatg cagttaaagg cgtcacagga		180
catgaagtct gcaattatct ctggaatggt gacgttcgca atgactggga aacaactata		240
gaaaactttc atgtgggtgga aacattagct gataatgcaa tcatcattta tcaaacacac		300
aagaggggtgt ggctgcttc tcagcgagac gtattatatac tttctgtcat tcgaaagata		360
ccagccttga ctgaaaatga cctgaaact tggatagttt gtaatttttc tgtggatcat		420
gacagtgtct ctctaaacaa ccgatgtgtc cgtgcacaaa taaatggtgc tatgatttgt		480

## 018190

caaaccttgg taagcccacc agagggaaac caggaaatta gcagggacaa cattctatgc 540  
aagattacat atgtagctaa tgtgaaccct ggaggatggg caccagcctc agtgtaagg 600  
gcagtggcaa agcgagagta tcctaaattt ctaaaacggt ttacttctta cgtccaag 658

<210> 19  
<211> 219  
<212> PRT  
<213> человеческий: белок START-домена CERTL

<400> 19

Gln Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln Asp  
1 5 10 15

Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu Met  
20 25 30

Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp Pro  
35 40 45

Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val Cys  
50 55 60

Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr Ile  
65 70 75 80

Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile Ile  
85 90 95

Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val Leu  
100 105 110

Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp Pro  
115 120 125

Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala Pro  
130 135 140

Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile Cys



## 018190

gttttattcc taaagtaaat agctatctaa gagagggcat ttccactttt ttttttttaa 900  
 attttgagac aggctctcac tctgttgccc atgctggagg gcagtgggat gatcacagct 960  
 cactgcaget ttgatctgac cgtcaaggg gttattctac ctacagctcc tgaatagctg 1020  
 ggaatacagc tgcacgccac tatgcatggc taatttttgt ttaatttttt gtagagatgt 1080  
 ggtcacactg tgttgcccag gctggctctg aactcctggc ctcaagtcac tccccacctt 1140  
 agcctcccaa agtggtggga ttataagcgt gagccaccat gcctggcccc aatttaaaat 1200  
 gtggaattca gttggtgtcc aagacttacc ttgagactct taaaagcacc agtctgtaac 1260  
 tagaacaat acagtcttag attacccea gtgcctagat atcattttat aatgattaga 1320  
 attgagtatt gtgggtcccc taattctgtg ggtgccttaa gtgagaattt ctaaagattt 1380  
 ttcacattct aaatgacttt gggttttgaa ctctccatct agtttacttc taaaatggga 1440  
 acttgaggca attcagggat ccaggcaaat ctttgtatat atttttttgt gtacatgac 1500  
 acatctcgaa atccatttcc gtgtttaatg ttagttgttt atgtgttagt attcctgtgt 1560  
 ctactgtttt gttgttgta atatgggtaa agtgagccct gaaatacatg ctaaacaaga 1620  
 catgaaatc agaaaggtac atagtgttcc aagtgcattg tagtttgatc tgtgttttac 1680  
 tttattgtgt tttcttgagt gtaaagaaag aataaatcaa agttcttcat acccattttg 1740  
 acaaagtgga acagtggagc tgttttttgc ttttgttttt atttattttt tgccactggt 1800  
 gatgatagat ttcaaaaaac aaaaggtggc agcagcacia tgttcattgt gaattatctc 1860  
 atagtatcta gattgatcaa gatctgacag aaggaatgca caaaggattc tatattotta 1920  
 atgatttatt aattaccagg atccttttct aaattgaatg tacttttgaa ttactaggtt 1980  
 tcttcttttt ttttgttctg caatagttaa agaaaactca gtagtttagt ttcagtttct 2040  
 catggaaatt ggtaaatgtt agttttgact tcatctatct tttatttgtt tttattagcg 2100  
 tagagttaga agtctcatat tctactgttc tatctaggat ggtgaaattc caaagggtgcc 2160  
 taacttgagt aagggatttg tgacaagata gtacacatta ctataagggc tattatttcc 2220  
 tgaactggat gtccttaaaa gcaataaac tgcccactat ctct 2264

<210> 21

<211> 205

## 018190

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; человеческий: белок StarD4

&lt;400&gt; 21

Met Glu Gly Leu Ser Asp Val Ala Ser Phe Ala Thr Lys Leu Lys Asn  
 1 5 10 15

Thr Leu Ile Gln Tyr His Ser Ile Glu Glu Asp Lys Trp Arg Val Ala  
 20 25 30

Lys Lys Thr Lys Asp Val Thr Val Trp Arg Lys Pro Ser Glu Glu Phe  
 35 40 45

Asn Gly Tyr Leu Tyr Lys Ala Gln Gly Val Ile Asp Asp Leu Val Tyr  
 50 55 60

Ser Ile Ile Asp His Ile Arg Pro Gly Pro Cys Arg Leu Asp Trp Asp  
 65 70 75 80

Ser Leu Met Thr Ser Leu Asp Ile Leu Glu Asn Phe Glu Glu Asn Cys  
 85 90 95

Cys Val Met Arg Tyr Thr Thr Ala Gly Gln Leu Trp Asn Ile Ile Ser  
 100 105 110

Pro Arg Glu Phe Val Asp Phe Ser Tyr Thr Val Gly Tyr Lys Glu Gly  
 115 120 125

Leu Leu Ser Cys Gly Ile Ser Leu Asp Trp Asp Glu Lys Arg Pro Glu  
 130 135 140

Phe Val Arg Gly Tyr Asn His Pro Cys Gly Trp Phe Cys Val Pro Leu  
 145 150 155 160

Lys Asp Asn Pro Asn Gln Ser Leu Leu Thr Gly Tyr Ile Gln Thr Asp  
 165 170 175

Leu Arg Gly Met Ile Pro Gln Ser Ala Val Asp Thr Ala Met Ala Ser  
 180 185 190

018190

Thr Leu Thr Asn Phe Tyr Gly Asp Leu Arg Lys Ala Leu  
 195 200 205

<210> 22  
 <211> 1344  
 <212> ДНК  
 <213> человеческая: кДНК StarD5

<400> 22  
 gagctccagc ctccaggcac ccgggatcca gcgccgcgc tcataacacc cgcgaacccg 60  
 cagctaagcg cagctcccga cgcaatggac ccggcgctgg cagcccagat gagcggagct 120  
 gtggccgaga agatgctcca gtaccggcgg gacacagcag gctggaagat ttgccgggaa 180  
 ggcaatggag tttcagtttc ctggaggcca tctgtggagt ttccagggaa cctgtaccga 240  
 ggagaaggca ttgtatatgg gacactagag gaggtgtggg actgtgtgaa gccagctgtt 300  
 ggaggcctac gagtgaagtg ggatgagaat gtgaccggtt ttgaaattat ccaaagcatc 360  
 actgacaccc tgtgtgtaag cagaacctcc actccctccg ctgccatgaa gctcatttct 420  
 cccagagatt ttgtggactt ggtgctagtc aagagatatg aggatgggac catcagttcc 480  
 aacgccaccc atgtggagca tccgttatgt ccccgaagc caggttttgt gagaggattt 540  
 aaccatcctt gtggttgctt ctgtgaacct cttccagggg aaccaccaa gaccaacctg 600  
 gtcacattct tccataccga cctcagcggt tacctcccac agaacgtggt ggactccttc 660  
 ttccccgcga gcatgaccog gttttatgcc aaccttcaga aagcagtga gcaattccat 720  
 gagtaatgct atcgttactt cttggcaaag aactcccgtg actcatcgag gagctccagc 780  
 tgttgggaca ccaaggagcc tgggagcacg cagaggcctg tgttactct ttggaacaag 840  
 ctgatggact ggcatactct gagaatgcca accagaggcg gcagcccacc cttcctgcct 900  
 cctgccccac tcagggttgg cgtgtgatga gccattcatg tgttccaaac tccatctgcc 960  
 tgttacccaa acacgcctct cctggcaggg tagaccagg cctctaacca tctgacagag 1020  
 actcggcctg gacaccatgc gatgcactct ggcaccaag ctttatgtgc ccatcactct 1080  
 cagagaccac gtttccctga ctgtcataga gaatcatcat cgcactgaa aaccaggccc 1140  
 tgttgctttt taagcatgta ccgctccctc agtccctgtc tgcagcccc caaatatatt 1200  
 tttctgatat agaccttgta tatggcttta atgccgcaa atatttattt ttccttaaaa 1260

## 018190

aagggtgtaa cttggaata atggtttaa aacaggataa gcattaagga aaaacaaaaa 1320

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1344

<210> 23

<211> 213

<212> PRT

<213> человеческий: белок StarD5

<400> 23

Met Asp Pro Ala Leu Ala Ala Gln Met Ser Glu Ala Val Ala Glu Lys  
1 5 10 15

Met Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Thr Ala Gly Trp Lys Ile Cys Arg Glu  
20 25 30

Gly Asn Gly Val Ser Val Ser Trp Arg Pro Ser Val Glu Phe Pro Gly  
35 40 45

Asn Leu Tyr Arg Gly Glu Gly Ile Val Tyr Gly Thr Leu Glu Glu Val  
50 55 60

Trp Asp Cys Val Lys Pro Ala Val Gly Gly Leu Arg Val Lys Trp Asp  
65 70 75 80

Glu Asn Val Thr Gly Phe Glu Ile Ile Gln Ser Ile Thr Asp Thr Leu  
85 90 95

Cys Val Ser Arg Thr Ser Thr Pro Ser Ala Ala Met Lys Leu Ile Ser  
100 105 110

Pro Arg Asp Phe Val Asp Leu Val Leu Val Lys Arg Tyr Glu Asp Gly  
115 120 125

Thr Ile Ser Ser Asn Ala Thr His Val Glu His Pro Leu Cys Pro Pro  
130 135 140

Lys Pro Gly Phe Val Arg Gly Phe Asn His Pro Cys Gly Cys Phe Cys  
145 150 155 160

## 018190

Glu Pro Leu Pro Gly Glu Pro Thr Lys Thr Asn Leu Val Thr Phe Phe  
 165 170 175

His Thr Asp Leu Ser Gly Tyr Leu Pro Gln Asn Val Val Asp Ser Phe  
 180 185 190

Phe Pro Arg Ser Met Thr Arg Phe Tyr Ala Asn Leu Gln Lys Ala Val  
 195 200 205

Lys Gln Phe His Glu  
 210

<210> 24  
 <211> 663  
 <212> ДНК  
 <213> человеческая: κДНК StarD6

<400> 24  
 atggacttca aggcaattgc ccaacaaact gcccaagaag ttttaggtta taatcgagat 60  
 acatcaggct ggaaagtgg taaaacttca aaaaagataa ctgtttccag taaggcttct 120  
 agaaaaattcc atggaaatct atatcgtgtt gaagggataa ttccagaatc accagctaaa 180  
 ctatctgatt tcctctacca aactggagac agaattacat gggataaatc attgcaagtg 240  
 tataatatgg tacacaggat tgattcggac acattcatat gtcataccat tacacaaagt 300  
 tttgccgtgg gctccatttc ccctcgagac tttatcgact tagtgtacat caagcgtac 360  
 gaaggaata tgaacattat cagttctaaa agtgtggatt ttccagaata tcctccatct 420  
 tcaaattata tccgcgggta taaccatcct tgtggctttg tatgttcacc aatggaagaa 480  
 aaccagcat attccaaact agtgatgttt gtccagacag aatgagagg aaaattgtcc 540  
 ccataataa ttgaaaaaac catgocctcc aacttagtaa acttcatcct caatgcaaaa 600  
 gatggaataa aggcacacag aactccatca agacgtggat ttcataataa tagtcattca 660  
 tga 663

<210> 25  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> человеческий: белок StarD6

018190

<400> 25

Met Asp Phe Lys Ala Ile Ala Gln Gln Thr Ala Gln Glu Val Leu Gly  
 1                   5                   10                   15

Tyr Asn Arg Asp Thr Ser Gly Trp Lys Val Val Lys Thr Ser Lys Lys  
                   20                   25                   30

Ile Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Arg Lys Phe His Gly Asn Leu Tyr  
                   35                   40                   45

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

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

Tyr Asn Met Val His Arg Ile Asp Ser Asp Thr Phe Ile Cys His Thr  
                   85                   90                   95

Ile Thr Gln Ser Phe Ala Val Gly Ser Ile Ser Pro Arg Asp Phe Ile  
                   100                   105                   110

Asp Leu Val Tyr Ile Lys Arg Tyr Glu Gly Asn Met Asn Ile Ile Ser  
                   115                   120                   125

Ser Lys Ser Val Asp Phe Pro Glu Tyr Pro Pro Ser Ser Asn Tyr Ile  
                   130                   135                   140

Arg Gly Tyr Asn His Pro Cys Gly Phe Val Cys Ser Pro Met Glu Glu  
 145                   150                   155                   160

Asn Pro Ala Tyr Ser Lys Leu Val Met Phe Val Gln Thr Glu Met Arg  
                   165                   170                   175

Gly Lys Leu Ser Pro Ser Ile Ile Glu Lys Thr Met Pro Ser Asn Leu  
                   180                   185                   190

Val Asn Phe Ile Leu Asn Ala Lys Asp Gly Ile Lys Ala His Arg Thr

195	200	205	
Pro Ser Arg Arg Gly Phe His His Asn Ser His Ser			
210	215	220	
<210>	26		
<211>	1932		
<212>	ДНК		
<213>	человеческая: КДНК РСТР		
<400>	26		
ccggactgcg gaaggatgga gctggccgcc ggaagcttct cggaggagca gttctggggag			60
gocctgocccg agctccagca gcccgctctg gccggggccg actggcagct cctagtggag			120
acctcgggca tcagcatcta ccggctgctg gacaagaaga ctggacttca tgagtataaa			180
gtctttggtg ttctggagga ctgctcacca actctactgg cagacatcta tatggactca			240
gattacagaa aacaatggga ccagtatgtt aaagaactct atgaacaaga atgcaacgga			300
gagactgtgg tctactggga agtgaagtac ccttttccca tgtccaacag agactatgtc			360
taccttcggc agcggcgaga cctggacatg gaaggaggga agatccatgt gatcctggcc			420
cggagcacct ccatgcctca gcttgccgag aggtctgggg tgatccgggt gaagcaatac			480
aagcagagcc tggcgattga gagtgacggc aagaagggga gcaaagtttt catgtattac			540
ttcgataacc cgggtggcca aattccgtcc tggctcatta actgggccgc caagaatgga			600
gttcttaact tcttgaaaga catggcaaga gctgtcaga actacctcaa gaaaacctaa			660
gaaagagaac tgggaacatt gcatccatgg gttgatgtct ctggaagtgc aaccacccaa			720
tgtctctgga agtgccacct ggaagtgcca cctggaagtg tctctggaag agcaccacc			780
actgttcagc cttcccctgc tgtttctgtc ttcagaggcc tacacactac cacatccttt			840
ctaagcatgt ttgcctgaca tccagctcac tcgtctgctt cctttctcgc tcccccatc			900
ctgggctggg ctgccttctt ctacagttca atatggggca gactagggaa acctttgctt			960
gcttactatt aggaggggaa gtcttcagta gggaacacga tcattccatt gtgcaatfff			1020
acggggatgg gtggggggag ggacacaaca aaatttaaga atgactatft gggcgggctg			1080
gctcttttgc agcttgtgat ttcttccagc ttgggagggg ctgctggaag tggcatttcg			1140
ttcagagctg actttcagtг caccctaaact ggatgacgtg ccaatgtcca tttgccttat			1200

018190

gctttgtgga gctgattagg ctgggatttg aggtgataat ccagtaagtc tttctcgtt 1260  
 cctacttgty gaggatcagt agctgttatg atgccagacc atttggagaa gtatcagagg 1320  
 cctgaccgga cacataatac gacaaccaca tttttctca tcatccatga ggaaatggat 1380  
 gattttctctt ttccatatgt cactggggga aaggctgcct gtacctctca agctttgcat 1440  
 tttactggaa actgaggcgt caagatggct gtggcagcta gcaaaagcaa agatgctttg 1500  
 tgcatagcct tgtgaaaaag tatcttteta tgcaataaga tgaattttcc tcccagaata 1560  
 tttagaaatg tagaagggat aacagttcac agccaggtaa aatttaactg gtggcttaat 1620  
 gactctgcac cttttctca ggaattctgc ctaagttgtc tgcttttct accaccaaaa 1680  
 agacttttag tttctatgc tttctcctga attttggtag ggtaagtatt tctatgtcaa 1740  
 aggcacagcc ttgatgatct cagggaaaaa ttttaatcac tgtgtataat gatactgaac 1800  
 cttgattaat aacagaaatt caggatgtaa agccacagaa tgggatttat taatgtggga 1860  
 tacctcagac tgtttgtttt ctttctggga agaaaagtgt gttctataat gaataaatat 1920  
 agagtggttt tt 1932

<210> 27  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> человеческий: белок PCTP  
 <400> 27

Met Glu Leu Ala Ala Gly Ser Phe Ser Glu Glu Gln Phe Trp Glu Ala  
 1 5 10 15

Cys Ala Glu Leu Gln Gln Pro Ala Leu Ala Gly Ala Asp Trp Gln Leu  
 20 25 30

Leu Val Glu Thr Ser Gly Ile Ser Ile Tyr Arg Leu Leu Asp Lys Lys  
 35 40 45

Thr Gly Leu His Glu Tyr Lys Val Phe Gly Val Leu Glu Asp Cys Ser  
 50 55 60

Pro Thr Leu Leu Ala Asp Ile Tyr Met Asp Ser Asp Tyr Arg Lys Gln



<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (2)..(2)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (3)..(4)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (5)..(5)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (6)..(8)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (9)..(9)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (10)..(10)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (11)..(11)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (12)..(12)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (13)..(13)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (14)..(15)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (16)..(16)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (17)..(17)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (18)..(20)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (22)..(38)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (39)..(40)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (41)..(41)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (42)..(42)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (43)..(61)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (62)..(62)

<223> положительно заряженная аминокислота: His, Lys, Arg или любая модифицированная положительно заряженная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (63)..(63)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (64)..(64)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (65)..(65)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (66)..(67)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (68)..(74)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (75)..(75)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (76)..(78)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (79)..(80)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (81)..(81)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (82)..(82)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (83)..(88)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (89)..(89)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (91)..(92)

<223> полярная аминокислота: Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная полярная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (93)..(93)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (94)..(94)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (95)..(107)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (108)..(108)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (109)..(109)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (110)..(110)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (111)..(111)

<223> алифатическая аминокислота: Ile, Leu, Val или любая модифицированная алифатическая аминокислота

<220>

<221> X

<222> (112)..(112)

<223> полярная аминокислота: Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная полярная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (113)..(113)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (114)..(114)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (115)..(115)  
<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (116)..(116)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (117)..(117)  
<223> малая аминокислота: Ala, Cys, Asp, Gly, Asn, Pro, Ser, Thr, Val или любая модифицированная малая аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (118)..(124)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (125)..(125)  
<223> малая аминокислота: Ala, Cys, Asp, Gly, Asn, Pro, Ser, Thr, Val или любая модифицированная малая аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (126)..(126)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (127)..(127)  
<223> алифатическая аминокислота: Ile, Leu, Val или любая модифицированная алифатическая аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (128)..(128)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (129)..(129)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (130)..(132)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (133)..(133)  
<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (134)..(135)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (136)..(136)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (137)..(139)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (140)..(140)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (141)..(141)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (142)..(142)  
<223> малая аминокислота: Ala, Cys, Asp, Gly, Asn, Pro, Ser, Thr, Val или любая модифицированная малая аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (143)..(143)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (145)..(145)  
<223> отрицательно заряженная аминокислота: Asp, Glu или любая модифицированная отрицательно заряженная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (146)..(147)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (148)..(148)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (149)..(149)  
<223> алифатическая аминокислота: Ile, Leu, Val или любая модифицированная алифатическая аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (151)..(151)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (152)..(152)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (153)..(153)  
<223> полярная аминокислота: Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная полярная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (154)..(164)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (165)..(166)  
<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидн аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (167)..(167)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (168)..(169)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (170)..(170)

<223> алифатическая аминокислота: Ile, Leu, Val или любая модифицированная алифатическая аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (171)..(171)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (172)..(173)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (174)..(174)  
<223> спиртовая аминокислота: Ser, Thr или любая модифицированная спиртовая аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (175)..(175)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (176)..(176)  
<223> полярная аминокислота: Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная полярная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (177)..(178)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (179)..(179)  
<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (180)..(188)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (189)..(189)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (190)..(191)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (193)..(193)

<223> малая аминокислота: Ala, Cys, Asp, Gly, Asn, Pro, Ser, Thr, Val или любая модифицированная малая аминокислота

<220>

<221> X

<222> (194)..(194)

<223> полярная аминокислота: Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная полярная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (195)..(196)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (197)..(197)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (198)..(198)

<223> малая аминокислота: Ala, Cys, Asp, Gly, Asn, Pro, Ser, Thr, Val или любая модифицированная малая аминокислота

<220>

<221> X

<222> (199)..(202)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (203)..(203)

<223> полярная аминокислота: Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная полярная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (204)..(205)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (206)..(207)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (208)..(208)

<223> малая аминокислота: Ala, Cys, Asp, Gly, Asn, Pro, Ser, Thr, Val или любая модифицированная малая аминокислота

<220>

<221> X

<222> (209)..(220)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (221)..(221)

<223> малая аминокислота: Ala, Cys, Asp, Gly, Asn, Pro, Ser, Thr, Val или любая модифицированная малая аминокислота

<220>

<221> X

<222> (222)..(222)

<223> полярная аминокислота: Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная полярная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (223)..(225)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (226)..(226)

<223> алифатическая аминокислота: Ile, Leu, Val или любая модифицированная алифатическая аминокислота

<220>

<221> X

<222> (227)..(228)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (229)..(229)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (230)..(230)

<223> отрицательно заряженная аминокислота: Asp, Glu или любая модифицированная отрицательно заряженная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (231)..(231)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (232)..(232)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (233)..(233)

<223> малая аминокислота: Ala, Cys, Asp, Gly, Asn, Pro, Ser, Thr, Val или любая модифицированная малая аминокислота

<220>

<221> X

<222> (234)..(240)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (241)..(241)

<223> полярная аминокислота: Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная полярная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (242)..(242)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (243)..(244)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (245)..(245)

<223> полярная аминокислота: Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная полярная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (246)..(246)

<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (247)..(248)

<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>

<221> X

<222> (249)..(249)

<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>

<221> X  
<222> (250)..(250)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (251)..(251)  
<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (252)..(252)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (253)..(254)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (255)..(256)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (257)..(257)  
<223> полярная аминокислота: Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная полярная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (258)..(261)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (262)..(262)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (263)..(264)  
<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (265)..(265)  
<223> гидрофобные аминокислоты: Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr или любая модифицированная гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (266)..(266)  
<223> полярная аминокислота: Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная полярная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (267)..(267)  
<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (268)..(268)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (269)..(269)  
<223> спиралевидные аминокислоты: Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная спиралевидная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (270)..(270)  
<223> любая аминокислота: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val или любая модифицированная аминокислота

<220>  
<221> X  
<222> (271)..(271)  
<223> полярная аминокислота: Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr или любая модифицированная полярная аминокислота

&lt;400&gt; 28

Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa  
 20 25 30

Xaa  
 35 40 45

Xaa  
 50 55 60

Xaa  
 65 70 75 80

Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 85 90 95

Xaa  
 100 105 110

Xaa  
 115 120 125

Xaa Arg  
 130 135 140

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa  
 145 150 155 160

Xaa  
 165 170 175

Xaa Arg  
 180 185 190

Xaa  
 195 200 205

Xaa  
210 215 220

Xaa  
225 230 235 240

Xaa  
245 250 255

Xaa  
260 265 270

