



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2008152780/10, 08.06.2007**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.06.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
09.06.2006 JP 2006-161350

(43) Дата публикации заявки: **20.07.2010** Бюл. № 20

(45) Опубликовано: **27.04.2012** Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2155066 C2, 27.08.2000. EP 0001137943 B1, 29.03.2006.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **11.01.2009**

(86) Заявка РСТ:
JP 2007/061652 (08.06.2007)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/142336 (13.12.2007)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной**

(72) Автор(ы):

**НИСИЯМА Масахико (JP),
ХИЯМА Кейко (JP),
ТАНИМОТО Кейдзи (JP),
МАСУКО Норико (JP)**

(73) Патентообладатель(и):

КАБУСИКИ КАЙСЯ ЯКУЛТ ХОНСА (JP)

(54) ГЕН, ВОВЛЕЧЕННЫЙ В ИММОРТАЛИЗАЦИЮ РАКОВОЙ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описан маркерный ген для определения иммортализации раковой клетки, причем маркерный ген представляет собой полинуклеотид, обладающий последовательностью, по меньшей мере, из 15 последовательных оснований. Представлен способ определения иммортализованной раковой клетки. Описан маркер иммортализации раковой клетки, представляющий собой полипептид. Представлено антитело к описанному маркеру. Описаны реагент для

определения иммортализованной раковой клетки, включающий в себя, по меньшей мере, один член, выбранный из группы, состоящей из маркерного гена и антитела. Представлен способ скрининга вещества на супрессию пролиферации иммортализованных раковых клеток. Представлен ингибитор роста иммортализованной раковой клетки, содержащий в качестве активного ингредиента описанный полинуклеотид. Изобретение позволяет определять иммортализованную раковую клетку. 12 н. и 4 з.п. ф-лы, 28 ил., 3 табл., 2 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2008152780/10, 08.06.2007**

(24) Effective date for property rights:
08.06.2007

Priority:

(30) Convention priority:
09.06.2006 JP 2006-161350

(43) Application published: **20.07.2010 Bull. 20**

(45) Date of publication: **27.04.2012 Bull. 12**

(85) Commencement of national phase: **11.01.2009**

(86) PCT application:
JP 2007/061652 (08.06.2007)

(87) PCT publication:
WO 2007/142336 (13.12.2007)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

**NISIJaMA Masakhiko (JP),
KhIJaMA Kejko (JP),
TANIMOTO Kejdzi (JP),
MASUKO Norio (JP)**

(73) Proprietor(s):

KABUSIKI KAJSJa JaKULT KhONSA (JP)

(54) **GENE INVOLVED IN IMMORTALISATION OF HUMAN CANCER CELL AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology. Described is a marker gene for determining cancer cell immortalisation, wherein the marker gene is a polynucleotide having a base sequence of at least 15 successive bases. A method for determining an immortalised cancer cell is disclosed. Described also is a cancer cell immortalisation marker which is a polynucleotide. An antibody to said marker is disclosed. Described is a reagent for determining an

immortalised cancer cell, comprising at least one member selected from a group consisting of a marker gene and an antibody. A method for screening a substance for suppressing proliferation of immortalised cancer cells is disclosed. An immortalised cancer cell growth inhibitor containing said polynucleotide as an active ingredient is disclosed.

EFFECT: invention enables to determine an immortalised cancer cell.

16 cl, 28 dwg, 3 tbl, 2 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к гену (определяющему иммортализацию гену), вовлеченному в иммортализацию раковых клеток человека, и к способу, применимому для избирательной терапии рака, нацеленной на иммортализованную раковую клетку, обладающую геном. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу распознавания иммортализованной раковой клетки с использованием определяющего иммортализацию гена в качестве показателя и реагента для распознавания. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу для скрининга активного ингредиента избирательного противоракового лекарственного средства (ингибитора роста иммортализованной раковой клетки), нацеленного на иммортализованные раковые клетки, и к противораковому лекарственному средству (ингибитору роста иммортализованной раковой клетки).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Пациенты получают плохой прогноз для солидного рака человека, если не проводить радикального хирургического вмешательства. Это в основном происходит из-за недостаточного эффекта современной химиотерапии. Поскольку существующие химиотерапевтические лекарственные средства в основном влияют на биосинтез нуклеиновых кислот, ДНК, микротрубочки и т.д., так как они ингибируют процесс синтеза от нуклеиновой кислоты до белка, они неминуемо разрушают в дополнение к раковым клеткам здоровые клетки, которые находятся в процессе роста. Недавнее исследование идентифицировало ряд молекул, которые специфически экспрессируются в раковых клетках, и ингибиторы, нацеленные на эти специфические молекулы, могут оказывать минимальное неблагоприятное действие на здоровые клетки. Это преимущество позволяет использовать более высокую дозу лекарственного средства. Однако несмотря на его активное развитие, такое нацеленное на молекулу лекарственное средство обладает следующим главным дефектом. Нацеленное на молекулу лекарственное средство не обязательно обещает конкретный эффект для большинства случаев рака; эффект может сильно меняться для каждого случая. Более того, обычно является сложным точно оценить эффект до введения. Такое сильное изменение для нацеленного на молекулу терапевтического лекарственного средства в каждом случае может происходить из-за того факта, что лекарственное средство направлено на молекулы генов, вовлеченных в канцерогенез или метастазирование. Канцерогенез меняется для различных типов рака и даже в пределах одного и того же рака; таким образом предполагают, что эффект, оказываемый молекулами-мишенями на развитие рака, отличается в каждом случае. В противоположность этому развитие нацеленного на молекулу терапевтического лекарственного средства, которое может обладать универсальным эффектом для множества видов рака, должно стать возможным посредством идентификации молекулы, обладающей универсальным и первичным эффектом для различных типов рака.

У всех позвоночных, включая человека, каждый конец хромосомы содержит простую повторяющуюся последовательность: «TTAGGG» (приблизительно 10 т.п.о. у человека и в несколько раз больше у мышей). Эта концевая последовательность не может до конца воспроизводиться при каждой дупликации ДНК при делении клетки и постепенно укорачивается (из расчета приблизительно 200 оснований у человека). Эта концевая часть названа «теломерой». Когда теломера укорачивается до определенной длины (приблизительно 5 т.п.о. в незлокачественных клетках человека) посредством повторяющихся делений клетки, деление клетки в конечном

счете прекращается. Деление клетки снова становится возможным посредством злокачественного перерождения клетки, однако затем когда укорачивание в конечном итоге достигает предельного уровня (приблизительно 2 т.п.о.), клетка погибает. Как описано в непатентном документе 1, обратная транскриптаза «теломеразы» служит для удлинения укороченной теломеры для стабилизации длины теломеры, таким образом продлевая предел делений клетки. Поскольку теломераза не экспрессируется в здоровой клетке, деление клетки для здоровой клетки ограничено несколькими десятками раз. Однако теломераза является высокоэкспрессированной как в способной к размножению клетке, так и в иммортализованной раковой клетке. Все раковые клетки привыкли рассматривать как иммортализованные; однако, опубликованы сообщения, что некоторые виды клинически выраженного рака не обладают активностью теломеразы (см. непатентные документы 2, 3 и т.д.). Опубликованы также другие сообщения, что вынужденная экспрессия ферментного компонента теломеразы TERT в незлокачественной клетке не приводит к получению раковой клетки (см. непатентный документ 4). Соответственно к настоящему времени злокачественное перерождение и иммортализацию рассматривают как различные феномены:

[Непатентный документ 1] Harley CB, Mutation Res, 256: 271-82, 1991

[Непатентный документ 2] Kim NW et al., Science 266: 2011-5, 1994

[Непатентный документ 3] Hiyama K et al., J Natl Cancer Inst 87: 895-902, 1995

[Непатентный документ 4] Morales CP et al., Nat Genet 21: 115-8, 1999

[Непатентный документ 5] Shay JW, Bacchetti S, Eur J Cancer 33: 787-91, 1997

[Непатентный документ 6] Hiyama K et al., J Immunol 155: 3711-5, 1995

[Непатентный документ 7] Hiyama E et al., Int J Oncol 9: 453-8, 1996

[Непатентный документ 8] Forsyth NR et al., Aging Cell 2: 235-43, 2003

[Непатентный документ 9] Bodnar AG et al., Exp Cell Res 228: 58-64, 1996

[Непатентный документ 10] Hiyama K et al., Int J Oncol 27: 87-95, 2005

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Техническая проблема

Настоящее изобретение относится к способу распознавания иммортализованной раковой клетки и к реагенту, применяемому для распознавания. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу скрининга активного ингредиента для ингибитора роста иммортализованной раковой клетки, который является применимым в качестве избирательного противоракового лекарственного средства благодаря его эффекту специфической супрессии роста иммортализованной раковой клетки; и к ингибитору роста иммортализованной раковой клетки.

Техническое решение

Чтобы разработать нацеленное на молекулу терапевтическое лекарственное средство, которое является эффективным для лечения рака, особенно лекарственное средство, которое, как ожидают, обладает универсальным эффектом для многих типов рака, авторы настоящего изобретения сфокусировали свое внимание на другом признаке рака - «иммортализации», который отличается от «перерождения в рак (злокачественного изменения)». Конкретно, даже если раковые клетки обнаружены, они не будут распространяться или метастазировать, чтобы погубить хозяина, если их неограниченный рост можно остановить. Супрессия неограниченного роста также увеличивает возможность естественной смерти раковых клеток, при условии, что число оставшихся раковых клеток снижено до некоторой степени посредством химиотерапии или нерадикального хирургического

вмешательства, поскольку ожидают, что время деления раковой клетки будет истекать до начала роста следующей клетки. Опубликовано, что эту экспрессию теломеразы наблюдали в 80% или более из нескольких тысяч клинических образцов (см. Непатентный документ 5); экспрессию теломеразы подтверждали при различных типах рака, исследованных до настоящего времени; а также экспрессию теломеразы наблюдали в большинстве штаммов клеток, происходящих из видов рака человека (см. Непатентный документ 2). На основании этих сообщений и известного факта, что раковые клетки с экспрессией теломеразы никогда естественным образом не станут отрицательными снова, феномен иммортализации, по-видимому, существует как универсальный и широко распространенный во многих раковых клетках, в отличие от большого разнообразия канцерогенеза. Соответственно посредством нацеливания на молекулу, которая регулирует иммортализацию, становится возможным супрессировать неограниченный раковый рост с универсальным эффектом для многих типов рака. На основании этого принципа тестировали противораковую стратегию, сфокусированную непосредственно на теломеразе.

Однако авторы настоящего изобретения уже обнаружили, что клетка-предшественник, лимфоцит и т.д., из регенерирующего органа обладает активацией теломеразы даже в нормальной здоровой клетке (см. Непатентные документы 6 и 7). Также известно, что иммортализация клеток не всегда является индуцированной вынужденной экспрессией TERT (ферментный компонент теломеразы) в незлокачественных клетках (см. Непатентный документ 8); и что здоровая клетка-предшественник или лимфоцит, экспрессирующие теломеразу, не являются иммортализованными, но обладают увеличенным временем жизни (см. Непатентные документы 6 и 9). Соответственно такое обнаружение активации теломеразы в здоровых клетках, очевидно, представляет собой просто экспрессию теломеразы, а не иммортализацию клетки. Более конкретно, хотя иммортализация клетки человека по существу требует активации фермента теломеразы, который служит для удлинения теломеры на конце хромосомы, иммортализация является индуцированной не только активацией теломеразы, но также присутствием специфических молекул для иммортализации. Молекулы, по-видимому, функционируют, в частности, в раковых клетках. Фактически, авторы настоящего изобретения подтвердили, что ген, который подвергается специфической экспрессии и изменению в клоне, который был иммортализован вынужденной экспрессией теломеразы посредством введения TERT в здоровые клетки, полностью отличается от опубликованных экспрессии и изменений, наблюдаемых в раковых клетках (см. Непатентный документ 10). Существует другой факт, показывающий, что ген, вовлеченный в иммортализацию здоровых клеток, отличается от гена, вовлеченного в иммортализацию раковых клеток. Если лекарственное средство направлено на теломеразу, оно супрессирует способность к делению лимфоцита, клетки-предшественника крови, клетки крипт слизистой оболочки кишечника и т.д., и таким образом проявляет тенденцию нарушать иммунность, кроветворную способность и функционирование желудочно-кишечного тракта, что, как известно, является неисправимым вредом при лечении рака. Однако если лекарственное средство направлено на определяющий иммортализацию фактор, который действует только в раковых клетках, становится возможным блокировать специфическую неограниченную пролиферацию раковых клеток без разрушения здоровых клеток организма/клеток-предшественников, обладающих активностью теломеразы.

На основании этой теории авторы настоящего изобретения провели интенсивное исследование для обнаружения генов, которые являются универсально вовлеченными в иммортализацию раковых клеток человека. В результате исследования авторы настоящего изобретения в конечном итоге поняли, что эти гены не являются вовлеченными в увеличение продолжительности жизни клеток в результате активации теломеразы в здоровых клетках, но являются специфически вовлеченными в постоянную пролиферацию раковых клеток. Затем авторы изобретения идентифицировали тринадцать определяющих иммортализацию генов (Таблица 1) следующим образом. Сначала гены с универсальной экспрессией и усилением в различных типах рака выделяли анализом на микрочипах. Среди полученных генов выбрали тринадцать видов генов на основании их более сильной экспрессии в органе с клиническим раком, состоящем из иммортализованных раковых клеток, чем экспрессия в раковой ткани, состоящей из неиммортализованных раковых клеток и на основании того, что они не подвергаются экспрессии или повышению уровня в здоровых клетках, экспрессирующих теломеразу посредством ее введения. Затем авторы изобретения подтвердили, что супрессия экспрессии тринадцати генов с использованием миРНК супрессирует пролиферацию иммортализованных раковых клеток.

Далее авторы настоящего изобретения провели более подробное исследование на основании вышеуказанной теории и в конечном итоге завершили настоящее изобретение. Конкретно настоящее изобретение включает в себя следующие формы.

Пункт 1. Маркерный ген для определения иммортализации раковой клетки, причем маркерный ген содержит полинуклеотид, обладающий последовательностью, по меньшей мере, из 15 оснований, которая специфически гибридизуется с непрерывной последовательностью, по меньшей мере, из 15 оснований внутри любой из последовательностей оснований, представленных SEQ ID NO:1-13.

Пункт 2. Маркерный ген по пункту 1, где маркерный ген представляет собой зонд или праймер.

Пункт 3. Способ определения иммортализованной раковой клетки, включающий в себя стадии:

(1) связывания маркерного гена по п.1 или 2 с РНК, приготовленной из биологического образца, который является выделенным из тестируемого субъекта и который может содержать раковую клетку, или с производным РНК;

(2) измерения количества РНК или производного, связанных с маркерным геном, с использованием маркерного гена в качестве показателя; и

(3) сравнения количества РНК или ее производного, обнаруженных на стадии (2) (в общем обозначаемого как «количество РНК» здесь и далее), с количеством (в общем обозначаемым как «сравнительное количество РНК» здесь и далее) соответствующей РНК или ее производного в неиммортализованной здоровой или раковой клетке.

Пункт 4. Способ определения иммортализованной раковой клетки по пункту 3, дополнительно включающий в себя стадию:

(4) определения, что раковая клетка тестируемого субъекта является иммортализованной, когда количество РНК, обнаруженное на стадии (2), выше, чем сравнительное количество РНК, и определения, что раковая клетка тестируемого субъекта не является иммортализованной, когда количество РНК, обнаруженное на стадии (2), не превышает сравнительное количество РНК.

Пункт 5. Антитело для распознавания полипептида, обладающего любой из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO:14-26. Антитело является пригодным для применения для определения иммортализованной раковой клетки.

5 Пункт 6. Способ определения иммортализованной раковой клетки, включающий в себя стадии:

(1') связывания содержащей белок фракции, содержащей полипептид, полученной из биологического образца, который является выделенным из тестируемого субъекта и который может содержать раковую клетку с антителом по пункту 5;

10 (2') измерения количества полипептида, связанного с антителом, с использованием антитела в качестве показателя; и

(3') сравнения количества (в общем обозначаемого как «количество полипептида» - здесь и далее) полипептида, обнаруженного на стадии (2'), с количеством (в общем обозначаемым как «сравнительное количество полипептида» - здесь и далее) соответствующего полипептида в неиммортализованной здоровой или раковой клетке.

15 Пункт 7. Способ определения иммортализованной раковой клетки по пункту 6, дополнительно включающий в себя стадию:

(4') определения, что раковая клетка тестируемого субъекта является иммортализованной, когда количество полипептида, обнаруженного на стадии (2'), выше, чем сравнительное количество полипептида, и определения, что раковая клетка тестируемого субъекта не является иммортализованной, когда количество полипептида, обнаруженное на стадии (2'), не превышает сравнительное количество полипептида.

20 Пункт 8. Набор реагентов для определения иммортализованной раковой клетки, включающий в себя, по меньшей мере, один член, выбранный из группы, состоящей из маркерного гена по пункту 1 и антитела по пункту 5.

30 Пункт 9. Способ скрининга вещества на супрессию пролиферации иммортализованных раковых клеток, включающий в себя стадии:

(A) приведения тестируемого материала в контакт с клеткой, которая может экспрессировать один из определяющих иммортализацию генов, представленных SEQ ID NO:1-13;

(B) измерения уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена в клетке, приведенной в контакт с тестируемым материалом;

(C) сравнения уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена, обнаруженного на стадии (B), с уровнем экспрессии (в общем обозначаемым как «сравнительный уровень экспрессии» - здесь и далее) определяющего иммортализацию гена в клетке, не находящейся в контакте с тестируемым материалом; и

(D) выбора тестируемого материала в качестве вещества-кандидата для супрессии пролиферации иммортализованных раковых клеток, когда уровень экспрессии, обнаруженный на стадии (B), ниже, чем сравнительный уровень экспрессии.

45 Пункт 10. Способ скрининга вещества на супрессию пролиферации иммортализованных раковых клеток, включающий в себя стадии:

(A') приведения тестируемого материала в контакт с полипептидом, обладающим одной из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO:14-26;

(B') измерения активности полипептида, обладающего одной из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO:14-26, приведенного в контакт с

тестируемым материалом;

(С') определения степени активности полипептида, обнаруженной на стадии (В'), путем сравнения активности полипептида, обнаруженной на стадии (В'), с активностью (в общем обозначаемой как «сравнительная активность» - здесь и

далее) полипептида, не находящегося в контакте с тестируемым материалом; и (D') выбора тестируемого материала в качестве вещества-кандидата для супрессии пролиферации иммортализованных раковых клеток, когда активность полипептида, обнаруженная на стадии (В'), ниже, чем сравнительная активность.

Пункт 11. Ингибитор роста иммортализованной раковой клетки, содержащий в качестве активного ингредиента полинуклеотид, обладающий последовательностью, по меньшей мере, из 15 оснований, которая специфически гибридизуется с непрерывной последовательностью, по меньшей мере, из 15 оснований внутри любой из последовательностей оснований, представленных SEQ ID NO:1-13.

Пункт 12. Ингибитор роста иммортализованной раковой клетки по пункту 11, где полинуклеотид обладает одной из последовательностей оснований, представленных SEQ ID NO:27-76.

Пункт 13. Способ противоракового лечения, включающий в себя стадию введения ингибитора роста иммортализованной раковой клетки по пункту 11 или 12 в раковые клетки пациента.

Пункт 14. Применение полинуклеотида, обладающего последовательностью, по меньшей мере, из 15 оснований, которая специфически гибридизуется с непрерывной последовательностью, по меньшей мере, из 15 оснований внутри одной из последовательностей оснований, представленных SEQ ID NO:1-13, для получения ингибитора роста иммортализованной раковой клетки.

Пункт 15. Применение по пункту 14, где полинуклеотид обладает одной из последовательностей оснований, представленных SEQ ID NO:27-76.

ЭФФЕКТ ИЗОБРЕТЕНИЯ

По настоящему изобретению выявили гены, которые универсальным образом определяют иммортализацию многих различных раковых клеток. Гены обладают специфически повышенной экспрессией в иммортализованных раковых клетках при множестве видов рака. Настоящее изобретение относится к способу распознавания иммортализованных раковых клеток и к реагенту, который применяют для способа распознавания, который позволяет измерение уровня экспрессии определяющих иммортализацию генов. По отношению к измеренному уровню становится возможным отличить иммортализованные раковые клетки от клеток с ограниченным числом делений. Это разделение никогда не являлось возможным при общепринятых общих патологических диагнозах. Таким образом разделение обладает большим потенциалом для клинического применения, которое является применимым для ранней диагностики, новых возможностей лечения, прогнозирования и т.п. для различных видов рака.

Кроме того, с помощью способа скрининга, нацеленного на определяющий иммортализацию ген, по настоящему изобретению получают активный ингредиент противоракового лекарственного средства, специфически супрессирующего пролиферацию иммортализованных раковых клеток.

НАИЛУЧШИЙ СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

(I) Определяющий иммортализацию ген

По настоящему изобретению термин «неиммортализованные раковые клетки» относится, среди раковых клеток вообще, к клеткам с ограниченным числом

делений, обладающим (1) отсутствием активации теломеразы, (2) сниженной длиной теломеры и (3) не поддающейся детекции экспрессией белка теломеразы. Кроме того, по настоящему изобретению термин «иммортилизованная раковая клетка» относится к клетке, в которой отсутствует по меньшей мере одно из

вышеупомянутых условий; более конкретно, к клетке, обладающей активацией теломеразы, к клетке, обладающей увеличенной длиной теломеры, и/или к клетке с поддающейся детекции экспрессией белка теломеразы. Такая «иммортилизованная раковая клетка» является способной к неограниченной пролиферации клетки.

По настоящему изобретению термин «определяющий иммортализацию ген» относится к гену, который определяет иммортализацию раковых клеток. Настоящее изобретение не ограничивает конкретно тип раковой клетки в качестве мишени и относится к клеткам, происходящим, например, из рака легкого, рака молочной железы, рака пищевода, рака головы и шеи, рака желудка, рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака печени, рака желчного пузыря и желчных протоков, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы или карциномы шейки матки.

Определяющими иммортализацию генами являются конкретно (1) ген UBE2S, (2) ген RFC4, (3) ген PTGES2, (4) ген MAF1, (5) ген ACVR2B, (6) ген FAM119A, (7) ген LTB4DH, (8) ген DPM2, (9) ген SEPX1, (10) ген PSMA3, (11) ген CHCHD3, (12) ген LSM3 и (13) ген GTSE1. В таблице 1 показаны регистрационный номер в GenBank, официальное наименование гена и символ гена, и SEQ ID NO:, обозначающие последовательности оснований генов. В таблице 1 наименование гена, символ гена и т.д. основаны на данных NCBI, описанных в Интернет (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Таблица 1			
SEQ ID NO:	Регистрационный № в GenBank	Наименование гена	Символ гена
1	NM_014501	присоединяющий убиквитин фермент E2S	UBE2S
2	NM_002916	фактор репликации C (активатор 1) 4, 37 кДа	RFC4
3	NM_025072	простагландин E-синтаза 2	PTGES2
4	NM_032272	гомолог MAF1 (<i>S. cerevisiae</i>)	MAF1
5	NM_001106	рецептор активина A, тип IIB	ACVR2B
6	NM_145280	семейство со сходством последовательностей 119, член A	FAM119A
7	NM_012212 (D49387, BQ214856)	12-гидроксидегидрогеназа лейкотриена B4	LTB4DH
8	NM_003863	полипептид 2 маннозилтрансферазы долихилфосфата, регуляторная субъединица	DPM2
9	NM_016332	селенопротеин X, 1	SEPX1
10	NM_002788	субъединица протеасомы (просомы, macropain), типа альфа, 3	PSMA3
11	NM_017812	домен, содержащий двойную спираль-спираль-двойную спираль-спираль 3	CHCHD3
12	NM_014463	гомолог LSM3, связанный с малой ядерной РНК U6 (<i>S. cerevisiae</i>)	LSM3
13	NM_016426	экспрессирующийся в G-2 и S-фазе 1	GTSE1

Как показано в примере 1, перечисленные выше определяющие иммортализацию гены все являются высокоэкспрессированными в иммортизованных раковых клетках, полученных из множества видов рака, включая рак легкого, рак пищевода и рак молочной железы. Как показано в примере 2, когда экспрессию этих тринадцати генов супрессировали посредством миРНК в иммортизованных раковых клетках, в каждом случае пролиферация иммортизованных раковых клеток являлась супрессированной. Это показывает, что тринадцать определяющих иммортализацию генов определяют иммортализацию раковых клеток (определяющий иммортализацию ген).

(II) Реагент для оценки иммортализации раковых клеток (маркерный ген)

Как описано выше, определяющие иммортализацию гены ((1)-(13)), обладающие последовательностями оснований, представленными SEQ ID NO:1-13, все обладают сильной экспрессией, специфической для иммортализованных раковых клеток.

Таким образом, с использованием тринадцати генов в качестве маркерных генов можно оценивать иммортализацию/смертность раковых клеток.

Настоящее изобретение относится к определяющему иммортализацию маркерному гену (сокращенному как «маркерный ген» по настоящему изобретению)

в качестве средства (реагента), которое подходящим образом используют для оценки иммортализации раковых клеток. Маркерный ген конструируют как полинуклеотид по меньшей мере из 15 оснований, который специфически гибридизуется с непрерывной последовательностью, по меньшей мере, из 15 оснований среди одной из последовательностей оснований, определяющих иммортализацию генов, представленных SEQ ID NO:1-13. Маркерный ген по настоящему изобретению может обладать произвольной формой в соответствии с объектом и может представлять собой любое из одноцепочечной ДНК, одноцепочечной РНК, двухцепочечной ДНК, двухцепочечной РНК и гибрида ДНК: РНК.

Маркерный ген содержит зонд или праймер, применимый для детекции возникновения экспрессии определяющего иммортализацию гена и/или уровня (уровня экспрессии) в раковых клетках, чтобы позволять распознавание иммортализованных раковых клеток. Кроме того, проба или праймер является также применимой в качестве средства (реагента для детекции) для детекции изменения экспрессии определяющего иммортализацию гена для скрининга материала, супрессирующего пролиферацию иммортализованных раковых клеток.

(II-1) Зонд

Иммортализацию раковых клеток распознают посредством детекции по меньшей мере одного из вышеупомянутых определяющих иммортализацию генов: (1) гена UBE2S, (2) гена RFC4, (3) гена PTGES2 и (4) гена MAF1, (5) гена ACVR2B, (6) гена FAM119A, (7) гена LTB4DH, (8) гена DPM2, (9) гена SEPX1, (10) гена PSMA3, (11) гена SNCHD3, (12) гена LSM3 и (13) гена GTSE1, которые обладают сильной экспрессией, специфической для иммортализованных раковых клеток.

При детекции определяющих иммортализацию генов в качестве зондов используют полинуклеотиды, каждый из которых специфически гибридизуется с последовательностью оснований одного из вышеупомянутых определяющих иммортализацию генов. По настоящему изобретению олигонуклеотид, обладающий последовательностями множества оснований, включен в разряд «полинуклеотид».

Каждый полинуклеотид сконструирован, чтобы специфически гибридизоваться с непрерывной последовательностью оснований одного из определяющих иммортализацию генов. Более конкретно, для каждого из вышеупомянутых определяющих иммортализацию генов соответствующий полинуклеотид специфически гибридизуется с непрерывными основаниями, по меньшей мере, 15 основаниями, предпочтительно, 20 основаниями, и более предпочтительно, 30 основаниями из общей длины оснований определяющего иммортализацию гена. Соответственно каждый полинуклеотид обладает длиной в основаниях, соответствующей определенной длине в основаниях.

На протяжении настоящего описания и формулы изобретения «специфическая гибридизация» относится к гибридизации, где образуется только специфический

гибрид и не образуется неспецифического гибрида в строгих условиях гибридизации. Строгие условия гибридизации определяют обычным образом, например, на основании температуры плавления (T_m) нуклеиновой кислоты, при которой образуется гибрид. Типичные условия отмывки для обеспечения состояния

5 гибридизации представляют собой приблизительно «1×SSC, 0,1% SDS, 37°C», более строгие «0,5×SSC, 0,1% SDS, 42°C», и еще более строгие «0,1×SSC, 0,1% SDS, 65°C».

Полинуклеотид (зонд) предпочтительно обладает последовательностью оснований, которая является комплементарной непрерывной последовательности, по меньшей мере, из 15 оснований из определяющего иммортализацию гена; однако

10 зонд не всегда должен являться полностью комплементарным указанной непрерывной последовательности оснований, при условии, что специфическая гибридизация является возможной. Полинуклеотид обладает идентичностью, по меньшей мере, 70%, предпочтительно, не менее, чем 80%, более предпочтительно, не менее, чем 90%, еще более предпочтительно, не менее, чем 95%, и еще более

15 предпочтительно, не менее, чем 98%, по отношению либо к полинуклеотиду, обладающему непрерывными основаниями по меньшей мере из 15 оснований внутри последовательности оснований определяющего иммортализацию гена, либо к

20 комплементарному ему полинуклеотиду. Идентичность каждой последовательности оснований можно вычислить посредством поиска идентичности, программы выравнивания, BLAST, FASTA, ClustalW или подобных.

Примеры зондов, подходящих по настоящему изобретению, включают в себя олигонуклеотиды и полинуклеотиды, обладающие непрерывной

25 последовательностью из 15 оснований, предпочтительно, 20 оснований, и более предпочтительно, 30 оснований из определяющего иммортализацию гена, который гибридизуется по меньшей мере с одним полинуклеотидом (однако когда полинуклеотид представляет собой РНК, основание «t» в последовательности

30 заменено на «u»), выбранные из группы, состоящей из следующего (1)-(13):

(1) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:1) гена UBE2S.

(2) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по

35 меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:2) гена RFC4.

(3) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по

40 меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:3) гена PTGES2.

(4) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по

меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:4) гена MAF1.

(5) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по

45 меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:5) гена ACVR2B.

(6) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по

50 меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:6) гена FAM119A.

(7) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по

меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:7) гена LTB4DH.

(8) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:8) гена DPM2.

5 (9) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:9) гена SEPX1.

10 (10) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:10) гена PSMA3.

(11) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:11) гена CHCHD3.

15 (12) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:12) гена LSM3.

20 (13) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:13) гена GTSE1.

Эти полинуклеотиды (зонды) можно получать известным способом, например, с использованием коммерчески доступного синтезатора нуклеотидов, на основании последовательности оснований - мишени из определяющего иммортализацию гена. Полинуклеотиды (зонды) можно получать также способом ПЦР с использованием последовательности оснований - мишени из определяющего иммортализацию гена в качестве матрицы.

25 Более предпочтительно, для упрощения детекции определяющих иммортализацию генов каждый зонд можно метить радиоактивным материалом, флуоресцентным материалом, химическим люминесцентным веществом или ферментом (описанными позднее более подробно).

Кроме того, каждый зонд можно иммобилизовать на любой твердой фазе перед использованием.

35 Соответственно зонды, подходящие для настоящего изобретения, включают в себя зонд, в котором вышеупомянутый полинуклеотид иммобилизован на твердой фазе (например, иммобилизованный зонд, включая генный чип, микрочип кДНК, чип олиго-ДНК, или мембранный фильтр). Этот зонд является пригодным для чипа ДНК для использования для детекции определяющего иммортализацию гена, или более конкретно, для использования для детекции иммортализованной раковой

40 клетки. Твердая фаза иммобилизованного зонда (полинуклеотида) не является конкретно ограниченной, при условии, что она иммобилизует полинуклеотид. Примеры твердых фаз включают в себя стеклянную пластину, нейлоновую мембрану, микробусины, кремниевый кристалл, капилляр и другие субстраты. Полинуклеотид можно иммобилизовать на твердой фазе посредством размещения синтетического полинуклеотида на твердой фазе или посредством синтеза полинуклеотида - мишени на твердой фазе. Иммобилизация представляет собой хорошо известный способ в данной области, и можно использовать любой подходящий способ в соответствии с

50 типом иммобилизованного зонда. Например, коммерчески доступное устройство для печати чипов (изготовленное Cosmobio Co., Ltd. и т.д.) часто используют для получения микрочипа ДНК. (Например, синтез полинуклеотида in situ с

использованием фотолитографического способа (AFFYMETRIX CO.), или способ распыления (ROSETTA INPHARMATICS CO.)

(II-2) Праймер

Настоящее изобретение относится к полинуклеотиду в качестве праймера, который служит маркерным геном для специфической амплификации области последовательности оснований каждого определяющего иммортализацию гена.

Полинуклеотид, как правило, представляет собой полинуклеотид, который обладает непрерывной последовательностью, по меньшей мере, из 15 оснований, предпочтительно, 15-100 оснований, более предпочтительно, 15-50 оснований, еще более предпочтительно, 15-35 оснований, и который специфически гибридизуется с частью по меньшей мере одного полинуклеотида (однако когда полинуклеотид представляет собой РНК, основание «t» в последовательности заменено на «u»), выбранного из группы, состоящей из следующего (1)-(13), так чтобы амплифицировать часть полинуклеотида или весь полинуклеотид:

(1) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:1) гена UBE2S.

(2) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:2) гена RFC4.

(3) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:3) гена PTGES2.

(4) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:4) гена MAF1.

(5) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:5) гена ACVR2B.

(6) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:6) гена FAM119A.

(7) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:7) гена LTB4DH.

(8) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:8) гена DPM2.

(9) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:9) гена SEPX1.

(10) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:10) гена PSMA3.

(11) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:11) гена CHCHD3.

(12) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по

меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:12) гена LSM3.

(13) Полинуклеотид с непрерывной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 15 основаниями из последовательности оснований (SEQ ID NO:13) гена GTSE1.

Как и в случае зонда, каждый из определенных полинуклеотидов (праймеров) предпочтительно обладает последовательностью оснований, комплементарной непрерывной последовательности, по меньшей мере, из 15 оснований в одном из определяющих иммортализацию генов; однако пока возможна специфическая гибридизация, он не должен являться полностью комплементарным. Полинуклеотид обладает идентичностью по меньшей мере 70%, предпочтительно, не менее, чем 80%, более предпочтительно, не менее чем 90%, еще более предпочтительно, не менее чем 95%, и еще более предпочтительно, не менее чем 98%, по отношению либо к полинуклеотиду, обладающему непрерывной последовательностью, по меньшей мере, из 15 оснований внутри последовательности определяющего иммортализацию гена или комплементарного ему полинуклеотида.

Как и в случае зондов, эти полинуклеотиды (праймеры) можно получать известным способом, например, с использованием коммерчески доступного синтезатора нуклеотидов на основании последовательности оснований - мишени из определяющего иммортализацию гена.

(II-3) Маркер

Маркерный ген (зонд или праймер) в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой продукт, полученный добавлением маркера, подходящего для детекции определяющего иммортализацию гена, такого как флуоресцентный краситель, фермент, белок, радиоактивный изотоп, химическое люминесцентное вещество или биотин, к вышеупомянутому полинуклеотиду.

Например, подходящим примером маркера по настоящему изобретению, изготовленного из флуоресцентного красителя, радиоактивного изотопа, или химического люминесцентного вещества, является обычный маркер, способный метить нуклеотид для детекции или определения количества нуклеиновых кислот. Флуоресцентные красители включают в себя в качестве неограничивающих примеров HEX (4,7,2',4',5',7'-гексахлор-6-карбоксилфлуоресцеин, зеленый флуоресцентный краситель), флуоресцеин, NED (название продукта; Applied Biosystems Inc., желтый флуоресцентный краситель), 6-FAM (название продукта; Applied Biosystems Inc, желто-зеленый флуоресцентный краситель) и родамин или его производное (например, тетраметилродамин (TMR)). Флуоресцентное цветное мечение нуклеотида выполняют подходящим способом из известных способов (см. Nature Biotechnology, 14, 303-308 (1996)). Можно использовать также коммерчески доступный набор с флуоресцентной меткой (например, система мечения олигонуклеотида ECL 3'-олиго, изготовленная Amersham Pharmacia Biotech).

Описанный выше маркерный ген (немеченый или меченый зонд или праймер) можно использовать в качестве реагента для детекции определяющего иммортализацию гена, иными словами, реагента для детекции иммортализованной раковой клетки.

(II-4) Набор реагентов для детекции иммортализованной раковой клетки

Настоящее изобретение, кроме того, относится к набору с реагентом (маркерный ген (меченый или немеченый зонд или праймер)) для детекции иммортализованной раковой клетки. Набор включает в себя по меньшей мере один из вышеупомянутых

немеченых или меченых полинуклеотидов, применяемых в качестве зондов или праймеров (полинуклеотид может являться иммобилизованным на твердой фазе). В дополнение к маркерному гену (зонду или праймеру) набор реагентов по
5 настоящему изобретению может включать в себя другие реагенты или средства, как необходимо в ходе фактического осуществления (описанного позже) способа по настоящему изобретению, такие как реагент для гибридизации, материал для
мечения зонда, средство для детекции метки, буферный раствор и т.д.

(III) Способ определения иммортализованных раковых клеток

10 (III-1) Маркерный ген (зонд или праймер) по настоящему изобретению позволяет измерение уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена (маркерного гена) в раковых клетках, полученных из тестируемого субъекта; далее измеренный уровень экспрессии позволяет оценить, являются ли раковые клетки
15 «иммортализованными раковыми клетками» или «неиммортализованными раковыми клетками». Существующими патологическими диагнозами нельзя определить иммортализованные раковые клетки; однако способом определения иммортализованной раковой клетки по настоящему изобретению можно
детектировать раннюю стадию зарождения иммортализованных раковых клеток
20 даже до их развития, таким образом позволяя быстрое обеспечение подходящего лечения рака для каждого индивидуума.

В этом случае праймер и зонд по настоящему изобретению используют в качестве праймера для специфического распознавания и амплификации РНК, образующейся в
25 результате экспрессии определяющего иммортализацию гена или полинуклеотида, полученного с РНК (например, кДНК), и в качестве зонда для специфической детекции РНК или полинуклеотида (например, кДНК, ДНК, амплифицированной с РНК или кДНК), производного от РНК соответственно.

30 Более конкретно, маркерный ген (праймер или зонд) по настоящему изобретению можно использовать в качестве праймера и/или зонда для специфической детекции определяющего иммортализацию гена с использованием известного способа для специфической детекции конкретного гена, такого как способ нозерн-блоттинга, способ ОТ-ПЦР, способ гибридизации *in situ* или т.п. Кроме того, детекцию и/или
35 количественное определение уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена в раковой клетке можно осуществлять с использованием чипа ДНК. В этом случае зонд по настоящему изобретению можно использовать в качестве зонда для чипа ДНК.

40 Например, измерение уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена посредством нозерн-блоттинга можно осуществлять с помощью зонда по настоящему изобретению или более предпочтительно посредством зонда, меченного радиоактивным изотопом, флуоресцентным материалом или химическим люминесцентным веществом. Более конкретно, РНК, выделенную из раковой клетки тестируемого субъекта, переносят на нейлоновую мембрану или т.п., и меченый зонд
45 гибридизуют с РНК. Затем количество полученного двухцепочечного продукта зонда и РНК измеряют на основании сигнала, полученного от маркера зонда. Детекцию сигнала можно осуществлять посредством подходящего известного аппарата, соответствующего маркеру зонда, такого как детектор радиоактивности
50 или детектор флуоресценции. Детекцию можно осуществлять также с помощью коммерчески доступного набора реагентов для нозерн-блоттинга согласно протоколу из набора.

Измерение уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена с

использованием способа ОТ-ПЦР можно также осуществлять с использованием праймера по настоящему изобретению, предпочтительно, праймера, меченного радиоактивным изотопом, флуоресцентным материалом, химическим люминесцентным веществом или т.п. Более конкретно, пару праймеров, снабженных маркером, гибридизуют с кДНК-матрицей, полученной по РНК, происходящей из раковой клетки тестируемого субъекта, и ПЦР проводят общепринятым способом. Затем количество полученной амплифицированной двухцепочечной ДНК измеряют на основании сигнала, полученного от маркера праймера. Детекцию сигнала можно осуществлять посредством подходящего известного аппарата, такого как детектор радиоактивности или детектор флуоресценции. Детекцию можно проводить также с помощью коммерчески доступного набора реагентов для ОТ-ПЦР согласно протоколу из набора.

Измерение уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена с использованием анализа чипа ДНК также можно осуществлять с использованием зонда по настоящему изобретению, предпочтительно зонда, меченного радиоактивным изотопом, флуоресцентным материалом и т.д. Более конкретно, чип ДНК с зондом, меченным радиоактивным изотопом, флуоресцентным материалом, химическим люминесцентным веществом или т.п., фиксируют на подходящем носителе. Затем чип ДНК гибридизуют со снабженными маркерами ДНК или РНК, которые получают из РНК, происходящей из раковой клетки тестируемого субъекта. Затем количество полученного двухцепочечного продукта зонда и снабженной маркером ДНК или РНК измеряют на основании сигнала, полученного от маркера зонда. Детекцию сигнала можно осуществлять посредством подходящего известного аппарата, такого как детектор радиоактивности или детектор флуоресценции. Этот способ можно осуществлять с помощью коммерчески доступного чипа ДНК, в котором ДНК, соответствующая зонду по настоящему изобретению, является фиксированной.

Измерение уровня экспрессии определяющих иммортализацию генов включает в себя две следующие стадии (1) и (2):

(1) стадию связывания зонда или праймера по настоящему изобретению с РНК, полученной из биологического образца, который может содержать раковую клетку, полученного из тестируемого субъекта, или с производным РНК; и

(2) стадию измерения количества РНК или ее производного, связавшегося с зондом или праймером, с использованием зонда или праймера в качестве показателя.

На стадии (1) биологический образец может представлять собой любой образец, выделенный из тестируемого субъекта, при условии, что он обладает возможностью содержать раковую клетку. Примеры биологического образца включают в себя жидкость организма (кровь, мочу и т.д.), ткани, или их экстракты и культуры полученных тканей. Выделение биологического образца из тестируемого объекта осуществляют подходящим способом в соответствии с типом биологического образца или типом рака. Получение РНК из биологического образца осуществляют известным способом.

На протяжении описания и формулы изобретения термин «производное РНК» относится к образцу, полученному посредством РНК, выделенной из биологического образца. Примеры производного РНК включают в себя комплементарный полинуклеотид (кДНК), полученный транскрипцией РНК, и ДНК, амплифицированную по РНК или кДНК с использованием ПЦР. кДНК можно получать с использованием известного способа, и вышеупомянутую ДНК получают

посредством ПЦР с использованием праймера по настоящему изобретению для определяющего иммортализацию гена. Кроме того, зонд или праймер по настоящему изобретению, применяемый на стадии (1), предпочтительно является меченным маркером, таким как радиоактивный изотоп, флуоресцентный материал или химическое люминесцентное вещество.

Количество РНК или производного РНК, обнаруженное на стадии (2), зависит от уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена у тестируемого субъекта. Соответственно это количество РНК или производного РНК (далее здесь в полном объеме обозначенное как «количество РНК»), обнаруженное на стадии (2), сравнивают с количеством соответствующей РНК или производного РНК (далее здесь в полном объеме обозначенное как «сравнительное количество РНК») в неиммортизированных здоровых или раковых клетках для оценки иммортализации раковых клеток тестируемого субъекта. Более конкретно, если количество РНК тестируемого субъекта, обнаруженное на стадии (2), больше, чем сравнительное количество РНК, заключают, что раковые клетки тестируемого субъекта являются иммортизированными. В обратном случае заключают, что раковые клетки тестируемого субъекта не являются иммортизированными.

Таким образом, в дополнение к стадиям (1) и (2) способ определения иммортизированной раковой клетки по настоящему изобретению дополнительно включает в себя следующую стадию (3) и предпочтительно также стадию (4).

(3) стадия сравнения количества РНК или производного РНК (количество РНК), обнаруженного на стадии (2), с количеством соответствующей РНК или производного РНК (сравнительное количество РНК) в неиммортизированной здоровой или раковой клетке; и

(4) стадия заключения того, что выделенная раковая клетка тестируемого субъекта является иммортизированной, когда количество РНК на стадии (2) выше, чем сравнительное количество РНК, и заключения того, что выделенная раковая клетка тестируемого субъекта не является иммортизированной, когда количество РНК на стадии (2) не превышает сравнительное количество РНК.

Количество РНК (сравнительное количество РНК) определяющего иммортализацию гена в неиммортизированной здоровой или раковой клетке вычисляют, сначала измеряя количество РНК определяющего иммортализацию гена во множестве неиммортизированных здоровых или раковых клеток в тех же самых условиях, и затем находя среднее или промежуточное значение из вычисляемых значений.

(III-2) Кроме того, иммортализацию раковых клеток можно оценить на основании количества продукта экспрессии определяющего иммортализацию гена по настоящему изобретению, иными словами, на основании количества продукции полипептида (определяющего иммортализацию полипептида здесь далее) - кодируемого вышеупомянутым геном. Количество продукции определяющего иммортализацию полипептида можно измерить с использованием антитела, распознающего полипептид.

Ниже следуют определяющие иммортализацию полипептиды, которые можно использовать по настоящему изобретению, соответствующие вышеупомянутым определяющим иммортализацию генам (1)-(13):

(14) полипептид UBE2S: полипептид, кодируемый геном UBE2S (1), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:1, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью,

представленной SEQ ID NO:14.

(15) полипептид RFC4: полипептид, кодируемый геном RFC4 (2), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:2, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:15.

(16) полипептид PTGES2: полипептид, кодируемый геном PTGES2 (3), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:3, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:16.

(17) полипептид MAF1: полипептид, кодируемый геном MAF1 (4), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:4, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:17.

(18) полипептид ACVR2B: полипептид, кодируемый геном ACVR2B (5), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:5, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:18.

(19) полипептид FAM119A: полипептид, кодируемый геном FAM119A (6), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:6, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:19.

(20) полипептид LTB4DH: полипептид, кодируемый геном LTB4DH (7), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:7, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:20.

(21) полипептид DPM2: полипептид, кодируемый геном DPM2 (8), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:8, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:21.

(22) полипептид SEPX1: полипептид, кодируемый геном SEPX1 (9), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:9, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:22.

(23) полипептид PSMA3: полипептид, кодируемый геном PSMA3 (10), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:10, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:23.

(24) полипептид CHCHD3: полипептид, кодируемый геном CHCHD3 (11), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:11, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:24.

(25) полипептид LSM3: полипептид, кодируемый геном LSM3 (12), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:12, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO:25.

(26) полипептид GTSE1: полипептид, кодируемый геном GTSE1 (13), обладающим последовательностью оснований, представленной SEQ ID NO:13, а именно полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью,

представленной SEQ ID NO:26.

Полипептид (14) UBE2S представляет собой широко известный полипептид, и его получение также известно, как описано в *J. Biol. Chem.* 267 (22), 15829-15835 (1992).

5 Полипептид (15) RFC4 также является широко известным, как описано в *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (12), 5211-5215 (1992). Подобным образом, полипептиды являются широко известными полипептидами, так как полипептид (16) PTGES2 описан в *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291 (4), 884-889 (2002); полипептид (18) ACVR2B описан в *Mol. Cell Biol.* 16 (3), 1066-1073 (1996); полипептид (20) LTB4DH
10 описан в *J. Biol. Chem.* 271 (5), 2844-2850 (1996); полипептид (21) DPM2 описан в *EMBO J.* 19 (11), 2475-2482 (2000); полипептид (22) SEPX1 описан в *J. Biol. Chem.* 274 (48), 33888-33897 (1999); полипептид (23) PSMA3 описан в *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207 (1), 318-323 (1995); полипептид (25) LSM3 описан в *EMBO J.* 18 (12), 3451-3462 (1999); и полипептид (26) GTSE1 описан в *Gene* 254 (1-2), 229-236 (2000).

15 Определяющие иммортализацию полипептиды (14)-(26) можно также получить способом, включающим в себя клонирование соответствующих определяющих иммортализацию генов (1)-(13), лигирование генов в векторную плазмиду, трансформацию генами клеток-хозяев, таких как *E.coli*, культивирование
20 трансформированных клеток и выделение полипептидов из культуры.

Антитело, применяемое по настоящему изобретению, не является ограниченным, при условии, что оно распознает определяющий иммортализацию полипептид, и может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело. Антитело может представлять собой антитело, полученное как антитело против
25 определяющего иммортализацию полипептида в качестве антигена для иммунизации, или антигенсвязывающее антитело по отношению к полипептиду, обладающему по меньшей мере 8 непрерывными аминокислотами, предпочтительно, 15 аминокислотами, и более предпочтительно, 20 аминокислотами из аминокислотной
30 последовательности, формирующей определяющий иммортализацию полипептид. Полипептид можно в основном синтезировать широко известным способом на основании аминокислотной последовательности определяющего иммортализацию полипептида по настоящему изобретению или последовательности оснований, кодирующих аминокислоты. Например, можно применять химический синтез с
35 использованием синтезатора аминокислот или промышленный синтез гена.

Антитело по настоящему изобретению можно получить обычным способом (см., например, *Current protocols in Molecular Biology*, edit. Ausubel et al. (1987), Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12-11.13). Например, поликлональное антитело можно
40 получать с использованием полипептида, полученного экспрессией полипептида в *E.coli*, или синтетического полипептида, как получают части аминокислотной последовательности общим способом, иммунизируя тестируемое животное вышеупомянутым полипептидом и выделяя антитело из сыворотки, полученной из иммунизированного животного. Моноклональное антитело можно также получать
45 для полипептида, экспрессированного в *E.coli* или синтетического полипептида, как получают части аминокислотной последовательности обычным способом, иммунизируя тестируемое животное вышеупомянутым полипептидом, сливая клетки селезенки и клетки миеломы, выделенные из тестируемого животного, для синтеза
50 клетки гибридомы, и выделяя антитело из клетки гибридомы.

Эти антитела также включены в качестве компонента вышеупомянутого набора реагентов для определения иммортализации раковой клетки для применения для оценки иммортализации раковых клеток.

Конкретно, оценку иммортализованных раковых клеток осуществляют с помощью следующих стадии (1') и стадий (2'):

(1') стадия смешивания содержащей белок фракции, содержащей полипептид, полученный из биологического образца, обладающего возможностью содержать раковые клетки, полученного из тестируемого субъекта, с антителом, распознающим определяющий иммортализацию полипептид по настоящему изобретению; и

(2') стадия измерения количества полипептида, связанного с антителом, с использованием антитела в качестве показателя.

Количество полипептида, обнаруженное на стадии (2'), зависит от количества продукции определяющего иммортализацию полипептида.

На стадии (2') биологический образец может представлять собой любой образец, выделенный из тестируемого субъекта, при условии, что он обладает возможностью содержать раковые клетки. Примеры биологических образцов включают в себя жидкости организма (кровь, мочу и т.д.), ткани или их экстракты, и культуры полученных тканей. Выделение биологического образца из тестируемого субъекта осуществляют подходящим способом в соответствии с типом биологического образца или типом рака. Получение содержащей белок фракции (включая полипептид) из биологического образца осуществляют посредством подходящего сочетания известных способов разделения и очистки. Определяющий иммортализацию полипептид можно детектировать посредством различных иммунологических способов детекции, таких как вестерн-блоттинг, ферментный иммуноанализ (EIA), радиоизотопный иммуноанализ (RIA), люминесцентный иммуноанализ или т.п. с использованием антитела в качестве зонда.

Далее объясняют стадии (1') и (2') для измерения количества полипептида (количество продукции определяющего иммортализацию полипептида) посредством вестерн-блоттинга. Сначала антитело против определяющего иммортализацию полипептида смешивают в качестве первичного антитела с содержащей белок фракцией, полученной из биологического образца тестируемого субъекта, для связывания с определяющим иммортализацию полипептидом, содержащимся в содержащей белок фракции. Затем вторичное антитело, меченное радиоактивным изотопом, флуоресцентным материалом или химическим люминесцентным веществом, связывается с первичным антителом. Затем количество определяющего иммортализацию полипептида измеряют на основании сигнала, полученного от маркера вторичного антитела. Детекцию сигнала можно осуществлять подходящим известным способом с использованием, например, детектора радиоактивности или детектора флуоресценции.

Иммортализацию раковых клеток тестируемого объекта можно оценивать сравнением полученного количества полипептида (количество продукции определяющего иммортализацию полипептида) у тестируемого субъекта на стадии (2') с количеством сравнительного определяющего иммортализацию полипептида (сравнительное количество продукции) в неиммортализованной здоровой или раковой клетке и нахождением уровня разницы. Более конкретно, если полученное количество полипептида (количество продукции определяющего иммортализацию полипептида) у тестируемого субъекта на стадии (2') выше, чем сравнительное количество полипептида (сравнительное количество продукции), заключают, что раковые клетки тестируемого субъекта являются иммортализованными. В обратном случае заключают, что раковые клетки

тестируемого субъекта не являются иммортализованными.

Соответственно в дополнение к вышеупомянутым стадиям (1') и (2') способ определения иммортализованной раковой клетки по настоящему изобретению включает в себя следующую стадию (3'), и предпочтительно, также стадию (4').

(3') стадия сравнения количества полипептида, обнаруженного на стадии (2'), с количеством (сравнительное количество полипептида) соответствующего полипептида в неиммортализованной здоровой или раковой клетке; и

(4') стадия заключения, что выделенная раковая клетка тестируемого субъекта является иммортализованной, когда количество полипептида, обнаруженное на стадии (2'), выше, чем сравнительное количество полипептида, и заключения, что выделенная раковая клетка тестируемого субъекта не является иммортализованной, когда количество полипептида не превышает сравнительное количество полипептида.

Количество продукции определяющего иммортализацию полипептида в неиммортализованной здоровой или раковой клетке вычисляют, сначала измеряя количество продукции определяющего иммортализацию полипептида во множестве неиммортализованных здоровых или раковых клеток в тех же самых условиях и затем находя среднее или промежуточное значение из вычисленных значений.

(IV) Способ скрининга ингибитора роста иммортализованной раковой клетки

(IV-1) Как показано в примерах, для определяющих иммортализацию генов ((1)-(13)) в соответствии с настоящим изобретением показали специфическую высокую экспрессию в иммортализованных раковых клетках. Кроме того, супрессией экспрессии определяющих иммортализацию генов с использованием миРНК супрессируют пролиферацию иммортализованных раковых клеток. Это указывает на то, что вещество, супрессирующее экспрессию определяющих иммортализацию генов ((1)-(13)), может служить ингибитором роста иммортализованной раковой клетки (противораковым лекарственным средством). Таким образом, с использованием супрессии экспрессии определяющих иммортализацию генов ((1)-(13)) в качестве показателя можно проводить скрининг вещества, супрессирующего пролиферацию иммортализованных раковых клеток.

Соответственно настоящее изобретение относится к способу скрининга ингибиторов роста иммортализованной раковой клетки с использованием супрессии экспрессии определяющих иммортализацию генов ((1)-(13)) в качестве показателя.

Настоящий способ может включать в себя следующие стадии (A)-(D):

(A) стадия приведения тестируемого материала в контакт с клеткой, которая может экспрессировать один из определяющих иммортализацию генов (1)-(13);

(B) стадия измерения уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена в клетке, приведенной в контакт с тестируемым материалом;

(C) стадия сравнения уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена, обнаруженного на стадии (B), с уровнем экспрессии (сравнительным уровнем экспрессии) определяющего иммортализацию гена в клетке, не находящейся в контакте с тестируемым материалом; и

(D) стадия выбора тестируемого материала в качестве вещества для ингибирования пролиферации иммортализованных раковых клеток, когда уровень экспрессии, обнаруженный на стадии (B), ниже, чем сравнительный уровень экспрессии.

Клетку, применяемую по настоящему изобретению, можно получать из любого вида клеток, при условии, что клетка может экспрессировать по меньшей мере один

из определяющих иммортализацию генов (1)-(13). Примеры органов, из которых можно получать применяемую клетку, включают в себя легкое, желудок, толстую кишку, прямую кишку, печень, желчный пузырь, желчный проток, поджелудочную железу, почку, мочевой пузырь, предстательную железу, матку, костный мозг, лимфатический узел и кровь. Клетку можно получать из млекопитающих или птиц, предпочтительно, млекопитающих, и более предпочтительно, человека. Экспрессия определяющего иммортализацию гена может являться эндогенной или экзогенной.

Тестируемый материал не является ограниченным и может представлять собой нуклеиновую кислоту (включая полинуклеотиды), пептид (включая полипептиды), органическое соединение или неорганическое соединение. Скрининг осуществляют приведением тестируемого материала или образца (тестируемого образца) в контакт с клеткой, которая может экспрессировать определяющий иммортализацию ген. Примеры тестируемого образца включают в себя экстракты клеток, продукты экспрессии из библиотеки генов и экстракты природных продуктов растительного или животного происхождения.

При скрининге способ приведения тестируемого материала в контакт с клеткой не является ограниченным при условии, что он не убивает клетку и не ингибирует экспрессию определяющего иммортализацию гена в клетке.

На стадиях (B) и (C) уровень экспрессии определяющего иммортализацию гена можно найти измерением количества мРНК определяющего иммортализацию гена или ее производного - кДНК или двухцепочечной ДНК, посредством нозерн-блоттинга или ОТ-ПЦР, с использованием вышеупомянутого зонда или праймера по настоящему изобретению. Кроме того, количество определяющего иммортализацию полипептида как продукта экспрессии определяющего иммортализацию гена можно использовать для нахождения уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена на стадиях (B) и (C). Количество определяющего иммортализацию полипептида можно найти посредством различных способов иммунологической детекции, таких как вестерн-блоттинг, ферментный иммуноанализ (EIA), радиоизотопный иммуноанализ (RIA), люминесцентный иммуноанализ или т.п., с использованием антитела против определяющего иммортализацию полипептида.

На стадии (C) скрининг вещества, ингибирующего пролиферацию иммортализованных раковых клеток, можно осуществлять сравнением уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена, измеренного на стадии (B), с уровнем экспрессии определяющего иммортализацию гена (сравнительным уровнем экспрессии) в клетке, не находящейся в контакте с тестируемым материалом. Более конкретно, когда уровень экспрессии определяющего иммортализацию гена, обнаруженный на стадии (B), ниже, чем сравнительный уровень экспрессии, тестируемый материал можно выбрать в качестве вещества для ингибирования пролиферации иммортализованной раковой клетки.

(IV-2) Ингибирование активности определяющих иммортализацию полипептидов ((14)-(26)), представляющих собой продукты экспрессии определяющих иммортализацию генов ((1)-(13)) по настоящему изобретению, также составляет признак для скрининга ингибитора роста иммортализованной раковой клетки. Например, известно, что полипептид (14) UBE2S обладает активатором убиквитина (E2) (J. Biol. Chem. 267 (22), 15829-15835 (1992)); известно, что полипептид (16) PTGES2 обладает активностью превращения простагландина H2 в простагландин E2 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 291 (4), 884-889 (2002)); полипептид (18) ACVR2B представляет собой трансмембранный рецептор и

обладает активностью киназы Ser/Thr в межклеточном домене (Mol. Cell Biol. 16 (3), 1066-1073 (1996)); полипептид (20) LTB4DH обладает активностью превращения лейкотриена B4 в 12-оксо-лейкотриен B4 (J. Biol. Chem. 271 (5), 2844-2850 (1996)); и полипептид (22) SEPX1 обладает активностью метионинсульфоксид-редуктазы (Mol. Biol. Cell 15 (3), 1055-1064 (2004)); таким образом, ингибирование этих видов активности определяющих иммортализацию полипептидов, является, в частности, применимым в качестве показателей для скрининга ингибитора роста иммортализованной раковой клетки.

Более конкретно, посредством осуществления следующих стадий (A')-(D') можно проводить скрининг вещества по супрессии пролиферации иммортализованных раковых клеток:

(A') стадия приведения тестируемого материала в контакт с одним из определяющих иммортализацию полипептидов (14)-(26);

(B') стадия измерения активности определяющего иммортализацию полипептида в контакте с тестируемым материалом;

(C') стадия сравнения активности определяющего иммортализацию полипептида, измеренной на стадии (B'), с активностью (сравнительной активностью)

определяющего иммортализацию полипептида в водном растворе, клетке, или фракции клетки, не находящихся в контакте с тестируемым материалом; и

(D') стадия выбора тестируемого материала в качестве вещества для ингибирования пролиферации иммортализованных раковых клеток, когда активность, обнаруженная на стадии (B'), ниже, чем сравнительная активность.

Для скрининга используют активность определяющего иммортализацию полипептида в качестве показателя, и его можно осуществлять по отношению к любому объекту, который содержит или может содержать определяющие иммортализацию полипептиды (14)-(26) (предпочтительно, (14), (16), (18), (20) или (22)). Подходящий объект выбирают в соответствии с желательной функцией (активностью) определяющего иммортализацию полипептида. Примеры объектов, подвергаемых скринингу, включают в себя водный раствор, содержащий один из определяющих иммортализацию полипептидов (14)-(26) (предпочтительно, (14), (16), (18), (20) или (22)); клетку, которая может экспрессировать один из определяющих иммортализацию генов (1)-(13) (предпочтительно, (1), (3), (5), (7) или (9)); или фракцию клетки, полученную из вышеупомянутой клетки. Водный раствор не является конкретно ограниченным, при условии, что он содержит определяющий иммортализацию полипептид. В дополнение к обычному водному раствору можно использовать раствор клетки, экстракт ядра или жидкий супернатант культуры. Клетка может являться эндогенной или экзогенной, и может представлять собой любую клетку, которая может экспрессировать один из определяющих иммортализацию генов. Фракция клетки обозначает фракцию, полученную из вышеупомянутой клетки, такую как фракция мембраны клетки, цитоплазматическая фракция, фракция ядра клетки или т.п.

Те же самую клетку и тестируемый материал, как и для описанного ранее скрининга, можно использовать для этого способа скрининга.

Измерение способности полипептида (14) UBE2S к активации убиквитина на стадии (B') можно осуществлять известным способом. Например, в «J. Biol. Chem. 267 (22), 15829-15835 (1992)» описан способ проведения реакции активации убиквитина для полипептида UBE2S в системе, содержащей убиквитин, активирующий убиквитин фермент (E1) и полипептид UBE2S, и измерения количества убиквитина, связанного с

полипептидом UBE2S. Измерение количества убиквитина можно осуществлять известным способом. Например, реакцию проводят с использованием убиквитина, меченного радиоактивным материалом или ферментом, и измеряют количество маркера (J. Biol. Chem. 267 (22), 15829-15835 (1992), J. Biol. Chem. 279 (51), 52970-52977 (2004)). Альтернативно, можно проводить измерение детекцией убиквитина с использованием антитела против убиквитина (J. Biol. Chem. 279 (51), 52970-52977 (2004)). Убиквитин и активирующий убиквитин фермент (E1) могут представлять собой продаваемые продукты или их можно получать известным способом синтеза белка.

Измерение активности синтеза простагландина E2 полипептида (16) PTGES2 на стадии (B') можно осуществлять с использованием известного способа. Например, как описано в «Biochem. Biophys. Res. Commun. 291 (4), 884-889 (2002)», уровень продукции простагландина E2 можно измерять проведением реакции превращения простагландина E2 с использованием полипептида PTGES2 в системе, содержащей полипептид PTGES2 и простагландин H2. Количество простагландина E2 можно измерить с использованием известного способа. Например, согласно «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (13), 7220-7225 (1999)», реакцию проводят с использованием простагландина H2, меченного радиоактивным материалом или ферментом, и затем измеряют количество маркера, чтобы найти количество продукции простагландина E2. Альтернативно, измерение можно проводить с использованием антитела против простагландина E2 (J. Dairy. Sci. 87 (7), 2197-2210 (2004)). Простагландин H2 может представлять собой продаваемый продукт, или его можно получать известным способом синтеза.

Измерение активности киназы Ser/Thr полипептида (18) ACVR2B на стадии (B') можно осуществлять с использованием известного способа. Например, как описано в «Mol. Cell Biol. 16 (3), 1066-1073 (1996)», активность киназы Ser/Thr можно измерить, проводя киназную реакцию в системе, содержащей полипептид ACVR2B в присутствии субстрата и АТР, и затем измеряя уровень фосфорилирования субстрата. Уровень фосфорилирования субстрата можно измерять известным способом. Например, уровень фосфорилирования можно измерять измерением радиоактивности с использованием γ -³²P-АТР или γ -³³P-АТР в качестве индикатора (Mol. Cell Biol. 16 (3), 1066-1073 (1996)). Альтернативно, уровень фосфорилирования можно измерять, проводя реакцию фосфорилирования с использованием субстрата, меченного флуоресцентным материалом или биотином, и измеряя количество маркера фосфорилирования. Примеры субстратов включают в себя полипептид ACVR2B и специфические субстраты и пептиды.

Измерение активности превращения лейкотриена В4 для полипептида (20) LTB4DH на стадии (B') можно осуществлять с использованием известного способа. Например, как описано в «J. Biol. Chem. 271 (5), 2844-2850 (1996)», активность превращения лейкотриена В4 можно измерять, проводя реакцию превращения лейкотриена В4 с использованием полипептида LTB4DH в системе, содержащей полипептид LTB4DH и лейкотриен В4, и затем измеряя уровень продукции 12-оксо-лейкотриена В4. Уровень продукции 12-оксо-лейкотриена В4 можно измерять известным способом, таким как ВЭЖХ. Лейкотриен В4 может представлять собой продаваемый продукт или его можно получать известным способом химического синтеза.

Измерение активности метионинсульфоксид-редуктазы полипептида (22) SEPX1 на стадии (B') можно осуществлять с использованием известного способа.

Например, как описано в «Mol. Biol. Cell 15 (3), 1055-1064 (2004)», активность метионинсульфоксид-редуктазы можно измерять, проводя реакцию восстановления метионинсульфоксида с использованием полипептида SEPX1 в системе, содержащей полипептид SEPX1 и метионинсульфоксид, и затем измеряя уровень продукции метионина. Уровень продукции метионина можно измерять известным способом, таким как ВЭЖХ. Метионинсульфоксид может представлять собой продаваемый продукт или его можно получать известным способом химического синтеза.

На стадиях (C') и (D') можно проводить скрининг вещества, ингибирующего пролиферацию иммортализованных раковых клеток, сравнением измеренной активности определяющего иммортализацию полипептида на стадии (B') со сравнительной активностью. Более конкретно, когда измеренная активность определяющего иммортализацию полипептида ниже, чем сравнительная активность, определяют, что тестируемый материал является веществом для ингибирования пролиферации иммортализованной раковой клетки.

Как объясняют в примерах, каждый из антисмысловых полинуклеотидов (миРНК) (SEQ ID NO:27-76), показанных в таблицах 2 и 3, гибридизуется с одним из определяющих иммортализацию генов по настоящему изобретению в раковой клетке для супрессии экспрессии определяющего иммортализацию гена, таким образом супрессируя пролиферацию иммортализованных раковых клеток. Таким образом, антисмысловой полинуклеотид (миРНК) можно использовать в качестве ингибитора роста иммортализованной раковой клетки. Соответственно настоящее изобретение относится к ингибитору роста иммортализованной раковой клетки, содержащему антисмысловой полинуклеотид в качестве активного ингредиента.

Антисмысловой полинуклеотид сформирован из полинуклеотида по меньшей мере из 15 оснований, который специфически гибридизуется с полинуклеотидом, обладающим непрерывной последовательностью, по меньшей мере, из 15 оснований внутри последовательности оснований определяющих иммортализацию генов (1)-(13). Полинуклеотид предпочтительно обладает последовательностью оснований, комплементарной непрерывной последовательности, по меньшей мере, из 15 оснований в одном из определяющих иммортализацию генов (1)-(13); однако при условии, что возможна специфическая гибридизация и таким образом экспрессия определяющего иммортализацию гена является супрессированной, он не всегда должен являться полностью комплементарным. Например, последовательность оснований полинуклеотида может обладать идентичностью 70%, предпочтительно, не менее чем 80%, более предпочтительно, не менее чем 90%, еще более предпочтительно, не менее чем 95%, и еще более предпочтительно не менее чем 98%, по отношению к комплементарной последовательности определяющего иммортализацию гена; и полинуклеотид может гибридизоваться с РНК определяющего иммортализацию гена для супрессии экспрессии определяющего иммортализацию гена. Антисмысловой полинуклеотид по настоящему изобретению предпочтительно имеет 15-1000 оснований, более предпочтительно, 15-500 оснований, и еще более предпочтительно 16-30 оснований.

Антисмысловой полинуклеотид по настоящему изобретению предпочтительно обладает последовательностью оснований, представленной одной из SEQ ID NO:27-76, и более предпочтительно, двухцепочечной РНК, обладающей одной из последовательностей оснований.

Антисмысловой полинуклеотид по настоящему изобретению можно модифицировать известным способом для улучшения стабильности и проницаемости

клеток. Например, фосфорный остаток каждого нуклеотида можно заменять химически модифицированным фосфорным остатком, таким как фосфоротиоат, метилфосфонат, или фосфородитиоат, для предотвращения расщепления гидролазой, такой как нуклеаза.

5 Антисмысловой полинуклеотид по настоящему изобретению не является ограниченным по форме и может представлять собой одноцепочечную ДНК, одноцепочечную РНК, двухцепочечную ДНК, двухцепочечную РНК или гибрид ДНК:РНК.

10 Как правило, антисмысловой полинуклеотид по настоящему изобретению можно синтезировать с использованием известного способа, такого как химический синтез, с использованием синтезатора.

15 Антисмысловой полинуклеотид по настоящему изобретению можно вводить в раковые клетки пациента с использованием вирусного вектора, такого как ретровирусный вектор, аденовирусный вектор, или аденоассоциированный вирусный вектор, или невирусного вектора, такого как липосома, посредством способа *ex vivo* или способа *in vivo*, таким образом, он соответствующим образом служит в качестве противоракового лечения. Соответственно настоящее изобретение относится к 20 способу противоракового лечения, включающего в себя стадию введения пациенту ингибитора роста иммортализованной раковой клетки, содержащего антисмысловой полинуклеотид в качестве активного ингредиента.

25 Ингибитор роста иммортализованной раковой клетки по настоящему изобретению содержит вышеупомянутый антисмысловой полинуклеотид в качестве активного ингредиента и может также содержать стабилизатор, суспензию, замораживающую смесь, буферный раствор, растворитель или т.п. до такой степени, что эффект супрессии пролиферации клетки ингибитором не нарушается. Дозу и расписание введения ингибитора роста иммортализованной раковой клетки по 30 настоящему изобретению пациенту с раком может подходящим образом определить специалист в данной области согласно типу заболевания, возрасту, массе пациента и т.д. Примеры расписаний введения включают в себя 3-недельный цикл внутривенного введения, при котором проводят последовательное 2-3-недельное введение антисмыслового полинуклеотида в дозе 2-10 мг/кг в сутки; 1-недельный 35 цикл внутривенного введения, при котором проводят последовательное 5-суточное введение антисмыслового полинуклеотида в дозе 80-120 мг/м² в сутки; и 4-недельный цикл внутривенного введения, при котором проводят последовательное 3-недельное введение антисмыслового полинуклеотида в дозе 80-120 мг/м² в сутки.

40 ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение более конкретно объясняют ниже по отношению к примерам. Однако настоящее изобретение не является ограниченным этими примерами.

45 Пример 1

Идентификация определяющего иммортализацию гена

1. Получение тотальной РНК из образца ткани человека, штамма раковой клетки человека и культуры неопластических клеток человека

50 С использованием набора RNeasyTM Mini (Qiagen) тотальную РНК выделяли из девяти видов штаммов клеток рака легкого, 21 вида штаммов раковых клеток пищевода, девяти видов рака пищеварительной системы, различных других штаммов раковых клеток (рак желудка, рак толстого кишечника, рак головы и шеи, лейкоз), двух видов неопластических эпителиальных клеток пищевода и двух видов

нормального респираторного эпителия согласно прилагаемому протоколу. Выделенную тотальную РНК хранили при -80°C .

Кроме того, тотальную РНК выделяли также из одиннадцати видов штаммов клеток рака молочной железы, десяти видов штаммов раковых клеток яичников, десяти видов штаммов раковых клеток поджелудочной железы, одного вида эпителия молочной железы с не неопластической иммортализацией, одного вида не неопластического эпителия молочной железы, десяти наборов ткани рака поджелудочной железы и не раковой ткани поджелудочной железы того же самого пациента с раком поджелудочной железы, первичного очага и трех частей с метастазами из ткани рака легкого одного и того же пациента с немелкоклеточным раком легкого. Полученную тотальную РНК сохраняли. Тотальную РНК проверяли, чтобы убедиться в высоком качестве, с четкими пиками 18S и 28S рРНК, с использованием 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) и RNA LabChip (Agilent Technologies), перед тем как подвергать анализу на микрочипе.

2. Анализ на микрочипе

С использованием выделенной тотальной РНК проводили всесторонний анализ экспрессии генов посредством микрочипа. Использовали микрочип CodeLink UniSet Human 20K I Bioarray (19881 зонд) и проводили (1) синтез кДНК по тотальной РНК, (2) синтез меченой кРНК по кДНК, (3) процесс фрагментации меченой кРНК, (4) гибридизацию фрагментов кРНК и микрочипа, (5) окрашивание микрочипа, (6) сканирование микрочипа и (7) анализ экспрессии генов.

(1) Синтез кДНК по тотальной РНК

С использованием набора реагентов для анализа экспрессии CodeLink (GE Healthcare Bio Science) синтезировали первую цепь кДНК согласно протоколу. Более конкретно, 1 мкг каждой из тотальных РНК, полученных в разделе 1, доводили до 10 мкл свободной от нуклеазы водой, смешивали с 1 мкл разбавляющего противобактериального раствора для мРНК и 1 мкл праймера Т7 олиго (dT), оба содержались в наборе. Всего 12 мкл жидкости нагревали при 70°C в течение 10 минут с последующим быстрым охлаждением на льду в течение 3 минут. На льду жидкость перемешивали с 2 мкл 10 × буфера для синтеза первой цепи, 4 мкл смеси 5-мМ dNTP, 1 мкл ингибитора РНКазы и 1 мкл обратной транскриптазы (200 ед./мкл) - все содержалось в наборе. Всего 20 мкл жидкости нагревали при 42°C в течение двух часов.

Затем согласно протоколу РНК в гибриде РНК-ДНК расщепляли, и цепь РНК заменяли цепью ДНК, таким образом синтезируя вторую цепь кДНК (двухцепочечная кДНК). Более конкретно, 63 мкл свободной от нуклеазы воды, 10 × буфер для синтеза второй цепи (10 мкл), 5-мМ смесь dNTP (4 мкл), смесь ДНК-полимеразы (2 мкл:10 ед./мкл), 1 мкл РНКазы Н - все содержалось в наборе, добавляли к 20 мкл реакционного раствора для первой цепи кДНК. Всего 100 мкл жидкости нагревали при 16°C в течение двух часов.

После реакции синтезированную двухцепочечную кДНК очищали с использованием набора для очистки продуктов ПЦР QIA quick (QIAGEN) согласно прилагаемому протоколу. Более конкретно, 100 мкл раствора кДНК смешивали с 500 мкл буфера РВ, содержащегося в наборе, и перемешанную жидкость помещали в центрифугируемую колонку QIA quick, установленную в 2-мл пробирку для центрифугирования, и подвергали центрифугированию в течение 50 секунд при 13000 об/мин. После элюции жидкость удаляли, центрифугируемую колонку QIA quick устанавливали снова, туда добавляли 700 мкл буфера РЕ, содержащегося в наборе, и

проводили центрифугирование при 13000 об/мин в течение 1 минуты. Жидкость после элюции удаляли, центрифугируемую колонку QIA quick устанавливали снова, и проводили еще одно центрифугирование при 13000 об/мин в течение 1 минуты, так чтобы полностью удалить буфер PE. Центрифугируемую колонку QIA quick устанавливали в новую 1,5-мл пробирку, и 30 мкл свободной от нуклеазы воды наносили непосредственно на мембрану в центрифугируемую колонку QIA quick, позволяли стоять 1 минуту и затем центрифугировали при 13000 об/мин в течение 1 минуты. Этот процесс проводили дважды (всего использовали 60 мкл). Затем раствор кДНК концентрировали до менее чем 9,5 мкл с использованием вакуумной сушки и доводили добавлением свободной от нуклеазы воды до 9,5 мкл.

(2) Синтез меченой кРНК по кДНК

Затем согласно протоколу набора реагентов для анализа экспрессии CodeLink (GE Healthcare Bio Science) проводили реакцию транскрипции *in vitro* (IVT) в присутствии меченого биотином нуклеотида для синтеза кРНК. Более конкретно, смешивали 4,0 мкл 10 × реакционного буфера для T7, 4,0 мкл раствора АТР для T7, 4,0 мкл раствора GTP для T7, 4,0 мкл раствора CTP для T7 и 3,0 мкл раствора UTP для T7 - все содержались в наборе. После дополнительного добавления 7,5 мкл 10-мМ биотин-11-UTP (Perkin Elmer Corporation), всего 26,5 мкл жидкости добавляли к 9,5 мкл раствора кДНК, полученного в предыдущем процессе (1). Затем добавляли 4,0 мкл 10 × ферментной смеси T7, содержащейся в наборе, и всего 40,0 мкл жидкости хорошо перемешивали и нагревали в газообразной фазе при 37°C в течение 14 часов. После реакции синтезированную кРНК очищали с использованием набора RNeasy Mini (QIAGEN) согласно прилагаемому протоколу. Более конкретно, 60 мкл свободной от нуклеазы воды добавляли к реакционному раствору IVT (40 мкл), добавляли 350 мкл буфера RLT, содержащегося в наборе, и 250 мкл 100% этанола, и хорошо перемешивали, и всего 700 мкл перемешанной жидкости помещали в центрифугируемую колонку RNeasy mini, чтобы подвергнуть центрифугированию в течение 15 секунд при 12000 об/мин. Центрифугируемую колонку RNeasy mini устанавливали в новую 2-мл пробирку для центрифугирования, на колонку наносили 500 мкл буфера RPE, содержащегося в наборе, и проводили другое центрифугирование при 12000 об/мин в течение 15 секунд. Этот процесс проводили дважды. После удаления жидкости после элюции центрифугируемую колонку RNeasy mini устанавливали в 2-мл пробирку для центрифугирования и проводили центрифугирование при 12000 об/мин в течение 2 минут для высушивания мембраны в колонке. После этого центрифугируемую колонку RNeasy mini устанавливали в новую 1,5-мл пробирку, и 50 мкл свободной от нуклеазы воды наносили непосредственно на мембрану, позволяли стоять 10 минут при комнатной температуре и затем центрифугировали при 12000 об/мин в течение 1 минуты. Этот процесс проводили дважды (всего использовали 100 мкл).

Образец хорошо перемешивали и отбирали порцию 2-мкл для проверки качества кРНК с использованием Agilent 2100 Bioanalyzer, и 2-мкл порцию разводили в 50 раз стерильной дистиллированной водой для количественного определения кРНК; остальное хранили при -80°C. Для количественного определения измеряли поглощение разведенного в 50 раз раствора по отношению к 260 нм и 280 нм, и определяли концентрацию кРНК. Подтверждали, что соотношение поглощения при 260 нм и 280 нм составляет 1,8 или более. Когда концентрация РНК составляла 0,5 мкг/мкл или менее, образец концентрировали с использованием вакуумной сушки. Проверку качества кРНК осуществляли электрофорезом с

использованием Agilent 2100 Bioanalyzer и RNA LabChip согласно прилагаемому протоколу, подтверждая что размытый пик имеет по меньшей мере 500 оснований.

(3) Фрагментация меченой кРНК

5 Затем согласно протоколу из набора реагентов для анализа экспрессии CodeLink (GE Healthcare Bio Science) кРНК фрагментировали до приблизительно 100-200 оснований. Более конкретно, добавляли свободную от нуклеазы воду, так что из 10 мкг кРНК получали 20 мкл; затем добавляли 5 мкл 5 × буфера для фрагментации, содержащегося в наборе. После нагревания при 94°C в течение 20 минут жидкость 10 быстро охлаждали на льду. 78 мкл буфера для гибридизации А, 130 мкл буфера для гибридизации В, 27 мкл свободной от нуклеазы воды - все содержались в наборе, добавляли к 25 мкл раствора, содержащего 10 мкг фрагментов кРНК, получая всего 260 мкл раствора для гибридизации. После перемешивания на встряхивателе при максимальной скорости в течение 5 секунд и осаждения центрифугированием 15 образец нагревали при 90°C в течение 5 минут для денатурации кРНК нагреванием с последующим охлаждением на льду.

(4) Гибридизация фрагментов кРНК и микрочипа

С использованием набора CodeLink Shaker (GE Healthcare Bio Science) и 20 встряхивателя CodeLink Innova проводили гибридизацию согласно протоколу. Более конкретно биочип CodeLink uniSet human 20K I устанавливали в лоток для встряхивания 12 пластин, содержащийся в наборе. Раствор для гибридизации, полученный в предыдущем процессе (3), встряхивали при максимальной скорости в течение 5 секунд и осаждали центрифугированием. 250 мкл раствора для 25 гибридизации инъецировали в отверстие справа внизу в камере для герметизации чипа, и отверстие закрывали уплотнительной лентой (наклейкой), присоединенной к чипу. Лоток для встряхивания с чипом на нем помещали в встряхиватель CodeLink Innova и нагревали при 37°C в течение 18 часов при вращении при 300 об/мин.

(5) Окрашивание микрочипа

С использованием набора CodeLink Parallel Processing (GE Healthcare Bio Science) чип окрашивали и промывали согласно протоколу. Более конкретно, камеру для герметизации удаляли с гибридизируемого чипа, 13 мл 0,75 × буфера TNT (0,1 М Трис-НСl (рН 7,6), 0,15 М NaCl, 0,05% Tween 20) добавляли при комнатной 35 температуре, и полученную жидкость разделяли по щелям среднего резервуара для реагентов с подставкой для биочипов, содержащейся в наборе. Подставку двигали вверх и вниз несколько раз, чтобы стряхнуть лишний раствор для гибридизации. Затем подставку для биочипов перемещали в большой резервуар для реагентов, 40 заполненный 240 мл 0,75 × буфера TNT, нагретого до 46°C. Подставку для биочипов нагревали до 46°C в течение часа.

В качестве жидкости для окрашивания для каждого чипа 6,8 мкл жидкого стрептавидин-Су5, растворенного в свободной от нуклеазы воде до 1 мг/мл, разводили в 500 раз с использованием 3393,2 мкл буфера TNB (0,1 М Трис-НСl (рН 45 7,6), 0,15 М NaCl, 0,5% блокирующего реагента TSA (Perkin Elmer Corporation)) при комнатной температуре. Всего подавали 3,4 мл, чтобы заполнить щели малого резервуара для реагентов, содержащегося в наборе. Подставку для биочипов, поддерживающую чип, перемещали в малый резервуар для реагентов, загоразивали 50 от света алюминнием или т.п. и подвергали окрашиванию в течение 30 минут при комнатной температуре (23°C ± 2°C).

После окрашивания подставку для биочипов перемещали в большой резервуар для реагентов, заполненный 240 мл буфера TNT (комнатная температура), двигали

вверх и вниз несколько раз и позволяли стоять 5 минут при комнатной температуре. Затем подставку перемещали в большой резервуар для реагентов, заполненный новым буфером TNT (комнатной температуре), двигали вверх и вниз несколько раз и позволяли стоять 5 минут при комнатной температуре. Этот процесс промывки повторяли четыре раза. Наконец, подставку промывали 240 мл раствора 0,05% Tween 20, двигая вверх и вниз в течение пяти секунд. Этот процесс повторяли дважды. Подставку для биочипов устанавливали в высушенный средний резервуар для реагентов с последующим центрифугированием при комнатной температуре 3 минуты при 600 × g.

(6) Сканирование микрочипа

Каждый из окрашенных чипов сканировали сканером Agilent G2565 (Agilent), чтобы сохранить картину окрашивания в виде изображения TIFF. Каждое изображение TIFF обрабатывали программным обеспечением для анализа экспрессии CodeLink, таким образом преобразуя в цифровую форму силу сигнала для пятна каждого гена на чипе.

(7) Анализ экспрессии генов

Данные силы сигнала, полученные таким образом, нормализовали с использованием программного обеспечения для анализа экспрессии генов на биочипах GeneSpring GX (Agilent Technologies), и затем анализировали данные. Конкретно, сигнал фона вычитали из сигнала пятна. Значения меньше 0,01 приравнивали к 0,01, и каждое значение делили на промежуточное значение из сигналов всех пятен, чтобы найти стандартизованный относительный уровень экспрессии гена. Гены, относительный уровень экспрессии которых в штаммах иммортализованных раковых клеток везде был выше (ФИГ. 1, внизу справа), чем в здоровой клетке (ФИГ. 1, вверху слева), распознавали следующим образом. Гены, обладающие универсальной повышенной экспрессией в различных органах, по-видимому, являются генами, вовлеченными в иммортализацию раковых клеток (ФИГ. 1, большая стрелка, указывающая направо), а не генами (ФИГ. 1, направленная вниз стрелка), вовлеченными в злокачественное перерождение здоровых клеток (ФИГ. 1, слева вверху).

В качестве первой группы при скрининге отбирали любой ген, для которого по меньшей мере в 8 из 9 видов штаммов клеток рака легкого показали экспрессию в двукратном количестве или выше, чем промежуточное значение для двух образцов нормального респираторного эпителия, любой ген, для которого по меньшей мере в 19 из 21 видов штаммов раковых клеток пищевода показали экспрессию в двукратном количестве или выше, чем промежуточное значение для двух образцов неопластического эпителия пищевода, и любой ген, для которого по меньшей мере в 8 из 9 видов рака пищеварительной системы, или различных других штаммов раковых клеток (рак желудка, рак ободочной и прямой кишки, рак головы и шеи, лейкоз) показали экспрессию в двукратном количестве или выше, чем промежуточное значение для четырех видов неопластического эпителия (двух видов респираторного эпителия и двух видов эпителия пищевода). В результате при скрининге отобрали пятьдесят один ген (ФИГ. 2, слева вверху). В качестве второй группы при скрининге отбирали любой ген, для которого среднее значение уровней экспрессии трех групп штаммов раковых клеток из различных органов являлось двукратным или выше, чем среднее значение для соответствующего эпителия (следует заметить, что для штаммов раковых клеток пищевода, используемых для этого скрининга, основывались на среднем значении, соответствующем семи видам,

проанализированным первыми), и для которого уровень экспрессии в ткани с метастазами рака легкого, состоящих из иммортализованных клеток рака легкого, являлся двукратным или выше, чем среднее значение для ткани первичного очага и ткани с метастазами, состоящей из не иммортализованных клеток рака легкого того же самого пациента. В результате выделили 80 генов (ФИГ. 2, справа вверху). Среди двух отобранных скринингом групп семь генов являлись общими.

Является известным фактом, что штаммы раковых клеток все являются иммортализованными. Для каждого из наборов тканей рака легкого с иммортализацией/без иммортализации, используемых в экспериментах, подтвердили, что первичный очаг (ФИГ. 3, «D2Pr») и очаг метастазирования в печени (ФИГ. 3, «D5M3») одного и того же пациента являлись неиммортализованными (активация теломеразы: отрицательная; длина теломеры: уменьшенная; экспрессия белка hTERT: не наблюдали), и что один из очагов метастазирования в лимфатических узлах (ФИГ. 3, «D4M2») по существу состоял только из иммортализованных клеток (высокую активацию теломеразы, увеличенную длину теломеры, экспрессию белка hTERT наблюдали почти во всех клетках), а другой очаг метастазирования (ФИГ. 3, «D3M1») состоял как из иммортализованных клеток, так и из неиммортализованных клеток (низкая активация теломеразы; клетки с экспрессией белка hTERT наблюдали среди клеток без экспрессии). Эти характеристики подтвердили анализом активации теломеразы (Hiyama K et al., J Natl Cancer Inst 87: 895-902, 1995, Case G), длины теломеры (Hiyama K et al., Oncogene 10: 937-44, 1995, Case 92-D) и экспрессии белка hTERT in situ (Hiyama E et al., Neoplasia 3: 17-26, 2001, Fig 6A, B).

Для дальнейшего уточнения проводили скрининг гена, обладающего универсальной высокой экспрессией в 11 штаммах клеток рака молочной железы, 10 штаммах клеток рака яичника и 10 штаммах клеток рака поджелудочной железы. Наконец, всего тринадцать генов: (1) присоединяющего убиквитин фермента E2S (UBE2S), (2) фактора репликации С (активатора 1) 4, 37 кДа (RFC4), (3) простагландин Е-синтазы 2, (PTGES2), (4) гомолога MAF1 (*S. cerevisiae*) (MAF1), (5) рецептора активина А, типа IIВ(ACVR2B), (6) семейства со сходством последовательностей 119, члена А (FAM119A), (7) 12-гидроксидегидрогеназы лейкотриена В4 (LTB4DH), (8) полипептида 2 маннозилтрансферазы долихилфосфата, регуляторной субъединицы (DPM2), (9) селенопротеина X, 1(SEPX1), (10) субъединицы протеасомы (просомы, macropain), типа альфа, 3 (PSMA3), (11) домена, содержащего двойную спираль-спираль-двойную спираль-спираль 3 (CHCHD3), (12) гомолога LSM3, связанного с малой ядерной РНК U6 (*S. cerevisiae*) (LSM3) и экспрессирующийся (13) в G-2 и S-фазе 1(GTSE1), обнаружили как гены, обладающие универсальной более высокой экспрессией в большинстве штаммов клеток рака легкого, штаммов раковых клеток пищевода, штаммов раковых клеток пищеварительной системы, штаммов клеток рака молочной железы, штаммов клеток рака яичника, штаммов клеток рака поджелудочной железы и различных других штаммов раковых клеток, чем в штаммах смертных не неопластических клеток; они обладают более высокой экспрессией в положительной по теломеразе ткани с метастазами рака легкого (иммортализованные раковые клетки), чем в отрицательной по теломеразе ткани с метастазами рака легкого и первичной ткани (неиммортализованные раковые клетки) одного и того же пациента; и обладают более высокой экспрессией в штаммах клеток рака поджелудочной железы, состоящих только из иммортализованных клеток, чем в раковой ткани

поджелудочной железы, содержащей как иммортализованные клетки, так и неиммортализованные клетки (ФИГ. 3). Для раковой ткани поджелудочной железы, используемой в этом эксперименте, показали более высокую экспрессию полноразмерной мРНК кодирующего теломеразу гена TERT, чем в здоровой ткани поджелудочной железы того же самого пациента. Однако поскольку экспрессия была явно ниже по сравнению со штаммами иммортализованных клеток рака поджелудочной железы, заключили, что ткань содержит неиммортализованные клетки.

Как показано на ФИГ. 3-15, вышеуказанные тринадцать генов обладают следующими характеристиками:

(1) для каждого гена показали более усиленную экспрессию в иммортализованных клетках (сплошные столбцы на ФИГ. 3-15, штаммы клеток, полученные из рака человека, за исключением MCF-12A, SV11e, SV11-106), чем в неопластических смертных клетках (незакрашенные столбцы на ФИГ. 3-15);

(2) для каждого гена показали более усиленную экспрессию в иммортализованных раковых клетках, полученных из рака человека (сплошные столбцы на ФИГ. 3-15, за исключением MCF-12A, SV11e, SV11-106), чем в раковых клетках (столбцы с диагональной штриховкой на ФИГ. 3-15, за исключением SV12e, SV12-72); и

(3) его экспрессия является менее усиленной в неопластических клетках с увеличенной продолжительностью жизни из-за экспрессии теломеразы, полученных введением кодирующего теломеразу гена TERT в здоровые фибробласты легкого (столбцы с ромбовидными точками на ФИГ. 3-15; TERT6e, TERT6-85), чем в родительских клетках (TIG-1). Эти гены обладают высокой экспрессией в положительных по теломеразе иммортализованных раковых клетках. Это показывает, что эти гены служат для определения иммортализации раковых клеток (определяющий иммортализацию ген).

Более того, в трансформированных для иммортализации клетках, полученных введением генов, кодирующих ген TERT, кодирующий теломеразу, и ранний антиген SV40, в здоровые фибробласты легких (ФИГ. 3-15, SV11e, SV11-106: формирование колоний и возможность пассирования до 300 PDL или более длительного пассирования подтверждали с использованием анализа формирования колоний с мягким агаром), экспрессия являлась более высокой, за исключением MAF1, LTV4DH, чем в родительских клетках (TIG-1), или в неопластических клетках с увеличенным временем жизни (TERT6e, TERT6-85: отсутствие формирования колоний и прекращение пролиферации клеток при 100 PDL или менее подтверждали с использованием анализа формирования колоний с мягким агаром). Это, по-видимому, происходит из-за того, что клетки, трансформированные *in vitro*, не всегда являются эквивалентными раковым клеткам человека.

Пример 2

Супрессия пролиферации раковой клетки посредством миРНК (малой интерферирующей РНК) определяющей иммортализацию гена

Чтобы анализировать какое отношение тринадцать видов определяющих иммортализацию генов, идентифицированных в примере 1, имеют к пролиферации раковой клетки, сконструированы и получены миРНК, определенные согласно последовательностям соответствующих генов. Их вводили в три вида штаммов раковых клеток (HeLa: рак шейки матки, KYSE150: рак пищевода и HCC50: рак толстого кишечника). С помощью этих образцов наблюдали супрессию экспрессии

мРНК определяющего иммортализацию гена и эффект на пролиферацию клеток через 96 часов после введения.

(1) Конструирование и получение специфической для последовательности определяющего иммортализацию гена миРНК (малой интерферирующей РНК)

В каждом из тринадцати определяющих иммортализацию генов определяли два или четыре вида последовательностей специфических миРНК, и двухцепочечные миРНК, сформированные каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи, закупили из Qiagen и Japan Bio Service. Из полученных последовательностей миРНК только смысловые цепи показаны в таблицах 2 и 3. миРНК-1 каждого гена представляла собой эквимольную смесь из двух видов.

Таблица 2

Символ гена	Наименование миРНК	Положение	Последовательность	SEQ ID NO:
<i>UBE2S</i>	миРНК-1	44-64	CCGGCCGGCCGCAGCCAUGAA	27
		146-166	UGGCAUCAAGGUCUUUCCCAA	28
	миРНК-2	473-491	GGAGAACUACGAGGAGUUAU	29
	миРНК-3	659-677	UGGCGAGCGCGAUAAGAAG	30
<i>RFC4</i>	миРНК-1	897-917	AGGGAAUAGCUUAUCUUGUUA	31
		189-209	CUGCACGAGAAGCCAGGCUAA	32
	миРНК-2	745-763	CCGAUUCUGUCUUUUCUGU	33
<i>PTGES2</i>	миРНК-1	2003-2023	CUGGGACAUGUUUGCAAUAAA	35
		1105-1125	CUGGCUCAUGCUCACGAGAA	36
	миРНК-2	943-961	AGGAGAAAGCUCGCAACAA	37
<i>MAFI</i>	миРНК-1	1538-1558	CAGCUGGACCCGAGUUUAU	39
		1031-1051	UAGCCUCUGGUCCUUCACUA	40
	миРНК-2	604-622	ACGACAAACACAUGUCAA	41

Таблица 3

	миРНК-3	866-874	GCCUAGCUGGGUGUGAA	42	
5	ACVR2B	миРНК-1	626-646	CAGCUCAUGAAUGACUUUGUA	43
			208-228	CACCAUCGAGCUCGUGAAGAA	44
	миРНК-2	684-702	GGCAGAGUGAACGGGAGAU	45	
	миРНК-3	840-858	GGAACAUCAUCAUGGAA	46	
10	FAM119A	миРНК-1	754-774	AAGGUUCACUACGAUCCUGAA	47
			1068-1088	UCGAUUUAUGCUAUUUGUGUA	48
	миРНК-2	201-219	GGAAUUUGGGUUGCAGAAA	49	
	миРНК-3	810-828	CCAGAAGGAGGACUUUAAA	50	
15	LTBADH	миРНК-1	775-795	CACUGUUAUCGGCCAGAUGAA	51
			658-678	UGGAUUUGAUGUCGUCUUUAA	52
	миРНК-2	263-281	GCCAAAAGAUUGAAGGAAG	53	
	миРНК-3	725-743	CCUGAUGGUUAUGAUUGUU	54	
20	DPM2	миРНК-1	145-165	CAGCAUGUCAUCCACAAGUUA	55
			84-104	UAGCCUGAUCUUCACCUA	56
	миРНК-2	116-134	GGGUGAUUCUCUUGCCAUU	57	
	миРНК-3	224-242	UGUUUGUGGGACUGUUCAU	58	
25	SEPX1	миРНК-1	870-890	CAGACUCUCGUCCUACCCGAA	59
			794-814	CUGAAUGACGUUACACCCUCA	60
	миРНК-2	161-179	GGGCGAGGUUUCAGAAU	61	
	миРНК-3	179-197	UCACUUUGAACCUGGCGUU	62	
30	PSMA3	миРНК-1	853-873	CCAGUCCAAUGUAAACUUAUUA	63
			686-706	CUCAGCUGGGUUGGUAUUA	64
	миРНК-2	291-309	UGGCAGAUGCUCGUUCUUU	65	
	миРНК-3	512-530	GGUGUUUCAUACGGUUAUU	66	
35	CHCHD3	миРНК-1	546-566	CAGGAUGCAUUCUACAAAGAA	67
			1450-1470	CUGGAAUAAUGUUUAUGAUUA	68
	миРНК-2	374-392	CGAAGAUCAAGAACGACUA	69	
	миРНК-3	522-540	GAGAAAGACCGAGUGCUAA	70	
40	LSM3	миРНК-1	540-560	UCCAAUAAAUUGACCACCAA	71
			37-57	ACGACGUAGACCAGCAACAAA	72
	миРНК-2	39-57	GACGUAGACCAGCAACAAA	73	
	миРНК-3	261-279	ACGAAACGGAAUUAUCCAA	74	
45	GTSE1	миРНК-2	1082-1100	GGGCAAAGCUAAAUCAAGU	75
		миРНК-3	2116-2134	UGACAAACACUCCAGACAU	76

(2) Культивирование штаммов раковых клеток человека

Три вида штаммов раковых клеток (HeLa: рак шейки матки, KYSE150: рак пищевода, и HCC50: рак толстого кишечника) культивировали в следующих условиях. HeLa культивировали в культуральной среде DMEM (Nacalai Tesque Inc.), содержащей 10% эмбриональную бычью сыворотку (Sigma Corporation) и гентамицин (Sigma Corporation). KYSE150 и HCC50 культивировали в культуральной среде RPMI 1640 (Nacalai Tesque Inc.), содержащей 10% эмбриональную бычью

сыворотку и гентамицин.

(3) Введение гена специфической для последовательности определяющего иммортализацию гена миРНК в штамм раковой клетки

5 На сутки перед трансфекцией раковые клетки, предварительно культивированные, выделяли с использованием трипсина. После суспендирования в культуральной среде, подробно описанной в (2) выше, HeLa= $1,2 \times 10^4$, KYSE150= 2×10^4 и HCC50= $1,5 \times 10^4$, рассеивали в каждую лунку 24-луночного планшета. На сутки трансфекции среду заменяли бессывороточной средой Opti-MEM (Invitrogen), и миРНК, 10 показанные в таблице 2 и 3, подвергали трансфекции с использованием олигофектамина (Invitrogen) или липофектамина 2000 (Invitrogen). Концентрация миРНК при трансфекции составляла 40 нМ на лунку. Контрольную (не вызывающую подавление транскрипции) миРНК (Qiagen) использовали в качестве отрицательного контроля. 15

(4) Анализ супрессии относительной экспрессии мРНК определяющего иммортализацию гена

Через одни сутки после трансфекции, подробно описанной в (3), тотальную РНК выделяли из каждого штамма раковых клеток с использованием RNeasy Mini (Qiagen) 20 согласно сборнику инструкций. С использованием зонда для ОТ-ПЦР QuantiTect (Qiagen) и специфического для последовательности определяющего иммортализацию гена зонда TaqMan (ABI), количественный ОТ-ПЦР (использовали систему детекции последовательности ABI PRISM 7000 (изготовленную в ABI)) проводили в 25 следующих условиях:

- i) 50°C, 30 минут,
- ii) 95°C, 15 минут,
- iii) 94°C, 15 секунд → 60°C, 1 минута × 35-45 циклов.

С использованием β-актина в качестве внутреннего стандарта уровень экспрессии 30 переводили в цифровую форму на основании каждой кривой амплификации. В качестве контроля использовали значение для клетки, в которую вводили NS-последовательность миРНК. Измерение относительной экспрессии мРНК определяющего иммортализацию гена проводили дважды с одним и тем же геном-мишенью и с одними и теми же штаммами раковых клеток в тех же самых условиях. 35

На ФИГ. 16-28 показаны проценты относительного количества мРНК определяющих иммортализацию генов в клетках, в которые вводили каждую из миРНК, где процент мРНК определяющего иммортализацию гена в контроле принимали за 100%. Измерения показаны как мРНК-1 и мРНК-2 соответственно на 40 ФИГ. 16-28. Супрессию экспрессии мРНК посредством любой из миРНК (миРНК-1 - миРНК-3) наблюдали для всех генов-мишеней.

(5) Измерение пролиферации штаммов раковых клеток

Пролиферацию штаммов раковых клеток измеряли с использованием реагента для измерения подсчета жизнеспособных клеток SF (Nacalai Tesque Inc.). 45 Через 96 часов после трансфекции, подробно описанной в (3), 10 мкл реагента WST добавляли в каждую лунку. После 3-часовой инкубации при 37°C поглощение при 450 нм и 595 нм (контрольные длины волны) измеряли с использованием считывателя планшетов (Wallac ARVO MX1420 Multilabel Counter: изготовлен в Perkin 50 Elmer). В соответствии с: поглощение при 450 нм - поглощение при 595 нм - поглощение при BG (только культуральная среда) данные переводили в цифровую форму и находили среднее значение для трех лунок. Затем значение показывали как процент, где процент для клетки с введением NS последовательности миРНК

принимали за 100%. Измерение пролиферации штаммов раковых клеток проводили дважды с одним и тем же геном-мишенью и с одними и теми же штаммами раковых клеток в тех же самых условиях.

5 Соответствующие количества клеток после введения миРНК показаны как МТТ-1 и МТТ-2 соответственно на ФИГ. 16-28, где процент количества клеток после введения NS последовательности миРНК принимали за 100%. Для всех генов-мишеней супрессию пролиферации посредством одной из миРНК (миРНК-1 - миРНК-3) наблюдали в трех видах раковых клеток, что указывает на то, что эти
10 тринадцать видов определяющих иммортализацию генов можно рассматривать как являющиеся молекулами-мишенями для достижения универсальной супрессии пролиферации иммортализованных раковых клеток.

Различение иммортализованных раковых клеток от смертных раковых клеток имеет значение для функционирования в качестве маркера заболевания, так же как
15 для вклада в разработку лекарственных средств. Общий диагноз рака основан на патологических показателях, с помощью которых возможен также диагноз дифференцировки, атипии и т.д. Однако общие патологические анализы не позволяют оценить, являются ли клетки иммортализованными, иными словами,
20 обладают ли клетки неограниченной продолжительностью жизни. Активация теломеразы человека до настоящего времени привлекает внимание в качестве маркера иммортализации. Однако, как показано выше, активацию теломеразы наблюдали также в некоторых здоровых клетках; таким образом, новая идея, что активация теломеразы не всегда немедленно приводит к иммортализации клеток,
25 переходит в фактические знания. Кроме того, поскольку уровень экспрессии теломеразы является очень низким, хотя разработана иммунная система окрашивания, только несколько лабораторий опубликовали свои достижения (Niyama E et al., Neoplasia 3: 17-26, 2001). Применение маркера по
30 настоящему изобретению для детекции экспрессии определяющего иммортализацию гена позволяет отличать иммортализованные раковые клетки от клеток с ограниченной продолжительностью жизни. Такое различие не являлось возможным посредством общепринятого общего патологического диагноза. Настоящее изобретение, таким образом, обладает большим потенциалом для
35 клинического применения, применимого для раннего диагноза, новых возможностей лечения, прогноза и т.п.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

40 ФИГ. 1 представляет собой схему, иллюстрирующую механизм злокачественного перерождения и иммортализации клетки человека.

ФИГ. 2 представляет собой схему, иллюстрирующую способ выделения гена-мишени в соответствии с настоящим изобретением.

ФИГ. 3 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии гена UBE2S в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием олиго-чипа.

45 ФИГ. 4 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии гена RFC4 в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием олиго-чипа.

ФИГ. 5 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии гена PTGES2 в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием
50 олиго-чипа.

ФИГ. 6 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии гена MAF1 в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием олиго-чипа.

ФИГ. 7 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии

гена ACVR2B в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием олиго-чипа.

ФИГ. 8 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии гена FAM119A в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием олиго-чипа.

ФИГ. 9 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии гена LTB4DH в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием олиго-чипа.

ФИГ. 10 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии гена DPM2 в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием олиго-чипа.

ФИГ. 11 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии гена SEPX1 в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием олиго-чипа.

ФИГ. 12 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии гена PSMA3 в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием олиго-чипа.

ФИГ. 13 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии гена SHCHD3 в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием олиго-чипа.

ФИГ. 14 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии гена LSM3 в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием олиго-чипа.

ФИГ. 15 представляет собой график, показывающий уровни экспрессии гена GTSE1 в различных иммортализованных раковых клетках, с использованием олиго-чипа.

ФИГ. 16 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена UBE2S и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

ФИГ. 17 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена RFC4 и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

ФИГ. 18 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена RTGES2 и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

ФИГ. 19 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена MAF1 и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

ФИГ. 20 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена ACVR2B и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

ФИГ. 21 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена FAM119A и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

ФИГ. 22 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена LTB4DH и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

ФИГ. 23 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена DPM2 и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

ФИГ. 24 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена *SEPX1* и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

5 ФИГ. 25 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена *PSMA3* и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

10 ФИГ. 26 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена *SNCHD3* и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

ФИГ. 27 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена *LSM3* и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

15 ФИГ. 28 представляет собой график, показывающий эффект супрессии экспрессии гена *GTSE1* и супрессии пролиферации клеток, вызываемый миРНК в штаммах раковых клеток (Пример 2).

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ВИДЕ ТЕКСТА

20 SEQ ID NO:27 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (44-64) гена *UBE2S*.

SEQ ID NO:28 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (146-166) гена *UBE2S*.

SEQ ID NO:29 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена *UBE2S*.

25 SEQ ID NO:30 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена *UBE2S*.

SEQ ID NO:31 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (897-917) гена *RFC4*.

30 SEQ ID NO:32 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (189-209) гена *RFC4*.

SEQ ID NO:33 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена *RFC4*.

35 SEQ ID NO:34 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена *RFC4*.

SEQ ID NO:35 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (2003-2023) гена *PTGES2*.

40 SEQ ID NO:36 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (1105-1125) гена *PTGES2*.

SEQ ID NO:37 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена *PTGES2*.

SEQ ID NO:38 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена *PTGES2*.

45 SEQ ID NO:39 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (1538-1558) гена *MAF1*.

SEQ ID NO:40 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (1031-1051) гена *MAF1*.

50 SEQ ID NO:41 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена *MAF1*.

SEQ ID NO:42 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена *MAF1*.

SEQ ID NO:43 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (626-646) гена ACVR2B.

SEQ ID NO:44 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (208-228) гена ACVR2B.

5 SEQ ID NO:45 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена ACVR2B.

SEQ ID NO:46 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена ACVR2B.

10 SEQ ID NO:47 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (754-774) гена FAM119A.

SEQ ID NO:48 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (1068-1088) гена FAM119A.

15 SEQ ID NO:49 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена FAM119A.

SEQ ID NO:50 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена FAM119A.

20 SEQ ID NO:51 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (775-795) гена LTB4DH.

SEQ ID NO:52 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (658-678) гена LTB4DH.

SEQ ID NO:53 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена LTB4DH.

25 SEQ ID NO:54 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена LTB4DH.

SEQ ID NO:55 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (145-165) гена DPM2.

30 SEQ ID NO:56 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (84-104) гена DPM2.

SEQ ID NO:57 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена DPM2.

35 SEQ ID NO:58 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена DPM2.

SEQ ID NO:59 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (870-890) гена SEPX1.

40 SEQ ID NO:60 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (794-814) гена SEPX1.

SEQ ID NO:61 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена SEPX1.

SEQ ID NO:62 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена SEPX1.

45 SEQ ID NO:63 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (853-873) гена PSMA3.

SEQ ID NO:64 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (686-706) гена PSMA3.

50 SEQ ID NO:65 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена PSMA3.

SEQ ID NO:66 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена PSMA3.

SEQ ID NO:67 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (546-566) гена CHCHD3.

SEQ ID NO:68 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (1450-1470) гена CHCHD3.

5 SEQ ID NO:69 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена CHCHD3.

SEQ ID NO:70 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена CHCHD3.

10 SEQ ID NO:71 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (540-560) гена LSM3.

SEQ ID NO:72 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-1 (37-57) гена LSM3.

15 SEQ ID NO:73 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена LSM3.

SEQ ID NO:74 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена LSM3.

20 SEQ ID NO:75 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-2 гена GTSE1.

SEQ ID NO:76 представляет собой последовательность оснований смысловой цепи миРНК-3 гена GTSE1.

Формула изобретения

25 1. Маркерный ген для определения иммортализации раковой клетки, причем маркерный ген представляет собой полинуклеотид, обладающий последовательностью, по меньшей мере, из 15 последовательных оснований, которая является комплементарной непрерывной последовательности, по меньшей
30 мере, из 15 оснований внутри любой из последовательностей оснований, представленных SEQ ID NO:1-13.

2. Маркерный ген по п.1, где маркерный ген представляет собой зонд или праймер.

35 3. Способ определения иммортализованной раковой клетки, включающий в себя стадии:

(1) связывания маркерного гена по п.1 или 2 с РНК, приготовленной из биологического образца, который является выделенным из тестируемого субъекта и который может содержать раковую клетку, или с производным РНК;

40 (2) измерения количества РНК или ее производного, связанных с маркерным геном, с использованием маркерного гена в качестве показателя; и

(3) сравнения количества РНК или ее производного, обнаруженных на стадии (2) (в общем обозначаемого как «количество РНК» здесь и далее), с количеством (в общем обозначаемым как «сравнительное количество РНК» здесь и далее)
45 соответствующей РНК или ее производного в неиммортализованной здоровой или раковой клетке.

4. Способ определения иммортализованной раковой клетки по п.3, дополнительно включающий в себя стадию:

50 (4) определения, что раковая клетка тестируемого субъекта является иммортализованной, когда количество РНК, обнаруженное на стадии (2), выше, чем сравнительное количество РНК, и определения, что раковая клетка тестируемого субъекта не является иммортализованной, когда количество РНК, обнаруженное на

стадии (2), не превышает сравнительное количество РНК.

5. Маркер иммортализации раковой клетки, представляющий собой полипептид, обладающий любой из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO:14-26, кодируемых последовательностями оснований, представленными SEQ ID NO:1-13, соответственно.

6. Антитело для распознавания полипептида по п.5, где антитело специфично распознает полипептид, обладающий любой из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO:14-26, и его получают из сыворотки или слитых клеток, полученных слиянием клеток селезенки и клеток миеломы, которые получают из животного, которое иммунизируют полипептидом, имеющим, по меньшей мере, 15 последовательных аминокислот из аминокислотной последовательности, образующей полипептид из п.5.

7. Способ определения иммортализованной раковой клетки, включающий в себя стадии:

(1') связывания содержащей белок фракции, содержащей полипептид, полученной из биологического образца, который является выделенным из тестируемого субъекта и который может содержать раковую клетку, с антителом по п.6;

(2') измерения количества полипептида, связанного с антителом, с использованием антитела в качестве показателя и

(3') сравнения количества (в общем обозначаемого как «количество полипептида» здесь и далее) полипептида, обнаруженного на стадии (2'), с количеством (в общем обозначаемым как «сравнительное количество полипептида» здесь и далее) соответствующего полипептида в неиммортализованной здоровой или раковой клетке.

8. Способ определения иммортализованной раковой клетки по п.7, дополнительно включающий в себя стадию:

(4') определения, что раковая клетка тестируемого субъекта является иммортализованной, когда количество полипептида, обнаруженного на стадии (2'), выше, чем сравнительное количество полипептида, и определения, что раковая клетка тестируемого субъекта не является иммортализованной, когда количество полипептида, обнаруженное на стадии (2'), не превышает сравнительное количество полипептида.

9. Реагент для определения иммортализованной раковой клетки, включающий в себя, по меньшей мере, один член, выбранный из группы, состоящей из маркерного гена по п.1 и антитела по п.6.

10. Способ скрининга вещества на супрессию пролиферации иммортализованных раковых клеток, включающий в себя стадии:

(А) обеспечения клетки, эндогенно экспрессирующей один из определяющих иммортализацию генов, представленных SEQ ID NO:1-13, или трансфицирования клетки, способной экспрессировать экзогенный генетический материал, одним из указанных генов;

(В) приведения тестируемого материала в контакт с указанной клеткой;

(С) измерения уровня экспрессии одного из определяющих иммортализацию генов, представленных SEQ ID NO:1-13, в клетке, приведенной в контакт с тестируемым материалом;

(D) сравнения уровня экспрессии определяющего иммортализацию гена, обнаруженного на стадии (С), с уровнем экспрессии (в общем обозначаемым как «сравнительный уровень экспрессии» здесь и далее) определяющего

иммортализацию гена в клетке, не находящейся в контакте с тестируемым материалом; и

(E) выбора тестируемого материала в качестве вещества-кандидата для супрессии пролиферации иммортализованных раковых клеток, когда уровень экспрессии, обнаруженный на стадии (C), ниже, чем сравнительный уровень экспрессии.

11. Способ скрининга вещества на супрессию пролиферации иммортализованных раковых клеток, включающий в себя стадии:

(A') приведения тестируемого материала в контакт с полипептидом по п.5;

(B') измерения активности полипептида, приведенного в контакт с тестируемым материалом;

(C') определения степени активности полипептида, обнаруженной на стадии (B'), путем сравнения активности полипептида, обнаруженной на стадии (B'), с активностью (в общем обозначаемой как «сравнительная активность» здесь и далее) полипептида, не находящегося в контакте с тестируемым материалом; и

(D') выбора тестируемого материала в качестве вещества-кандидата для супрессии пролиферации иммортализованных раковых клеток, когда активность полипептида, обнаруженная на стадии (B1), ниже, чем сравнительная активность.

12. Ингибитор роста иммортализованной раковой клетки, содержащий в качестве активного ингредиента полинуклеотид, обладающий последовательностью, по меньшей мере, из 15 оснований, которая является комплементарной непрерывной последовательности оснований, представленных SEQ ID NO:1-13.

13. Ингибитор роста иммортализованной раковой клетки по п.12, где полинуклеотид обладает одной из последовательностей оснований, представленных SEQ ID NO:27-76.

14. Применение полинуклеотида, обладающего последовательностью, по меньшей мере, из 15 оснований, которая является комплементарной непрерывной последовательности оснований, представленных SEQ ID NO:1-13, для получения ингибитора роста иммортализованной раковой клетки.

15. Применение по п.14, где полинуклеотид обладает одной из последовательностей оснований, представленных SEQ ID NO:27-76.

16. Способ получения антитела для распознавания полипептида по п.5, где антитело специфично распознает полипептид, обладающий любой из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO:14-26, включающий стадии:

(5) иммунизации тестируемого животного полипептидом, имеющим, по меньшей мере, 15 последовательных аминокислот из аминокислотной последовательности, образующей полипептид из п.5; и

(6) выделения антитела из сыворотки или слитых клеток, полученных слиянием клеток селезенки и клеток миеломы, которые получают из указанного тестируемого животного.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> HIROSHIMA UNIVERSITY
 <110> TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.
 <120> ГЕН, ВОВЛЕЧЕННЫЙ В ИММОТАЛИЗАЦИЮ РАКОВОЙ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА,
 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ
 <130> P07-68
 <150> JP 2006-161350
 <151> 2006-06-09
 <160> 76
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 890
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

ggcggaccga	agaacgcagg	aagggggccg	gggggacccg	ccccggccg	gccgcagcca	60
tgaactccaa	cgtggagaac	ctacccccgc	acatcatccg	cctgggtgtac	aaggagggtga	120
cgacactgac	cgcagaccga	cccgatggca	tcaaggctct	tccaacgcag	gaggacctca	180
ccgacctcca	ggtcaccatc	gagggccctg	aggggacccc	atatgctgga	ggtctgttcc	240
gcatgaaact	cctgctgggg	aaggacttcc	ctgcctcccc	accaagggc	tacttctctga	300
ccaagatctt	ccacccgaac	gtgggcgcca	atggcgagat	ctgcgtcaac	gtgctcaaga	360
gggactggac	ggctgagctg	ggcatccgac	acgtactgct	gaccatcaag	tgctctgctga	420
tccaccctaa	ccccgagtct	gcactcaacg	aggaggcggg	ccgcctgctc	ttggagaact	480
acgaggagta	tgccgctcgg	gcccgtctgc	tcacagagat	ccacgggggc	gccggcgggc	540
ccagcggcag	ggccgaagcc	ggtcgggccc	tggccagtgg	caactgaagct	tctccaccg	600
accctggggc	cccagggggc	ccgggagggg	ctgagggctc	catggccaag	aagcatgctg	660
gcgagcgcga	taagaagctg	gcggccaaaga	aaaagacgga	caagaagcgg	gcgctgcggg	720
cgctgcggcg	gctgtagtgg	gctctcttcc	tccttccacc	gtgaccccaa	cctctcctgt	780
ccccctctc	caactctgtc	tctaagttat	ttaaattatg	gctggggctc	gggagggtag	840
agggggcact	gggacctgga	tttgtttttc	taaataaagt	tggaaaagca		890

<210> 2
 <211> 1427
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

accggcgtat	tcccgcctg	cttttcgccc	gccgttccgt	ggcgggaact	gaggcgactg	60
tggggacatc	agtgatcgta	agtctcctgg	gcccgttatt	ctcagattag	gtgacggagc	120
taagacttcg	agaccatctc	gtcctttttg	tatcgcgga	acctgaggaa	cgagccggcg	180
gcggtgacct	gcacgagaag	ccaggctaac	tgggtgaagt	acctgcaag	catttcttaa	240
aggtacatcc	atcagtacta	aacccccgct	gaccaaggat	cgaggagtag	ctgccagtgc	300
gggaagtgtg	ggagagaaca	agaaagccaa	acccgttccc	tgggtggaaa	aatatcgccc	360
aaaaatgtgtg	gatgaagttg	ctttccagga	agaagtgggt	gcagtgtctga	aaaaatcttt	420
agaaggagca	gatcttctta	atctcttggt	ttacggacca	cctggaactg	gaaaaacatc	480
caactatttg	gcagcagcta	gagaactctt	tgggectgaa	cttttccgat	taagagttct	540
tgagttaaat	gcatctgatg	aacgtggaat	acaagttagt	cgagagaaag	tgaaaaattt	600
tgctcaatta	actgtgtcag	gaagtcgctc	agatgggaag	ccgtgtccgc	cttttaagat	660
tgtgattctg	gatgaagcag	attctatgac	ctcagctgct	caggcagctt	taagacgtac	720
catggagaag	gagtcgaaaa	ccacccgatt	ctgtcttata	tgtaactatg	tcagtcgaat	780
aattgaacct	ctgacctcta	gatgttcaaa	attccgcttc	aagcctctgt	cagataaaat	840
tcaacagcag	cgattactag	acattgccaa	gaaggaaaat	gtcaaaatta	gtgatgagg	900
aatagcttat	cttgtaaaag	tgtcagaagg	agacttaaga	aaagccatta	catttcttca	960
aagcgtact	cgattaacag	gtggaaagga	gatcacagag	aaagtgatta	cagacattgc	1020
cggggtaata	ccagctgaga	aaattgatgg	agtatttgc	gcctgtcaga	gtggctcttt	1080
tgacaaacta	gaagctgtgg	tcaaggattt	aatagatgag	ggtcatgcag	caactcagct	1140
cgatcaatcaa	ctccatgatg	tggttgtaga	aaataactta	tctgataaac	agaagtctat	1200
tatcacagaa	aaacttgccg	aagttgacaa	atgcctagca	gatgggtgctg	atgaacattt	1260
gcaactcatc	agcctttgtg	caactgtgat	gcagcagtta	tctcagaatt	gttaacgtga	1320
atatatctgg	atggggggtt	ttgtaaataa	tgaagttgta	ataaaaaata	aatgaccaa	1380
agcaccttta	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaa		1427

<210> 3

<211>	2120							
<212>	ДНК							
<213>	Homo sapiens							
<400>	3							
ggagggcaga	gagaaccgca	acacctggtg	ccgggtcggg	tcgtttccgg	ggctttcagt			60
ggccggaagt	cgcggcgcct	gtactgactc	taggaagggc	tggagtgtgt	ttgaatgggc			120
gcccgtaaga	gaggtgggca	agtagctgtt	acagacggcc	acgcegcctt	ttaggcggtc			180
aagtgggggc	gagcagacgt	tcgccccctt	gcagtcggcc	gggtcactac	ccaagagcct			240
ttggaggcgg	aagcatggaa	cggtctgcaa	acgttcccga	gcgggcctct	gcggctctgg			300
cgggcgtttc	gaacttgggc	gccgggcaca	cgcccagtc	cgagagcgct	gagggttccc			360
ttagcgtcgc	cctcaccctg	gccaaccctg	ggggcgccag	agtcctggcc	ctttaaaccg			420
cgcgctgcc	tcggcgtctt	cgtttcgcgc	gcccgcctgc	ggcgccggcg	gagcgaacat			480
ggaccocgct	gcgcgggtgg	tgccggcgct	gtggcctggt	gggtgcgcct	tggcctggag			540
gctgggaggc	cgccccccag	cgctgctacc	cacgcagagc	cgggctggct	tcgcgggggc			600
ggcgggcggc	ccgagccccg	tggtgcagc	tcgtaagggg	agcccgcggc	tgctgggagc			660
tgcgccgctg	gcocctggggg	gagccctggg	gctgtaccac	acggcgcggt	ggcactgctg			720
cgcccaggac	ctccacgcag	agcgcctcag	cgccagctc	tcctctcca	gccgcctgca			780
gctgaccctg	taccagtaca	agacgtgtcc	cttctgcagc	aaggtccgag	ccttccctga			840
cttccatgcc	ctgccctacc	aggtggtgga	ggtgaaccct	gtgcgcaggg	ctgagatcaa			900
gttctcctcc	tacagaaagg	tgcccatect	ggtggcccag	gaaggagaaa	gctcgcaaca			960
actaaatgac	tcctctgtca	tcacagcgc	cctcaagacc	tacctggtgt	cggggcagcc			1020
cctggaagag	atcatcacct	actaccagc	catgaaggct	gtgaacgagc	agggcaagga			1080
ggtgaccgag	ttcggcaata	agtactggct	catgctcaac	gagaaggagg	cccagcaagt			1140
gtatggtggg	aaggaggcca	ggacggagga	gatgaagtgg	cggcagtggt	cggacgactg			1200
gctggtgcac	ctgatctccc	ccaatgtgta	ccgcacgccc	accgaggctc	tggcgtcctt			1260
tgactacatt	gtccgcgagg	gcaagttcgg	agccgtggag	ggtgcccgtg	ccaagtacat			1320
gggtgcagcg	gccatgtacc	tcacagcaa	gcgactcaag	agcaggcacc	gctccaggga			1380
caacgtgcgc	gaggacctct	atgaggctgc	tgacaagtgg	gtggctgctg	tgggcaagga			1440
ccggcccttc	atggggggcc	agaagccgaa	tctcgtgat	ttggcggtgt	atggcgtgct			1500
gcgtgtgatg	gaggggctgg	atgcattcga	tgacctgatg	cagcacacgc	acatccagcc			1560
ctggtagctg	cggttgagga	gggcatcac	cgaggcctcc	ccagcgcact	gaatgtcccc			1620
gcgcagagca	gagggaaagg	agcggaaagc	gccagctgcc	agggcctggg	gccactgggc			1680
cagcgcctgg	cgatactggt	tgggggcagg	atcattctgc	cccttgtcca	cgcccccca			1740
ccagccctct	cgcttctaac	acagggcacc	tgctggggct	cagggatggt	agggacgagt			1800
tcagccctg	ccactgccct	ggggcgaccc	ctccctgtcc	ctgcctccct	gctctgccgc			1860
ccctcttct	ggaccctcag	tggtgtccc	atggctacat	cctgtgggtg	ggggccctcg			1920
acaggacagc	aggacggttt	gttttcagtg	gaatcccac	cctgggttcc	cctgggtccc			1980
actcttccca	agcctcccgg	gactgggaca	tgtttgaat	aaaggaaagg	tttgtggcgc			2040
ctgtcatggc	aggcatctca	tggaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa			2100
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa							2120

<210>	4							
<211>	1766							
<212>	ДНК							
<213>	Homo sapiens							
<400>	4							
accgatggc	tattcgagct	ctcgatctcg	gagactggag	cgggccattc	agaggcggcg			60
ggccggggccc	ggcggacgct	tgttgtttgc	cgccgggggg	agggcgagggt	cgctcgctcg			120
ctcgctcggc	tcgctgactc	gccggagcgc	tctgtggcgg	tcggcgccag	gtcggctcgcg			180
agagcgggct	ctgtggaagg	gggcgaggct	atgtcgcggg	ggcagcccgg	atgggcccgg			240
agggccggga	gtaacgggac	gtcgcggcgg	agcttcttcc	cccggataca	gtgcggcccg			300
agcggaggcc	gcggcgccgc	cctccgatct	tgaagagccc	gcgctgcgcg	gagcccggcc			360
ccgcttgcgc	accggcaccg	acgcggagcg	accagccca	gccagaccgg	gcccggcgcg			420
gcctgatcta	accagccag	gcaggcaata	ctagcccctc	tggagcacgg	agctccttcc			480
ccaagacat	gaagctattg	gagaactcga	gctttgaagc	catcaactca	cagctgactg			540
tggagaccgg	agatgccac	atcattggca	ggattgagag	ctactcatgt	aagatggcag			600
gagacgacaa	acacatgttc	aagcagttct	gccaggaggg	ccagcccac	gtgctggagg			660
cactttctcc	accccagact	tcaggactga	gccccagcag	actcagcaaa	agccaaggcg			720
gtgaggaggga	gggccccctc	agtgacaagt	gcagccgcaa	gacctcttc	tacctgattg			780
ccacgctcaa	tgagtccttc	aggcctgact	atgacttcag	cacagcccgc	agccatgagt			840
tcagccggga	gcccagcctt	agctgggtgg	tgaatgcagt	caactgcagt	ctgttctcag			900
ctgtgcggga	ggaactcaag	gatctgaaac	cacagctgtg	gaacgcgggtg	gacgaggaga			960
tctgcctggc	tgaaatgtgac	atctacagct	ataaccaga	cttgactca	gatcccttcg			1020
gggaggatgg	tagcctctgg	tccttcaact	acttcttcta	caacaagcgg	ctcaagcga			1080

tcgtcttctt	tagctgccgt	tccatcagtg	gctccaccta	cacaccctca	gaggcaggca	1140
acgagctgga	catggagctg	ggggaggagg	aggtggagga	agaaagcaga	agcaggggca	1200
gtggggccga	ggagaccagc	accatggagg	aggacagggg	cccagtgatc	tgtatttgat	1260
gaggaggagc	cgaggcccca	gcttcatcca	gcttcaacca	atgcctggac	ctgtccacct	1320
gagaggcccc	tggggcctcc	ccagctgctg	gccagaccct	ggcgctgcca	cagtctctggc	1380
actgccccaa	gccatacctg	cctagccctt	tggctccatc	ctgtggatgc	ccactcacc	1440
ctcagactcc	tgctgoccat	gctgtggcgg	gacttgctag	cagggggcct	ggtggggagga	1500
gcgactgccc	tgccccaaatg	aactgccaca	gcagggacag	ctggaccgca	gagtttattt	1560
ttgtatttct	actgggcctg	cacactccag	cccaaagggt	ctgtggccgg	aggccccacg	1620
agcaggcccc	agcagtcacc	ggctctggtc	ttgggcgggc	cccggtgccc	acctgtaccc	1680
ccacctcgcc	catttgggccg	cgtgcactga	gtgtcacttt	gctgcagctc	gtttctttcc	1740
aataaaagtt	tctgtgactt	agaaaa				1766

<210> 5
 <211> 1584
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

gaacatgacg	gcgccctggg	tggccctcgc	cctcctctgg	ggatcgctgt	ggccccgctc	60
tgggcgtggg	gaggtcgaga	cacgggagtg	catctactac	aacgccaaact	gggagctgga	120
gcgcaccaac	cagagcggcc	tggagcgtg	cgaaggcgag	caggacaagc	ggctgcaactg	180
ctacgcctcc	tgggccaaca	gctctggcac	catcgagctc	gtgaagaagg	gctgctggct	240
agatgacttc	aactgctacg	ataggcagga	gtgtgtggcc	actgaggaga	acccccagg	300
gtactttctg	tgctgtgaag	gcaacttctg	caacgagcgc	ttcactcatt	tgccagaggc	360
tgggggcccc	gaagtcaactg	acgagccacc	cccagacagc	cccaccctgc	tcacgggtgt	420
ggcctactca	ctgctgcccc	tggggggcct	ttccctcatc	gtcctgctgg	ccttttgat	480
gtaccggcat	cgcaagcccc	cctacgggtca	tgtggacatc	catgaggacc	ctgggcctcc	540
accaccatcc	cctctggtgg	gocctgaagcc	actgcagctg	ctggagatca	aggctcgggg	600
gcgctttggc	tgtgtctgga	aggcccagct	catgaatgac	tttgtagctg	tcaagatctt	660
cccactccag	gacaagcagt	cgtggcagag	tgaacgggag	atcttcagca	cacctggcat	720
gaagcacgag	aacctgctac	agttcattgc	tgccgagaag	cgaggctcca	acctcgaagt	780
agagctgtgg	ctcatcacgg	ccttccatga	caagggtccc	ctcacggatt	acctcaaggg	840
gaacatcatc	acatggaacg	aactgtgtca	tgtagcagag	acgatgtcac	gaggcctctc	900
atacctgcat	gaggatgtgc	cctgggtgccg	tggcgagggc	cacaagccgt	ctattgcccc	960
cagggacttt	aaaagtaaga	atgtattgct	gaagagcgac	ctcacagccg	tgtgtgctga	1020
ctttggcttg	gctgttcgat	ttgagccagg	gaaacctcca	ggggacaccc	acggacagg	1080
aggcacgaga	cggtacatgg	ctcctgaggt	gctcgaggga	gccatcaact	tccagagaga	1140
tgcttctctg	cgcatcgaca	tgtatgccat	ggggttggtg	ctgtgggagc	ttgtgtctcg	1200
ctgcaaggct	gcagacggac	ccgtggatga	gtacatgctg	ccctttgagg	aagagattgg	1260
ccagcaccct	tcgttgagg	agctgcagga	ggtggtggtg	cacaagaaga	tgaggccac	1320
cattaaagat	catgggtga	aacaccggg	cctggcccag	ctttgtgtga	ccatcgagga	1380
gtgctgggac	catgatgcag	aggctcgtct	gtccgcgggc	tgtgtggagg	agcgggtgtc	1440
cctgattcgg	aggtegggtca	acggcaactac	ctcggactgt	ctcgtttccc	tggtgacctc	1500
tgtcaccaat	gtggacctgc	cccctaaaga	gtcaagcatc	taagcccagg	acatgagtg	1560
ctctccagac	tcagtggatc	tga				1584

<210> 6
 <211> 1770
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

ccacgcgtcc	gcacttccag	ggtcggggag	acggaactgc	ggcgaccatg	tatttctggt	60
ttatcaaacc	gctaacaccc	agtctaaggg	caggttctgt	cccattgtta	tcactatcga	120
agcagccgat	ggaggagggg	aggtctgagc	agagggcggg	gtgcaggcgg	aatggccctc	180
gtgccctatg	aggagaccac	ggaatttggg	ttgcagaaat	tccacaagcc	tcttgcaact	240
ttttcctttg	caaaccacac	gatccagatc	cggcaggact	ggagacacct	gggagtcgca	300
gcggtgggtt	gggatgcggc	catcgttctt	tccacatacc	tggagatggg	agctgtggag	360
ctcagggggc	gctctgccgt	ggagctgggt	gctggcacgg	ggctggtggg	catagtggct	420
gccctgctgg	gtgctcatgt	gactatcacg	gatcgaaaag	tagcattaga	atctctaaa	480
tcaaacgttc	aagccaactt	acctcctcat	atccaaacta	aaactgtgtg	taaggagctg	540
acttggggac	aaaatttggg	gagttttct	cctggagaat	ttgacctgat	acttgggtgt	600
gatatcatat	atctagaaga	aacattcaca	gatcttcttc	aaacactgga	acatctctgt	660
agcaatcact	ctgtgattct	tttagcatgc	cgaattcgtc	atgaacggga	taacaacttc	720
ttagcaatgc	tggagaggca	atctattgtg	agaaagggtc	actacgatcc	tgaaaaagat	780

gtacatat	ttt	acgaagcaca	gaagagaaac	cagaaggagg	acttataatt	ggctataatt	840
tataagaatg	ttgtcattga	gtgtgtcact	taaggtctta	gactgcaaat	ctaaccatat		900
ttaatgaaat	gtcttactgt	acaaaaagtc	taagccaaag	gttctcaggg	gagaaagcac		960
atgtgcagtt	ttaaaacaaa	gcagtgcttt	gtcccattgc	tgtgattttt	agtcagactt		1020
tactcagctc	gaaatgcaat	taacattaaa	ggattaagtg	tgagatttcg	atztatgcta		1080
tttgtgtatc	ccatactcct	cccttttaat	aaacagtttc	cactgatgat	atgaagggcc		1140
ggtataaaga	agtcttttaa	tgagtaagct	ttcttggtaa	gattaaatct	tacaaattat		1200
ttttaaaacc	ttgtgatata	tacaatgttt	agctgagttt	tctaattttc	tggatgtaaa		1260
acaaaaggtt	taacctatac	attccttgag	ctgttagtgc	tatttaaatc	ttttgccctg		1320
tttaggtcct	aaacactttt	agttgagtag	gatatgagct	tttttgggtc	tcatatcatg		1380
ctttttgcct	taatttcagg	tatatatata	tataagtaaa	ggaattaagt	aaaaataaaa		1440
tttcagttac	tttttaaaag	cacctgaaat	ctggccggat	gcggtggctc	atgcctgtaa		1500
tcccaccact	ttgggaggcc	gaggcgggca	gatcacctga	ggtcgggagt	tcaagaccag		1560
cctggccaac	atggtgaaac	cccactctcta	ctaaaaatac	aaaaattagc	cgggcgtggt		1620
gtcgggccc	tgtagtccca	gctgctcggg	aggctgaggc	aggggaatcg	cttgaacctg		1680
ggaggcggag	gttgcagtg	gctgagattg	cgccattgta	ctccagcctg	ggggacagga		1740
gcgagactcc	atctcaaaaa	aaaaaaaaaa					1770

<210> 7
 <211> 1257
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

gtccccgacgc	ctcccccccc	cgcagttcct	tggagagctt	ggagccgcgc	gccggagggga	60
ataggaaagc	ttggttaca	cccgggacac	ccggagcttc	aggatggttc	gtactaagac	120
atggaccctg	aagaagcact	ttgttggtca	tcctactaat	agtgactttg	agttgaagac	180
atctgagctc	ccacccttaa	aaaatggaga	ggtcctgctt	gaagctttgt	tcctcaccgt	240
ggatccctac	atgagagtgg	cagccaaaag	attgaaggaa	ggtgatacaa	tgatggggca	300
gcaagtggcc	aaagtgtg	aaagtaaaaa	tgtagcccta	ccaaaaggaa	ctattgtact	360
ggctttctcca	ggctggacaa	cgcaactccat	ttctgatggg	aaagatctgg	aaaagctgct	420
gcagagtgg	ccagacacaa	taccactgtc	tttggctctg	gggacagttg	gcatgccagg	480
cctgactgcc	tactttggcc	tacttgaat	ctgtggtgtg	aaggggtggag	aaacagtgat	540
ggttaatgca	gcagctggag	ctgtgggctc	agtcgtggg	cagattgcaa	agctcaagg	600
ctgcaaagtt	gttggagcag	tagggctctga	tgaaaaggtt	gcctaccttc	aaaagcttg	660
atgtgatgtc	gtctttaa	acaagacggt	agagtccttg	gaagaaacct	tgaagaaagc	720
gtctcctgat	ggttatgatt	gttattttga	taatgtaggt	ggagagtttt	caaacactgt	780
tatcgccag	atgaagaaat	ttggaaggat	tgccatatgt	ggagccatct	ctacatataa	840
cagaaccggc	ccacttcccc	caggcccacc	cccagagat	gttatctatc	aggagcttcg	900
catggaagct	tttgtcgtct	accgctggca	aggagatgcc	cgccaaaaag	ctctgaagga	960
cttgctgaaa	ttggctcttag	agggtaaaa	ccagtaaaag	gaatatatca	ttgaaggatt	1020
tgaaaaacatg	ccagccgcat	ttatgggaat	gctgaaagga	gataatttgg	ggaagacaat	1080
agtgaagca	tgaaaaagag	gacacatgga	atctggaggc	catttagatg	attagttaat	1140
ttgtttttca	ccatttagca	aaaatgtata	ctaccttaaa	tgtcttaaga	aatagtactc	1200
ataatgagtt	tgagctactt	aataaaatac	atthaagtgg	taaaaaaaaa	aaaaaaa	1257

<210> 8
 <211> 910
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

gtggcttgccg	gctcgggtgg	ctgagcgcgc	ggggaaatgg	ccacgggggac	agaccaggtg	60
gtgggactcg	gcctcgtcgc	cgttagcctg	atcatcttca	cctactacac	cgctgggtg	120
attctcttgc	cattcatcga	cagtcagcat	gtcatccaca	agtatttcct	gccccgagcc	180
tatgctgtcg	ccatcccact	ggctgcaggc	ctcctgctgc	tcctgtttgt	gggactgttc	240
atctcctatg	tgatgctgaa	gaccaagaga	gtgaccaaga	aggctcagtg	aaggtcccgc	300
agggatgagg	ctgccagccc	cttctctgct	tcacctccag	cacagggacc	aagtggggga	360
gctgcagaaa	cctgtccagg	cacagtggct	cctcaagcct	gcctgtcctg	cagagtcccc	420
atggcatgga	gcttacacct	gactgactgg	agccccctcc	ccgactccca	cttccagaag	480
ctaggagggg	gggataacctg	gaagactccg	gtcacctcct	tcttgctcag	ggcctaaaag	540
atgctggctc	tcccacctc	actctcagac	tccttcccac	cttttcccct	gggttctgcc	600
gcttgctc	acttcccctc	ctgtcacatg	ctgacgttgg	acttagcagg	ttctaaggcc	660
acatgtgtga	ctctctgac	ttctcttctc	ccaccaaggc	agctttcctt	accctgacac	720
agccccagac	cccacaaagc	cttctggacc	tggaaagcct	ggggaaggac	tgacagacct	780
caggaccagc	cctggggctc	agggcagcca	ccccggggccg	ctgaccgact	gacctctcct	840

cacggaggcc cagcccaaaa gccccagggc tggcccgttt gggacagctg accaataaac 900
actgatggtg 910

<210> 9
<211> 1386
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 9

ggaagccggg	attcgccctc	cggggagcga	ttggtcctcg	ggaggggcyg	ggaggtggac	60
gcgggtaccg	gcggtcgtcg	ggtcggcagc	ctttgggtcag	ttggcagcgg	caagcgcgct	120
gcggttccgg	tggcgccatg	tcgttctgca	gcttcttcgg	gggcgagggt	ttccagaatc	180
actttgaacc	tggcgtttac	gtgtgtgcca	agtgtggcta	tgagctgttc	tccagccgct	240
cgaagtatgc	acaactcgtct	ccatggccgg	cgttcaccga	gaccattcac	gccgacagcg	300
tggccaagcg	tccggagcac	aatagatctg	aagccttgaa	ggtgtcctgt	ggcaagtgtg	360
gcaatgggtt	gggocacgag	ttcctgaacg	acggcccaaa	gccggggcag	tcccgattct	420
gaatattcag	cagctcgctg	aagtttgtcc	ctaaaggcaa	agaaacttct	gcctcccagg	480
gtcactaggc	gggcagccca	caccaccccc	agacggccac	cacactgagg	ccacacgttg	540
gccattccac	cttggagttg	gaaccctggg	cgtcgagaca	ggaaggcagg	gcgcagtggt	600
tgaaacatca	ggacactccc	aaggccccgg	ctctgaacaa	gacctttcgg	tttcttgtaa	660
aagagactca	tttgcctgatg	gttcctgctc	tctgctggga	caggcctggg	ctgtgcagcc	720
acactgtcgg	ctgacttagc	ccccctgctc	ctctagggtc	ctccaggagg	tgagccctgg	780
gtgcagctgg	tctctgaatg	acgttacacc	ctcaccttct	tttcttgccc	ctgtctctgg	840
actctcccct	gtgaggccca	attccaagac	agactctcgt	cctcaccgaa	gcttaggccc	900
acatctccca	ggctgcttag	gagacagaat	ggaaacggag	gccgccccctg	ccagccgccc	960
tggccctggt	cactgcatga	tccgctctgg	tcaaaccctt	ccaggccagc	cagagtgggg	1020
atggctctgtg	acctgctggg	aaggcaggct	gatggggcac	acccttgccc	tctcgtccac	1080
gaggggagaa	acctaaaccc	tgtttcacaa	tctgtgcgga	agtagcttgc	ctcacttctg	1140
cttaggaaag	cggtctgttc	tccataactc	taaccagcac	agggctgagg	cctgcagtgc	1200
acacctgcag	ggaggccctt	cccaagggtg	ggtgactgtg	ccttactgta	catgctcgga	1260
ggcctggcca	tataggaggg	tgggtgatgc	tgaaatcacc	ccccatctta	agtaattact	1320
ttctggagta	atcaggtgga	aatccataga	caaatgaaac	attcagaaaa	aaaaaaaaaa	1380
aaaaaa						1386

<210> 10
<211> 949
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 10

gcgctccggg	cctggaatcc	ctacgcgtcc	ctttgggttt	agcacgatga	gctcaatcgg	60
cactgggtat	gacctgtcag	cctctacatt	ctctcctgac	ggaagagttt	ttcaagttga	120
atatgctatg	aaggctgtgg	aaaatagtag	tacagctatt	ggaatcagat	gcaaagatgg	180
tgttgtcttt	gggtagaaaa	aattagtcct	ttctaaactt	tatgaagaag	gttccaacaa	240
aagacttttt	aatgttgatc	ggcagtttgg	aatggcagta	gcaggtttgt	tggcagatgc	300
tcgttcttta	gcagacatag	caagagaaga	agcttccaac	ttcagatcta	actttggcta	360
caacattcca	ctaaaacatc	ttgcagacag	agtggccatg	tatgtgcatg	catatacaact	420
ctacagtgtc	gtagacctt	ttggctgcag	ttctatgtta	gggtcttaca	gtgtgaatga	480
cggtgcgcaa	ctctacatga	ttgaccatc	aggtgtttca	tacggttatt	ggggctgtgc	540
catcggaaca	gccaggcaag	ctgcaaagac	ggaaatagag	aagcttcaga	tgaaagaaat	600
gacctgccgt	gatatcgta	aagaagttgc	aaaaataatt	tacatagtac	atgacgaagt	660
taaggataaa	gcttttgaac	tagaactcag	ctgggttggg	gaattaacta	atggaagaca	720
tgaattgtt	ccaaaagata	taagagaaga	agcagagaaa	tatgctaagg	aatctctgaa	780
ggaagaagat	gaatcagatg	atgataatat	gtaacattta	ctccagcatc	tattgtattt	840
taaatttcta	ctccagtcca	atgtaactat	ttagccctgg	attatacata	ctgtccaatt	900
ttcattaaat	ttttgtctta	taactataaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa		949

<210> 11
<211> 1623
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 11

gctggtttct	gggggtcgtg	gccttgctcc	cgctgtgcgg	gaaaagaatc	caggcccttc	60
cacgcgcgtg	tgggtgcggg	ggccccgaag	tgctcgtggg	tccccgetag	gtctccgctg	120
gggcaggaac	cggaatcatg	ggtgggacca	ccagcaccgg	ccgggtcacc	ttcgaggcgg	180
accgagaatga	gaacatcacc	gtgggtgaagg	gcatccggct	ttcggaataa	gtgattgatc	240

gaatgaagga	atcctctcca	tctggttcca	agtctcagcg	gtattctggt	gcttatgggtg	300
cctcagtttc	tgatgaagaa	ttgaaaagaa	gagtagctga	ggagctggca	ttggagcaag	360
ccaagaaaga	atccgaagat	cagaaacgac	taaagcaagc	caaagagctg	gaccgagaga	420
gggctgctgc	caatgagcag	ttaaccagag	ccatccttcg	ggagaggata	tgtagcgagg	480
aggaacgcgc	taaggcaaaag	cacctggcta	ggcagctgga	agagaaagac	cgagtgcata	540
agaagcagga	tgcattctac	aaagaacagc	tggctagact	ggaggagagg	agctcagagt	600
tctacagagt	caccactgaa	caatatcaga	aagctgctga	agaggtggaa	gcaaagtca	660
agcgatatga	gtctcatcca	gtctgtgctg	atctgcaggc	caaaattctt	cagtgttacc	720
gtgagaacac	ccaccagacc	ctcaaatgct	ccgctctggc	caccagtat	atgactgtg	780
tcaatcatgc	caaacagagc	atgcttgaga	agggaggata	aaaactttca	gaatgagcaa	840
aacaccatca	acgttaattc	cagagatgga	acattttttt	tcttagtgag	aaaacaacc	900
atgtgaagag	aagaccacta	atgagaagac	cactaaagag	agacatcaag	aatggattca	960
gcagaatcat	ttcacgtttt	gaacagcagc	agtttgaagg	gccaaagcct	tgatcagggg	1020
tcagtcatta	aaggacactc	ttgagtatta	gtaaaccctc	ttatgatgat	taaaagagaa	1080
gggcagccct	ctccaccttt	tggtactttc	tattcaactt	gcaactgacca	taaaatgttt	1140
ctcttctgaa	caagcccat	catttggtga	acctccacc	taacaaagta	ggatgggggt	1200
gggggctaaa	ttaattggag	tggggcgagg	agagagccag	aaaacataga	tccgagggca	1260
gcagtgctgg	gtggagagag	ccagaaaaca	gatctggagg	cagcagtgct	ggatgggaatt	1320
ttcattgata	cttattatgg	gttttgcctt	tctttctctc	tttgattatg	taagagctat	1380
cctcttctac	tggataaatg	tttatgatta	caagtgggat	aaggtatttt	tatcaatatg	1440
aaggcaacct	tggctgataa	aacctctata	gtgaatactc	acatctttac	ttcactcact	1500
atcaataata	aatatatttt	ctgacaaaaga	ctggcaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1560
aaa						1620
						1623

<210> 12
 <211> 579
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

acgaggggaa	agggcgaggg	gtttgaaaca	tggcgagcga	cgtagaccag	caacaaacta	60
ccaacactgt	agaggagccc	ctggatctta	tcaggctcag	cctagatgag	cgaatttatg	120
tgaaaatgag	aatgaccgga	gagcttcgag	gcagattaca	tgcttatgat	caacatttaa	180
atatgatctt	gggagatgtg	gaagaaactg	tgactactat	agaaattgat	gaagaaacat	240
atgaagagat	atataaatca	acgaaacgga	atattccaat	gctctttgtc	cggggagatg	300
gcgttgcctc	ggttgcccct	ccactgagag	ttggctgaaa	caaagaattt	gtcctgtatg	360
gaaaacggga	gactttgtac	agtggcctct	ctaaaagtac	aaaacattca	taagagaaac	420
ctgcatacat	tttgatatta	agaaataatt	ccggggattc	ttccactcct	gaaatgagtt	480
gatttgacga	taactcacia	cttcttaagc	taaatgggat	tttcattttt	ctcaagctct	540
ccaataaata	tgaccaccaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa			579

<210> 13
 <211> 4493
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

atcgtctgcc	gctttggtga	cttctgacag	ctctctccat	ggaaggaggc	ggcggccgcg	60
atgagccttc	agcctgcccg	gcaggggacg	tgaacatgga	tgaccctaag	aaggaaagaca	120
ttcttctttt	ggccgatgaa	aaatttgact	tcgatctttc	attgtcttct	tcgagtgcaa	180
atgaagatga	tgaagtcttc	ttcggaccct	ttggacataa	agaaagatgt	attgctgcca	240
gcttggaaat	aaataatccg	gttcccgaac	agcctccggt	gcccacatct	gagagtccct	300
ttgcctggag	ccctctggcc	ggggagaagt	tcgtggaggt	gtacaaagaa	gtcactttac	360
tggttttaca	cattgagagc	agcagccgga	accaggcagc	ccaagctgcc	aagcctgaag	420
accctcggag	ccagggcgtg	gaaagattca	tacaggagtc	aaaattaaaa	ataaacctct	480
ttgagaaaga	aaaggaaatg	aagaaaagcc	ccacgtctct	taaaagggag	acatactacc	540
tgctcagacag	ccccttgctg	gggccccctg	tgggtgagcc	tcggctcttg	gctcctccc	600
cggccctgcc	cagctctggt	gcccaggccc	gcctcaccog	ggcgccgggg	cctccgcact	660
ctgctcatgc	ttgcccagg	gaatcatgca	ctgctcatgc	tgcaagtcag	gcagcgactc	720
agaggaagcc	cgggaccaa	ttgctgctgc	ctcgagcggc	ctctgttaga	ggaagaagca	780
tcccctgggc	tgcggagaag	cccaagaaag	agattccagc	tagtccttcc	aggacaaaa	840
tcccagctga	gaaggaaatc	caccgggatg	ttctcctga	caaacctgcc	cggggtctg	900
tcaatgtgcc	ggccgcccga	agccacttgg	gccagggcaa	gcgggcgatc	cctgttccaa	960
acaagttggg	gctgaagaag	accctgttaa	aagcaccggg	ctctaccagc	aatctcgcaa	1020
ggaagtctct	ctcggggcct	gtttggagcg	gggcatccag	tgcgtgcaca	tccccagcag	1080

tgggcaaagc	taaatacaagt	gaatttgcaa	gtatttctgc	aaatagctcc	cggcctctgt	1140
caaacatcag	caagtcaggc	agaatgggac	cogccatgct	goggccagct	ctgcctgcag	1200
gccctgtggg	ggcatcctcc	tggcaggcca	agcgggtcga	tgtttctgag	ctggcagcgg	1260
agcagctcac	ggcaccctcc	tcagcatccc	ccaccctaac	ccagactccg	gaaggtggcg	1320
gccagtggct	gaactccagt	tgcgcttggt	cagaatcttc	tcaattgaat	aagactagaa	1380
gtatcagacg	gcgagattcc	tgtctaaatt	ccaagacaaa	ggttatgcct	actcctacaa	1440
atcaatttaa	aattcctaag	ttttctattg	gtgactcccc	ggacagctca	acaccaaaagc	1500
tttcgcgggc	acagcggccg	cagtcgtgca	cgtcagttgg	cacaaagcct	gctgagcgcg	1560
ccccggttag	acgctcatct	ggccagcac	ggccagcct	gctgagcgcg	cgccgctgtg	1620
cagccttgcc	cacaccgcgc	agccggcgct	gctctggcct	tccaccgatg	acccccaaaa	1680
cgatgccccag	ggccgtgggc	tctccccctg	gtgtgccagc	tccgagacgt	tccctctgagc	1740
cccgcgaagaa	ctctgcaatg	agaactgaac	caacaaggga	gagcaacaga	aagacagatt	1800
ccaggetggt	ggatgtgtcc	cctgacaggg	gttctcctcc	ttcccgtgtg	cctcagggcac	1860
ttaacttttc	tccagaggaa	agcgattcta	ctttctccaa	aagtactgcc	acagaagtag	1920
ctcgggagga	agccaagccg	ggtggagatg	cagcccctag	tgaggctctt	cttgtagata	1980
tcaaactgga	accactcgcg	gtcactccag	atgctgcaag	ccagcccctc	attgaccttc	2040
ctctcatcga	cttctgcatg	accccagaag	cacacgtggc	tgtaggatct	gaaagcaggc	2100
ctctgatcga	cctcatgaca	aacctccag	acatgaataa	aaatgtggcc	aaaccttcac	2160
cgggtggtggg	acagctcata	gacctgagct	ccctctgat	ccagctgagc	cctgagggctg	2220
acaaggagaa	cgtggattcc	ccactcctca	agttctaagc	cgaaccaaat	cctttgcctt	2280
gaaagaacag	ccctaaagtg	gttttcaacc	ctcagaaaca	agcttttaggc	tggtcgcagt	2340
ggcttacct	tgtaacccta	gaacttggga	ggctgaggtg	ggcggattac	ttgagcccag	2400
gagttcggga	ccagcctggg	aaatatagtg	aaactcctgt	ccctacaaaa	aatacaaaaa	2460
ttagccgggt	gtggtagtg	atgcctgtag	tcccagctac	ttgggaggct	gaagtgggag	2520
gatggcctga	gctcaaggag	atgcaggctg	cagtgggctg	tgattgtgcc	actgcactcc	2580
agcctgggca	ccaatgtgag	aacctgtctt	ggaaaaaaaa	aaaaagaaac	atgttttagt	2640
agaagtttta	tttgaaaaag	aaaaataagc	ataaatatat	tcccagtgct	ggagaggggtg	2700
ggctgagga	ctggggccag	cacggaccac	ccaaggcctc	tgcttcccgc	cgccaccctc	2760
ctcgtgcca	ttctctgggc	tggaaatgta	agcctcagtc	actctaaatg	aagaattttc	2820
ttttgaaatg	tttgatgta	aaatgaag	tggctatttt	taaagttaag	ttgtataaaa	2880
tagttagata	ttctagattt	acattaaatt	gtaaaaaaaa	tggacttatt	gaagcatatc	2940
ttgattttta	agcttatctt	gattttcaaa	catgcatagc	tattttttatc	actctaatca	3000
gtaaggctac	tatctagact	cgaatgcttt	catacaagtg	attttcaaaa	attagtcaat	3060
aaaaattgat	gtcagtgca	gcccaggccc	gccccagat	acactagttt	ctaggtctgg	3120
ggccagccta	gtaattgta	ctagggcacac	aggtgatgct	gactcgatgg	cctgagacac	3180
acccttgag	aagaagctgc	tctggggaga	cgagggtatg	agtggaaaga	ggatgggcga	3240
ggaggccggg	cttacctgga	cactaagggtg	atggacggcg	tctgctgggc	aggcctcggg	3300
gaggaccctt	cagctttgct	ctcagcaggg	gcccgacaag	ctcagtgggc	agtggcagga	3360
actgagtgcc	actggaaagc	ccattccctt	tatttagaaa	acgagctcca	ggaagccgct	3420
actttgtgtc	catttctctt	gaggaaactt	accaccttgg	ttgagcggct	tcatggcaga	3480
cagcagcgag	ccagcggccg	gactctgtat	ttcggacccc	actccagtgc	tccctgggtc	3540
ataccaggat	ctgcctctgt	ccacaaagat	gagggaaaaa	gatgactgtg	ctgtgctctc	3600
tacttctctg	ggttactcgc	tgattctaaa	gctgccaactc	ggaacagcga	gtcctctgcc	3660
gtcagagaca	gggaggggta	gggtggacag	gcgatgccgt	ggaaagacgt	ctcgggtggaa	3720
actgccatgg	tggaaaagtg	gcgcgcttct	cacggctgag	ttgctgcgcc	tcagacagga	3780
agctccccac	aggcagagct	gcttggatgt	gtgagtcatg	aagccagaga	agccccgctc	3840
catgagcagt	gactccccag	gccctgtgac	ctcctcctg	tcttgagct	cctcctggca	3900
ccagtcccca	gggctctcct	gttggtagtt	cctgcttttc	ttcttggaaa	ttcctcgtgg	3960
acctcgagat	ctttacccta	aaatagttct	gttgaatttc	accctggcaa	tgtaaattga	4020
tagcttatct	tcacagatgc	cagacaatgg	acaactcacc	atcagtcctc	tgctcacctg	4080
agacaaatgc	atgtctgatt	gcttctctctg	ccctattggt	tatgtgaaaa	tcagatttca	4140
ctgagccaga	ctaaggcatc	agtgactggt	cctctacctg	cctctcacat	ggagattgtg	4200
tattcagtg	aaggctgac	aaagacccaa	aggaatgcaa	cagtttatct	cttatctacc	4260
tatgacctgc	gagctgcca	ccaccctccag	ttgttgccgc	tttccagaca	gaaccagtg	4320
acatcttaca	cgtattaatt	gatgtcctgt	gtctccctaa	tatgtatcaa	agcaagctgt	4380
gcctcgacca	ccttgggcac	atatacctcag	gacatcatcc	tgaggctgtg	tcactggcat	4440
gtccttaacc	ttggcaaaat	aaactttcta	aattgaaaaa	aaaaaaaaaa	aaa	4493

<210> 14
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

Met Asn Ser Asn Val Glu Asn Leu Pro Pro His Ile Ile Arg Leu Val

1 5 10 15
 Tyr Lys Glu Val Thr Thr Leu Thr Ala Asp Pro Pro Asp Gly Ile Lys
 20 25 30
 Val Phe Pro Asn Glu Glu Asp Leu Thr Asp Leu Gln Val Thr Ile Glu
 35 40 45
 Gly Pro Glu Gly Thr Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Phe Arg Met Lys Leu
 50 55 60
 Leu Leu Gly Lys Asp Phe Pro Ala Ser Pro Pro Lys Gly Tyr Phe Leu
 65 70 75 80
 Thr Lys Ile Phe His Pro Asn Val Gly Ala Asn Gly Glu Ile Cys Val
 85 90 95
 Asn Val Leu Lys Arg Asp Trp Thr Ala Glu Leu Gly Ile Arg His Val
 100 105 110
 Leu Leu Thr Ile Lys Cys Leu Leu Ile His Pro Asn Pro Glu Ser Ala
 115 120 125
 Leu Asn Glu Glu Ala Gly Arg Leu Leu Leu Glu Asn Tyr Glu Glu Tyr
 130 135 140
 Ala Ala Arg Ala Arg Leu Leu Thr Glu Ile His Gly Gly Ala Gly Gly
 145 150 155 160
 Pro Ser Gly Arg Ala Glu Ala Gly Arg Ala Leu Ala Ser Gly Thr Glu
 165 170 175
 Ala Ser Ser Thr Asp Pro Gly Ala Pro Gly Gly Pro Gly Gly Ala Glu
 180 185 190
 Gly Pro Met Ala Lys Lys His Ala Gly Glu Arg Asp Lys Lys Leu Ala
 195 200 205
 Ala Lys Lys Lys Thr Asp Lys Lys Arg Ala Leu Arg Ala Leu Arg Arg
 210 215 220
 Leu
 225

<210> 15
 <211> 363
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

Met Gln Ala Phe Leu Lys Gly Thr Ser Ile Ser Thr Lys Pro Pro Leu
 1 5 10 15
 Thr Lys Asp Arg Gly Val Ala Ala Ser Ala Gly Ser Ser Gly Glu Asn
 20 25 30
 Lys Lys Ala Lys Pro Val Pro Trp Val Glu Lys Tyr Arg Pro Lys Cys
 35 40 45
 Val Asp Glu Val Ala Phe Gln Glu Glu Val Val Ala Val Leu Lys Lys
 50 55 60
 Ser Leu Glu Gly Ala Asp Leu Pro Asn Leu Leu Phe Tyr Gly Pro Pro
 65 70 75 80
 Gly Thr Gly Lys Thr Ser Thr Ile Leu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Phe
 85 90 95
 Gly Pro Glu Leu Phe Arg Leu Arg Val Leu Glu Leu Asn Ala Ser Asp
 100 105 110
 Glu Arg Gly Ile Gln Val Val Arg Glu Lys Val Lys Asn Phe Ala Gln
 115 120 125
 Leu Thr Val Ser Gly Ser Arg Ser Asp Gly Lys Pro Cys Pro Pro Phe
 130 135 140
 Lys Ile Val Ile Leu Asp Glu Ala Asp Ser Met Thr Ser Ala Ala Gln
 145 150 155 160
 Ala Ala Leu Arg Arg Thr Met Glu Lys Glu Ser Lys Thr Thr Arg Phe
 165 170 175
 Cys Leu Ile Cys Asn Tyr Val Ser Arg Ile Ile Glu Pro Leu Thr Ser
 180 185 190
 Arg Cys Ser Lys Phe Arg Phe Lys Pro Leu Ser Asp Lys Ile Gln Gln
 195 200 205
 Gln Arg Leu Leu Asp Ile Ala Lys Lys Glu Asn Val Lys Ile Ser Asp
 210 215 220
 Glu Gly Ile Ala Tyr Leu Val Lys Val Ser Glu Gly Asp Leu Arg Lys

```

225              230              235              240
Ala Ile Thr Phe Leu Gln Ser Ala Thr Arg Leu Thr Gly Gly Lys Glu
                245              250              255
Ile Thr Glu Lys Val Ile Thr Asp Ile Ala Gly Val Ile Pro Ala Glu
                260              265              270
Lys Ile Asp Gly Val Phe Ala Ala Cys Gln Ser Gly Ser Phe Asp Lys
                275              280              285
Leu Glu Ala Val Val Lys Asp Leu Ile Asp Glu Gly His Ala Ala Thr
                290              295              300
Gln Leu Val Asn Gln Leu His Asp Val Val Val Glu Asn Asn Leu Ser
305              310              315              320
Asp Lys Gln Lys Ser Ile Ile Thr Glu Lys Leu Ala Glu Val Asp Lys
                325              330              335
Cys Leu Ala Asp Gly Ala Asp Glu His Leu Gln Leu Ile Ser Leu Cys
                340              345              350
Ala Thr Val Met Gln Gln Leu Ser Gln Asn Cys
                355              360

```

<210> 16

<211> 377

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 16

```

Met Asp Pro Ala Ala Arg Val Val Arg Ala Leu Trp Pro Gly Gly Cys
1              5              10              15
Ala Leu Ala Trp Arg Leu Gly Gly Arg Pro Gln Pro Leu Leu Pro Thr
                20              25              30
Gln Ser Arg Ala Gly Phe Ala Gly Ala Ala Gly Gly Pro Ser Pro Val
                35              40              45
Ala Ala Ala Arg Lys Gly Ser Pro Arg Leu Leu Gly Ala Ala Ala Leu
                50              55              60
Ala Leu Gly Gly Ala Leu Gly Leu Tyr His Thr Ala Arg Trp His Leu
65              70              75              80
Arg Ala Gln Asp Leu His Ala Glu Arg Ser Ala Ala Gln Leu Ser Leu
                85              90              95
Ser Ser Arg Leu Gln Leu Thr Leu Tyr Gln Tyr Lys Thr Cys Pro Phe
                100              105              110
Cys Ser Lys Val Arg Ala Phe Leu Asp Phe His Ala Leu Pro Tyr Gln
                115              120              125
Val Val Glu Val Asn Pro Val Arg Arg Ala Glu Ile Lys Phe Ser Ser
                130              135              140
Tyr Arg Lys Val Pro Ile Leu Val Ala Gln Glu Gly Glu Ser Ser Gln
145              150              155              160
Gln Leu Asn Asp Ser Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Lys Thr Tyr Leu
                165              170              175
Val Ser Gly Gln Pro Leu Glu Glu Ile Ile Thr Tyr Tyr Pro Ala Met
                180              185              190
Lys Ala Val Asn Glu Gln Gly Lys Glu Val Thr Glu Phe Gly Asn Lys
                195              200              205
Tyr Trp Leu Met Leu Asn Glu Lys Glu Ala Gln Gln Val Tyr Gly Gly
                210              215              220
Lys Glu Ala Arg Thr Glu Glu Met Lys Trp Arg Gln Trp Ala Asp Asp
225              230              235              240
Trp Leu Val His Leu Ile Ser Pro Asn Val Tyr Arg Thr Pro Thr Glu
                245              250              255
Ala Leu Ala Ser Phe Asp Tyr Ile Val Arg Glu Gly Lys Phe Gly Ala
                260              265              270
Val Glu Gly Ala Val Ala Lys Tyr Met Gly Ala Ala Ala Met Tyr Leu
                275              280              285
Ile Ser Lys Arg Leu Lys Ser Arg His Arg Leu Gln Asp Asn Val Arg
                290              295              300
Glu Asp Leu Tyr Glu Ala Ala Asp Lys Trp Val Ala Ala Val Gly Lys
305              310              315              320
Asp Arg Pro Phe Met Gly Gly Gln Lys Pro Asn Leu Ala Asp Leu Ala

```

				325					330					335			
Val	Tyr	Gly	Val	Leu	Arg	Val	Met	Glu	Gly	Leu	Asp	Ala	Phe	Asp	Asp		
			340					345					350				
Leu	Met	Gln	His	Thr	His	Ile	Gln	Pro	Trp	Tyr	Leu	Arg	Val	Glu	Arg		
		355					360					365					
Ala	Ile	Thr	Glu	Ala	Ser	Pro	Ala	His									
	370					375											

<210> 17
 <211> 256
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Met	Lys	Leu	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Phe	Glu	Ala	Ile	Asn	Ser	Gln	Leu		
1			5						10					15			
Thr	Val	Glu	Thr	Gly	Asp	Ala	His	Ile	Ile	Gly	Arg	Ile	Glu	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Ser	Cys	Lys	Met	Ala	Gly	Asp	Asp	Lys	His	Met	Phe	Lys	Gln	Phe	Cys		
		35				40						45					
Gln	Glu	Gly	Gln	Pro	His	Val	Leu	Glu	Ala	Leu	Ser	Pro	Pro	Gln	Thr		
	50					55					60						
Ser	Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	Arg	Leu	Ser	Lys	Ser	Gln	Gly	Gly	Glu	Glu		
65					70					75				80			
Glu	Gly	Pro	Leu	Ser	Asp	Lys	Cys	Ser	Arg	Lys	Thr	Leu	Phe	Tyr	Leu		
				85					90					95			
Ile	Ala	Thr	Leu	Asn	Glu	Ser	Phe	Arg	Pro	Asp	Tyr	Asp	Phe	Ser	Thr		
			100					105					110				
Ala	Arg	Ser	His	Glu	Phe	Ser	Arg	Glu	Pro	Ser	Leu	Ser	Trp	Val	Val		
		115					120					125					
Asn	Ala	Val	Asn	Cys	Ser	Leu	Phe	Ser	Ala	Val	Arg	Glu	Asp	Phe	Lys		
	130					135					140						
Asp	Leu	Lys	Pro	Gln	Leu	Trp	Asn	Ala	Val	Asp	Glu	Glu	Ile	Cys	Leu		
145				150						155				160			
Ala	Glu	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Pro	Asp	Leu	Asp	Ser	Asp	Pro		
				165					170					175			
Phe	Gly	Glu	Asp	Gly	Ser	Leu	Trp	Ser	Phe	Asn	Tyr	Phe	Phe	Tyr	Asn		
			180					185					190				
Lys	Arg	Leu	Lys	Arg	Ile	Val	Phe	Phe	Ser	Cys	Arg	Ser	Ile	Ser	Gly		
		195				200						205					
Ser	Thr	Tyr	Thr	Pro	Ser	Glu	Ala	Gly	Asn	Glu	Leu	Asp	Met	Glu	Leu		
	210					215						220					
Gly	Glu	Glu	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Ser	Arg	Ser	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala		
225				230						235				240			
Glu	Glu	Thr	Ser	Thr	Met	Glu	Glu	Asp	Arg	Val	Pro	Val	Ile	Cys	Ile		
				245					250					255			

<210> 18
 <211> 512
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

Met	Thr	Ala	Pro	Trp	Val	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Trp	Gly	Ser	Leu	Trp		
1			5						10					15			
Pro	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr		
			20					25					30				
Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg		
		35				40						45					
Cys	Glu	Gly	Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala		
	50					55					60						
Asn	Ser	Ser	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp		
65				70						75				80			
Asp	Phe	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn		
				85					90					95			
Pro	Gln	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg		

			100					105					110			
Phe	Thr	His	Leu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro	
		115					120					125				
Pro	Pro	Thr	Ala	Pro	Thr	Leu	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Tyr	Ser	Leu	Leu	
		130				135					140					
Pro	Ile	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Ala	Phe	Trp	Met	Tyr	
145					150					155					160	
Arg	His	Arg	Lys	Pro	Pro	Tyr	Gly	His	Val	Asp	Ile	His	Glu	Asp	Pro	
				165					170					175		
Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Val	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Gln	Leu	
			180					185					190			
Leu	Glu	Ile	Lys	Ala	Arg	Gly	Arg	Phe	Gly	Cys	Val	Trp	Lys	Ala	Gln	
		195				200						205				
Leu	Met	Asn	Asp	Phe	Val	Ala	Val	Lys	Ile	Phe	Pro	Leu	Gln	Asp	Lys	
	210					215					220					
Gln	Ser	Trp	Gln	Ser	Glu	Arg	Glu	Ile	Phe	Ser	Thr	Pro	Gly	Met	Lys	
225					230					235					240	
His	Glu	Asn	Leu	Leu	Gln	Phe	Ile	Ala	Ala	Glu	Lys	Arg	Gly	Ser	Asn	
				245						250				255		
Leu	Glu	Val	Glu	Leu	Trp	Leu	Ile	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Lys	Gly	Ser	
			260					265					270			
Leu	Thr	Asp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Ile	Ile	Thr	Trp	Asn	Glu	Leu	Cys	
		275					280						285			
His	Val	Ala	Glu	Thr	Met	Ser	Arg	Gly	Leu	Ser	Tyr	Leu	His	Glu	Asp	
	290					295					300					
Val	Pro	Trp	Cys	Arg	Gly	Glu	Gly	His	Lys	Pro	Ser	Ile	Ala	His	Arg	
305					310						315				320	
Asp	Phe	Lys	Ser	Lys	Asn	Val	Leu	Leu	Lys	Ser	Asp	Leu	Thr	Ala	Val	
				325					330					335		
Leu	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Phe	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Pro	
			340					345					350			
Gly	Asp	Thr	His	Gly	Gln	Val	Gly	Thr	Arg	Arg	Tyr	Met	Ala	Pro	Glu	
		355					360					365				
Val	Leu	Glu	Gly	Ala	Ile	Asn	Phe	Gln	Arg	Asp	Ala	Phe	Leu	Arg	Ile	
	370					375					380					
Asp	Met	Tyr	Ala	Met	Gly	Leu	Val	Leu	Trp	Glu	Leu	Val	Ser	Arg	Cys	
385					390					395					400	
Lys	Ala	Ala	Asp	Gly	Pro	Val	Asp	Glu	Tyr	Met	Leu	Pro	Phe	Glu	Glu	
				405					410					415		
Glu	Ile	Gly	Gln	His	Pro	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Glu	Val	Val	Val	
			420					425					430			
His	Lys	Lys	Met	Arg	Pro	Thr	Ile	Lys	Asp	His	Trp	Leu	Lys	His	Pro	
		435					440					445				
Gly	Leu	Ala	Gln	Leu	Cys	Val	Thr	Ile	Glu	Glu	Cys	Trp	Asp	His	Asp	
	450					455					460					
Ala	Glu	Ala	Arg	Leu	Ser	Ala	Gly	Cys	Val	Glu	Glu	Arg	Val	Ser	Leu	
465					470					475					480	
Ile	Arg	Arg	Ser	Val	Asn	Gly	Thr	Thr	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Ser	Leu	
				485					490					495		
Val	Thr	Ser	Val	Thr	Asn	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Lys	Glu	Ser	Ser	Ile	
			500					505					510			

<210> 19
 <211> 218
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

Met	Ala	Leu	Val	Pro	Tyr	Glu	Glu	Thr	Thr	Glu	Phe	Gly	Leu	Gln	Lys
1				5					10					15	
Phe	His	Lys	Pro	Leu	Ala	Thr	Phe	Ser	Phe	Ala	Asn	His	Thr	Ile	Gln
			20					25					30		
Ile	Arg	Gln	Asp	Trp	Arg	His	Leu	Gly	Val	Ala	Ala	Val	Val	Trp	Asp
		35					40					45			
Ala	Ala	Ile	Val	Leu	Ser	Thr	Tyr	Leu	Glu	Met	Gly	Ala	Val	Glu	Leu

290 295 300
 Gly Phe Glu Asn Met Pro Ala Ala Phe Met Gly Met Leu Lys Gly Asp
 305 310 315 320
 Asn Leu Gly Lys Thr Ile Val Lys Ala
 325

<210> 21
 <211> 84
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

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

<210> 22
 <211> 116
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

Met Ser Phe Cys Ser Phe Phe Gly Gly Glu Val Phe Gln Asn His Phe
 1 5 10 15
 Glu Pro Gly Val Tyr Val Cys Ala Lys Cys Gly Tyr Glu Leu Phe Ser
 20 25 30
 Ser Arg Ser Lys Tyr Ala His Ser Ser Pro Trp Pro Ala Phe Thr Glu
 35 40 45
 Thr Ile His Ala Asp Ser Val Ala Lys Arg Pro Glu His Asn Arg Ser
 50 55 60
 Glu Ala Leu Lys Val Ser Cys Gly Lys Cys Gly Asn Gly Leu Gly His
 65 70 75 80
 Glu Phe Leu Asn Asp Gly Pro Lys Pro Gly Gln Ser Arg Phe Ser Ile
 85 90 95
 Phe Ser Ser Ser Leu Lys Phe Val Pro Lys Gly Lys Glu Thr Ser Ala
 100 105 110
 Ser Gln Gly His
 115

<210> 23
 <211> 255
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

Met Ser Ser Ile Gly Thr Gly Tyr Asp Leu Ser Ala Ser Thr Phe Ser
 1 5 10 15
 Pro Asp Gly Arg Val Phe Gln Val Glu Tyr Ala Met Lys Ala Val Glu
 20 25 30
 Asn Ser Ser Thr Ala Ile Gly Ile Arg Cys Lys Asp Gly Val Val Phe
 35 40 45
 Gly Val Glu Lys Leu Val Leu Ser Lys Leu Tyr Glu Glu Gly Ser Asn
 50 55 60
 Lys Arg Leu Phe Asn Val Asp Arg His Val Gly Met Ala Val Ala Gly
 65 70 75 80
 Leu Leu Ala Asp Ala Arg Ser Leu Ala Asp Ile Ala Arg Glu Glu Ala
 85 90 95
 Ser Asn Phe Arg Ser Asn Phe Gly Tyr Asn Ile Pro Leu Lys His Leu
 100 105 110

Ala Asp Arg Val Ala Met Tyr Val His Ala Tyr Thr Leu Tyr Ser Ala
 115 120 125
 Val Arg Pro Phe Gly Cys Ser Phe Met Leu Gly Ser Tyr Ser Val Asn
 130 135 140
 Asp Gly Ala Gln Leu Tyr Met Ile Asp Pro Ser Gly Val Ser Tyr Gly
 145 150 155 160
 Tyr Trp Gly Cys Ala Ile Gly Lys Ala Arg Gln Ala Ala Lys Thr Glu
 165 170 175
 Ile Glu Lys Leu Gln Met Lys Glu Met Thr Cys Arg Asp Ile Val Lys
 180 185 190
 Glu Val Ala Lys Ile Ile Tyr Ile Val His Asp Glu Val Lys Asp Lys
 195 200 205
 Ala Phe Glu Leu Glu Leu Ser Trp Val Gly Glu Leu Thr Asn Gly Arg
 210 215 220
 His Glu Ile Val Pro Lys Asp Ile Arg Glu Glu Ala Glu Lys Tyr Ala
 225 230 235 240
 Lys Glu Ser Leu Lys Glu Glu Asp Glu Ser Asp Asp Asn Met
 245 250 255

<210> 24
 <211> 227
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

Met Gly Gly Thr Thr Ser Thr Arg Arg Val Thr Phe Glu Ala Asp Glu
 1 5 10 15
 Asn Glu Asn Ile Thr Val Val Lys Gly Ile Arg Leu Ser Glu Asn Val
 20 25 30
 Ile Asp Arg Met Lys Glu Ser Ser Pro Ser Gly Ser Lys Ser Gln Arg
 35 40 45
 Tyr Ser Gly Ala Tyr Gly Ala Ser Val Ser Asp Glu Glu Leu Lys Arg
 50 55 60
 Arg Val Ala Glu Glu Leu Ala Leu Glu Gln Ala Lys Lys Glu Ser Glu
 65 70 75 80
 Asp Gln Lys Arg Leu Lys Gln Ala Lys Glu Leu Asp Arg Glu Arg Ala
 85 90 95
 Ala Ala Asn Glu Gln Leu Thr Arg Ala Ile Leu Arg Glu Arg Ile Cys
 100 105 110
 Ser Glu Glu Glu Arg Ala Lys Ala Lys His Leu Ala Arg Gln Leu Glu
 115 120 125
 Glu Lys Asp Arg Val Leu Lys Lys Gln Asp Ala Phe Tyr Lys Glu Gln
 130 135 140
 Leu Ala Arg Leu Glu Glu Arg Ser Ser Glu Phe Tyr Arg Val Thr Thr
 145 150 155 160
 Glu Gln Tyr Gln Lys Ala Ala Glu Glu Val Glu Ala Lys Phe Lys Arg
 165 170 175
 Tyr Glu Ser His Pro Val Cys Ala Asp Leu Gln Ala Lys Ile Leu Gln
 180 185 190
 Cys Tyr Arg Glu Asn Thr His Gln Thr Leu Lys Cys Ser Ala Leu Ala
 195 200 205
 Thr Gln Tyr Met His Cys Val Asn His Ala Lys Gln Ser Met Leu Glu
 210 215 220
 Lys Gly Gly
 225

<210> 25
 <211> 102
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 25

Met Ala Asp Asp Val Asp Gln Gln Gln Thr Thr Asn Thr Val Glu Glu
 1 5 10 15
 Pro Leu Asp Leu Ile Arg Leu Ser Leu Asp Glu Arg Ile Tyr Val Lys
 20 25 30

Met Arg Asn Asp Arg Glu Leu Arg Gly Arg Leu His Ala Tyr Asp Gln
 35 40 45
 His Leu Asn Met Ile Leu Gly Asp Val Glu Glu Thr Val Thr Thr Ile
 50 55 60
 Glu Ile Asp Glu Glu Thr Tyr Glu Glu Ile Tyr Lys Ser Thr Lys Arg
 65 70 75 80
 Asn Ile Pro Met Leu Phe Val Arg Gly Asp Gly Val Val Leu Val Ala
 85 90 95
 Pro Pro Leu Arg Val Gly
 100

<210> 26
 <211> 720
 <212> Бeлoк
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

Met Asp Asp Pro Lys Lys Glu Asp Ile Leu Leu Leu Ala Asp Glu Lys
 1 5 10 15
 Phe Asp Phe Asp Leu Ser Leu Ser Ser Ser Ala Asn Glu Asp Asp
 20 25 30
 Glu Val Phe Phe Gly Pro Phe Gly His Lys Glu Arg Cys Ile Ala Ala
 35 40 45
 Ser Leu Glu Leu Asn Asn Pro Val Pro Glu Gln Pro Pro Leu Pro Thr
 50 55 60
 Ser Glu Ser Pro Phe Ala Trp Ser Pro Leu Ala Gly Glu Lys Phe Val
 65 70 75 80
 Glu Val Tyr Lys Glu Ala His Leu Leu Ala Leu His Ile Glu Ser Ser
 85 90 95
 Ser Arg Asn Gln Ala Ala Gln Ala Ala Lys Pro Glu Asp Pro Arg Ser
 100 105 110
 Gln Gly Val Glu Arg Phe Ile Gln Glu Ser Lys Leu Lys Ile Asn Leu
 115 120 125
 Phe Glu Lys Glu Lys Glu Met Lys Lys Ser Pro Thr Ser Leu Lys Arg
 130 135 140
 Glu Thr Tyr Tyr Leu Ser Asp Ser Pro Leu Leu Gly Pro Pro Val Gly
 145 150 155 160
 Glu Pro Arg Leu Leu Ala Ser Ser Pro Ala Leu Pro Ser Ser Gly Ala
 165 170 175
 Gln Ala Arg Leu Thr Arg Ala Pro Gly Pro Pro His Ser Ala His Ala
 180 185 190
 Leu Pro Arg Glu Ser Cys Thr Ala His Ala Ala Ser Gln Ala Ala Thr
 195 200 205
 Gln Arg Lys Pro Gly Thr Lys Leu Leu Leu Pro Arg Ala Ala Ser Val
 210 215 220
 Arg Gly Arg Ser Ile Pro Gly Ala Ala Glu Lys Pro Lys Lys Glu Ile
 225 230 235 240
 Pro Ala Ser Pro Ser Arg Thr Lys Ile Pro Ala Glu Lys Glu Ser His
 245 250 255
 Arg Asp Val Leu Pro Asp Lys Pro Ala Pro Gly Ala Val Asn Val Pro
 260 265 270
 Ala Ala Gly Ser His Leu Gly Gln Gly Lys Arg Ala Ile Pro Val Pro
 275 280 285
 Asn Lys Leu Gly Leu Lys Lys Thr Leu Leu Lys Ala Pro Gly Ser Thr
 290 295 300
 Ser Asn Leu Ala Arg Lys Ser Ser Ser Gly Pro Val Trp Ser Gly Ala
 305 310 315 320
 Ser Ser Ala Cys Thr Ser Pro Ala Val Gly Lys Ala Lys Ser Ser Glu
 325 330 335
 Phe Ala Ser Ile Pro Ala Asn Ser Ser Arg Pro Leu Ser Asn Ile Ser
 340 345 350
 Lys Ser Gly Arg Met Gly Pro Ala Met Leu Arg Pro Ala Leu Pro Ala
 355 360 365
 Gly Pro Val Gly Ala Ser Ser Trp Gln Ala Lys Arg Val Asp Val Ser
 370 375 380

Glu Leu Ala Ala Glu Gln Leu Thr Ala Pro Pro Ser Ala Ser Pro Thr
 385 390 395 400
 Gln Pro Gln Thr Pro Glu Gly Gly Gly Gln Trp Leu Asn Ser Ser Cys
 405 410 415
 Ala Trp Ser Glu Ser Ser Gln Leu Asn Lys Thr Arg Ser Ile Arg Arg
 420 425 430
 Arg Asp Ser Cys Leu Asn Ser Lys Thr Lys Val Met Pro Thr Pro Thr
 435 440 445
 Asn Gln Phe Lys Ile Pro Lys Phe Ser Ile Gly Asp Ser Pro Asp Ser
 450 455 460
 Ser Thr Pro Lys Leu Ser Arg Ala Gln Arg Pro Gln Ser Cys Thr Ser
 465 470 475 480
 Val Gly Arg Val Thr Val His Ser Thr Pro Val Arg Arg Ser Ser Gly
 485 490 495
 Pro Ala Pro Gln Ser Leu Leu Ser Ala Arg Arg Val Ser Ala Leu Pro
 500 505 510
 Thr Pro Ala Ser Arg Arg Cys Ser Gly Leu Pro Pro Met Thr Pro Lys
 515 520 525
 Thr Met Pro Arg Ala Val Gly Ser Pro Leu Cys Val Pro Ala Arg Arg
 530 535 540
 Arg Ser Ser Glu Pro Arg Lys Asn Ser Ala Met Arg Thr Glu Pro Thr
 545 550 555 560
 Arg Glu Ser Asn Arg Lys Thr Asp Ser Arg Leu Val Asp Val Ser Pro
 565 570 575
 Asp Arg Gly Ser Pro Pro Ser Arg Val Pro Gln Ala Leu Asn Phe Ser
 580 585 590
 Pro Glu Glu Ser Asp Ser Thr Phe Ser Lys Ser Thr Ala Thr Glu Val
 595 600 605
 Ala Arg Glu Glu Ala Lys Pro Gly Gly Asp Ala Ala Pro Ser Glu Ala
 610 615 620
 Leu Leu Val Asp Ile Lys Leu Glu Pro Leu Ala Val Thr Pro Asp Ala
 625 630 635 640
 Ala Ser Gln Pro Leu Ile Asp Leu Pro Leu Ile Asp Phe Cys Asp Thr
 645 650 655
 Pro Glu Ala His Val Ala Val Gly Ser Glu Ser Arg Pro Leu Ile Asp
 660 665 670
 Leu Met Thr Asn Thr Pro Asp Met Asn Lys Asn Val Ala Lys Pro Ser
 675 680 685
 Pro Val Val Gly Gln Leu Ile Asp Leu Ser Ser Pro Leu Ile Gln Leu
 690 695 700
 Ser Pro Glu Ala Asp Lys Glu Asn Val Asp Ser Pro Leu Leu Lys Phe
 705 710 715 720

<210> 27
 <211> 21
 <212> PНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) мРНК-1(44-64) для мРНК UBE2S человека
 <400> 27
 ссггссггсс гсагссага а 21

<210> 28
 <211> 21
 <212> PНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) мРНК-1(146-166) для мРНК
 UBE2S человека
 <400> 28
 уггсаусааг гусииссса а 21

<210> 29
 <211> 19

<212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК UBE2S человека
 <400> 29
 ggagaасuас gaggaуau 19

<210> 30
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-3 для мРНК UBE2S человека
 <400> 30
 uggсgаgсgс gauaаgааg 19

<210> 31
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(897-917) для мРНК RFC4 человека
 <400> 31
 aggааuаgс uиaиcиuиu а 21

<210> 32
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(189-209) для мРНК RFC4 человека
 <400> 32
 сигсасgаgа агссaggсua а 21

<210> 33
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК RFC4 человека
 <400> 33
 ссgаиисиги сииаисиги 19

<210> 34
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-3 для мРНК RFC4 человека
 <400> 34
 ggguaаuасс агсигаgаа 19

<210> 35
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(2003-2023) для мРНК
 PTGES2 человека
 <400> 35
 сигggасаuг uиигсааuаа а 21

<210> 36
 <211> 21

<212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(1105-1125) для мРНК
 PTGES2 человека
 <400> 36
 суггсисауг сисаасгага а 21

<210> 37
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК PTGES2 человека
 <400> 37
 аггагааагс исгсаасаа 19

<210> 38
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-3 для мРНК PTGES2 человека
 <400> 38
 ссгагуисгг сааиаагаа 19

<210> 39
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(1538-1558) для мРНК
 MAF1 человека
 <400> 39
 сагсуггасс гсагагуииа u 21

<210> 40
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(1031-1051) для мРНК
 MAF1 человека
 <400> 40
 иагссисугг иссиусааси а 21

<210> 41
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК MAF1 человека
 <400> 41
 асгасаааса саугиусаа 19

<210> 42
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-3 для мРНК MAF1 человека
 <400> 42
 гссшагсиг ггуигуааа 19

<210> 43
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(626-646) для мРНК
 ACVR2B человека
 <400> 43
 сарсусауга аугасиуигу а 21

<210> 44
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(208-228) для мРНК
 ACVR2B человека
 <400> 44
 сассаусгаг сисгигаага а 21

<210> 45
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК ACVR2B человека
 <400> 45
 ггсагагуга асгггагау 19

<210> 46
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-3 для мРНК ACVR2B человека
 <400> 46
 ггаасауау сасауггаа 19

<210> 47
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(754-774) для мРНК
 LOC151194 человека
 <400> 47
 ааггуисаси асгауссуга а 21

<210> 48
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(1068-1088) для мРНК
 LOC151194 человека
 <400> 48
 исгаишиауг сиаишигугу а 21

<210> 49
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК LOC151194 человека

<400> 49
 ggaauuuuggg uugсагааа 19

<210> 50
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-3 для мРНК LOC151194 человека
 <400> 50
 ссагааggag гасииааа 19

<210> 51
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(705-725) для мРНК
 LTB4DH человека
 <400> 51
 сасигииаус ggссагаага а 21

<210> 52
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(588-608) для мРНК
 LTB4DH человека
 <400> 52
 уггаиуигаи гисгисиуиа а 21

<210> 53
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК LTB4DH человека
 <400> 53
 гссаааагаи угааggааg 19

<210> 54
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-3 для мРНК LTB4DH человека
 <400> 54
 ссигааggии аугаиуиуи 19

<210> 55
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(145-165) для мРНК
 DPM2 человека
 <400> 55
 сагсаугса иссааагаи и 21

<210> 56
 <211> 21
 <212> РНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(84-104) для мРНК DPM2 человека
 <400> 56
 uagccugauc aucsucassu a 21

<210> 57
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК DPM2 человека
 <400> 57
 gggugaucsu cuugssaui 19

<210> 58
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-3 для мРНК DPM2 человека
 <400> 58
 uguuuuggg asiguucau 19

<210> 59
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(870-890) для мРНК
 SEPX1 человека
 <400> 59
 сагасисисг иссисассга а 21

<210> 60
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(794-814) для мРНК
 SEPX1 человека
 <400> 60
 сугааугасг уасасссис а 21

<210> 61
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК SEPX1 человека
 <400> 61
 gggcgagui ucсагааи 19

<210> 62
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-3 для мРНК SEPX1 человека
 <400> 62
 уасиуугаа ссиггсгви 19

<210> 63
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(853-873) для мРНК
 PSMA3 человека
 <400> 63
 ссагуссааи гуаасиааии а 21

<210> 64
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(686-706) для мРНК
 PSMA3 человека
 <400> 64
 сисагсуггг иуггугааии а 21

<210> 65
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК PSMA3 человека
 <400> 65
 иггсагаугс исгиисии 19

<210> 66
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-3 для мРНК PSMA3 человека
 <400> 66
 гггиуисаи асггиаии 19

<210> 67
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(546-566) для мРНК
 SNCHD3 человека
 <400> 67
 саггаугсаи исиасаага а 21

<210> 68
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(1450-1470) для мРНК
 SNCHD3 человека
 <400> 68
 суггааиааи гуиааугаии а 21

<210> 69
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК SNCHD3 человека
 <400> 69
 sgaagaucag aaacgacua 19

 <210> 70
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-3 для мРНК SNCHD3 человека
 <400> 70
 gagaagacc gagucuaa 19

 <210> 71
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(540-560) для мРНК
 LSM3 человека
 <400> 71
 ucсааааааа аугассасса а 21

 <210> 72
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-1(37-57) для мРНК LSM3 человека
 <400> 72
 асгасгага ссгсасааа а 21

 <210> 73
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК LSM3 человека
 <400> 73
 гасгагасс агсааааа 19

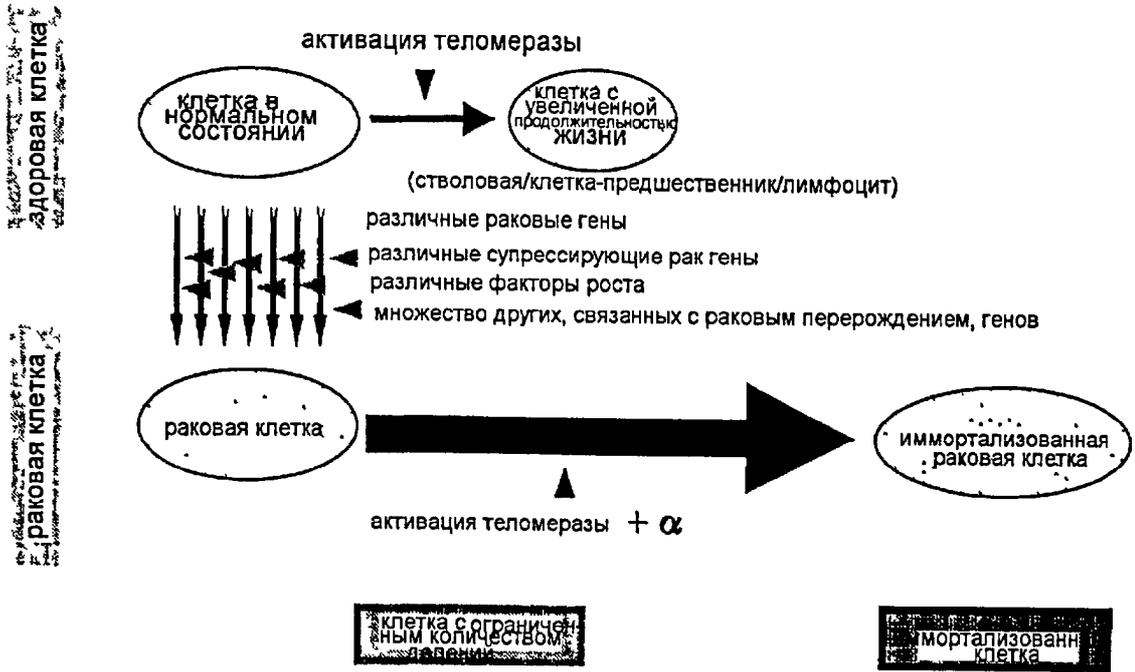
 <210> 74
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-3 для мРНК LSM3 человека
 <400> 74
 асгааасга аиаииссаа 19

 <210> 75
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловой) миРНК-2 для мРНК GTSE1 человека
 <400> 75
 ggcсаагсu аааисааg 19

 <210> 76
 <211> 19
 <212> РНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> олигонуклеотид (смысловый) миРНК-3 для мРНК GTSE1 человека
 <400> 76
 ugasaasac issagasau

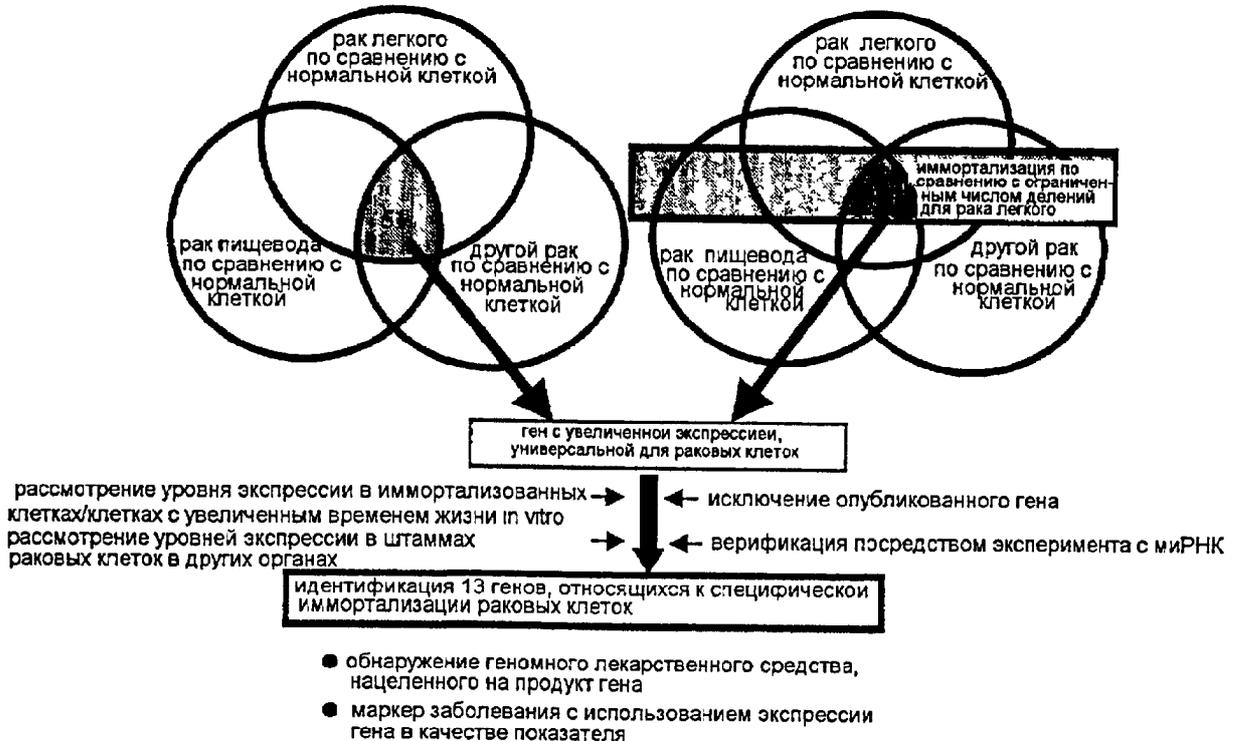
19



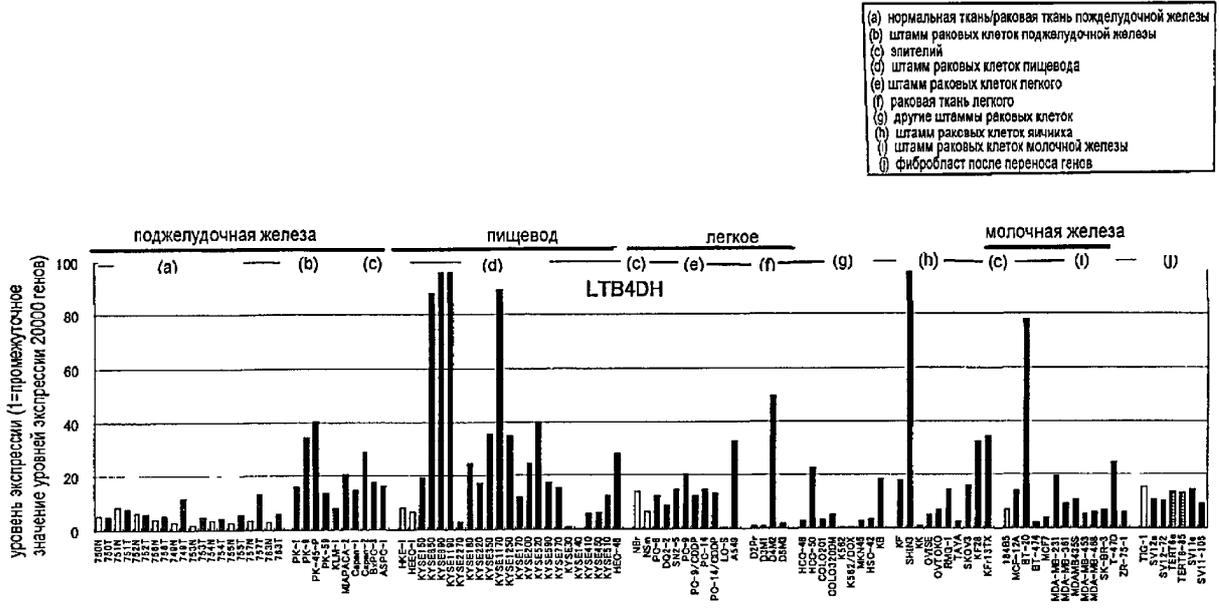
ФИГ.1

Обладает экспрессией в двукратном количестве или выше в 90% штаммов раковых клеток из каждого органа

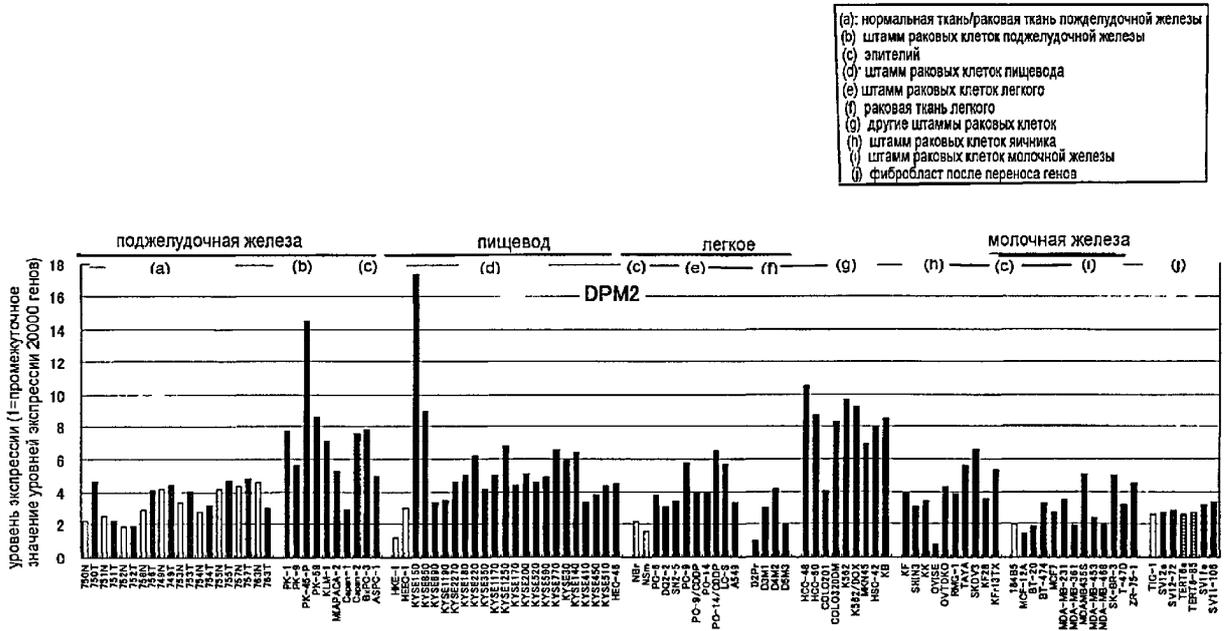
Для экспрессии при раке среднее, определенное для органа, является двукратным или выше



ФИГ.2

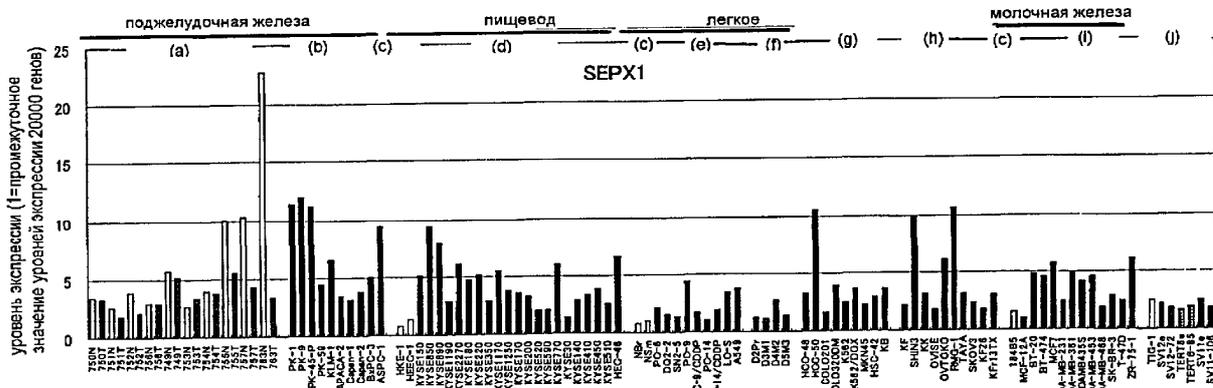


ФИГ.9



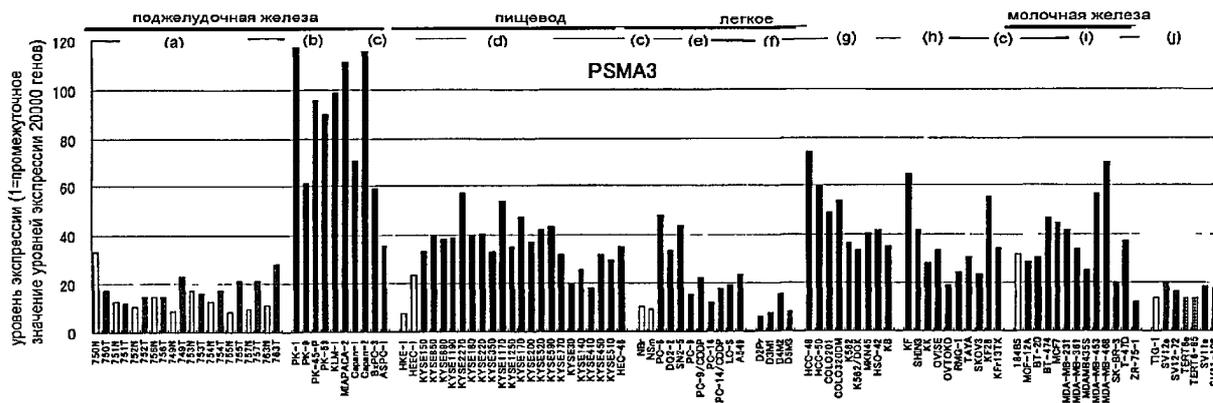
ФИГ.10

- (a): нормальная ткань/раковая ткань поджелудочной железы
- (b) штамм раковых клеток поджелудочной железы
- (c) эпителий
- (d) штамм раковых клеток пищевода
- (e) штамм раковых клеток легкого
- (f) раковая ткань легкого
- (g) другие штаммы раковых клеток
- (h) штамм раковых клеток яичника
- (i) штамм раковых клеток молочной железы
- (j) фибробласт после переноса генов



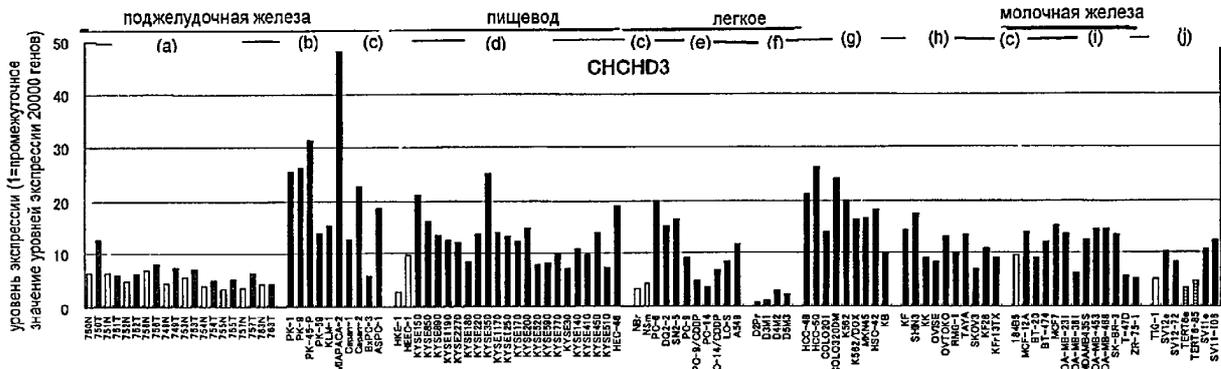
ФИГ.11

- (a), нормальная ткани/раковая ткань поджелудочной железы
- (b) штамм раковых клеток поджелудочной железы
- (c) эпителий
- (d) штамм раковых клеток пищевода
- (e) штамм раковых клеток легкого
- (f), раковая ткань легкого
- (g) другие штаммы раковых клеток
- (h) штамм раковых клеток яичника
- (i) штамм раковых клеток молочной железы
- (j) фибробласт после переноса генов



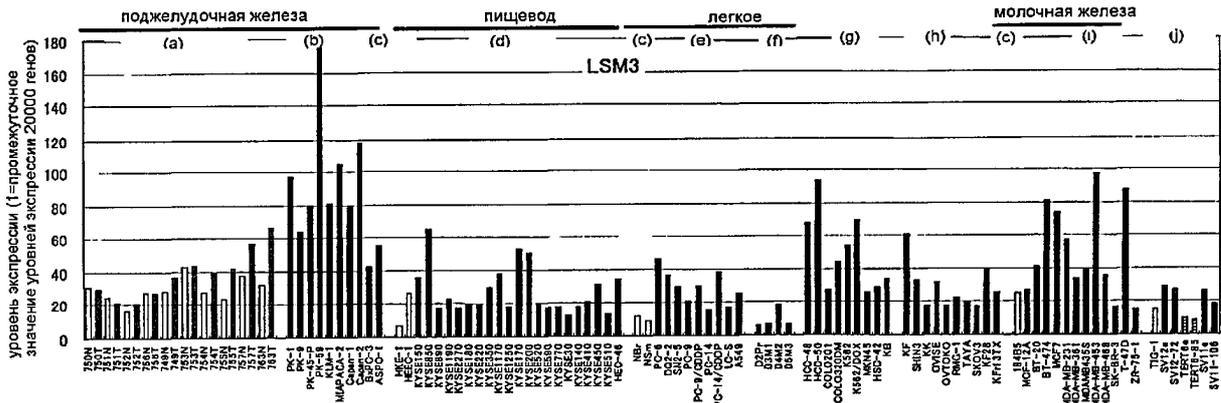
ФИГ.12

- (a) нормальная ткань/раковая ткань поджелудочной железы
- (b) штамм раковых клеток поджелудочной железы
- (c) эпителий
- (d) штамм раковых клеток пищевода
- (e) штамм раковых клеток легкого
- (f) раковая ткань легкого
- (g) другие штаммы раковых клеток
- (h) штамм раковых клеток яичника
- (i) штамм раковых клеток молочной железы
- (j) фибробласт после переноса генов

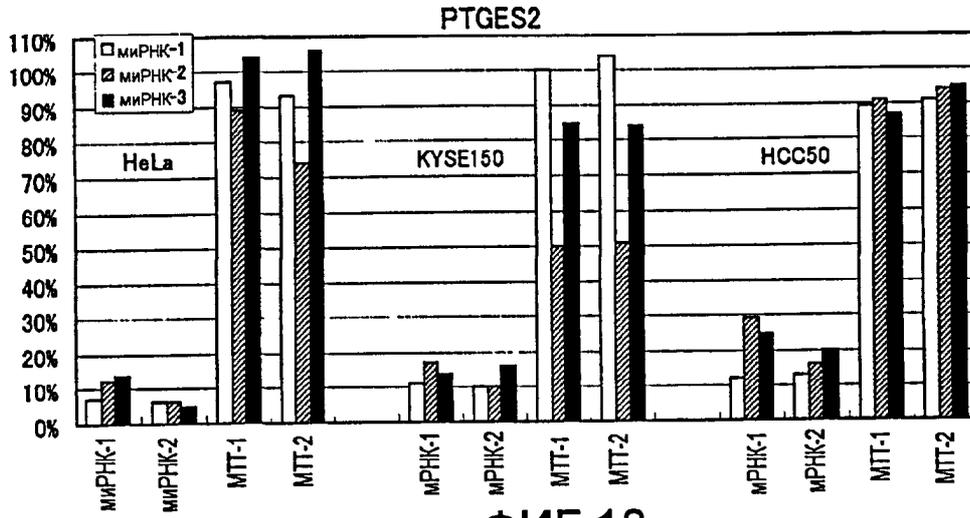


ФИГ.13

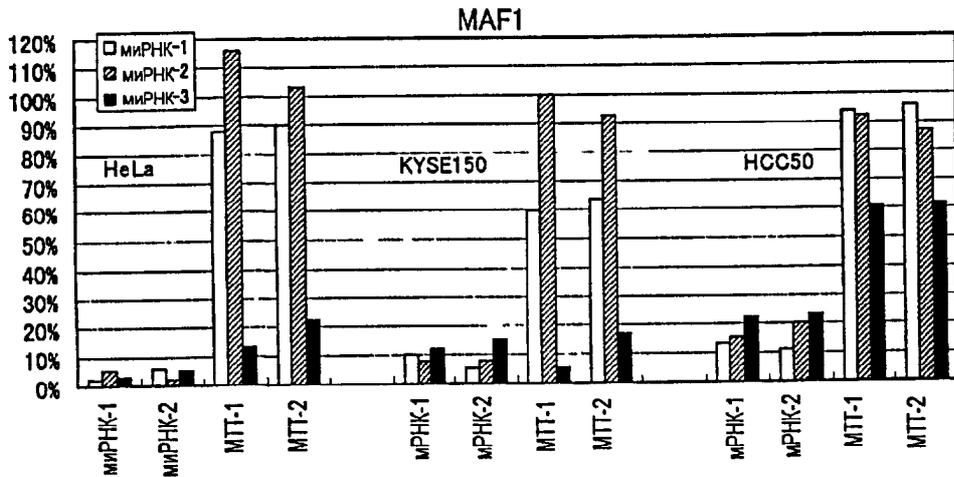
- (a) нормальная ткань/раковая ткань поджелудочной железы
- (b) штамм раковых клеток поджелудочной железы
- (c) эпителий
- (d) штамм раковых клеток пищевода
- (e) штамм раковых клеток легкого
- (f) раковая ткань легкого
- (g) другие штаммы раковых клеток
- (h) штамм раковых клеток яичника
- (i) штамм раковых клеток молочной железы
- (j) фибробласт после переноса генов



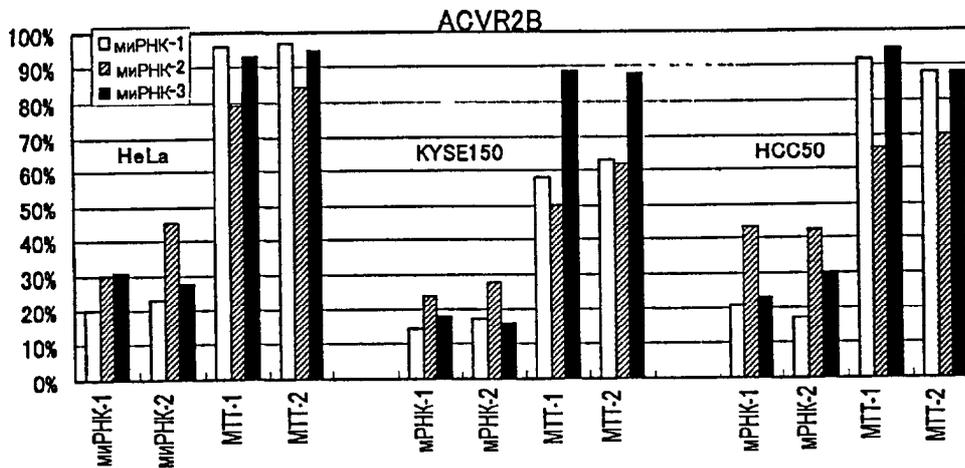
ФИГ.14



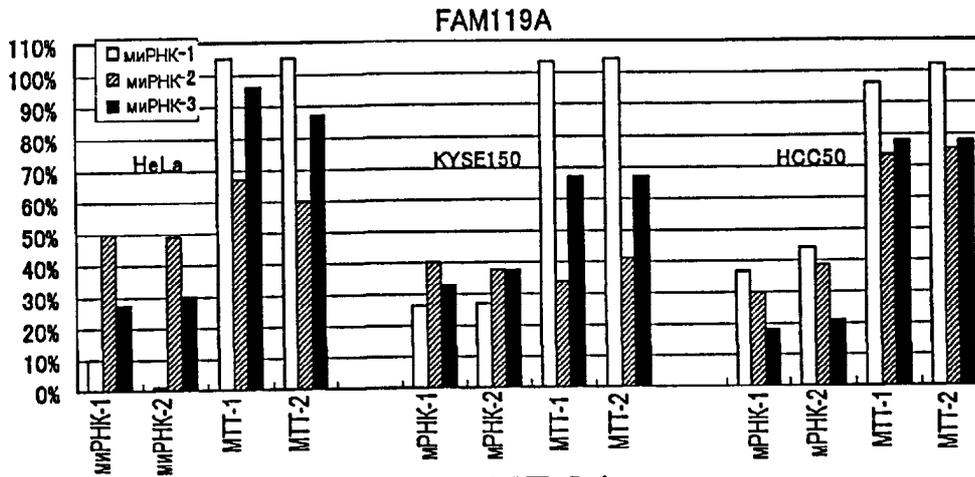
ФИГ.18



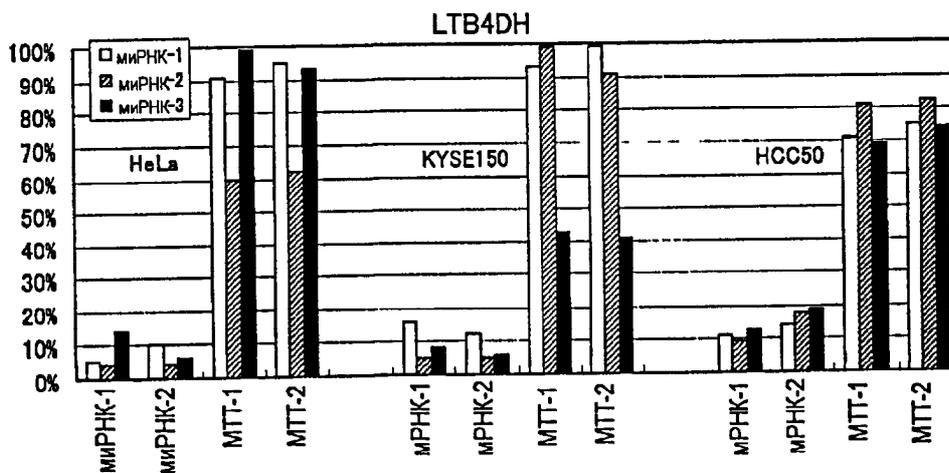
ФИГ.19



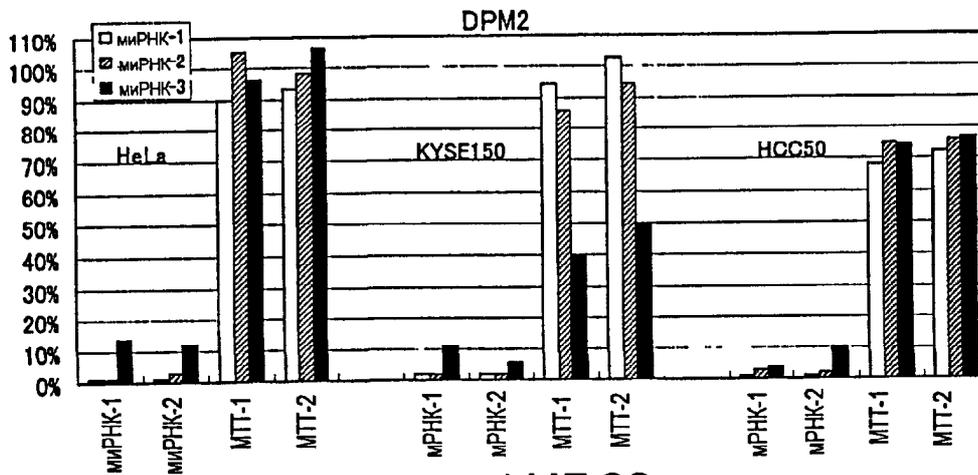
ФИГ.20



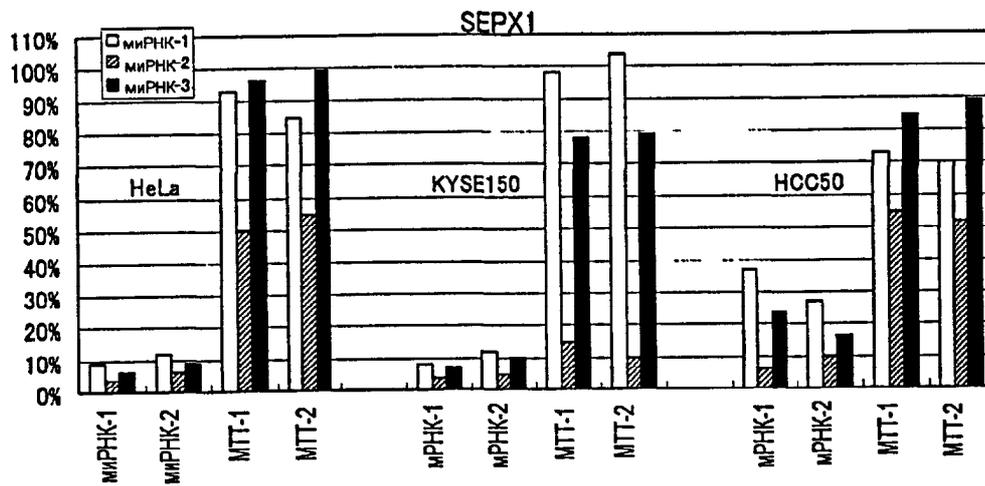
ФИГ.21



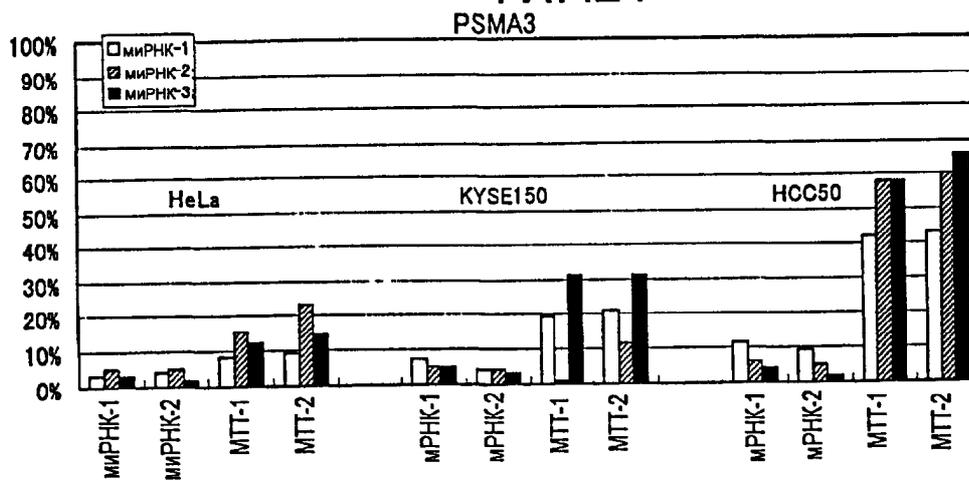
ФИГ.22



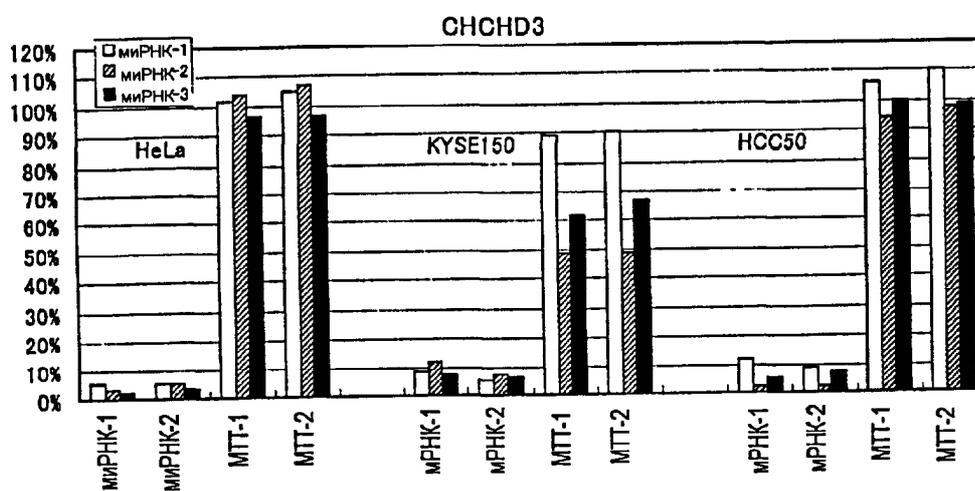
ФИГ.23



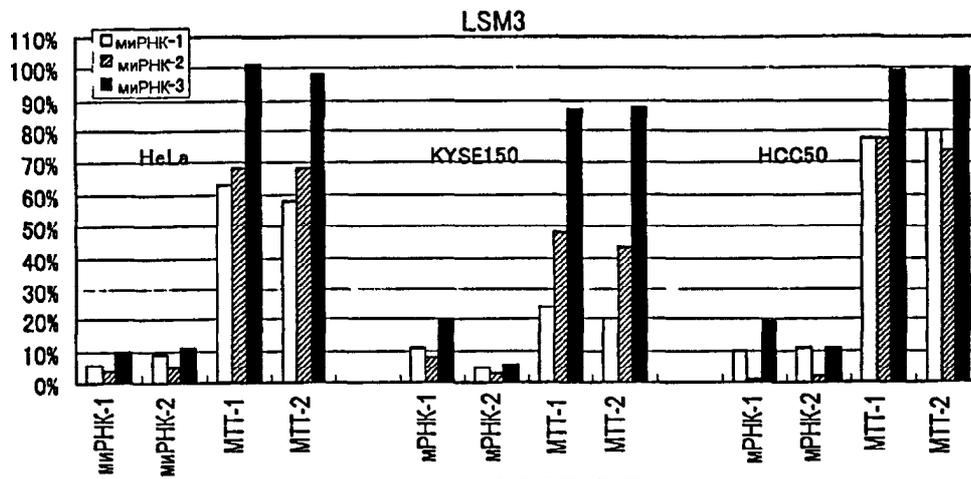
ФИГ.24



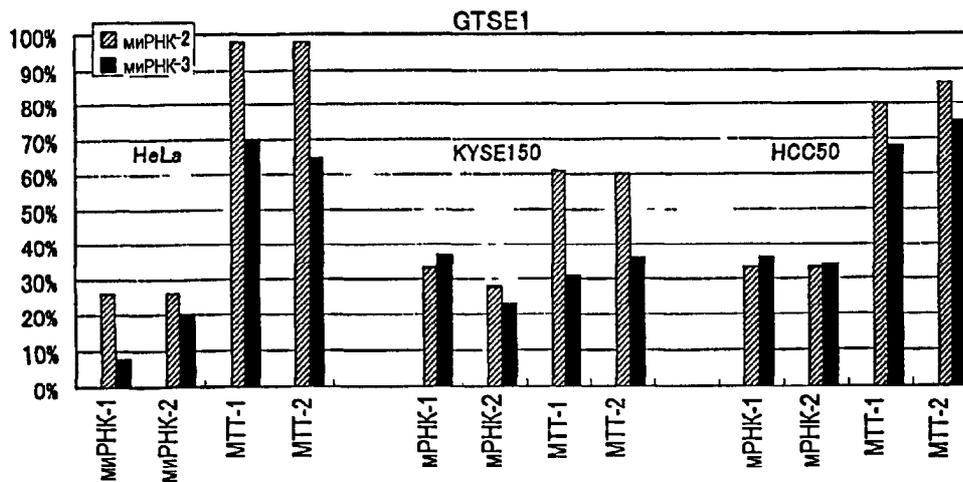
ФИГ.25



ФИГ.26



ФИГ.27



ФИГ.28