

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 039776

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.11

(51) Int. Cl. C07K 14/47 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892085

(22) Дата подачи заявки
2017.03.17

(54) НОВЫЕ БЕЛКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ АЛЬФА-1-МИКРОГЛОБУЛИНА, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) PA 2016 70158

(56) WO-A2-2010006809

(32) 2016.03.18

WO-A1-2014037390

(33) DK

(43) 2019.02.28

(86) PCT/EP2017/056436

(87) WO 2017/158181 2017.09.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГАРД ТЕРАПЬЮТИКС
ИНТЕРНЭШНЛ АЙБИ (SE)

(72) Изобретатель:
Розенлёф Лена Вестер, Хегервалль
Аннели Эдстрем, Окерстрем Бо (SE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Данное изобретение относится к белку, полученному из альфа-1-микроглобулина, для применения в медицине.

039776 B1

039776 B1

039776

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к модифицированным вариантам белка α -1-микроглобулина человека с улучшенными свойствами и применению таких вариантов в лечении и диагностике в медицине. Заявители изобретения неожиданно обнаружили, что интродукция определенных аминокислотных замен и/или добавление определенных N-концевых удлинений обеспечивают улучшенные свойства альфа-1-микроглобулина в отношении стабильности, растворимости и связывания тема.

Уровень техники

A1M (α -1-микроглобулин) представляет собой низкомолекулярный белок с фильтрующей функцией для внеклеточной ткани (Ekstrom et al., 1977; Akerstrom and Gram, 2014). Он присутствует во всех тканях и органах у рыб, птиц, грызунов, млекопитающих и других позвоночных. A1M в основном синтезируется в печени, но также на более низком уровне в большинстве других клеток в организме. Он кодируется геном предшественника α 1-микроглобулин-бикунина (AMBIP) и транслируется во всех клетках и у всех видов как постоянный пептидный предшественник вместе с другим белком, бикунином (Kaumeier et al., 1986). Однако два белка разделяются расщеплением протеазой, процессируются и секретируются в кровь в виде двух разных белков с различными функциями (Lindqvist et al., 1992; Bratt et al., 1993). Причина повсеместного совместного синтеза A1M и бикунина пока неизвестна. В крови примерно 50% A1M находится в свободной мономерной форме, а остальные 50% в виде высокомолекулярных комплексов, ковалентно связанных с иммуноглобулином A, альбумином и протромбином (Berggard et al., 1997).

A1M является однодоменным, гликозилированным белком из 183 аминокислот. Недавно была опубликована кристаллическая структура большого фрагмента A1M, экспрессированного в *E.coli* (Meining and Skerra, 2012). На основании его структуры A1M относится к белкам семейства липокалинов, которое включает 50 и более членов животного, растительного и бактериального происхождения (Flower, 1996; Akerstrom et al., 2006). Липокалины имеют общую трехмерную структуру, состоящую из восьми антипараллельных β -тяжей, образующих "бочонок" с одним закрытым концом (внизу) и открытым концом (вверху). "Бочонок" функционирует в качестве кармана для гидрофобных лигандов у большинства липокалинов. Четыре петли (петля 1-4), которые составляют внешнюю оболочку открытого конца "бочонка", очень резко различаются по длине и составу между различными липокалинами. Было показано, что в A1M небольшое количество боковых групп аминокислот, расположенных в этих петлях или на внутренней стороне кармана, имеет важное значение для проявления установленных функций белка. Таким образом, свободный цистеин C34, расположенный в короткой спирали в петле 1, обладает отрицательным редокс-потенциалом и обеспечивает редуктазные свойства A1M (Allhorn et al., 2005). Было показано, что два остатка тирозина, Y22 и 132, ковалентно модифицируются продуктами свободнорадикального окисления *in vitro* (Åkerström et al., 2007). Четыре лизиновых остатка, K69, 92, 118 и 130, регулируют редуктазную активность (Allhorn et al., 2005), оказывают влияние на связывание свободных групп гема (Rutardottir et al., 2015) и ковалентно модифицируются в A1M, выделенном из мочи и амниотической жидкости человека низкомолекулярными желто-коричневыми гетерогенными веществами (Berggard et al., 1999; Sala et al., 2004).

За счет редуктазной активности, способности гасить радикалы и связывания гема, A1M функционирует в качестве антиоксиданта, который защищает клетки и ткани от окислительного повреждения. Показано, что A1M защищает *in vitro* культуры клеток крови, ткань плаценты и кожи от окислительного повреждения, вызванного гемоглобином, гемом и активными формами кислорода (ROS) (Olsson et al., 2008; May et al., 2011; Olsson et al., PloS One, 2011; Olsson et al., ARS 2012). A1M также показал протективные эффекты *in vivo* у крыс и кроликов от повреждения плаценты и почек после инфузии гемоглобина (Sverrisson et al., 2014; Nääv et al., 2015). В серии сообщений было показано, что гемоглобин и окислительный стресс вовлечены в патогенез преэклампсии, серьезного осложнения при беременности (Centlow et al., 2008; Hansson et al., 2013), и уровни мРНК и белка A1M в печени, плаценте и плазме повышены у беременных женщин с преэклампсией (Olsson et al., 2010; Anderson et al., 2011). Следовательно, было высказано предположение, что A1M можно использовать в качестве терапевтического агента для лечения беременных женщин с преэклампсией в целях ослабления окислительного повреждения и, следовательно, клинических симптомов заболевания (Olsson et al., 2010).

Разработан способ получения рекомбинантного человеческого A1M в *E.coli*, и было показано, что он обладает редуктазными, связывающими радикалы и связывающими гем свойствами (Kwasek et al., Allhorn et al., 2002, 2005; Åkerström et al., 2007). Действительно, данный рекомбинантный вариант A1M показал терапевтические эффекты *in vivo* на модели преэклампсии на овцах (Wester-Rosenlöf et al., 2014). Однако, несмотря на то, что он является функциональным, в экспрессированном в *E.coli* рекомбинантном A1M отсутствует гликозилирование, и он обладает низкой растворимостью и стабильностью по сравнению с человеческим A1M, выделенным из мочи или плазмы. Отсутствие стабильности и растворимости белка ограничивает его применение в качестве лекарственного средства для использования человеку, главным образом, за счет трудностей с получением высококонцентрированных растворов и обеспечением длительного хранения в буферах в условиях физиологических значений pH и концентрации солей.

Следовательно, существует потребность в разработке белка со структурным сходством с человеческим А1М, но с улучшенными свойствами в отношении стабильности и растворимости. Более того, необходимо, чтобы белок было относительно легко получать в количествах, подходящих для терапевтического применения.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новым белкам альфа-1-микроглобулина с улучшенными профилями стабильности и растворимости.

Сайт-направленный и аддитивный мутагенез использовали для получения генно-инженерных видов А1М с сохраненными или, возможно, более высокими функциональными свойствами, но с улучшенной стабильностью и растворимостью белка, которые обеспечивают длительное хранение при высоких концентрациях в физиологических буферах.

Как следует из приведенных здесь примеров, следовали четырем направлениям обоснования при выборе положений и идентичностей мутантных аминокислотных боковых групп.

1) Экспрессировали гомологи животных разных видов с различной предполагаемой экологической нагрузкой с точки зрения окислительного стресса, температуры, давления кислорода (N=12).

2) Вводили единичные аминокислотные замены, которые часто встречаются среди 56 секвенированных гомологов А1М в положениях, расположенных в петлях 1-4 или внутренней поверхности гидрофобного кармана, в конструкцию человеческого гена и экспрессировали варианты (N=3).

3) Добавляли или удаляли благоприятно расположенные остатки лизина или тирозина на основе гипотезы о том, что они могут оказывать влияние на рКа тиолила C35 (Allhorn et al., 2005) или служить в качестве сайтов захвата свободных радикалов (Berggård et al., 1999; Sala et al., 2004; Åkerström et al., 2007) (N=5).

4) Кроме того, исследовали влияние N-концевых, заряженных и гидрофильных удлинений в некоторых вариантах А1М. Обоснованием для конструирования тестируемых N-концевых удлинений было добавление 1) метки для очистки (например, His-метки), 2) линкера для отделения метки от белкового кода А1М, 3) нескольких (1-5) заряженных аминокислотных боковых групп, обеспечивающих гидрофильные свойства белка, для достижения максимальной стабильности и растворения в водных растворах, 4) без нарушения физиологических функций А1М.

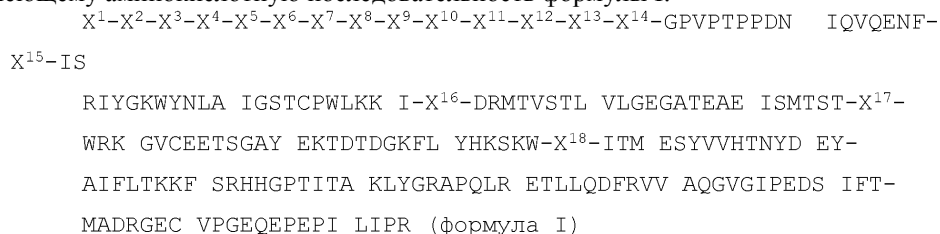
Проект разделяли на три основных фазы.

Фаза I) экспрессия 27 вариантов А1М, описанных выше, с последующим анализом растворимости, стабильности и функции.

Фаза II) конструирование, экспрессия и анализ нескольких вариантов А1М с предполагаемыми оптимальными свойствами на основе результата фазы I.

Фаза III) конструирование, экспрессия и анализ немутантного А1М дикого типа (wt) и наиболее успешного мутантного варианта А1М, имеющего N-концевые, заряженные и гидрофильные удлинения или без них.

Как здесь будет пояснено более подробно, настоящее изобретение относится к белку, полученному из А1М, имеющему аминокислотную последовательность формулы I:



где присутствует по меньшей мере один X и (в пояснении приведены предложения для дополнительных замен) и

X¹ отсутствует или представляет Met или N-формил-Met;

X² отсутствует или представляет His;

X³ отсутствует или представляет His;

X⁴ отсутствует или представляет His;

X⁵ отсутствует или представляет His;

X⁶ отсутствует или представляет His;

X⁷ отсутствует или представляет His;

X⁸ отсутствует или представляет His;

X⁹ отсутствует или представляет His;

X¹⁰ отсутствует или выбран из Asp и Glu, Lys и Arg;

X¹¹ отсутствует или выбран из Asp и Glu, Lys и Arg;

X¹² отсутствует или выбран из Asp и Glu, Lys и Arg;

X¹³ отсутствует или выбран из Asp и Glu, Lys и Arg;

X¹⁴ отсутствует или представляет Lys или Glu, Asp или Arg или Met или N-формил-Met ;

X¹⁵ представляет Asp или Asn или Glu;

X¹⁶ представляет Met или Lys или Arg;

X¹⁷ представляет Arg или His или Lys;

X¹⁸ представляет Asp или Asn или Glu;

или его фармацевтически приемлемой соли,

при условии, что, когда все X¹-X¹⁴ отсутствуют, то X¹⁵ представляет Asn, X¹⁶ представляет Met и X¹⁷ представляет Arg, то тогда X¹⁸ не может быть Asn.

Изобретение также обеспечивает производное A1M, т.е. X¹-X¹⁴-A1M, где A1M может быть любым A1M, полученным из видов, указанных в табл. 2 (т.е. человека, мыши, голого землекопа, лягушки, цыпленка, кролика, беличьей обезьяны, моржа, ламантина, камбалы и орангутанга). Заявители настоящего изобретения обнаружили, что включение X¹-X¹⁴ придает улучшенные свойства, по меньшей мере, человеческому A1M, и соответственно предполагается, что эта исходная последовательность также может придавать важные улучшенные свойства для A1M из других видов или рекомбинантному с видовой специфичностью A1M.

Настоящее изобретение также обеспечивает белок, полученный из A1M, имеющий аминокислотную последовательность формулы II:

X¹-X²-X³-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷-X⁸-X⁹-X¹⁰-X¹¹-X¹²-X¹³-X¹⁴-GPVPTPPDN IQVQENF-
X¹⁵-IS RIYGKWNLA IGSTCPWLKK I-X¹⁶-DRMTVSTL VLGEGATEAE ISMTST-X¹⁷-
WRK GVCEETSGAY EKTDTDGKFL YHKSXW-X¹⁸-ITM ESYVVHTNYD EYAI FLTKKF
SRNHGPTITA KLYGRAPQLR ETLLQDFRVV AQGVGIPEDS IFTMADRGE
VPGEQEPERI (формула II)

где присутствует по меньшей мере один X и (в пояснении приведены предложения для дополнительных замен) и

X¹ отсутствует или представляет Met или N-формил-Met ;

X² отсутствует или представляет His;

X³ отсутствует или представляет His;

X⁴ отсутствует или представляет His;

X⁵ отсутствует или представляет His;

X⁶ отсутствует или представляет His;

X⁷ отсутствует или представляет His;

X⁸ отсутствует или представляет His;

X⁹ отсутствует или представляет His;

X¹⁰ отсутствует или выбран из Asp и Glu, Lys и Arg;

X¹¹ отсутствует или выбран из Asp и Glu, Lys и Arg;

X¹² отсутствует или выбран из Asp и Glu, Lys и Arg;

X¹³ отсутствует или выбран из Asp и Glu, Lys и Arg;

X¹⁴ отсутствует или представляет Lys или Glu, Asp или Arg или Met или N-формил-Met;

X¹⁵ представляет Asp или Asn или Glu;

X¹⁶ представляет Met или Lys или Arg;

X¹⁷ представляет Arg или His или Lys;

X¹⁸ представляет Asp или Asn или Glu;

или его фармацевтически приемлемую соль,

при условии, что, когда все X¹-X¹⁴ отсутствуют, X¹⁵ представляет Asn, X¹⁶ представляет Met и X¹⁷ представляет Arg, то тогда X¹⁸ не может быть Asn.

Изобретение также обеспечивает производное A1M, т.е. X¹-X¹⁴-A1M, где A1M может быть любым A1M, полученным из видов, указанных в табл. 2 (т.е. человека, мыши, голого землекопа, лягушки, курицы, кролика, беличьей обезьяны, моржа, ламантина, камбалы и орангутанга), где A1M усечен на С-конце таким образом, что последовательность С-концевого тетрапептида LIPR не является частью белка.

Как следует из приведенных здесь примеров, заявители настоящего изобретения обнаружили, что

i) исходная последовательность X¹-X¹⁴, по-видимому, придает улучшенные свойства A1M;

ii) точечная мутация M41K, R66H или N17,96D молекулы A1M придает повышенную стабильность с сохраненной функцией A1M;

iii) мутации (M41K+R66H), (M41K+N17,96D), (R66H+N17,96D) и/или (M41K+R66H+N17,96D) придают повышенную растворимость и/или стабильность с сохраненной функцией;

iv) мутация (R66H+N17,96D) обеспечивала наилучшую общую функциональную активность в проведенных экспериментах;

v) тестировали A1M с мутациями (R66H+N17,96D) и исходные последовательности

MNNNNNNHHGGGGGEGEG (M8H5GIEGR),

MNNNNNNHDDDDK (M8H4DK),

МННННННННННННН (М6Н4ДК) или
МННННННННННН (М8Н)

в виде N-концевых последовательностей, и варианты белка с мутацией М8Н4ДК в виде N-концевой последовательности показали более высокую растворимость и/или стабильность по сравнению с другими N-концевыми удлинениями;

vi) усечение С-конца А1М, по-видимому, способствует улучшению связывания и деградации гема.

Интересно отметить, что последовательность данного N-концевого удлинения напоминает His-метку с сайтом расщепления энтерокиназой, но она не обладает способностью отщеплять His-метку из А1М, поскольку не включена аминокислота Ala. Наличие Ala в DDDKA указывает на сайт расщепления энтерокиназой. Таким образом, предполагается, что сама N-концевая последовательность придает А1М улучшенные свойства в отношении стабильности и растворимости белка, когда за повторами His-остатков следуют пять заряженных аминокислот.

Исходя из этих наблюдений, предполагается, что изменение белка А1М согласно указанным выше направлениям обеспечивает белки с функциональными свойствами А1М, но с улучшенными характеристиками относительно стабильности и/или растворимости.

Таким образом, настоящее изобретение относится ко всем возможным комбинациям А1М, содержащим X^1-X^{18} , как описано выше.

Более конкретно, следующие белки, полученные из А1М, входят в объем настоящего изобретения, при этом все белки могут быть полноразмерными, соответствующими человеческому А1М дикого типа; или могут быть усечены на С-конце, т.е. без LIPR.

Положение в hA1M				Соединение			
Метка	Мутации			X1	X2	X3	X4
Максимально широкое требование				Met/Отсутствует	His/Отсутствует	His/Отсутствует	His/Отсутствует
6-His	'в последовательности' мутации		2	(f)Met	His	His	His
8-His	'в последовательности' мутации		3	(f)Met	His	His	His
Без метки;	'в последовательности' мутации		4	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Любая метка	могут быть любыми		5	Met/отсутствует	His/отсутствует	His/отсутствует	His/отсутствует
Любая метка	M41K		6	Met/отсутствует	His/отсутствует	His/отсутствует	His/отсутствует
Без метки	N17, 96D		7	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	N17D		8	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	N17, 96D		9	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	N96D		10	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	N17, 96D, R66H		11	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	M41K		12	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	R66H		13	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	N17, 96D, M41K, R66H		14	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	N17D, R66H		15	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	R66H, N96D		16	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	M41K, R66H		17	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	N17, 96D, M41K		18	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	N17D, M41K		19	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	M41K, N96D		20	Met/Отсутствует	His/Отсутствует	His/Отсутствует	His/Отсутствует
Любая метка	N17, 96D, R66H		21	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	N17D, M41K, R66H		22	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Без метки	M41K, R66H, N96D		23	(f)Met	His	His	His
6His	N17D		24	(f)Met	His	His	His
6His	N17, 96D		25	(f)Met	His	His	His
6His	N96D		26	(f)Met	His	His	His
6His	N17, 96D, R66H						

Положение в hA1M		Соединение	X1	X2	X3	X4
Метка	Мутации					
6His	M41K	27	(f)Met	His	His	His
6His	R66H	28	(f)Met	His	His	His
6His	N17,96D, M41K, R66H	29	(f)Met	His	His	His
6His	N17D, R66H	30	(f)Met	His	His	His
6His	R66H, N96D	31	(f)Met	His	His	His
6His	M41K, R66H	32	(f)Met	His	His	His
6His	N17,96D, M41K	33	(f)Met	His	His	His
6His	N17D, M41K	34	(f)Met	His	His	His
6His	M41K, N96D	35	(f)Met	His	His	His
6His	N17D, M41K, R66H	36	(f)Met	His	His	His
6His	M41K, R66H, N96D	37	(f)Met	His	His	His
8His	N17D	38	(f)Met	His	His	His
8His	N17,96D	39	(f)Met	His	His	His
8His	N96D	40	(f)Met	His	His	His
8His	N17,96D, R66H	41	(f)Met	His	His	His
8His	M41K	42	(f)Met	His	His	His
8His	R66H	43	(f)Met	His	His	His
8His	N17,96D, M41K, R66H	44	(f)Met	His	His	His
8His	N17D, R66H	45	(f)Met	His	His	His
8His	R66H, N96D	46	(f)Met	His	His	His
8His	M41K, R66H	47	(f)Met	His	His	His
8His	N17,96D, M41K	48	(f)Met	His	His	His
8His	N17D, M41K	49	(f)Met	His	His	His
8His	M41K, N96D	50	(f)Met	His	His	His
8His	N17D, M41K, R66H	51	(f)Met	His	His	His
8His	M41K, R66H, N96D	52	(f)Met	His	His	His

Положение в hAlM		Соединение (продолжение)	N-концевая 'метка'						
Метка	Мутации		X5	X6	X7	X8	X9	X10	
Максимально требование	широкое	1	His/Отсутств ует	His/Отсутств ует	His/Отсутст вует	His/Отсутст вует	His/Отсутст вует	Asp/Отсутств е т/Glu/Lys/Arg	
6-His	последовательности мутации могут быть любыми	2	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp	
8-His	последовательности мутации могут быть любыми	3	His	His	His	His	His	Asp	
Без метки;	последовательности мутации могут быть любыми	4	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Любая метка	M41K	5	His/Отсутств ует	His/Отсутств ует	His/Отсутст вует	His/Отсутст вует	His/Отсутст вует	Asp/Отсутств е т/Glu/Lys/Arg	
Любая метка	N17, 96D	6	His/Отсутств ует	His/Отсутств ует	His/Отсутст вует	His/Отсутст вует	His/Отсутст вует	Asp/Отсутств е т/Glu/Lys/Arg	
Без метки	N17D	7	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	N17, 96D	8	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	N96D	9	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	N17, 96D, R66H	10	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	M41K	11	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	R66H	12	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	N17, 96D, M41K, R66H	13	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	N17D, R66H	14	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	R66H, N96D	15	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	M41K, R66H	16	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	N17, 96D, M41K	17	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	N17D, M41K	18	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	M41K, N96D	19	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Любая метка	N17, 96D, R66H	20	His/Отсутств ует	His/Отсутств ует	His/Отсутст вует	His/Отсутст вует	His/Отсутст вует	Asp/Отсутств е т/Glu/Lys/Arg	
Без метки	N17D, M41K, R66H	21	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Без метки	M41K, R66H, N96D	22	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
6His	N17D	23	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp	
6His	N17, 96D	24	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp	
6His	N96D	25	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp	
6His	N17, 96D, R66H	26	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp	

Положение в hAlM		Соединение (продолжение)	N-концевая 'метка'					
Метка	Мутации		X5	X6	X7	X8	X9	X10
6His	M41K	27	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp
6His	R66H	28	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp
6His	N17,96D, M41K, R66H	29	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp
6His	N17D, R66H	30	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp
6His	R66H, N96D	31	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp
6His	M41K, R66H	32	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp
6His	N17,96D, M41K	33	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp
6His	N17D, M41K	34	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp
6His	M41K, N96D	35	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp
6His	N17D, M41K, R66H	36	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp
6His	M41K, R66H, N96D	37	His	His	His	Отсутствует	Отсутствует	Asp
8His	N17D	38	His	His	His	His	His	Asp
8His	N17,96D	39	His	His	His	His	His	Asp
8His	N96D	40	His	His	His	His	His	Asp
8His	N17,96D, R66H	41	His	His	His	His	His	Asp
8His	M41K	42	His	His	His	His	His	Asp
8His	R66H	43	His	His	His	His	His	Asp
8His	N17,96D, M41K, R66H	44	His	His	His	His	His	Asp
8His	N17D, R66H	45	His	His	His	His	His	Asp
8His	R66H, N96D	46	His	His	His	His	His	Asp
8His	M41K, R66H	47	His	His	His	His	His	Asp
8His	N17,96D, M41K	48	His	His	His	His	His	Asp
8His	N17D, M41K	49	His	His	His	His	His	Asp
8His	M41K, N96D	50	His	His	His	His	His	Asp
8His	N17D, M41K, R66H	51	His	His	His	His	His	Asp
8His	M41K, R66H, N96D	52	His	His	His	His	His	Asp
Положение в hAlM		Соединение (продолжение)	X11 X12 X13					
Метка	Мутации							
Максимально широкое требование 'в последовательности'		1	Asp/Отсутствует/Glu u/Lys/Arg					
6-His	могут быть любыми	2	Asp					
8-His	в последовательности	3	Asp					
Без метки	могут быть любыми	4	Отсутствует					
Любая метка	могут быть любыми	5	Asp/Отсутствует/Glu u/Lys/Arg					
Любая метка		6	Asp/Отсутствует/Glu u/Lys/Arg					
Без метки	N17,96D	7	Отсутствует					
Без метки	N17D	8	Отсутствует					
Без метки	N17,96D	9	Отсутствует					
Без метки	N96D	10	Отсутствует					
Без метки	N17,96D, R66H	11	Отсутствует					
Без метки	M41K	12	Отсутствует					
Без метки	R66H	13	Отсутствует					
Без метки	N17,96D, M41K, R66H	14	Отсутствует					
Без метки	N17D, R66H	15	Отсутствует					
Без метки	R66H, N96D	16	Отсутствует					
Без метки	M41K, R66H	17	Отсутствует					
Без метки	N17,96D, M41K	18	Отсутствует					
Без метки	N17D, M41K	19	Отсутствует					
Без метки	M41K, N96D	20	Asp/Отсутствует/Glu u/Lys/Arg					
Любая метка	N17,96D, R66H	21	Отсутствует					
Без метки	N17D, M41K, R66H	22	Отсутствует					
Без метки	M41K, R66H, N96D	23	Asp					
6His	N17D	24	Asp					
6His	N17,96D	25	Asp					
6His	N96D	26	Asp					
6His	N17,96D, R66H		Asp					

Положение в hAlM		Соединение					
Метка	Мутации	(продолжение)	X11	X12	X13		
6His	M41K	27	Asp	Asp	Asp		
6His	R66H	28	Asp	Asp	Asp		
6His	N17,96D, M41K, R66H	29	Asp	Asp	Asp		
6His	N17D, R66H	30	Asp	Asp	Asp		
6His	R66H, N96D	31	Asp	Asp	Asp		
6His	M41K, R66H	32	Asp	Asp	Asp		
6His	N17,96D, M41K	33	Asp	Asp	Asp		
6His	N17D, M41K	34	Asp	Asp	Asp		
6His	M41K, N96D	35	Asp	Asp	Asp		
6His	N17D, M41K, R66H	36	Asp	Asp	Asp		
6His	M41K, R66H, N96D	37	Asp	Asp	Asp		
8His	N17D	38	Asp	Asp	Asp		
8His	N17,96D	39	Asp	Asp	Asp		
8His	N96D	40	Asp	Asp	Asp		
8His	N17,96D, R66H	41	Asp	Asp	Asp		
8His	M41K	42	Asp	Asp	Asp		
8His	R66H	43	Asp	Asp	Asp		
8His	N17,96D, M41K, R66H	44	Asp	Asp	Asp		
8His	N17D, R66H	45	Asp	Asp	Asp		
8His	R66H, N96D	46	Asp	Asp	Asp		
8His	M41K, R66H	47	Asp	Asp	Asp		
8His	N17,96D, M41K	48	Asp	Asp	Asp		
8His	N17D, M41K	49	Asp	Asp	Asp		
8His	M41K, N96D	50	Asp	Asp	Asp		
8His	N17D, M41K, R66H	51	Asp	Asp	Asp		
8His	M41K, R66H, N96D	52	Asp	Asp	Asp		

Положение в hAlM		Соединение		Метка'/первая AA	17	41	66	96
Метка	Мутации	(продолжение)	X14	X15	X16	X17	X18	
Максимально широкое требование		1	Lys/(f)Met/Отсутствует/Glu/Asp/Arg	Asp/Asn	Met/Lys/Arg	Arg/His/Lys	Asp/Asn	
6-His	'в последовательности мутации могут быть любыми	2	Lys	Asp/Asn	Met/Lys/Arg	Arg/His/Lys	Asp/Asn	
8-His	в последовательности мутации могут быть любыми	3	Lys	Asp/Asn	Met/Lys/Arg	Arg/His/Lys	Asp/Asn	
Без метки;	в последовательности мутации могут быть любыми	4	Отсутствует	Asp/Asn	Met/Lys/Arg	Arg/His/Lys	Asp/Asn	
Любая метка	M41K	5	Lys/(f)Met/Отсутствует/Glu/Asp/Arg	Asn	Lys	Arg	Asn	
Любая метка	N17,96D	6	Lys/(f)Met/Отсутствует/Glu/Asp/Arg	Asp	Met	Arg	Asp	
Без метки	N17D	7	(f)Met	Asp	Met	Arg	Asn	
Без метки	N17,96D	8	(f)Met	Asp	Met	Arg	Asp	
Без метки	N96D	9	(f)Met	Asn	Met	Arg	Asp	
Без метки	N17,96D, R66H	10	(f)Met	Asp	Met	His	Asp	
Без метки	M41K	11	(f)Met	Asn	Lys	Arg	Asn	
Без метки	R66H	12	(f)Met	Asp	Met	His	Asn	
Без метки	N17,96D, M41K, R66H	13	(f)Met	Asp	Lys	His	Asp	
Без метки	N17D, R66H	14	(f)Met	Asp	Met	His	Asn	
Без метки	R66H, N96D	15	(f)Met	Asn	Met	His	Asp	
Без метки	M41K, R66H	16	(f)Met	Asn	Lys	His	Asn	
Без метки	N17,96D, M41K	17	(f)Met	Asp	Lys	Arg	Asp	
Без метки	N17D, M41K	18	(f)Met	Asp	Lys	Arg	Asn	
Без метки	M41K, N96D	19	(f)Met	Asn	Lys	Arg	Asp	
Любая метка	N17,96D, R66H	20	Lys/(f)Met/Отсутствует/Glu/Asp/Arg	Asp	Met	His	Asp	
Без метки	N17D, M41K, R66H	21	(f)Met	Asp	Lys	His	Asn	
Без метки	M41K, R66H, N96D	22	(f)Met	Asn	Lys	His	Asp	
6His	N17D	23	Lys	Asp	Met	Arg	Asn	
6His	N17,96D	24	Lys	Asp	Met	Arg	Asp	
6His	N96D	25	Lys	Asn	Met	Arg	Asp	
6His	N17,96D, R66H	26	Lys	Asp	Met	His	Asp	

Положение в hA1M		Соединение	Метка'/первая AA	17	41	66	96
Метка	Мутации	(продолжени е)	X14	X15	X16	X17	X18
6His	M41K	27	Lys	Asn	Lys	Arg	Asn
6His	R66H	28	Lys	Asn	Met	His	Asn
6His	N17,96D, M41K, R66H	29	Lys	Asp	Lys	His	Asp
6His	N17D, R66H	30	Lys	Asp	Met	His	Asn
6His	R66H, N96D	31	Lys	Asn	Met	His	Asp
6His	M41K, R66H	32	Lys	Asn	Lys	His	Asn
6His	N17,96D, M41K	33	Lys	Asp	Lys	Arg	Asp
6His	N17D, M41K	34	Lys	Asp	Lys	Arg	Asn
6His	M41K, N96D	35	Lys	Asn	Lys	Arg	Asp
6His	N17D, M41K, R66H	36	Lys	Asp	Lys	His	Asn
6His	M41K, R66H, N96D	37	Lys	Asn	Lys	His	Asp
8His	N17D	38	Lys	Asp	Met	Arg	Asn
8His	N17,96D	39	Lys	Asp	Met	Arg	Asp
8His	N96D	40	Lys	Asn	Met	Arg	Asp
8His	N17,96D, R66H	41	Lys	Asp	Met	His	Asp
8His	M41K	42	Lys	Asn	Lys	Arg	Asn
8His	R66H	43	Lys	Asn	Met	His	Asn
8His	N17,96D, M41K, R66H	44	Lys	Asp	Lys	His	Asp
8His	N17D, R66H	45	Lys	Asp	Met	His	Asn
8His	R66H, N96D	46	Lys	Asn	Met	His	Asp
8His	M41K, R66H	47	Lys	Asn	Lys	His	Asn
8His	N17,96D, M41K	48	Lys	Asp	Lys	Arg	Asp
8His	N17D, M41K	49	Lys	Asp	Lys	Arg	Asn
8His	M41K, N96D	50	Lys	Asn	Lys	Arg	Asp
8His	N17D, M41K, R66H	51	Lys	Asp	Lys	His	Asn
8His	M41K, R66H, N96D	52	Lys	Asn	Lys	His	Asp
Положение в hA1M		Соединени е (продолже ние)	Комментарий				
Метка	Mutations						
Максимально широкое требование		1	При условии:	когда все X1-X14 отсутствуют, X15 представляет Asn, X16 и X17 представляют Arg, то тогда X18 не может быть Asn			
'в последовательности							
мутации могут быть		2					
6-His	любыми						
в последовательности							
8-His	мутации могут быть	3					
любыми							
в последовательности			При условии:	когда X15 представляет Asn, X16 представляет Met, и X17 представляет Arg, то тогда X18 не может быть Asn			
мутации могут быть		4					
любыми							
Без метки;							
Любая метка	M41K	5					
Любая метка	N17,96D	6					
Без метки	N17D	7					
Без метки	N17,96D	8					
Без метки	N96D	9					
Без метки	N17,96D, R66H	10	Предпочтительная мутация без метки				
Без метки	M41K	11					
Без метки	R66H	12					
Без метки	N17,96D, M41K, R66H	13	Все мутации				
Без метки	N17D, R66H	14					
Без метки	R66H, N96D	15					
Без метки	M41K, R66H	16					
Без метки	N17,96D, M41K	17					
Без метки	N17D, M41K	18					
Без метки	M41K, N96D	19					
Любая метка	N17,96D, R66H	20					
Без метки	N17D, M41K, R66H	21					
Без метки	M41K, R66H, N96D	22					
6His	N17D	23					
6His	N17,96D	24					
6His	N96D	25					
6His	N17,96D, R66H	26	Предпочтительная мутация с 6His				

Метка	Положение в hA1M	Соединение (продолжение)	Комментарий
6His	Мутации		
	M41K	27	
6His	R66H	28	
6His	N17, 96D, M41K, R66H	29	
6His	N17D, R66H	30	
6His	R66H, N96D	31	
6His	M41K, R66H	32	
6His	N17, 96D, M41K	33	
6His	N17D, M41K	34	
6His	M41K, N96D	35	
6His	N17D, M41K, R66H	36	
6His	M41K, R66H, N96D	37	
8His	N17D	38	
8His	N17, 96D	39	
8His	N96D	40	
8His	N17, 96D, R66H	41	Предпочтительная мутация с 8His
8His	M41K	42	
8His	R66H	43	
8His	N17, 96D, M41K, R66H	44	
8His	N17D, R66H	45	
8His	R66H, N96D	46	
8His	M41K, R66H	47	
8His	N17, 96D, M41K	48	
8His	N17D, M41K	49	
8His	M41K, N96D	50	
8His	N17D, M41K, R66H	51	
8His	M41K, R66H, N96D	52	

Альфа-1-микроглобулин - общая исходная информация

A1M синтезируется в печени на высоком уровне, секретируется в кровотоки и переносится через стенки сосудов во внесосудистый компартмент всех органов. Белок также синтезируется в других тканях (клетках крови, головном мозге, почках, коже), но на более низком уровне. За счет небольшого размера свободный A1M быстро фильтруется из крови в почках.

A1M является членом суперсемейства липокалинов, группы белков животных, растений и бактерий с консервативной трехмерной структурой, но очень разнообразными функциями. Каждый липокалин состоит из цепи 160-190 аминокислотных остатков, которая складывается в карман структуры β-бочонка с гидрофобной внутренней частью. Известно по меньшей мере двенадцать генов человеческих липокалинов. A1M представляет собой плазматический и тканевой белок с молекулярной массой 26 кДа, который к настоящему времени был обнаружен у млекопитающих, птиц, рыб и лягушек. Трехмерная структура A1M, определенная рентгеновской кристаллографией, показана на фиг. 10. A1M синтезируется в печени на высоком уровне, секретируется в кровотоки и быстро (T_{1/2}=2-3 мин) переносится через стенки сосуда во внесосудистый компартмент всех органов. A1M обнаружен как в виде свободной мономерной формы, так и в виде ковалентных комплексов с более крупными молекулами (IgA, альбумином, протромбином) в крови и интерстициальных тканях. За счет небольшого размера, свободный A1M быстро фильтруется из крови в почках. Большая часть затем реадсорбируется, но значительные количества выделяются с мочой.

Антиоксиданты являются защитными факторами, которые удаляют окислители или предупреждают вредные последствия окислительных реакций. Организм человека может продуцировать антиоксиданты в ответ на окислительный стресс. Такие эндогенные антиоксиданты включают супероксиддисмутазу, фермент, разрушающий супероксиды (SOD), каталазу и глутатионпероксидазу, ферменты, разрушающие пероксиды водорода, и гемоксигеназу-1, фермент, разрушающий гем (HO-1). Недавно было показано, что A1M участвует в защите тканей от окислительного повреждения, функционируя в качестве акцептора свободных радикалов и гема, а также редуктазы и ингибитора окисления. В нескольких недавно опубликованных статьях было показано, что A1M защищает клеточные культуры и эксплантаты органов от окислительного повреждения, частично посредством накопления в митохондриях и защиты митохондриальной функции. Действительно, инфузия человеческого рекомбинантного A1M была успешно использована для лечения *in vivo* преэклампсии, связанной с окислительным стрессом, и индуцированных гемо-

глобином повреждений клубочкового аппарата на животных моделях. Последовательность и структурные свойства A1M.

Известна полная последовательность человеческого A1M. Белок состоит из полипептида с 183 аминокислотными остатками. Было обнаружено, выделено и/или секвенировано много дополнительных кДНК и/или белков A1M из других млекопитающих, птиц, амфибий и рыб. Длина пептидной цепи A1M незначительно различается среди видов, в основном за счет изменений на С-конце. Сравнение выравниванием различных выведенных аминокислотных последовательностей показывает, что процент идентичности варьируется в пределах примерно 75-80% между грызунами или представителями когорты *Ferungulata* и человеком, примерно на уровне 45% между рыбами и млекопитающими. Свободная боковая цепь цистеина в положении 34 сохраняется. Показано, что эта группа участвует в редокс-реакциях (см. ниже), в сложном образовании с другими белками плазмы и в связывании с желто-коричневым хромофором. Трехмерная структура A1M показывает, что C34 является гидрофильным и расположенным около отверстия липокалинового кармана (см. фиг. 10).

В контексте настоящего изобретения термин " α_1 -микроглобулин" предназначен для охвата α_1 -микроглобулина, последовательность которого показана в SEQ ID NO: 1 (человеческий A1M), SEQ ID NO: 2 (человеческий рекомбинантный A1M) и A1M от других видов, включая их гомологи, фрагменты или варианты, обладающие сходной терапевтической активностью. Таким образом, как здесь используется, термин A1M предназначен для обозначения белка, обладающего по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Как здесь используется, предпочтительно, чтобы A1M обладал по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Как здесь используется, еще более предпочтительно, чтобы A1M обладал по меньшей мере 95%, например 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В предпочтительном аспекте α_1 -микроглобулин соответствует SEQ ID NO: 1 или 2, как здесь определено. В списке последовательностей приведены аминокислотные последовательности человеческого A1M и человеческого рекомбинантного A1M (SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно). Однако гомологи, варианты и фрагменты A1M, имеющие важные участки белков, определенные ниже, также входят в понятие термина A1M, как здесь используется. В отношении выравнивания/идентичности см. следующий абзац.

Подробная информация о выравнивании/идентификации

Положения аминокислотных остатков здесь относятся к положениям в человеческом wt-A1M, который обнаружен в плазме крови человека (SEQ ID NO: 1). В отношении аминокислотных остатков в рекомбинантном A1M, который содержит остаток метионина или N-формилметионина, связанный на N-конце с остатком глицина, который является исходным остатком в wt-A1M (SEQ ID NO: 2), или в мутантном человеческом A1M или A1M из других видов, то специалист в данной области поймет, как идентифицировать остатки, соответствующие остаткам в человеческом wt-A1M (SEQ ID NO: 1), даже, когда положения смещены за счет, например, делеций или инсерций.

Когда продуцируются рекомбинантные белки, то чаще всего они начинаются с исходного остатка Met, который может быть удален, например, при участии метионинаминопептидазы или другого фермента с аналогичной активностью. Представленные здесь варианты A1M могут быть с исходным остатком Met или без него.

Гомологи A1M

Как указывалось выше, гомологи A1M также можно использовать в соответствии с описанием, представленным в настоящем документе. Теоретически A1M из всех видов может использоваться для описанных здесь целей, включая наиболее примитивные, найденные к настоящему времени, которые происходят из рыб (камбалы). A1M также доступен в выделенной форме от человека, орангутанга, белой обезьяны, крысы, голубого землекопа, мыши, кролика, морской свинки, коровы, лягушки, цыпленка, моржа, ламантина и камбалы.

В отношении гомологов, вариантов и фрагментов A1M, в качестве фрагментов белка, важных для антиокислительного эффекта, были идентифицированы следующие:

- Y22 (тирозин, положение 22, п.о. 64-66);
- C34 (цистеин, положение 34, п.о. 100-102);
- K69 (лизин, положение 69, п.о. 205-207);
- K92 (лизин, положение 92, п.о. 274-276);
- K118 (лизин, положение 118, п.о. 352-354);
- K130 (лизин, положение 130, п.о. 388-390);
- Y132 (тирозин, положение 132, п.о. 394-396);
- L180 (лейцин, положение 180, п.о. 538-540);
- I181 (изолейцин, положение 181, п.о. 541-543);
- P182 (пролин, положение 182, п.о. 544-546);
- R183 (аргинин, положение 183, п.о. 547-549).

Нумерация аминокислот и нуклеотидов по всему тексту настоящего документа относится к SEQ ID 1; если используются другие A1M из других видов, аналоги A1M или их рекомбинантные последова-

тельности, то специалист в данной области будет знать, как идентифицировать аминокислоты, соответствующие аминокислотам в SEQ ID NO: 1.

Таким образом, в тех случаях, когда A1M, например, обладает 80% (или 90%, или 95%) идентичностью последовательности с одной из последовательностей SEQ ID NO: 1 или 2, то предпочтительно, чтобы вышеуказанные аминокислоты присутствовали в соответствующих участках в молекуле.

Человеческий A1M замещен олигосахаридами в трех положениях, двумя сиалилированными сложного типа, вероятно, диантенными углеводами, связанными с N17 и N96, и еще одним простым олигосахаридом, связанным с T5. Содержание углеводов в белках A1M из разных видов сильно варьирует, начиная от отсутствия гликозилирования вообще в *Xenopus leavis* до спектра различных паттернов гликозилирования. Однако один сайт гликозилирования, соответствующий N96 у человека, сохраняется у млекопитающих, что указывает на то, что данный специфический углевод может быть более важной составляющей белка, чем два других олигосахарида.

A1M имеет желто-коричневый цвет при выделении из плазмы или мочи. Цвет обусловлен наличием гетерогенных соединений, ковалентно связанных с различными аминокислотными боковыми группами, преимущественно расположенными у входа в карман. Эти модификации представляют собой окисленные продукты деградации органических окислителей, ковалентно захваченных A1M *in vivo*, например гема, кинуренина и тирозильных радикалов.

A1M также является неоднородным по заряду и размеру, и более сильно окрашенные в коричневый цвет молекулы A1M являются более отрицательно заряженными. Вероятное объяснение такой неоднородности заключается в том, что различные боковые группы модифицируются в различной степени разными радикалами и что модификации изменяют суммарный заряд белка. Ковалентно связанные окрашенные соединения локализованы в C34 и K92, K118 и K130, последние с молекулярными массами от 100 до 300 Да. Метаболит кинуренинового пути обмена триптофана был обнаружен ковалентно присоединенным к остаткам лизина в A1M из мочи пациентов, находящихся на гемодиализе и, по-видимому, в этом случае является причиной коричневого цвета белка [6]. Окисленные фрагменты синтетического радикала ABTS (2,2'-азино-ди-(3-этилбензотиазолин)-6-сульфоновой кислоты) были связаны с боковыми цепями Y22 и Y132.

C34 представляет реактивный центр A1M. Он становится высокоэлектроотрицательным, означая, что он имеет высокий потенциал для отвода электронов посредством близости положительно заряженных боковых цепей K69, K92, K118 и K130, которые индуцируют депротонирование C34 тиоловой группы, что является необходимым условием окисления атома серы. Предварительные данные показывают, что C34 является одной из наиболее известных электроотрицательных групп.

Теоретически аминокислоты, которые определяют свойства A1M (C34, Y22, K92, K118, K130, Y132, L180, I181, P182, R183), которые будут описаны более подробно ниже, могут располагаться в аналогичной трехмерной конфигурации в другой рамке считывания, например, белка с таким же общим фолдингом (другой липокалин) или полностью искусственной органической или неорганической молекулы, такой как синтетический полимер, наночастица или металл-полимер.

Трехмерное расположение некоторых этих аминокислот (синие эллипсы, лизины изображены "+"), A1M-рамка считывания ("бочонок"), электронный поток и захват радикалов на фиг. 10.

Следовательно, предпочтительными являются гомологи, фрагменты или варианты, содержащие структуру, включающую реактивный центр и его окружение, как показано выше.

Модификации и изменения были внесены в структуру полипептидов по настоящему изобретению, которые обеспечивали молекулу, имеющую аналогичные функциональные характеристики, как и исходный полипептид (например, консервативная аминокислотная замена). Например, некоторые аминокислоты могут быть заменены на другие аминокислоты в последовательности без существенной потери активности. Поскольку интерактивная способность и природа полипептида определяет биологическую функциональную активность полипептида, то можно ввести некоторые аминокислотные замены в полипептидную последовательность и тем не менее получить полипептид с аналогичными функциональными свойствами.

При осуществлении таких изменений может быть учтен гидропатический индекс аминокислот. Важность гидропатического индекса аминокислот в придании интерактивной биологической функции полипептиду хорошо известна в данной области. Известно, что некоторые аминокислоты могут быть замещены на другие аминокислоты, имеющие аналогичный гидропатический индекс или показатель, и по-прежнему приводя к получению полипептида с аналогичной биологической активностью. Каждой аминокислоте был присвоен гидропатический индекс на основании ее гидрофобности и характеристик заряда. Такими показателями являются: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистеин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9); и аргинина (-4,5).

Полагается, что относительный гидропатический характер аминокислоты определяет вторичную структуру полученного полипептида, которая, в свою очередь, определяет взаимодействие полипептида с другими молекулами, такими как ферменты, субстраты, рецепторы, антитела, антигены и тому подоб-

ное. В данной области известно, что аминокислота может быть заменена другой аминокислотой, имеющей аналогичный гидропатический индекс, и все же можно получить функционально эквивалентный полипептид. При таких изменениях замена аминокислот, у которых гидропатические индексы находятся в пределах ± 2 , являются предпочтительными, особенно предпочтительными являются те, которые имеют данный показатель в пределах ± 1 , и наиболее предпочтительными в пределах $\pm 0,5$.

Замена подобных аминокислот также может быть сделана на основе гидрофильности, особенно где биологически функциональный эквивалентный полипептид или пептид, созданный таким образом, предназначен для применения в иммунологических вариантах осуществления. Аминокислотным остаткам были даны следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспартат (+3,0 $\pm$ 1); глутамат (+3,0 $\pm$ 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); пролин (-0,5 $\pm$ 1); треонин (-0,4); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5); триптофан (-3,4). Следует понимать, что аминокислота может быть заменена другой аминокислотой, имеющей сходное значение гидрофильности и все еще давая биологически эквивалентный, и в частности иммунологически эквивалентный полипептид. При таких изменениях замена аминокислот, у которых значения гидрофильности находятся в пределах ± 2 , являются предпочтительными, особенно предпочтительными являются те, которые имеют данный показатель в пределах ± 1 , и наиболее предпочтительными в пределах $\pm 0,5$.

Как указано выше, аминокислотные замены в основном основаны на относительном сходстве заместителей в боковой цепи аминокислоты, например их гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и тому подобное. Примеры замен, которые учитывают различные указанные выше характеристики, хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, не ограничиваясь этим (исходный остаток: примерная замена)

(Ala:

Gly, Ser), (Arg: Lys), (Asn: Gln, His), (Asp: Glu, Cys, Ser),
(Gln: Asn), (Glu: Asp), (Gly: Ala), (His: Asn, Gln), (Ile: Leu,
Val), (Leu: Ile, Val), (Lys: Arg), (Met: Leu, Tyr), (Ser: Thr),
(Thr: Ser), (Trp: Tyr), (Tyr: Trp, Phe) и (Val: Ile, Leu).

Таким образом, варианты осуществления настоящего раскрытия включают функциональные или биологические эквиваленты полипептида, как указано выше. В частности, варианты осуществления полипептидов могут включать варианты, имеющие примерно 50, 60, 70, 80, 90 и 95% идентичности последовательности с представляющим интерес полипептидом.

В контексте настоящего изобретения гомология между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя последовательностями нуклеиновых кислот описывается параметром "идентичность" (см. также выше). Выравнивание последовательностей и вычисление баллов гомологии может быть выполнено с использованием полного выравнивания Смита-Ватермана, пригодного как для выравнивания белков, так и для ДНК. Матрицы оценки по умолчанию BLOSUM50 и матрица идентичности используются для выравнивания белков и ДНК соответственно. Штраф за первый остаток в гэпе составляет -12 для белков и -16 для ДНК, тогда как штраф за дополнительные остатки в гэпе составляет -2 для белков и -4 для ДНК. Выравнивание можно проводить с версией пакета FASTA v20u6.

Множественные выравнивания белковых последовательностей могут быть сделаны с использованием алгоритма "ClustalW". Множественные выравнивания последовательностей ДНК могут быть выполнены с использованием выравнивания белка в качестве матрицы, заменяя аминокислоты соответствующим кодоном из последовательности ДНК.

Альтернативно для выравнивания аминокислотных последовательностей и последовательностей ДНК можно использовать другое программное обеспечение. Выравнивание двух аминокислотных последовательностей представляет собой, например, определение с помощью программы Needle из пакета EMBOSS (<http://emboss.org>) версии 2.8.0. Программа Needle реализует алгоритм глобального выравнивания. Используемая матрица замещения представляет BLOSUM62, штраф за открытие гэпа равен 10, и штраф за удлинение гэпа равен 0,5.

Степень идентичности между аминокислотной последовательностью, например SEQ ID NO: 1, и другой аминокислотной последовательностью (например, SEQ ID NO: 2) вычисляют в виде числа точных совпадений при выравнивании двух последовательностей, деленное на длину "SEQ ID NO: 1" или длину "SEQ ID NO: 2", в зависимости от того, какая последовательность является самой короткой. Результат выражается в процентах идентичности. См. выше информацию относительно выравнивания и идентичности.

Точное совпадение имеет место, когда две последовательности имеют одинаковые аминокислотные остатки в одинаковых положениях при наложении.

При необходимости степень идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определена методом Уилбера-Липмана с использованием программного обеспечения LASER-GENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) с таблицей идентификации и следующими

многочисленными параметрами выравнивания: штраф за гэн 10 и штраф за длину гэпа 10 баллов. Парные параметры выравнивания представляют $K_{tuple}=3$, штраф за гэн=3 и окна=20.

Процент идентичности аминокислотной последовательности полипептида, с или к, аминокислотам SEQ ID NO: 1 может быть определен: i) выравниванием двух аминокислотных последовательностей с использованием программы Needle с матрицей замены BLOSUM62, штрафом за открытие гэпа 10 и штрафом за удлинение гэпа 0,5; ii) подсчетом числа точных совпадений при выравнивании; iii) делением числа точных совпадений на длину самой короткой из двух аминокислотных последовательностей и iv) преобразованием результата деления iii) в проценты. Процент идентичности, к или с, другим последовательностям по изобретению рассчитывается аналогичным образом.

В качестве примера полипептидная последовательность может быть идентична референсной последовательности, которая должна быть на 100% идентичной или может включать определенное целое число аминокислотных изменений по сравнению с референсной последовательностью, так что идентичность в % будет ниже 100%. Такие изменения выбраны из по меньшей мере, делеции одной аминокислоты, замены (включая консервативную и неконсервативную замену) или инсерции, и где указанные изменения могут иметь место в положениях на аминоконце или карбоксиконце референсной полипептидной последовательности или где-либо между этими концевыми положениями, располагаются либо индивидуально среди аминокислот в референсной последовательности, либо в одной или нескольких смежных группах в референсной последовательности.

Консервативные варианты аминокислот могут также включать неприродные аминокислотные остатки. Не встречающиеся в природе аминокислоты включают, без ограничения, транс-3-метилпролин, 2,4-метанопролин, цис-4-гидроксипролин, транс-4-гидроксипролин, N-метилглицин, аллотреонин, метилтреонин, гидроксиэтилцистеин, гидроксиэтилгомоцистеин, нитроглутамин, гомоглутамин, пипеколиновую кислоту, тиазолидинкарбоновую кислоту, дегидропролин, 3- и 4-метилпролин, 3,3-диметилпролин, трет-лейцин, норвалин, 2-азафенилаланин, 3-азафенилаланин, 4-азафенилаланин и 4-фторфенилаланин. В данной области известно несколько способов включения в белки не встречающихся в природе аминокислотных остатков. Например, можно использовать систему *in vitro*, в которой нонсенс-мутации подавляются с использованием химически аминокислотированных супрессорных тРНК. Способы синтеза аминокислот и аминокислотирующей тРНК известны в данной области. Транскрипцию и трансляцию плазмид, содержащих нонсенс-мутации, проводят в бесклеточной системе, содержащей экстракт *E. coli* и коммерчески доступные ферменты и другие реагенты. Белки очищают хроматографией. Во втором способе трансляцию проводят в ооцитах *Xenopus* микроинъекцией мутированной мРНК и химически аминокислотированных супрессорных тРНК. В третьем способе клетки *E. coli* культивируют в отсутствие природной аминокислоты, которая должна быть заменена (например, фенилаланин), и в присутствии желаемой неприродной аминокислоты (аминокислот) (например, 2-азафенилаланина, 3-азафенилаланина, 4-азафенилаланина или 4-фторфенилаланина). Не встречающаяся в природе аминокислота вводится в белок вместо ее природного аналога. Встречающиеся в природе аминокислотные остатки могут быть превращены в не встречающиеся в природе виды химической модификацией *in vitro*. Химическую модификацию можно объединить с сайт-направленным мутагенезом для дальнейшего расширения ряда замен.

Альтернативные химические структуры, обеспечивающие трехмерную структуру, достаточную для поддержания антиокислительных свойств A1M, могут быть обеспечены другими технологиями, например, искусственными скаффолдами, аминокислотными заменами и тому подобное. Кроме того, структуры, имитирующие активные сайты A1M, как указано выше, рассматриваются как имеющие аналогичную терапевтическую или физиологическую функцию, что и A1M.

Фармацевтические композиции и дозировка

Настоящее изобретение также обеспечивает набор, включающий

- i) фармацевтическую композицию, содержащую контрастное вещество, и
- ii) фармацевтическую композицию, содержащую A1M с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-10 и 17, или любой из белков, полученных из A1M, указанных здесь (или мутант, аналог, фрагмент или вариант, как здесь определено).

Ниже приводится список последовательностей. Изобретение охватывает все возможные варианты, например такие, как приведенные здесь.

SEQ ID NO: 1: wt hA1M

SEQ ID NO: 2: rhA1M (т.е. Met-A1M)

SEQ ID NO: 3: предпочтительная мутация без «удлинения» -

N17,96D, R66H

SEQ ID NO: 4: без удлинения, M41K

SEQ ID NO: 5: предпочтительная мутация с 6His, N17,96D, R66H

SEQ ID NO: 6: 6His, M41K

SEQ ID NO: 7: предпочтительная мутация с удлинением 8His, N17,96D, R66H

SEQ ID NO: 8: 8His, M41K

SEQ ID NO: 9: удлинение+wt hA1M

SEQ ID NO: 10: идентичный A1M с возможными удлинениями

SEQ ID NO: 11-16: сегменты wt hA1M

SEQ ID NO: 17: идентичный A1M, усеченный на С-конце, с возможными удлинениями

SEQ ID NO: 18: предпочтительная мутация без «удлинения» - N17,96D, R66; усеченный на С-конце

SEQ ID NO: 19: без удлинения, M41K; усеченный на С-конце

SEQ ID NO: 20: предпочтительная мутация с 6His, N17,96D, R66H; усеченный на С-конце

SEQ ID NO: 21: 6His, M41K; усеченный на С-конце

SEQ ID NO: 22: предпочтительная мутация с удлинением 8His, N17,96D, R66H; усеченный на С-конце

SEQ ID NO: 23: 8His, M41K; усеченный на С-конце.

Набор находится в форме одной упаковки, содержащей две вышеуказанные композиции.

Фармацевтическая композиция, содержащая контрастное вещество, обычно представляет собой композицию, уже представленную на рынке.

Фармацевтическая композиция, содержащая A1M (или его аналог, фрагмент или вариант, как здесь определено), предназначена для в/в введения. Следовательно, A1M может быть формулирован в жидкости, например в растворе, дисперсии, эмульсии, суспензии и т.д.

Для парентерального применения подходящими растворителями являются вода, растительные масла, пропиленгликоль и органические растворители, обычно разрешенные для таких целей. В общем, специалист в данной области может найти указания в "Remington's Pharmaceutical Science" под редакцией Gennaro et al. (Mack Publishing Company), в "Handbook of Pharmaceutical Excipients" под редакцией Rowe et al. (PhP Press) и в официальных монографиях (например, Ph.Eur. или USP), в разделах, касающихся соответствующих эксципиентов для конкретных типов составов, и к способам получения конкретного состава.

A1M будет вводиться в виде одной или более доз в сочетании с введением контрастного вещества. Предпочтительно каждая доза будет вводиться в/в либо в виде разовой дозы, в виде разовой дозы с последующей медленной инфузией в течение короткого периода времени до 60 мин или только в виде медленной инфузии в течение короткого периода времени до 60 мин. Первая доза может вводиться одновременно с контрастным веществом или в течение периода продолжительностью от 0-60 мин до 0-30 мин после инъекции контрастного вещества. Могут вводиться дополнительные дозы A1M, но они могут быть необязательными, после инъекции контрастного вещества. Каждая доза содержит количество A1M, которое зависит от массы тела пациента: 1-15 мг A1M/кг пациента.

Свободный текст перечня последовательностей:

SEQ ID NO: 1

<223> человеческий AlM дикого типа, без мутаций

SEQ ID NO: 2

<223> rhAlM, т.е. N-концевой Met

SEQ ID NO: 3

<223> hAlM, без метки, N-концевой Met, N17,96D; R66H

SEQ ID NO: 4

<223> hAlM, без метки, N-концевой Met, M41K

SEQ ID NO: 5

<223> 6His, N17,96D; R66H

SEQ ID NO: 6

<223> hAlM, 6His, M41K

SEQ ID NO: 7

<223> 8His, N17,96D; R66H

SEQ ID NO: 8

<223> hAlM, 8His, M41K

SEQ ID NO: 9

<223> hA1M, 8His, без мутации
SEQ ID NO: 10
<211> 193
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 1
<223> Xaa=Met или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 1
<223> Xaa=Met или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 2
<223> Xaa=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 2
<223> Xaa=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 3
<223> Xaa=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 3
<223> Xaa=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 4
<223> Xaa=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 4

<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 5
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 5
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 6
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 6
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 7
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 7
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 8
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 8
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 9

<223> Xaa=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 9
<223> Xaa=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 10
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 10
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 11
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 11
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 12
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 12
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 13
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 13

<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 14
 <223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 14
 <223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 31
 <223> Xaa=Asn или Asp
 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 55
 <223> Xaa=Met или Lys
 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 80
 <223> Xaa=Arg или His
 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 110
 <223> Xaa=Asn или Asp
 SEQ ID NO: 11
 <223> Y1
 SEQ ID NO: 12
 <223> Y2
 SEQ ID NO: 13
 <223> Y3
 SEQ ID NO: 14
 <223> Y4
 SEQ ID NO: 15
 <223> Y5
 SEQ ID NO: 16

<223> Y5
SEQ ID NO: 17
<211> 197
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 1
<223> Хаа=Met или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 1
<223> Хаа=Met или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 2
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 2
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 3
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 3
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 4
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 4

<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 5
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 5
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 6
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 6
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 7
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 7
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 8
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 8
<223> Хаа=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 9

<223> Xaa=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 9
<223> Xaa=His или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 10
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 10
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 11
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 11
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 12
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 12
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 13
<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 13

<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 14

<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 14

<223> Xaa=Asp, Glu, Lys, Arg или отсутствует

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 31

<223> Xaa=Asn или Asp

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 55

<223> Xaa=Met или Lys

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 80

<223> Xaa=Arg или His

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 110

<223> Xaa=Asn или Asp

SEQ ID NO: 18

<223> hA1M, без метки, N-концевой Met, N17,96D; R66H;

усеченный

SEQ ID NO: 19

<223> hA1M, без метки, N-концевой Met, M41K; усеченный

SEQ ID NO: 20

<223> 6His, N17,96D; R66H; усеченный

SEQ ID NO: 21

<223> hA1M, 6His, M41K; усеченный

SEQ ID NO: 22

<223> 8His, N17,96D; R66H; усеченный

SEQ ID NO: 23
<223> hA1M, 8His, M41K; усеченный
SEQ ID NO: 24
<223> 1. M8H5GIEGR-мышь
SEQ ID NO: 25
<223> 2. M8H5GIEGR-голый землекоп
SEQ ID NO: 26
<223> 3. M8H5GIEGR-лягушка
SEQ ID NO: 27
<223> 4. M8H5GIEGR-цыпленок
SEQ ID NO: 28
<223> 5. M8H5GIEGR-кролик
SEQ ID NO: 29
<223> 6. M8H5GIEGR-беличья обезьяна
SEQ ID NO: 30
<223> 7. M8H5GIEGR-морж
SEQ ID NO: 31
<223> 8. M8H5GIEGR-ламантин
SEQ ID NO: 32
<223> 9. M8H5GIEGR-камбала
SEQ ID NO: 33
<223> 10. M8H5GIEGR-орангутанг
SEQ ID NO: 34
<223> 11. M8H5GIEGR-человек P35K
SEQ ID NO: 35
<223> 12. M8H5GIEGR-человек M41K
SEQ ID NO: 36
M8H5GIEGR-человек R66H
SEQ ID NO: 37
<223> 14. M8H5GIEGR-человек T75K
SEQ ID NO: 38
<223> 15. M8H5GIEGR-человек T75Y
SEQ ID NO: 39
<223> 16. M8H5GIEGR-человек M99K
SEQ ID NO: 40
<223> 17. M8H5GIEGR-человек S101Y

SEQ ID NO: 41
<223> 18. M8H5GIEGR-человек K69.92.118.130R
SEQ ID NO: 42
<223> 19. M8H5GIEGR-латимерия
SEQ ID NO: 43
<223> 21. M8H5GIEGR-человек L89T
SEQ ID NO: 44
<223> 22. M8H5GIEGR-человек N1796D
SEQ ID NO: 45
<223> 23. M8H5GIEGR-человек T45K
SEQ ID NO: 46
<223> 24. M8H5GIEGR-человек A135E
SEQ ID NO: 47
<223> 25. M8H5GIEGR-человек V170S
SEQ ID NO: 48
<223> 26. M8H5GIEGR-человек
SEQ ID NO: 49
<223> 27. M8H5GIEGR-человек G172Q
SEQ ID NO: 50
<223> 33. M8H4DK-человек M41K+
SEQ ID NO: 51
<223> 34. M8H4DK-человек M41K+N1796D 34
SEQ ID NO: 52
<223> 35. M8H4DK-человек R66H+N1796D
SEQ ID NO: 53
<223> 36. M8H4DK-человек M41K+R66H+N1796D
SEQ ID NO: 54
<223> 38. M8H4DK-человек R66H
SEQ ID NO: 55
<223> 39. M8H4DK-человек
SEQ ID NO: 56
<223> 40. M8H-человеческий wt
SEQ ID NO: 57
<223> 41. M8H-человек R66H+N1796D
SEQ ID NO: 58
<223> 60. M8H4DK-человеческий wt

SEQ ID NO: 59
<223> 1. M8H5GIEGR-мышь
SEQ ID NO: 60
<223> 2. M8H5GIEGR-голый землекоп
SEQ ID NO: 61
<223> 3. M8H5GIEGR-лягушка
SEQ ID NO: 62
<223> 4. M8H5GIEGR-цыпленок
SEQ ID NO: 63
<223> 5. M8H5GIEGR-кролик
SEQ ID NO: 64
<223> 6. M8H5GIEGR-беличья обезьяна
SEQ ID NO: 65
<223> 7. M8H5GIEGR-морж
SEQ ID NO: 66
<223> 8. M8H5GIEGR-ламантин
SEQ ID NO: 67
<223> 9. M8H5GIEGR-камбала
SEQ ID NO: 68
<223> 10. M8H5GIEGR-орангутанг
SEQ ID NO: 69
<223> 11. M8H5GIEGR-человек P35K
SEQ ID NO: 70
<223> 12. M8H5GIEGR-человек M41K
SEQ ID NO: 71
<223> 13. M8H5GIEGR- человек R66H
SEQ ID NO: 72
<223> 14. M8H5GIEGR-человек T75K
SEQ ID NO: 73
<223> 15. M8H5GIEGR-человек T75Y
SEQ ID NO: 74
<223> 16. M8H5GIEGR-человек M99K
SEQ ID NO: 75
<223> 17. M8H5GIEGR-человек S101Y
SEQ ID NO: 76
<223> 18. M8H5GIEGR-человек K69.92.118

SEQ ID NO: 77
 <223> 19. M8H5GIEGR-латимерия
 SEQ ID NO: 78
 <223> 21. M8H5GIEGR- человек L89T
 SEQ ID NO: 79
 <223> 22. M8H5GIEGR-человек N1796D
 SEQ ID NO: 80
 <223> 23. M8H5GIEGR-человек T45K
 SEQ ID NO: 81
 <223> 24. M8H5GIEGR-человек A135E
 SEQ ID NO: 82
 <223> 25. M8H5GIEGR-человек V170S
 SEQ ID NO: 83
 <223> 26. M8H5GIEGR-человек V148D
 SEQ ID NO: 84
 <223> 27. M8H5GIEGR-человек G172Q
 SEQ ID NO: 85
 <223> 33. M8H4DK-человек M41K+R66H
 SEQ ID NO: 86
 <223> 34. M8H4DK-человек M41K+N1796D
 SEQ ID NO: 87
 <223> 35. M8H4DK-человек R66H+N1796D
 SEQ ID NO: 88
 <223> 36. M8H4DK-человек M41K+R66H+N1796D
 SEQ ID NO: 89
 <223> 37. M8H4DK-человек M41K
 SEQ ID NO: 90
 <223> 38. M8H4DK-человек R66H
 SEQ ID NO: 91
 <223> 39. M8H4DK-человек N1796D
 SEQ ID NO: 92
 <223> 40. M8H-человеческий wt
 SEQ ID NO: 93
 <223> 41. M8H-человек R66H+N1796D
 SEQ ID NO: 94
 <223> 42. без метки, человек R66H+N1796D
 SEQ ID NO: 95
 <223> 61. без метки, человеческий wt

Сокращенные обозначения:

A1M: альфа-1-микроглобулин;

IB: тельца включения;

wt: дикий тип;

R66H: точечная мутация в гене A1M, приводящая к экспрессии His вместо Arg в положении 66;

тид могут отличаться по аминокислотной последовательности одной или более модификациями (например, заменами, добавлениями и/или делециями). Замененный или вставленный аминокислотный остаток может кодироваться или может не кодироваться генетическим кодом. Вариант полипептида может встречаться в природе, такой как аллельный вариант, или он может быть вариантом, который, как известно, не встречается в природе.

Изобретение далее иллюстрировано (но не ограничивается) фигурами.

Пояснения к фигурам

Фиг. 1. Выравнивание аминокислотной последовательности A1M из 12 различных видов.

Аминокислотную последовательность человеческого wt A1M и 11 дополнительных видов, исследованных в фазе I проекта, выравнивали с использованием программного обеспечения <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Идентичность различных последовательностей с человеческой последовательностью представлена в виде процентов. Аминокислоты, идентичные между всеми видами, выделены желтым цветом. Кроме того, выделены аминокислоты, которые считаются важными в человеческом A1M: неспаренный остаток цистеина (C34), важный для проявления восстановительных и антиоксидантных свойств (Allhorn et al., 2005), а также связывания гема, выделены розовым цветом (Meining and Skerra, 2012). Аспарагины, которые, как известно, являются гликозилированными (N17 и 96), отмечены зеленым цветом (Escibano et al., 1990). Четыре лизина (K69, 92, 118 и 130), которые были обнаружены модифицированными в A1M из мочи (Åkerström et al., 1995; Berggård et al., 1999) и считаются важными для проявления редуктазной активности (Allhorn et al., 2005), отмечены голубым цветом. H123, который предположительно участвует в связывании гема (Meining and Skerra, 2012), выделен серым цветом, и, наконец, тирозины (Y22 и 132), которые, как показано, участвуют в гашении свободных радикалов (Åkerström et al., 2007), выделены в темно-синим цветом.

Фиг. 2. SDS-PAGE экспрессированных белков в фазе III. Равное количество бактериального лизата из неиндуцированных образцов (обозначено 0) и образцов, отобранных через 1-4 ч после индукции (обозначены 1, 2, 3, 4), разделяли электрофорезом SDS-PAGE. В этих образцах полоса чуть ниже 25 кДа экспрессируется в возрастающих количествах во времени. Интенсивность полос достигает максимума через 3 ч после индукции. M8H-меченные wt-A1M и R66K+N17,96D-A1M экспрессируются с молекулярными массами несколько ниже, чем соответствующие полосы M8H4DK, но и в данном случае уровень экспрессии достигает максимума примерно через 3 ч. Немеченные wt-A1M и R66H+N17,96D-A1M присутствуют в виде еще более мелких полос, но в данном случае интенсивность полос выше на 4 ч, чем на 3 ч, что указывает на несколько замедленную экспрессию, в частности для wt A1M.

Фиг. 3. Выход, чистота и агрегация вариантов фазы III.

А. Сравнивали выходы выделенных A1M всех вариантов фазы III. Все варианты были получены с высокими выходами, с несколько более низким выходом немеченного wt-A1M.

В. Чистоту определяли разделением 10 мкг всех вариантов электрофорезом SDS-PAGE. Чистоту определяли с помощью денситометрического анализа основной полосы мономера по сравнению со всеми полосами с использованием программного обеспечения Image от Bio-Rad. Все варианты с гистидиновыми метками показали очень высокую чистоту, в то время как чистота немеченных вариантов была несколько ниже (примерно 90%).

С. Присутствие крупных агрегатов анализировали разделением 20 мкг каждого варианта нативным PAGE. Интенсивность основной полосы мономера и вещества, оставшегося в щели для нанесения (очень крупный агрегированный), определяли денситометрией. Большинство вариантов демонстрировали низкие количества крупных агрегатов, за исключением M8H-wt-A1M и немеченных вариантов, которые имеют несколько более высокий процент. Все варианты кодированы номером, указанным на панели А.

Фиг. 4. Анализ агрегации 100 мкМ и 1 мМ растворов вариантов фазы III в различных буферах.

Тенденцию к агрегации после концентрирования из 100 мкМ до 1 мМ в разных буферах исследовали анализом нативным PAGE. 20 мкг белка разделяли в каждой полосе. Процент крупных агрегатов рассчитывали с использованием денситометрического анализа по интенсивности отдельных полос.

А. Все варианты концентрировали из 100 мкМ до 1 мМ в Трис-буфере с pH 8,0 или 7,4 и разделяли PAGE. M8H4DK-wt, R66H+N1796D, M41K, R66H, N1796D обозначены как 60, 35, 37, 38 и 39 соответственно, M8H-wt и M8H-R66H+N1796D обозначены как 40 и 41 и немеченные wt и R66H+N1796D обозначены как 61 и 42.

В. Варианты концентрировали до 1 мМ в Трис-буфере с pH 8,0 и 7,4 и в PBS с pH 7,4, подвергали одному циклу замораживания-оттаивания и затем разделяли PAGE и анализировали, как описано выше.

Фиг. 5. Анализ редуктазной и антиоксидантной активности вариантов фазы III.

А. Редуктазную активность анализировали по восстановлению ABTS-радикала. 0-2 мкМ A1M добавляли в двух повторностях к 56 мкМ ABTS-радикала. Восстановление оценивали по уменьшению поглощения при 405 нм в течение 95 с. Рассчитывали площадь под кривой (AUC) для каждой концентрации, и общую AUC рассчитывали вычитанием AUC только буфера. Строили график зависимости среднего значения общей AUC+SEM по двум повторностям против концентрации. Все варианты M8H4DK имеют примерно такую же активность, как wt A1M, с тенденцией к снижению активности для M41K и R66H. M8H и немеченные варианты также демонстрируют полную активность с наличием небольшой

тенденции к повышению активности для вариантов R66H+N1796D по сравнению с wt A1M.

В. Антиоксидантную активность исследовали в анализе ORAC. Активность вариантов A1M сравнивали со стандартом Тролокс и выражали в виде количества эквивалентов Тролокс. Каждый анализ проводили в трех повторностях и результат для M84DK-wt устанавливали на 100%. Антиоксидантную активность всех других вариантов выражали по отношению к нему. Вариант M8H4DK-R66H+N17,96D показал достоверно более высокую активность, чем M8H4DK-wt A1M. Когда метки были укорочены или удалены, то разница была меньше. Приведенные данные представляют объединенные результаты двух независимых экспериментов.

Фиг. 6. Анализ редуцтазной активности и связывания гема вариантов фазы III.

А. Способность вариантов A1M восстанавливать цитохром С исследовали смешиванием серийных разведений (0-10 мкМ) A1M с 100 мкМ цитохрома С+100 мкМ NADH и оценкой увеличения оптической плотности при 550 нм в течение 20 мин. Анализ проводили в двух повторностях. AUC рассчитывали для каждой концентрации и общую AUC рассчитывали вычитанием AUC только буфера. Данные представлены в виде общей AUC+SEM по двум независимым экспериментам. В качестве отрицательного контроля использовали овальбумин. Большинство вариантов A1M показали несколько более низкую способность к восстановлению по сравнению с A1M дикого типа в более низких концентрациях. Для N17,96D-A1M и R66H+N17,96D-A1M эта тенденция была достоверной (при 0,3-0,6 мкМ). Укорочение и удаление метки не повлияло на эту активность.

В. Включение гема в варианты A1M анализировали по появлению пика поглощения между 410-420 нм и величиной красного смещения пика (Karnaukhova et al., 2014; Rutardottir et al., 2016); 44 мкМ белковых растворов смешивали с 40 мкМ гема в двух повторностях и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Смеси анализировали сканированием при длинах волн в интервале 270-450 нм. Вычисляли положение максимального пика и отношение 413:386. Все варианты M8H4DK имеют примерно одинаковое красное смещение и отношение, что и wt-A1M, в то время как M8H-меченные варианты имеют достоверно более высокое отношение. Немеченные варианты не имеют активности красного смещения, что подтверждает ранее полученные результаты (Karnaukhova et al., 2014).

С. Связывание A1M с гем-гарозой. Специфическое связывание A1M анализировали смешиванием серийных разведений A1M или контрольного овальбумина с гем-гарозой или контрольной агарозой. Анализ проводили в двух повторностях. Количественное определение белка исходного материала и проточных фракций с инкубации с гем-агарозой и контрольной агарозой определяли с использованием ВСА. По этим данным можно определить количество белка, специфически связанного с гем-агарозой, для каждого образца. Строили график зависимости связанного белка против добавленного белка, и была показана линейная корреляция для всех вариантов. Наклон линии рассчитывали линейной регрессией, и показано среднее значение для двух повторностей. Все варианты связывают гем в этом методе примерно в одинаковой степени.

Фиг. 7. Спасение клеток K562 от гибели, индуцированной гемом.

Клетки K562 подвергали воздействию 100 мкМ гема в присутствии серийных разведений A1M (0-10 мкМ) в течение 1 ч. Затем определяли гибель клеток по высвобождению ЛДГ в среду. Значение поглощения от живых клеток вычитали и сигнал клеток, инкубированных с гемом без A1M, устанавливали на 100%. Рассчитывали значения инкубации с A1M относительно этого значения. Анализ проводили в двух повторностях. Средний результат трех независимых экспериментов (среднее значение+SEM) показан на фигуре. Отсутствовала достоверная разница между вариантами, за исключением немеченного R66H+N17,96D-A1M, который имел более низкую активность, чем немеченный wt-A1M.

Фиг. 8. Разделение по размеру и редуцтазная активность M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M и M8H4DK-wt-A1M после хранения при +4°C и комнатной температуре.

M8H4DK-Wt-A1M и M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M представлены в виде "wt" и "варианта 35" и показаны соответственно на верхней и нижней панелях. Агрегацию анализировали SEC-FPLC. Мономерный A1M и крупные агрегаты элюировались примерно при 15 мл и 8 мл соответственно. Небольшое плечо, видимое примерно при 13-14 мл, вероятно, представляет димерный A1M. Процент крупных агрегатов рассчитывали по площади под пиком, соответствующим 8 мл, в сравнении с общей площадью пика. Выделение белка (%), показанное курсивом) после воздействия напряжения рассчитывали по общим площадям пиков по сравнению с общей площадью пика исходного материала. Восстановительную активность ABTS анализировали в 2 мкМ растворах A1M. Данные представлены в виде среднего значения для двух повторностей. Только размороженные 100 мМ растворы A1M показаны в (А), 100 мкМ раствор A1M, подвергнутый пяти циклам замораживания-оттаивания (В), 1 мМ раствор A1M, хранящийся при +4°C в течение ночи (С), 1 мМ раствор A1M, хранящийся при +4°C в течение недели (D), 100 мкМ раствор A1M, хранящийся при комнатной температуре в течение недели (Е), и 1 мМ раствор A1M, хранящийся при комнатной температуре в течение недели (F). Данные показывают, что M8H4DK-R66H+N1796D лучше выдерживают концентрирование до 1 мМ (С & D) и хранение при комнатной температуре (Е и F).

Фиг. 9. Разделение по размеру и редуцтазная активность 1 мМ M8H4DK-wt-A1M и M8H4DK-

R66H+N17,96D-A1M после хранения при +37°C.

Wt-A1M и R66H+N17,96D-A1M обозначены в виде "ht2014" и "35" и показаны соответственно на верхней и нижней панелях. Агрегацию анализировали SEC-FPLC. Мономерный A1M и крупные агрегаты элюируются примерно на 20 мин и 12 мин соответственно. Небольшое плечо, наблюдаемое примерно на 18-19 мин, вероятно, является димерным A1M. Процент крупных агрегатов рассчитывали по площади под пиком на 12 мин по сравнению с общей площадью пика. Выделение белка (%; показанное курсивом) после приложения напряжения рассчитывали по общим площадям пиков по сравнению с общей площадью пика исходного материала. Редуктазную активность для ABTS анализировали в 2 мкМ растворах A1M. Данные представлены в виде среднего значения для двух повторностей. 1 мМ растворы A1M, хранящиеся в течение 1,5 ч (B), 2,5 ч (C) и 4,5 ч (D), сравнивали с 1 мМ исходным материалом A1M (A). M8H4DK-wt на 4,5 ч полностью выпадал в осадок, и его анализ не проводили. Данные свидетельствуют о том, что M8H4DH-R66H+N1796D лучше выдерживает хранение при +37°C, чем M8H4DK-wt.

Фиг. 10. Модель структуры A1M. Модель была подготовлена, как описано ранее (ссылка 29). Восемь β -тяжей, показанных в виде лент, образуют слегка конусообразный цилиндр с гидрофобной внутренней частью: "липокалиновый карман". Одна сторона липокалинового кармана открыта (показана стрелкой), т.е. обеспечивает входение небольших молекул. Обратная сторона закрыта. Две α -спирали показаны в виде цилиндров. Показаны положения трех углеводных фрагментов (T5; N17; N96) и четырех боковых цепей, участвующих в проявлении редуктазной активности (C34; K92, K118, K130).

Фиг. 11. Связывание гема анализировали по изменению миграции/гашению флуоресценции нативным PAGE (A и B) и спектрофотометрией по поглощению в УФ-свете (C).

A. Пятнадцать мкг M8H4DK-wt A1M (wt-A1M) или M8H4DK-35-A1M (35-A1M) инкубировали с различными количествами гема в течение 30 мин при 20°C, разделяли нативным PAGE и гель анализировали флуоресценцией триптофана (Flourescence) и сканированием денситометрией после окрашивания кумасси (краситель).

B. Изображения преобразовывали в цифровую форму с помощью программного обеспечения Image Lab™ (Bio-Rad). Строили график зависимости связывания гема, измеренного в виде гашения флуоресценции (черный) и расстояния миграции (синий), против молярного отношения A1M:гем. Представлены средние значения для двух экспериментов, wt-A1M (закрашенные символы), 35-A1M (незакрашенные символы).

C. A1M и гем смешивали (32 и 19 мкМ соответственно), инкубировали в течение 2 ч при 20°C и сканировали. Для сравнения показано поглощение только белков в концентрации 32 мкМ. Поглощение буфера (20 мМ Трис-HCl, pH 8,0+0,15 М NaCl) вычитали из всех сканов в качестве контроля.

Фиг. 12. Сравнение ферментативных свойств M8H4DK-wt A1M (wt-A1M) и M8H4DK-35-A1M (35-A1M).

A. Свежевыделенные wt-A1M (■) или 35-A1M (○) в различных концентрациях смешивали с ABTS-радикалом в 56 мкМ в 25 мМ натрий-фосфатном буфере с pH 8,0 в лунках микротитрационного планшета, после чего определяли скорость восстановления на ридере по поглощению при 405 нм в течение 95 с. Строили график зависимости поглощения для каждой концентрации против времени и рассчитывали площадь под кривой (AUC) между 0 и 95 с для каждой концентрации. Общую AUC рассчитывали вычитанием AUC только буфера. Показаны значения для трех повторностей $\pm$ SEM.

B. Скорость восстановления ABTS определяли, как описано в A, но с использованием wt-A1M (■) или 35-A1M (○) после хранения в течение 7 суток при 4°C или комнатной температуре и концентрации 0,1 или 1 мМ. Показаны отдельные эксперименты.

C. Восстановление цитохрома C исследовали смешиванием серийных разведений (0-10 мкМ) wt-A1M (■) или 35-A1M (○) с 100 мкМ цитохрома C+100 мкМ NADH и последующим мониторингом повышения оптической плотности при 550 нм в течение 20 мин. Анализ проводили в двух повторностях. AUC рассчитывали для каждой концентрации и общую AUC рассчитывали вычитанием AUC только буфера. Данные представлены в виде общей AUC $\pm$ SEM для двух независимых экспериментов. В качестве отрицательного контроля использовали овальбумин.

D. Антиоксидантную активность определяли в анализе ORAC. Активность вариантов A1M в концентрации 5 мкМ сравнивали со стандартом Тролокс и выражали в виде количества эквивалентов Тролокса. Каждый анализ проводили в трех повторностях, и результат wt-A1M устанавливали на 100%.

Представленные данные представляют собой среднее значение для двух независимых экспериментов $\pm$ SEM.

Фиг. 13. Клетки K562, культивированные из расчета 10^5 клеток на лунку в 96-луночном микротитрационном планшете, подвергали воздействию 100 мкМ гема в присутствии серийных разведений M8H4DK-wt A1M (wt-A1M) или M8H4DK-35-A1M (35-A1M) (0-10 мкМ) в течение 1 ч. Гибель клеток определяли по высвобождению ЛДГ в среду. Значение ЛДГ для живых клеток вычитали и сигнал клеток, инкубированных с гемом без A1M, устанавливали на 100%, и значения для инкубации с A1M рассчитывали по отношению к этому значению. Анализ проводили в двух повторностях. Показано среднее значение для трех независимых экспериментов (среднее значение $\pm$ SEM). Wt-A1M (■) или 35-A1M (○).

Фиг. 14. Клетки НК-2 подвергали воздействию смеси 200 мкМ $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, 400 мкМ перекиси водорода и 2 мМ аскорбата (реакция Фентона, показано на А и В) или 0-30 мкМ гема (показано на С и D), с одновременным добавлением 0-20 мкМ M8H4DK-wt A1M (wt-A1M) (показано в виде ■ и черных столбцов) или M8H4DK-35-A1M (35-A1M) (показано в виде ○ и белых столбцов) в течение 6 ч.

После инкубации клетки анализировали на жизнеспособность с использованием WST-1 (показано на А и С) или экспрессии мРНК HO-1 и Hsp70 (показано на В и D), как описано в разделе "Материалы и методы". Жизнеспособность клеток (А и С) нормализовали к контрольным образцам, представляющим необработанные клетки.

Результаты представляют данные трех параллельных экспериментов и представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM. Экспрессию мРНК HO-1 и Hsp70 (В и D) нормализовали к GAPDH и представляли в виде кратного изменения. Значения кратного изменения рассчитывали нормализацией к контрольным образцам, представляющим необработанные клетки. Результаты представляют данные трех параллельных экспериментов и представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM. Различия между соответствующими экспозициями и контрольными условиями анализировали с использованием одностороннего ANOVA с апостериорной поправкой Бонферрони.

*указывает статистическое сравнение по сравнению с реакцией Фентона (показано на В) или гемом (показано на D). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. При сравнении wt-A1M и 35-A1M достоверной разницы не наблюдали.

Фиг. 15. Клиренс из плазмы крови (фармакокинетика, показано на А) и биораспределение (показано на В) M8H4DK-wt A1M (wt-A1M) и M8H4DK-35-A1M (35-A1M) определяли после внутривенного введения животным.

А. Wt-A1M (■) или 35-A1M (○) вводили (в дозе 5 мг/кг) крысам Вистар и отбирали образцы крови через регулярные промежутки времени. Концентрацию A1M определяли анализом RIA с использованием определенного варианта A1M в качестве стандарта. Каждая точка происходит от трех животных и представлена в виде среднего значения $\pm$ SEM. В. Wt-A1M или 35- вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг мышам C57BL/6NRj, которых подвергали эвтаназии через 10 и 30 мин после инъекции. Органы отбирали, взвешивали и гомогенизировали. Концентрацию введенного (человеческого) A1M определяли с помощью сэндвич ELISA. Каждый столбец соответствует трем животным и представлен в виде среднего значения $\pm$ SD. Wt-A1M, 10 мин (черный) и 30 мин (темно-серый); 35-A1M, 10 мин (белый) и 30 мин (светло-серый).

Фиг. 16. Мышам самкам C57BL/6 вводили глицерин (в дозе 2,0 мл/кг, в/м) и затем в/в M8H4DK-35-A1M (wt-A1M) (темно-серые столбцы, $n=10$), M8H4DK-35-A1M (35-A1M) (белые столбцы, $n=10$) или буфер, который использовали в качестве растворителя (контроль плацебо, серые столбцы, $n=6$) через 30 мин после инъекции глицерина. Через 4 ч (после введения глицерина) животных подвергали эвтаназии и извлекали почки, замораживали и затем анализировали на экспрессию мРНК HO-1 (А) и Hsp70 (В) с использованием ПЦР в режиме реального времени, как описано в разделе "Материалы и методы". Экспрессию мРНК нормализовали к показателям экспрессии GAPDH, и значения кратных изменений рассчитывали нормализацией к контрольным образцам от необработанных животных (контролей).

Результаты представлены в виде коробчатых графиков, отображающих медианы и 25-й и 75-й процентиля. Статистическое сравнение между группами проводили с помощью ANOVA с апостериорной поправкой Бонферрони. *указывает статистическое сравнение против глицерина. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. При сравнении wt-A1M и 35-A1M достоверной разницы не наблюдали.

Далее изобретение будет иллюстрировано следующими примерами. Примеры являются иллюстративными, и никоим образом не ограничивают объем изобретения.

Экспериментальный раздел

Экспериментальная работа была разделена на три основные фазы.

Фаза I): экспрессия 27 вариантов A1M, описанных выше, с последующим анализом растворимости, стабильности и функциональных свойств.

Фаза II): конструирование, экспрессия и анализ нескольких вариантов A1M с предполагаемыми оптимальными свойствами на основе результата фазы I.

Фаза III): конструирование, экспрессия и анализ wt-A1M и наиболее эффективного мутированного варианта A1M, имеющего N-концевые метки или без них.

В фазе I использовали четыре направления обоснования при выборе положений и идентичности мутированных аминокислотных боковых групп: 1) экспрессировали гомологи животных разных видов с различной предполагаемой экологической нагрузкой с точки зрения окислительного стресса, температуры, давления кислорода ($N=12$); 2) вводили единичные аминокислотные замены, которые часто встречаются среди 56 секвенированных гомологов A1M в положениях, расположенных в петлях 1-4 или внутренней поверхности гидрофобного кармана, в конструкцию человеческого гена и экспрессировали варианты ($N=3$); 3) добавляли или удаляли благоприятно расположенные остатки лизина или тирозина на основе гипотезы о том, что они могут оказывать влияние на pKa тиолила C35 (Allhorn et al., 2005) или служить в качестве сайтов захвата свободных радикалов (Berggård et al., 1999; Sala et al., 2004; Åkerström

et al., 2007) (N=5); 4) гидрофобные→гидрофильные замены на поверхности белка, без прогнозируемого влияния на функцию или фолдинг (N=7).

Материалы и методы

Экспрессия

Последовательности вариантов A1M были предоставлены компании DNA2.0, Inc. (США), которая провела синтез и клонирование генов в экспрессионный вектор PJ401Express (промотор T5, резистентность к канамицину). Последовательность ДНК подтверждали секвенированием. Векторы трансформировали в компетентные *E. coli* (BL21 Star (DE3) (Invitrogen, Life technologies corp, USA)) в соответствии с инструкциями изготовителя и четыре отдельных клон каждого варианта тестировали на микроэкспрессию. Получали клон с самой высокой экспрессией каждого варианта в виде стокового материала в глицерине, который использовали для производственной экспрессии.

Экспрессионные клоны варианта A1M культивировали в полной среде NYAT (15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 84 mM K_2HPO_4 , 23 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 2,2 mM $(\text{NH}_4)_2\text{H-цитрат}$, 1% (мас./об.), 2 mM MgSO_4 , 9 мкМ $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 85 мкМ $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 1,3 мкМ $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,3 мкМ $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 1,8 мкМ $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 1,5 мкМ $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 10^8 мкМ ЭДТА, 50 мкг/мл канамицина) до оптической плотности OD600 1,5. Затем экспрессию белка индуцировали добавлением 1 mM IPTG. Продукция продолжалась 4 ч. Образцы для анализа SDS-PAGE отбирали перед индукцией и через 1, 2, 3 и 4 ч после индукции.

Очистка

Бактерии из культур собирали центрифугированием при 5000 об/мин, в течение 15 мин. Бактериальные осадки лизировали в пяти циклах замораживания-оттаивания, разводили в 3 раза 20 mM Трис-HCl буфером, pH 8,0, и обрабатывали ультразвуком. Тельца включения (IB) собирали центрифугированием при 6000 об/мин, в течение 30 мин и отмывали тремя циклами ресуспендирования и центрифугирования. Для экстракции тельца включения ресуспендировали в 6 M растворе гуанидина гидрохлорида, 20 mM Трис-HCl, pH 8,0 (6 M Gu-HCl) и инкубировали при перемешивании в течение ночи при +4°C. Экстракт осветляли высокоскоростным центрифугированием при 26000 g в течение 60 мин. Супернатант сохраняли для дальнейшего осветления, в то время как осадок подвергали еще одному циклу экстракции. Супернатанты экстрактов объединяли и дополнительно осветляли фильтрацией на глубинном фильтре (фильтр K700P, помещенный поверх фильтра KS50P, Pall Corp., США). A1M в осветленном экстракте очищали с использованием Ni-агарозной смолы (Sigma-Aldrich, США). Вкратце, смолу упаковывали в одноразовую хроматографическую колонку объемом 10 мл (Bio-Rad, США) и уравнивали 6M Gu-HCl. Экстракт A1M наносили на колонку с использованием свободного потока и протока. Колонку промывали пятью объемами колонки 6M Gu-HCl и затем элюировали четырьмя объемами 6M Gu-HCl+0,5 M имидазола. Исходный материал, проточные фракции и элюированные фракции осаждали этанолом, растворяли в загрузочном буфере 1× SDS-PAGE и разделяли SDS-PAGE. Процедуру очистки повторяли, если проточная фракция содержала значительные количества A1M. Содержание белка в экстракте определяли поглощением при 280 нм.

Элюаты с Ni-агарозы разбавляли до оптической плотности A280 примерно 5,0 и охлаждали до +4°C перед рефолдингом. Затем элюат смешивали с 2/3 объемами 0,275 M L-цистеина в 20 mM Трис-HCl, pH 9,5+0,1 M NaCl. Затем быстро добавляли 16,7 объемов буфера для рефолдинга. Конечная концентрация компонентов буфера составляла: (0,2 мг/мл A1M, 0,1 M Трис, 0,6 M NaCl, 0,45 M L-аргинина, 2 mM ЭДТА, 10 mM L-цистеина и 1 mM L-цистеина, pH 9,5). Затем смесь перемешивали в течение 1 ч при +4°C и раствор концентрировали до исходного объема раствора A1M с использованием устройства для ультрафильтрации Centricon plus 70, 10K (Merck Millipore, США). После концентрирования раствор A1M подвергали диафильтрации с 20 mM Трис-HCl, pH 8,0, используя те же устройства, в 10 последовательных циклах 2,5× разбавления/концентрирования. После диафильтрации раствор осветляли центрифугированием при 15000 g в течение 15 мин и затем пропускали через фильтр 0,2 мкм.

Подвергшийся рефолдингу A1M сразу наносили на 5-мл картридж Bio-Scale Mini UNOspere Q (Bio-Rad), уравновешенный 20 mM Трис-HCl, pH 8,0. Колонку анализировали на системе для очистки ÄKTA 10 (GE Healthcare, США) в соответствии с инструкцией Bio-Rad для картриджей. После нанесения образца колонку промывали пятью объемами колонки (CV) 20 mM Трис-HCl, pH 8,0, перед элюированием линейным градиентом 20 CV от 0 до 0,35 M NaCl. Наконец, колонку промывали тремя CV 1 M NaCl. Проточные фракции и выбранные фракции, собранные во время линейного градиента, анализировали с помощью SDS-PAGE. Проточную фракцию с оставшимся A1M немедленно анализировали повторно на новой колонке и фракции, содержащие A1M, объединяли, концентрировали до 100 мкМ, стерилизовали фильтрованием и замораживали в аликвотных порциях при -20°C.

Гель-электрофорез SDS-PAGE проводили, как описано Laemmli (Laemmli, 1970) с использованием стандартных протоколов. Белки разделяли на бесцветных 4-20% TGX-гелях (Bio-Rad) при 300 В в течение 17 мин. Нативный PAGE проводили без SDS и без восстанавливающих агентов на бесцветных 4-20% TGX гелях при 200 В в течение 40 мин. Гели анализировали на приборе Chemidoc MP (Bio-Rad).

Круговой дихроизм

Спектры кругового дихроизма 10 мкМ растворов в 20 mM Трис-HCl, pH 8,0+0,15 M NaCl снимали

на спектрофлуориметре Jasco-J180 (JASCO Inc., Япония) в 2 мм кювете. Растворы сканировали при +22°C при 190-260 нм. Три анализа проводили для каждого образца. Процент структуры α -спирали и β -листа рассчитывали с использованием программного обеспечения <http://k2d3.org.ca>.

SEC-FPLC

Белки анализировали эксклюзионной хроматографией в системе для очистки ÄKTA 10 с использованием колонки Superose 12 10/30 GL объемом 24 мл (GE Healthcare). Колонку уравнивали 20 mM Трис-НCl, pH 8,0+0,15 M NaCl, используя скорость потока 1 мл/мин; 100-200 мкг белка наносили на колонку в объеме 100 мкл и элюировали 20 mM Трис-НCl, pH 8,0+0,15 M NaCl, используя скорость потока 0,75 мл/мин. Как правило, мономерный A1M элюировался после 15 мл/20 мин, димерный после 13-14 мл/18-19 мин и крупные агрегаты элюировались после 8 мл/12 мин. Процент крупных агрегатов рассчитывали по площади под пиком 8 мл по сравнению с общей площадью пика. Процент общего белка, полученного на колонке после приложения напряжения (см. ниже), рассчитывали сравнением общих площадей пиков обработанных или необработанных образцов.

ОФ-ВЭЖХ

Обращеннофазовую ВЭЖХ проводили на системе Agilent 1260 Infinity Binary LC с использованием колонки Aeris Wildpore 3,6 мкм XP-C8 (Phenomenex Inc., США). Анализ на колонке проводили при +25°C с использованием скорости потока 1 мл/мин и уравнивания смесью 70% H₂O+0,1% ТФУ и 30% ацетонитрила+0,1% ТФУ. Наносили 10 мкл (=10 мкг белка) и элюировали в линейном градиенте 30-50% ацетонитрила в течение 20 мин. Колонку регенерировали промыванием 95% ацетонитрилом в течение 10 мин.

Динамическое рассеяние света

Анализ динамического рассеяния света (DLS) образцов без приложения напряжения и с приложением напряжения сдвига проводили с использованием устройства SARomics Biostructure AB, Lund. Образцы A1M, разведенные до 10 мкМ в 10 mM Трис-НCl, pH 8,0+0,125 M NaCl, анализировали на приборе Malvern APS при +20°C. Образцы готовили в двух повторностях, и каждый образец анализировали три раза.

Дифференциальная сканирующая флуориметрия

Термостабильность вариантов A1M анализировали с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), используя устройство SARomics Biostructure AB, Lund. A1M, разведенный до 4,4 мкМ в 10 mM HEPES pH 8,0+0,125 M NaCl, смешивали с SYPRO оранжевым (разведение SYPRO 1000× в целом). Анализ проводили в двух повторностях и рассчитывали среднюю температуру плавления.

Введение напряжения сдвигающей силой

10 мкл 100 мкМ растворов A1M подвергали напряжению сдвигающей силой 80-кратным пипетированием с помощью многоканальных пипеток с использованием 0-10 мкл наконечников пипеток. Приложение напряжения проводили в двух повторностях.

После пипетирования повторности объединяли и разводили в 10 раз перед анализом с помощью DLS, как описано выше.

Напряжение, индуцированное высокой концентрацией

Растворимость и стабильность A1M анализировали при высокой концентрации. 500 мкл 100 мкМ растворов A1M концентрировали в десять раз до 50 мкл с использованием устройства Amicon Ultra-0.5, 10K (Merck Millipore) центрифугированием при 14000 g в течение 10 мин. После концентрирования объемы доводили точно до 50 мкл с использованием соответствующих проточных фракций. Концентрированные и неконцентрированные образцы (10 мкг) последовательно сравнивали анализом нативным PAGE. Влияние различных буферов исследовали диафильтрацией образцов до концентрирования. Данный анализ проводили с пятью циклами 10-кратного разведения/концентрирования на устройстве Amicon Ultra-15, 10K.

Количественное определение свободных тиоловых групп

Свободные тиоловые группы вариантов A1M определяли с помощью набора для количественного определения тиолов и сульфидов производства Molecular probes. Анализ проводили в 96-луночных планшетах в соответствии с инструкцией к набору. Стандарт или A1M (100 мкМ) в объеме 3 мкл смешивали с 3 мкл рабочего раствора цистамина, 100 мкл папаина-SSCH, 100 мкл L-BAPNA. Результаты анализа определяли на ридере по поглощению при 405 нм.

Анализ восстановления ABTS

Анализ является модификацией ранее опубликованного протокола (Åkerström et al., 2007). 7 mM раствор диаммониевой соли 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (Sigma-Aldrich) в течение ночи окисляли 2,45 mM раствором K₂S₂O₈ и затем разбавляли до 56 мкМ 25 mM натрий-фосфатным буфером с pH 8,0. Рабочий раствор ABTS добавляли из расчета 100 мкл на лунку в 96-луночном планшете. Измерение на нулевой точке проводили при A₄₀₅ с использованием ридера для планшетов Perkin Elmer Plate. 2 мкл раствора A1M (0-100 мкМ) быстро добавляли многоканальной пипеткой. Кинетику снижения поглощения при 405 нм быстро анализировали в течение 95 с. По практическим соображениям на это время анализировали только 8 лунок. Серийные разведения A1M анализировали в двух или в трех повторностях. Если для количества образцов, подлежащих анализу, требовалось

несколько планшетов, то новый стоковый материал ABTS разводили для приготовления рабочего раствора для каждого планшета и контрольный образец wt-A1M включали во все планшеты. Строили график зависимости поглощения для каждой концентрации против времени и площадь под кривой (AUC) рассчитывали для каждой концентрации. Общую AUC рассчитывали вычитанием AUC только буфера.

Анализ объема поглощения кислородных радикалов (ORAC)

Коммерческий набор OxySelect™ для анализа объема поглощения кислородных радикалов (ORAC) (Cell Biolabs, Inc., США) основан на окислении и разрушении флуоресцентного зонда пероксильными радикалами. Когда присутствует антиоксидант, то разрушение ингибируется. В качестве стандарта использовали водорастворимый витамин Е Тролокс. Постановку, анализ и расчеты проводили согласно инструкции к набору, и концентрации A1M 2,5-5 мкМ четко соответствовали стандартной кривой. Овальбумин (Sigma-Aldrich) использовали в качестве отрицательного белкового контроля.

Анализ восстановления цитохрома C

Анализ является модификацией ранее опубликованного протокола (Allhorn et al., 2005). Рабочий раствор готовили смешиванием 100 мкМ цитохрома C (Sigma-Aldrich) и 100 мкМ NADH в 10 мМ Трис-HCl, pH 8,0+0,125 М NaCl. 11 мкл раствора A1M (0-100 мкМ) добавляли в 96-луночный планшет в двух параллелях. Рабочий раствор цитохрома C быстро добавляли в лунки с использованием многоканальной пипетки. Кинетику повышения поглощения при 550 нм анализировали в течение 20 мин. На каждое время анализировали один планшет. Никакие отклонения со временем не могли наблюдать. Если требовалось анализировать несколько планшетов, то для всех использовали один и тот же рабочий раствор без каких-либо наблюдаемых артефактов, вызванных данной процедурой. После измерений результаты анализировали, как описано для анализа ABTS.

Анализ красного смещения

Включение свободного гема в A1M приводит к красному смещению пика поглощения полосы Сопета (Karnaukhova et al., 2014; Rutardottir et al., 2016) и оценивали для мутантов A1M в виде отношения A_{413}/A_{386} . 44 мкМ A1M в 20 мМ Трис-HCl, pH 8,0+0,25 М NaCl, смешивали с 40 мкМ свободного гема (Applchem). Инкубации проводили в двух повторностях и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Красное смещение анализировали в четырехкратно разведенных образцах сканированием при длинах волны на спектрофотометре Бекмана. Рассчитывали средний максимальный пик для двух повторностей, а также среднее соотношение между поглощением при 413 и 386 нм. Только овальбумин и буфер использовали в качестве отрицательных контролей.

Специфическое связывание A1M с гем-агарозой

Связывание A1M с гем-агарозой анализировали методом (Larsson et al., 2004), модифицированным, как описано ранее (Rutardottir et al., 2016). Гем-агарозу (Sigma-Aldrich) и контрольную сефарозу 4B (Sigma-Aldrich) уравнивали 20 мМ Трис-HCl, pH 8,0+0,25 М NaCl, и готовили в виде 50% суспензий. 75 мкл серийных разведений A1M (0-13,3 мкМ) вносили в два параллельных 96-луночных планшета (один планшет для гем-агарозы и один для контрольной сефарозы). 20 мкл суспензий гем-агарозы или контрольной сефарозы добавляли в лунки осторожным пипетированием для обеспечения переноса одинаковых количеств и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре при вращательном перемешивании. Смеси переносили переносили в 96-луночный фильтрующий планшет AcoPrep Advance, мембрана Supor 1,2 мкм (Pall Corp). Планшеты центрифугировали в течение 2 мин при 1000g, собирая проточную фракцию в микропланшет с низким связыванием. 25 мкл каждой проточной фракции, а также исходного материала без инкубации анализировали на содержание белка с использованием набора для анализа белка Pierce BCA (Thermo Scientific Inc., США). Количество белка пересчитывали в виде связанного количества (добавленного минус количество в проточной фракции) для образцов, инкубированных с гемом и контрольной сефарозой. После вычитания количества, связанного с контрольной сефарозой, строили график зависимости количества, специфически связанного с гем-агарозой, против добавленного количества. Наклон кривой рассчитывали линейной регрессией. SD двух повторностей использовали для оценки статистической значимости различий между вариантами A1M.

Связывание гема M8H4DK-wt A1M (Wt-A1M) и M8H4DK-35-A1M (35-A1M)

Связывание гема анализировали, как описано ранее, нативным PAGE (Karnaukhova et al., 2014) и УФ-спектрофотометрией (Rutardottir et al., 2016). Вкратце, для нативного PAGE A1M и гем в различных концентрациях инкубировали в Трис-буфере, pH 8,0 в течение 30 мин при комнатной температуре, разделяли нативным PAGE на 12% бесцветных гелях TGX Criterion при 200 В в течение 40 мин. Полосы геля анализировали на приборе Chemidoc MP (Bio-Rad) на флуоресценцию триптофана, используя режим без окрашивания, с окрашиванием кумасси бриллиантовым синим, который снова обесцвечивали и визуализировали на Chemidoc, используя режим с окрашиванием кумасси. Затем оба набора полос анализировали количественно с использованием программного обеспечения Image Lab™ Software (Bio-Rad). Затем связывание гема оценивали по уровню гашения флуоресценции триптофана относительно суммарного количества белка после окрашивания кумасси. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA) DU 800 с использованием скорости сканирования 600 нм/мин в области UV-VIS между 250 и 700 нм при 22°C. Концентрации A1M и гема составляли соответственно

32 и 19 мкМ в 20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 0,15 М NaCl. Гем добавляли из 10 мМ стокового раствора в ДМСО. Растворы белков сканировали через 2 ч после смешивания.

Клиренс из плазмы крови и биораспределение

Для исследования клиренса из плазмы крови каждый вариант А1М вводили внутривенно (в/в) шести крысам самцам Вистар (в дозе 5,0 мг/кг, стоковые растворы в 20 мМ Трис-НСl, рН 8,0) и образцы крови отбирали в пробирки с ЭДТА на 1; 5; 15; 30 мин и 1, 3, 6, 16 и 24 ч после инъекции с использованием групп из трех крыс на разные интервалы отбора, чтобы избежать отрицательных последствий слишком частого отбора образцов. Плазму аспирировали после центрифугирования 140× g в течение 10 мин, и концентрацию А1М определяли с помощью радиоиммуноанализа (RIA), как описано (Gram et al., 2015) с использованием специфического варианта А1М в качестве стандарта. Для исследования биораспределения варианты А1М вводили в/в мышам C57BL/6NRJ (в дозе 5,0 мг/кг, стоковые растворы в 20 мМ Трис-НСl, рН 8,0). Мышей подвергали эвтаназии через 10 мин после инъекции (n=3) и через 30 мин (n=3). Отбирали образцы органов, взвешивали и гомогенизировали в буфере для экстракции клеток 5:1 (объем:масса), содержащей 50 мкл/мл complete Mini, таблетки смесей ингибиторов протеиназ без ЭДТА (Roche, номер по каталогу 11836170001). Концентрацию А1М определяли с помощью варианта сэндвич ELISA заявителей. Вкратце, 96-луночные микротитрационные планшеты покрывали в течение ночи при 4°C мышиным моноклональным анти-А1М-антителом (клон 35,14, 5 мкг/мл в PBS), отмывали и затем инкубировали со стандартами А1М (А1М из мочи человека, выделенный как описано в лаборатории заявителей (Åkerström et al., 1995) или гомогенизированными образцами тканей, разбавленными буфером для инкубации (PBS+0,05% твин 20+0,5% бычьего сывороточного альбумина) в течение 60 мин при комнатной температуре. После отмывки лунки инкубировали с мышиным моноклональным антителом против А1М, конъюгированным с пероксидазой хрена (клон 57,10, 5 нг/мл в буфере для инкубации) в течение 60 мин при комнатной температуре. Планшеты отмывали и развивали инкубацией с субстратом пероксидазы SureBlue TMB (KPL) в темноте в течение 20 мин и, наконец, реакцию останавливали добавлением 1 М серной кислоты. Поглощение определяли на ридере при 450 нм на счетчике Wallac 1420 Multi-label Counter. Два мышиных моноклональных антитела получали от AgriSera AB (Vannas, Швеция) против А1М из мочи человека. ELISA был специфичен для человеческого А1М, не реагировал перекрестно с эндогенным плазматическим А1М мыши, и в одинаковой степени реагировал с А1М из мочи человека, M8H4DK-wt А1М (wt-А1М) и M8H4DK-35-А1М (35-А1М).

Повреждение почек, индуцированное рабдомиолизом

Данное исследование было одобрено этическим комитетом по проведению исследований на животных в Malmö-Lund, no. M21-15. Мышей самок C57BL/6 с массой тела 20,5±0,7 г получали из питомника Taconic (Дания), помещали в клетки с проволочными крышками для грызунов типа III при постоянной комнатной температуре с 12 ч циклом свет-темнота. В ходе исследований поддерживалась постоянная температура (20±0,5°C) и относительная влажность (50±5%). Все животные имели свободный доступ к корму (RM1 (E) SQC, SDS, Англия), водопроводной воде и обогащению клеток. После лишения воды в течение ночи (15 ч) животных взвешивали и проводили анестезию с использованием изофлурана, и затем распределяли на следующие четыре группы: 1) контрольная группа (n=6), без внутримышечного (в/м) или внутривенного (в/в) введения; 2) группа с глицерином (n=10), животные получали 50% стерильный глицерин (Teknova, Hollister, CA, USA), в/м (2,0 мл/кг массы тела, однократная доза, разделенная на введение в обе задние конечности); 3) группа с глицерином+M8H4DK-wt А1М (wt-А1М) (n=10), животные получали wt-А1М, в/в (7 мг/кг массы тела, однократная доза) через 30 мин после введения глицерина в/м (2,0 мл/кг массы тела); и 4) группа с глицерином+M8H4DK-35-А1М (35-А1М) (n=10), животные получали 35-А1М, в/м (7 мг/кг массы тела, однократная доза) через 30 мин после введения глицерина, в/м (2,0 мл/кг массы тела). После в/м введения животных помещали на подушку с подогревом на время пробуждения и затем возвращали в их клетки и обеспечивали свободный доступ к корму и воде. Через 4 ч (после введения глицерина) животных подвергали анестезии с использованием изофлурана и отбирали почки, для экстракции РНК с последующим определением фракции мРНК, как описано ниже.

Выделение РНК и ПЦР в режиме реального времени

Общую фракцию РНК выделяли из клеток НК-2, используя набор Direct-zol™ РНК MiniPrep, производства Zymo Research (Irvine, CA, США), или почек мышей с использованием набора NucleoSpin RNA/protein (Machery-Nagel, Duren, Германия), с последующим использованием набора RNeasy® Mini (QIAGEN, German-town, MD, США). Соотношение OD (оптическая плотность при 260 нм/280 нм) РНК во всех случаях было выше 1,9. Обратную транскрипцию проводили согласно инструкциям изготовителя на 1,0 мкг общей фракции РНК с использованием набора для синтеза кДНК iScript™ (Bio-Rad, CA, США). Набор праймеров RT² qPCR Primer Assay (человеческие (НК-2 клетки) и мышиные (почки) от QIAGEN) использовали для количественной оценки экспрессии мРНК гемоксигеназы-1 (HO-1) и белка теплового шока 70 (Hsp70). Данные нормализовали к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (человеческие клетки (НК-2) и мышиные (почки) GAPDH, RT² qPCR Primer Assay от QIAGEN). Данные представлены в виде столбцов, представляющих среднее значение±SEM для данных in vitro, и коробчатых графиков, отображающих медианы и 25-й и 75-й процентиля для данных in vivo. Значения кратных изменений

рассчитывали нормализацией к контрольным образцам из необработанных клеток или животных (контроли). Экспрессию анализировали с использованием реакционных смесей iTaq™ Universal с красителем SYBR® Green (Bio-Rad). Амплификацию проводили, как описано изготовителем (Bio-Rad) в 40 циклах в термоциклере iCycler (Bio-Rad), и данные анализировали с использованием программного обеспечения iCycler iQ Optical System (Bio-Rad).

Спасение клеток K562 от гибели, индуцированной гемом

Ранее было показано, что A1M ингибирует индуцированную гемом гибель человеческих эритроидных клеток K562 (Olsson et al., 2008). Клетки культивировали в DMEM с глутамаксом+10% FCS и антибиотиками (Gibco, Life Technologies Corp., США) в соответствии с инструкциями ATCC. Клетки отмывали и ресуспендировали в DMEM без фенолового красного и FCS, но добавляли глутамакс I и антибиотики (Gibco). Клетки высевали в 96-луночные планшеты из расчета 10^5 клеток на лунку и подвергали воздействию 100 мкМ тема в присутствии серийных разведений 0-10 мкМ A1M. В качестве положительного контроля на гибель клеток добавляли 10 мкл раствора для лизиса из набора для определения ЛДГ (см. ниже). Клетки инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 1 ч. Планшеты быстро центрифугировали при 350g в течение 4 мин, после чего 50 мкл среды переносили в 96-луночный микропланшет для анализа высвобождения ЛДГ с использованием набора cytoTox 96® Non-Radio. Анализ цитотоксичности (Promega Biotech AB, Швеция) проводили в соответствии с инструкциями изготовителя. Индуцированные гемом клетки обычно давали сигнал в 7 раз выше по сравнению с живыми клетками и 70% сигнала полностью лизированных клеток. Среднее значение сигнала клеток, инкубированных без добавления тема или A1M, вычитали из всех показаний, и сигнал клеток, инкубированных только с гемом, устанавливали на 100%. Все другие сигналы сравнивали с этим значением. Данная процедура позволила сравнить результаты нескольких независимых экспериментов.

Защита клеток НК-2

Эпителиальные клетки проксимальных канальцев коры почек человека (НК-2, ATCC® CRL-2190, ATCC, Teddington, UK) культивировали в бессывороточной среде для кератиноцитов (K-SFM), с добавлением экстракта гипофиза крупного рогатого скота (BPE, 0,05 мг/мл) и эпидермального фактора роста (5 нг/мл) (все производства Invitrogen, Paisley, UK). Когда клетки достигали примерно 80-90% конfluence, добавляли гем (0-30 мкМ, из свежеприготовленного 10 мМ стокового раствора) или смесь (NH₄)Fe(SO₄)₂, перекись водорода и аскорбат (0-200 мкМ, реакция Фентона) с одновременным добавлением A1M (0-20 мкМ, M8H4DK-wt A1M (wt-A1M) и M8H4DK-35-A1M (35-A1M)), и клетки инкубировали в течение 6 ч. После инкубации клетки анализировали на жизнеспособность с использованием WST-1 (показатель метаболической активности клеток, например, показатель клеточного расщепления стабильной тетразолиевой соли WST-1 до растворимого формазанового красителя, который прямо коррелирует с числом жизнеспособных клеток) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Германия) в соответствии с инструкциями изготовителя. Жизнеспособность клеток нормализовали к контрольным образцам из необработанных клеток. Параллельные культуры собирали с использованием реагента Qiazol™ Lysis (для экстракции РНК, QIAGEN, Germantown, MD, США). Общую фракцию РНК экстрагировали из клеток для оценки экспрессии мРНК, как описано ниже.

Статистика

Сравнение между отдельными группами проводили с помощью ANOVA с апостериорной поправкой Бонферрони. Значения $P < 0,05$ считались значимыми.

Результаты и обсуждение

Обзор проекта

Целью настоящего исследования является идентификация более стабильных и растворимых вариантов A1M с сохраненными функциональными свойствами. Проект выполняли в три фазы. В фазе I A1M из различных видов и с точечными мутациями человеческого A1M подвергали скринингу для идентификации отдельных аминокислот, которые оказывали положительное влияние на стабильность без нарушения функции. В фазе II аминокислоты, показавшие положительный эффект в фазе I, объединяли для поиска еще лучших комбинаций. Наконец, в фазе III подтверждали данные, полученные в фазах I и II, и исследовали влияние различных N-концевых меток. Во всех трех фазах белки экспрессировали в одной и той же системе E-coli, используя тот же вектор и протокол очистки. Все варианты экспрессировали, выделяли и анализировали параллельно, используя аналогичные протоколы и процедуры в каждой фазе. Панель анализа в каждой фазе обобщена в табл. 1. Аминокислотную последовательность и последовательность ДНК всех конструкций можно найти ниже.

Таблица 1. Анализы, проведенные в различных фазах проекта по исследованию вариантов А1М

	Анализ	фаза I	фаза II	фаза III
1	SDS-PAGE (идентичность, чистота)	x	x	x
2	Поглощение при 280 нм (количество)	x	x	x
3	Круговой дихроизм (идентичность)	x		
4	PAGE (анализ агрегации)	x	x	x
5	SEC-FPLC (анализ агрегации)		x	
6	DLS (анализ агрегации)	x		x
7	ОФ-ВЭЖХ (чистота, анализ агрегации)			x
8	DSF (термостабильность)	x		x
9	Стабильность к сдвигу (анализ DLS)	x		x
10	Стабильность при концентрировании (анализ PAGE)	x	x	x
11	Стабильность при концентрировании в различных буферах (анализ PAGE)			x
12	Стабильность при замораживании-оттаивании, длительном хранении в холодильнике, комнатной температуре, +37°C (SEC-FPLC, восстановление ABTS)*		x	
13	Количественное определение свободных тиоловых групп	x		
14	Восстановительная активность для ABTS-радикала	x	x	x
15	Объем поглощения кислородных радикалов (ORAC)			x
16	Восстановительная активность для цитохрома С			x
17	Восстановительная/связывающая активность для свободного гема	x	x	x
18	Связывающая активность для гем-агарозы	x	x	x
19	Спасение клеток K562 от гибели, индуцированной гемом		x	x
* Проводили только на человеческом А1М дикого типа и варианте M8H4DK-R66H+N1796D				

Аминокислотная последовательность всех конструкций.

60. M8H4DK-человеческий wt (rhAlM) (SEQ ID NO: 9)

MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIMDRMT
 VSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYD
 EYAIFLTCKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVAQGVGIPEDSIFTMADRGECPGE
 QEPEPILIPR

1. M8H5GIEGR-мышь (SEQ ID NO: 24)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRDPASTLPDIQVQENFSESRI
 YGKWNLAVGSTCPWLSRIKDKMSVQTLVLQEGATETEISMTSTRWRRGVCEEIT
 GAYQKTDIDGKFLYHKSKWNITLESYVVHTNYDEYAIFLTCKSSHHTGLTI
 TAKLYGREPQLRDSLLQEFKDVALNVGISENSIIFMPDRGECVPGDREVEPTSIAR

2. M8H5GIEGR-голый землекоп (SEQ ID NO: 25)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRNPVPMPPDNIQVQENFDESRIYGKWFNLATGSTCPWLKRIK
 DRLSVSTMVLGKGTETETQISTTHTHWRQVCQETSGVYKKTDTAGKFLYHKSKWNVTMESYVVH
 TNYDEYAIILTKKFSHHHGPTITAKLYGREPRLRDSLLQEFREMAVGIPEDSIFTMANRGE
 VPGDQAPSTPAPR

3. M8H5GIEGR-лягушка (SEQ ID NO: 26)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRCSPIQPEDNIQIQENFDLQRIYGKWDIAIGSTCKWLKHHK
 EKFMGTLELSDGETDGEVRIVNTRMRHGTCSQIVGSYQKTETPGKFDYFNARWGTTIQNYIVF
 TNYNEYVIMQMRKKKGSETTTTVKLYGRSPDLRPTLVDEFQFALAQGIPEDSIVMLPNNGECS
 PGEIEVRPRR

4. M8H5GIEGR-цыпленок (SEQ ID NO: 27)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRTPVGDQDEDIQVQENFEPERMYGKWDVAVGTTCKWMKNYK
 EKFSMGTLVLGPGPSADQISTISTRRLRQGDCKRVSGEYQKTDTPGKYTYYNPKWDVSIKSYVLR
 TNYEEYAVILMKKTSNFGPTTTTLKLYGRSPELREELTEAFQQLALEMGIPADSVFILANKGECV
 PQETATAPER

5. M8H5GIEGR-кролик (SEQ ID NO: 28)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRDPVPTLPDDIQVQENFELSRIYGKWNLAVGSTCPWLKRIK
 DRMAVSTLVLGEGTSETEISMTSTHWRRGVCEEISGAYEKTDTDGKFLYHKAKWNLTMESYVH
 TNYDEYAIFLTCKKFSRRHGPTITAKLYGREPQLRESLLQEFREVALGVGIPENSIFTMIDRGEC
 VPGQQEPKPAVLR

6. M8H5GIEGR-SQ обезьяна (SEQ ID NO: 29)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRSPVPTPPEGIQVQENFNLSRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIM
 DRLKVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGFCQTSWAYEKTDTDGKFLYHEPKWNVTMESYVAH
 TNYEEYAIFLTCKKFSRRHGPTITAKLYGREPQLRESLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMANRGEC
 VPGEQEPQPILHRR

7. M8H5GIEGR-морж (SEQ ID NO: 30)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRSPVLTTPDAIQVQENFDISRIYGKWFHVAMGSTCPWLKKFM
 DRMSMSTLVLGEGATDGEISMTSTRWRRGTCEEISGAYEKTSTNGKFLYHNPKNITMESYVH
 TDYDEYAIFLTCKKFSRRHGPTITAKLYGRQPQLRESLLEEFRELALGVGIPEDSIFTMANKGEC
 VPGEQEPEPSPHMR

8. M8H5GIEGR-ламантин (SEQ ID NO: 31)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRSPVKTPLNDIQVQENFDLPRIYGKWFNIAIGSTCQWLKRLK
 AGPTMSTLVLGEGATDTEISTTSTRWRKGFCCEEISGAYEKTDTAGKFLYHGSKWNVLTLESYVH
 TNYDEYAIFLTCKKFSRYGLTITAKLYGRQPQVRESLLEEFREFALGVGIPEDSIFTTADKGECV
 PGEQEPEPTAALR

9. M8H5GIEGR-камбала (SEQ ID NO: 32)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRLPVLPEPLYPTQENFDLTRFVGTWHDVALTSSCPHMQRNRA
 DAAIGKLVLEKDTGNKLVTRTRLRHGTCVEMSGEYELTSTPGRIFYHIDRWADVDAYVVHTN
 YDEYAIIMSQKTSGENSTSLKLYSRTMSVRDVLDDFKTLVRHQMSDDTIIKQNKGCIP
 GEQVEEAPSQPEPKR

10. M8H5GIEGR-орангутанг (SEQ ID NO: 33)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIM
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKNITMESYVH
 TNYDEYAIFLTCKKFSRRHGPTITAKLYGRAPQLRETLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

11. M8H5GIEGR-человек P35K (SEQ ID NO: 34)

MHHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCKWLKKIM
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKS KWNITMESYVVH
 TNYDEYAI FLTKKF SRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

12. M8H5GIEGR-человек M41K (SEQ ID NO: 35)

MHHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIK
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKS KWNITMESYVVH
 TNYDEYAI FLTKKF SRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

13. M8H5GIEGR-человек R66H (SEQ ID NO: 36)

MHHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIM
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKS KWNITMESYVVH
 TNYDEYAI FLTKKF SRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

14. M8H5GIEGR-человек T75K (SEQ ID NO: 37)

MHHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIM
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEEKSGAYEKTDTDGKFLYHKS KWNITMESYVVH
 TNYDEYAI FLTKKF SRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

15. M8H5GIEGR-человек T75Y (SEQ ID NO: 38)

MHHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIM
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEEYSGAYEKTDTDGKFLYHKS KWNITMESYVVH
 TNYDEYAI FLTKKF SRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

16. M8H5GIEGR-человек M99K (SEQ ID NO: 39)

MHHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIM
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKS KWNITKESYVVH
 TNYDEYAI FLTKKF SRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

17. M8H5GIEGR-человек S101Y (SEQ ID NO: 40)

MHHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIM
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKS KWNITMEYYVVH
 TNYDEYAI FLTKKF SRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

18. M8H5GIEGR-человек K69.92.118.130R (SEQ ID NO: 41)

MHHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIM

DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRRGVCEETSGAYEKTDGKFLYHRSKWNITMESYVVH
 TNYDEYAIFLTCKFRHHGPTITARLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

19. M8H5GIEGR-латимерия (SEQ ID NO: 42)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRGSPLRDEDIQVQENFDLPRIYKWEIAIASTCPWVKNHKD
 KMFMGTMVLQEGEQSDRISTTSTRIRDGTCQITGYTLTTTPGKFAYHNSKWNLDVNSYVVHT
 NYDEYSIVMMQKYKSSNSTTTVRLYGRTOELRDSLHAEFKKFALDQGIDEDSIYILPKRDECVP
 GEPKAESLMAR

21. M8H5GIEGR-человек L89T (SEQ ID NO: 43)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYKQWYNLAIGSTCPWLKKIM
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDGKFTYHKSKNITMESYVVH
 TNYDEYAIFLTCKFRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

22. M8H5GIEGR-человек N1796D (SEQ ID NO: 44)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYKQWYNLAIGSTCPWLKKIM
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDGKFLYHKSKNITMESYVVH
 TNYDEYAIFLTCKFRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

23. M8H5GIEGR-человек T45K (SEQ ID NO: 45)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYKQWYNLAIGSTCPWLKKIM
 DRMKVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDGKFLYHKSKNITMESYVVH
 TNYDEYAIFLTCKFRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

24. M8H5GIEGR-человек A135E (SEQ ID NO: 46)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYKQWYNLAIGSTCPWLKKIM
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDGKFLYHKSKNITMESYVVH
 TNYDEYAIFLTCKFRHHGPTITAKLYGREPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 VPGEQEPEPILIPR

25. M8H5GIEGR-человек V170S (SEQ ID NO: 47)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYKQWYNLAIGSTCPWLKKIM
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDGKFLYHKSKNITMESYVVH
 TNYDEYAIFLTCKFRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE
 SPGEQEPEPILIPR

26. M8H5GIEGR-человек V148D (SEQ ID NO: 48)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYKQWYNLAIGSTCPWLKKIM
 DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDGKFLYHKSKNITMESYVVH

TNYDEYAI FLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRDVAQGVGIPEDSIFTMADRGECPGEQEPEPILIPR

27. M8H5GIEGR-человек G172Q (SEQ ID NO: 49)

MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDTNYDEYAI FLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECPGEQEPEPILIPR

33. M8H4DK-человек M41K+R66H (SEQ ID NO: 50)

MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIKDRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAI FLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECPGEQEPEPILIPR

34. M8H4DK-человек M41K+N1796D (SEQ ID NO: 51)

MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIKDRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDGKFLYHKSKWDITMESYVVHTNYDEYAI FLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECPGEQEPEPILIPR

35. M8H4DK-человек R66H+N1796D (SEQ ID NO: 52)

MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDGKFLYHKSKWDITMESYVVHTNYDEYAI FLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECPGEQEPEPILIPR

36. M8H4DK-человек M41K+R66H+N1796D (SEQ ID NO: 53)

MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIKDRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDGKFLYHKSKWDITMESYVVHTNYDEYAI FLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECPGEQEPEPILIPR

37. M8H4DK-человек M41K (SEQ ID NO: 8)

MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIKDRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAI FLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECPGEQEPEPILIPR

38. M8H4DK-человек R66H (SEQ ID NO: 54)

MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAI FLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECPGEQEPEPILIPR

QEPEPILIPR

39. M8H4DK-человек N1796D (SEQ ID NO: 55)

MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIMDRMT
VSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKS KWDITMESYVVHTNYD
EYAI FLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETL LQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE CVPGE
QEPEPILIPR

40. M8H-человеческий wt (SEQ ID NO: 56)

MHHHHHHHHHGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLV
LGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKS KWNITMESYVVHTNYDEYAI F
LTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETL LQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE CVPGEQEPEP
ILIPR

41. M8H-человек R66H+N1796D (SEQ ID NO: 57)

MHHHHHHHHHGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLV
LGEGATEAEISMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKS KWDITMESYVVHTNYDEYAI F
LTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETL LQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE CVPGEQEPEP
ILIPR

42. R66H+N1796D (SEQ ID NO: 3)

MGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGATEA
EISMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKS KWDITMESYVVHTNYDEYAI FLTKKFSRH
HGPTITAKLYGRAPQLRETL LQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE CVPGEQEPEPILIPR

61. без метки, человеческий wt (SEQ ID NO: 2)

MGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGATEA
EISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKS KWNITMESYVVHTNYDEYAI FLTKKFSRH
HGPTITAKLYGRAPQLRETL LQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGE CVPGEQEPEPILIPR

Последовательность ДНК всех конструкций.

60. M8H4DK-человеческий wt (SEQ ID NO: 58)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCC
GCCCAGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAAC
CTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGC
TGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGG
TGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCAC
AAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCA
TTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCG
GGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCAGGGTGTGGGCATC
CCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAG
AGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

1. M8H5GIEGR-мышь (SEQ ID NO: 59)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGACCC
 TCGTCAACACTGCCAGATATCCAGGTTTCAGGAGAACTTCAGTGAGTCCCGGATCTATGAAAA
 TGGTACAACCTGGCGGTGGGATCCACCTGCCCCGTGGCTGAGCCGCATTAAGGACAAGATGAGCG
 TGAGCACGCTGGTGCTGCAGGAGGGGGCGACAGAAACAGAGATCAGCATGACCAGTACTCGATG
 GCGGAGAGGTGTCTGTGAGGAGATCACTGGGGCGTACCAGAAGACGGACATCGATGGAAAGTTC
 CTCTACCACAAATCCAAATGGAACATAACCTTGAATCCTATGTGGTCCACACCAACTATGACG
 AATATGCCATTTTTCCTTACCAAGAAGTCCAGCCACCACCACGGGCTCACCATCACTGCCAAGCT
 CTATGGTCGGGAGCCACAGCTGAGGGACAGCCTTCTGCAGGAGTTCAAGGATGTGGCCCTGAAT
 GTGGGCATCTCTGAGAACTCCATCATTTTTATGCCTGACAGAGGGGAATGTGTCCCTGGGGATC
 GGGAGGTGGAGCCCACATCAATTGCCAGATGA

2. M8H5GIEGR-голый землекоп (SEQ ID NO: 60)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCAATCC
 TGTGCCGATGCCGCCAGACAACATCCAAGTGCAGGAGAACTTTGATGAATCCCGGATCTATGGG
 AAATGGTTCAACCTGGCTACGGGCTCCACGTGCCCCGTGGCTGAAGAGGATCAAAGACAGGCTGA
 GTGTGAGCACAATGGTGCTGGGCAAGGGGACCACGGAGACACAGATCAGCACAACCCACACCCA
 CTGGCGGCAAGGGGTGTGCCAGGAGACCTCAGGGGTTTACAAGAAAACAGACACGGCTGGGAAG
 TTCCTCTACCACAAGTCCAAATGGAATGTAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
 ATGAGTATGCCATCATTTCTAACTAAGAAGTTTCAGCCACCACCATGGACCGACCATTTACTGCCAA
 GCTCTATGGGAGAGAGCCGCGGCTGAGAGACAGCCTCCTGCAGGAATTCAGGGAGATGGCCCTG
 GGCGTAGGCATCCCCGAGGATTCCATCTTACAATGGCCAACAGAGGGGAATGTGTCCCTGGTG
 ACCAGGCACCAGAGTCCACCCCAGCCCCGAGGTGA

3. M8H5GIEGR-лягушка (SEQ ID NO: 61)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCTGCAG
 CCAATCCAGCCAGAGGACAATATCCAGATCCAGGAGAACTTTGATCTCCAGAGGATTTATGGC
 AAATGGTACGACATTGCCATCGGCTCCACCTGCAAATGGCTGAAGCACCACAAGGAAAAGTTCA
 ACATGGGGACACTGGAGCTTAGCGATGGGGAGACCGACGGGGAGGTGCGGATTGTGAACACAAG
 GATGAGGCACGGAACCTGCTCTCAGATTGTTGGGTCCTATCAGAAGACAGAGACCCAGGGAAG
 TTCGACTATTTCAACGCACGGTGGGGAACCACGATCCAAAACACATTGTCTTACTAACTACA
 ATGAGTATGTCATCATGCAGATGAGGAAGAAGAAGGGATCGGAGACCACCACGACCGTCAAGCT
 GTATGGGCGGAGCCAGACTTGCCTCCGACCTCGTTGATGAATTCAGGCAGTTTGCCTTGGCT
 CAGGGCATTCTGAAGACTCCATCGTGATGCTACCTAACAATGGTGAGTGCTCTCAGGGGAAA
 TAGAAGTGAGACCACGGAGATGA

4. M8H5GIEGR-цыпленок (SEQ ID NO: 62)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCACGCC
 TGTTGGGGACCAGGATGAGGACATTCAAGTGCAAGAGAATTTTGAGCCTGAGCGGATGTATGGG

AAATGGTATGACGTAGCTGTTGGCACCACTGCAAGTGGATGAAGAACTACAAGGAGAAGTTCA
GCATGGGCACACTGGTGCTGGGCCCCGGCCCCAGCGCTGACCAGATCAGTACCATCAGCACCCAG
GCTGCGGCAAGGTGACTGCAAACGTGTCTCAGGAGAGTACCAGAAAAGTACACCCCTGGCAAA
TACACCTACTATAACCCCAAGTGGGATGTGTCTATCAAGTCCTACGTGCTTCGCACCAACTATG
AAGAATACGCAGTCATTCTGATGAAGAAGACAAGTAATTTTGGCCCAACCACCACACTGAAGCT
GTATGGGAGAAGCCCAGAGCTGCGGGAAGAGCTCACCGAGGCTTTCCAGCAGCTGGCTCTGGAG
ATGGGCATCCCTGCAGATTCCGTCTTCATCCTGGCCAACAAAGGTGAATGTGTCCCACAGGAGA
CTGCCACTGCCCCCTGAGAGGTGA

5. M8H5GIEGR-кролик (SEQ ID NO: 63)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGACCC
CGTGCCCAACCCTGCCGACGACATCCAAGTGCAGGAGAACTTCGAGCTCTCTCGGATCTACGGG
AAATGGTACAACCTGGCTGTGGGGTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAGGATCAAGGACAGGATGG
CCGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGGACGAGCGAGACGGAGATCAGCATGACCAGCACGCA
CTGGCGGAGGGGCGTCTGTGAGGAGATCTCCGGGGCCTATGAGAAAACGGACACTGACGGGAAG
TTCTGTACCACAAAGCCAAATGGAACCTTAACCATGGAGTCCTACGTGGTGCACACCAACTACG
ATGAGTATGCCATTTTTCTCACCAGAAATTCAGCCGCCGCCACGGCCCCACCATCACCGCCAA
GCTCTATGGGCGGGAGCCGAGCTGAGGGAGAGCCTCCTGCAGGAGTTCAGGGAGGTGGCTCTC
GGGGTGGGGATCCCCGAGAACTCCATCTTACCATGATCGACAGAGGGGAATGTGTGCCCCGGGC
AGCAGGAACCAAAGCCTGCCCCCGTGTGAGATGA

6. M8H5GIEGR-беличья обезьяна (SEQ ID NO: 64)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGAGCCC
AGTGCCGACGCCGCCCGAAGGCATTCAAGTGCAGGAAAAGTTCATCTCTCTCGGATCTACGGC
AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCTGGCTAAAGAAGATCATGGACAGGTTGA
AAGTGAGCACGCTGGTGCTGGAAGAGGGCGCCACGGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
CTGGCGGAAAGGTTTCTGTGAGCAGACCTCTTGGGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
TTTCTCTATCACGAACCCAAATGGAACGTAACCATGGAGTCCTATGTGGCCCACACCAACTATG
AGGAGTATGCCATTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCCATCATGGACCCACCATTAAGTCCAA
GCTCTATGGGCGGGAGCCACAGCTGAGGGAAAGCCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
GGTGTGGGCATCCCTGAGGATTCCATCTTACCATGGCTAACCGAGGTGAATGCGTCCCTGGGG
AGCAGGAACCAAGCCATCCTACACCGGAGATGA

7. M8H5GIEGR-морж (SEQ ID NO: 65)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGAGTCC
CGTGCTGACGCCGCCTGACGCCATCCAAGTGAAGAGAACTTCGACATCTCTCGGATCTACGGG
AAGTGGTTTCATGTGGCCATGGGCTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGTTCATGGACAGGATGT
CCATGAGCACGCTGGTGCTGGGCGAGGGGGCGACGGATGGGGAGATCAGCATGACCAGCACACG
TTGGCGGAGAGGCACCTGTGAGGAGATCTCTGGGGCTTATGAGAAAACAGCACTAACGGAAAG

TTCTCTATCATAATCCCAAATGGAACATCACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCGACTATG
 ATGAGTACGCCATCTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCACCATGGGCCCACCATTACTGCCAA
 GCTCTATGGGCGACAGCCGCAGCTTCGAGAAAGCCTGCTGGAGGAGTTCAGGGAGCTTGCCTTG
 GGTGTGGGCATCCCCGAGGACTCCATCTTCACCATGGCCAACAAAGGTGAGTGTGTCCCTGGGG
 AGCAGGAACCAGAGCCCTCTCCACACATGAGGTGA

8. M8H5GIEGR-ламантин (SEQ ID NO: 66)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGTATCGAGGGCCGCAGCCC
 AGTGAAAACACCACTCAACGACATCCAAGTGCAGGAGAACTTTGACCTCCCTCGGATCTACGGG
 AAATGGTTCAACATAGCCATTGGCTCCACCTGCCAATGGCTGAAGAGGTTGAAGGCCGGGCCGA
 CCATGAGCACCCCTGGTCTGGGAGAGGGAGCTACAGACACAGAGATCAGCACAACCAGCACTCG
 TTGGCGGAAAGGCTTCTGTGAGGAGATCTCTGGGGCATATGAGAAAACAGACACAGCTGGGAAG
 TTCCTTTATCACGGATCCAAATGGAATGTAACCTTGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
 ATGAGTACGCCATTTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCTATGGACTCACCATTACTGCTAAGCT
 CTATGGGCGGCAGCCTCAGGTGAGGGAGAGCCTCCTGGAGGAGTTCAGGGAATTTGCCCTGGGT
 GTGGGCATCCCTGAGGATTCCATCTTCACCACGGCCGACAAAGGTGAGTGTGTCCCTGGAGAGC
 AGGAGCCAGAACCCACCGCAGCCCTGAGATGA

9. M8H5GIEGR-камбала (SEQ ID NO: 67)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGTATCGAGGGCCGCCTCCC
 TGTGCTCCCTGAACCTCTTTACCCGACACAGGAGAACTTTGATCTGACCCGGTTTGTGGGGACA
 TGGCAGGATGTTGCCTTGACGAGCAGCTGCCCCCATATGCAGCGTAACAGGGCGGATGCAGCCA
 TTGGTAAACTGGTTCTGGAGAAAGACACTGGAAACAACTCAAGGTGACACGAACTAGACTCAG
 ACATGGAACATGTGTGGAGATGTCTGGAGAATATGAGTTAACCAGCACACCAGGACGAATCTTC
 TACCATATTGACAGGTGGGATGCAGACGTGGACGCCTACGTGGTTTACACCAACTACGACGAGT
 ACGCAATTATAATAATGAGCAAACAGAAAACATCGGGGGAGAACAGCACCTCAAGCTGTA
 CAGTCGGACGATGTCTGTGAGAGACACTGTGCTGGATGACTTCAAACTCTGGTCAGACATCAG
 GGAATGAGTGACGACACCATTATCATCAAGCAGAACAAAGGTGACTGTATTCTTGAGAGCAGG
 TGGAAGAAGCACCATCTCAGCCAGAGCCCAAGCGGTGA

10. M8H5GIEGR-орангутанг (SEQ ID NO: 68)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGTATCGAGGGCCGCGGCC
 TGTGCCGACGCCGCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
 AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
 CAGTGAGCACCCCTGGTGTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
 TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACATCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
 TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
 ATGAGTATGCCATTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCGTCATGGACCCACCATTACTGCCAA
 GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAAACCCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCAG

GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
AACAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

11. M8H5GIEGR-человек P35K (SEQ ID NO: 69)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
TGTGCCAACGCCGCCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCAAATGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
CAGTGAGCACGCTGGTGTCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
ATGAGTATGCCATTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAAAACCTCTCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

12. M8H5GIEGR-человек M41K (SEQ ID NO: 70)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
TGTGCCAACGCCGCCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCAAAGACAGGATGA
CAGTGAGCACGCTGGTGTCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
ATGAGTATGCCATTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAAAACCTCTCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

13. M8H5GIEGR-человек R66H (SEQ ID NO: 71)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
TGTGCCAACGCCGCCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
CAGTGAGCACGCTGGTGTCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCA
TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
ATGAGTATGCCATTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAAAACCTCTCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

14. M8H5GIEGR-человек T75K (SEQ ID NO: 72)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
 TGTGCCAACGCCGCCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAAC TTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
 AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
 CAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
 TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGAAATCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
 TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
 ATGAGTATGCCATTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
 GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
 GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
 AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

15. M8H5GIEGR-человек T75Y (SEQ ID NO: 73)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
 TGTGCCAACGCCGCCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAAC TTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
 AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
 CAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
 TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGTATTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
 TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
 ATGAGTATGCCATTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
 GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
 GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
 AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

16. M8H5GIEGR-человек M99K (SEQ ID NO: 74)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
 TGTGCCAACGCCGCCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAAC TTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
 AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
 CAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
 TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
 TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCAAAGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
 ATGAGTATGCCATTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
 GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
 GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
 AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

17. M8H5GIEGR-человек S101Y (SEQ ID NO: 75)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
 TGTGCCAACGCCGCCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAAC TTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
 AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA

CAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
 TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
 TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTATTATGTGGTCCACACCAACTATG
 ATGAGTATGCCATTTTCTTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
 GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
 GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
 AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

18. M8H5GIEGR-человек K69.92.118.130R (SEQ ID NO: 76)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
 TGTGCCAACGCCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
 AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
 CAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
 TTGGCGGCGTGGTGCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
 TTTCTCTATCACCGTTCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
 ATGAGTATGCCATTTTCTTGACCAAGCGTTTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCCCG
 TCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
 GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
 AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

19. M8H5GIEGR-латимерия (SEQ ID NO: 77)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGAAG
 TCCCCCTCGAGATGAAGACATCCAAGTGCAGGAGAACTTTGACCTTCCCAGGATTTATGGAAAA
 TGGTACGAAATTGCAATCGCTTCGACCTGTCCCTGGGTGAAGAATCACAAGGATAAGATGTTCA
 TGGGAACATATGGTGCTACAAGAGGGAGAGCAGAGTGACCGGATCAGTACCACCTCCACCCGAAT
 CAGGGATGGAACCTGCTCACAGATCACTGGATATTACACGTTAACCACAACACCTGGGAAGTTC
 GCTTATCACAATTCTAAATGGAACCTGGATGTCAACAGTTATGTTGTTACACTAACTATGACG
 AATACTCGATTGTGATGATGCAGAAATACAAAAGCTCTAACTCTACCACTACAGTCCGACTCTA
 TGGAAGAACTCAAGAGCTACGAGACAGCTTGCATGCCGAGTTCAAAAAGTTTGCTCTGGATCAG
 GGAATAGATGAGGACTCCATTTACATTCTGCCAAAAGAGATGAATGTGTACCTGGTGAACCTA
 AAGCAGAATCTCTCATGGCACGTTGA

21. M8H5GIEGR-человек L89T (SEQ ID NO: 78)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
 TGTGCCAACGCCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
 AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
 CAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
 TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
 TTTACCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG

ATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

22. M8H5GIEGR-человек N1796D (SEQ ID NO: 79)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
TGTGCCAACGCCGCCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTTCGATATCTCTCGGATCTATGGG
AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
CAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGGATATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
ATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

23. M8H5GIEGR-человек T45K (SEQ ID NO: 80)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
TGTGCCAACGCCGCCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
AAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
ATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

24. M8H5GIEGR-человек A135E (SEQ ID NO: 81)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
TGTGCCAACGCCGCCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
CAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATG
ATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
GCTCTACGGGCGGGAACCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAG
GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG

AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

25. M8H5GIEGR-человек V170S (SEQ ID NO: 82)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
TGTGCCAACGCCGCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
CAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCATGTGGTCCACACCAACTATG
ATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCAG
GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTTCTCCTGGGG
AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

26. M8H5GIEGR-человек V148D (SEQ ID NO: 83)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
TGTGCCAACGCCGCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
CAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCATGTGGTCCACACCAACTATG
ATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGATGTTGCCAG
GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGG
AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

27. M8H5GIEGR-человек G172Q (SEQ ID NO: 84)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCC
TGTGCCAACGCCGCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTCAATATCTCTCGGATCTATGGG
AAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGA
CAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCG
TTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAG
TTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCATGTGGTCCACACCAACTATG
ATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAA
GCTCTACGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCAG
GGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTCAGG
AGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

33. M8H4DK-человек M41K+R66H (SEQ ID NO: 85)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCC

GCCCCACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAAC
 CTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCAAAGACAGGATGACAGTGAGCACGC
 TGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCATTGGCGGAAAGG
 TGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCAC
 AAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCA
 TTTTCCTGACCAAGAAATTACAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCG
 GCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCAGGGTGTGGGCATC
 CCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAG
 AGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

34. M8H4DK-человек M41K+N1796D (SEQ ID NO: 86)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCC
 GCCCCACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTTCGATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAAC
 CTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCAAAGACAGGATGACAGTGAGCACGC
 TGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGG
 TGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCAC
 AAATCCAAATGGGATATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCA
 TTTTCCTGACCAAGAAATTACAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCG
 GCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCAGGGTGTGGGCATC
 CCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAG
 AGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

35. M8H4DK-человек R66H+N1796D (SEQ ID NO: 87)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCC
 GCCCCACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTTCGATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAAC
 CTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGC
 TGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCATTGGCGGAAAGG
 TGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCAC
 AAATCCAAATGGGATATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCA
 TTTTCCTGACCAAGAAATTACAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCG
 GCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCAGGGTGTGGGCATC
 CCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAG
 AGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

36. M8H4DK-человек M41K+R66H+N1796D (SEQ ID NO: 88)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCC
 GCCCCACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTTCGATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAAC
 CTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCAAAGACAGGATGACAGTGAGCACGC
 TGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCATTGGCGGAAAGG

TGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCAC
 AAATCCAAATGGGATATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCA
 TTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCG
 GGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATC
 CCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAG
 AGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

37. M8H4DK-человек M41K (SEQ ID NO: 89)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCC
 GCCCACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAAC
 CTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCAAAGACAGGATGACAGTGAGCACGC
 TGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGG
 TGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCAC
 AAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCA
 TTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCG
 GGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATC
 CCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAG
 AGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

38. M8H4DK-человек R66H (SEQ ID NO: 90)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCC
 GCCCACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAAC
 CTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGC
 TGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCATTTGGCGGAAAGG
 TGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCAC
 AAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCA
 TTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCG
 GGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATC
 CCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAG
 AGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

39. M8H4DK-человек N1796D (SEQ ID NO: 91)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCC
 GCCCACAACATCCAAGTGCAGGAAAACCTCGATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAAC
 CTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGC
 TGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGG
 TGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCAC
 AAATCCAAATGGGATATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCA
 TTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCG

GGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCAGGGTGTGGGCATC
CCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAG
AGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

40. M8H-человеческий wt (SEQ ID NO: 92)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCAGGCCCTGTGCCAACGCCGCCGACAACATCCA
AGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCC
ACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGG
GCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGAC
GTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAAC
ATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGA
AATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGCTGAG
GGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATC
TTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCC
CGAGATGA

41. M8H-человек R66H+N1796D (SEQ ID NO: 93)

ATGCATCACCATCACCATCACCATCAGGCCCTGTGCCAACGCCGCCGACAACATCCA
AGTGCAGGAAAACTTCGATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCC
ACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGG
GCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCATTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGAC
GTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGGAT
ATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGA
AATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGCTGAG
GGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATC
TTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCC
CGAGATGA

42. без метки, человек R66H+N1796D (SEQ ID NO: 94)

ATGGGCCCTGTGCCAACGCCGCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCGATATCTC
TCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATC
ATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCA
TGACCAGCACTCATTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGA
TACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGGATATAACCATGGAGTCCTATGTGGTC
CACACCAACTATGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCA
CCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAG
AGTGGTTGCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAA
TGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

61. без метки, человеческий wt (SEQ ID NO: 95)

ATGGGCCCTGTGCCAACGCCGCCGACAAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTC
 TCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCCTGGCTGAAGAAGATC
 ATGGACAGGATGACAGTGAGCAGCTGGTGTCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCA
 TGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGA
 TACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTC
 CACACCAACTATGATGAGTATGCCATTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCA
 CCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCTGCAGGACTTCAG
 AGTGTTGCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAA
 TGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

Обоснование конструкций вариантов A1M

Были сконструированы, экспрессированы, выделены и анализированы человеческий wt-A1M, 11 гомологов A1M из разных видов и 15 вариантов A1M с точечными мутациями, в общей сложности 27 вариантов A1M (табл. 2). 11 гомологов A1M были выбраны по следующим соображениям. A1M является высококонсервативным между видами. Проводили поиск последовательностей A1M из разных видов в базах данных (www.ncbi.nlm.nih.gov и www.uniprot.org). Были найдены

последовательности AMBP из 67 разных видов. Последовательности исследовали на присутствие A1M-специфических функциональных групп (K69, K92, K118, K130, Y22, Y132, H122 и H123), липокалиновых мотивов (SCR1, 2, 3) (см. ссылки в разделе "Введение") и прогнозируемых сайтов связывания углеводов (Escribano et al., 1990). Пять были классифицированы в качестве не относящихся к A1M и отброшены, поскольку в них отсутствовал цистеин 34, три были отброшены, потому что в них отсутствовал цистеин 169, четыре, потому что они были неполными, и два, потому что у них были длинные, сомнительные вставки. Аминокислотные последовательности оставшихся 53 гомологов выравнивали, и была моделирована их гипотетическая трехмерная 3D-структура проекцией их аминокислотных последовательностей на кристаллическую структуру человеческого A1M (Meining and Skerra, 2012), для идентификации расположения отдельных аминокислотных боковых цепей в петлях липокалина или внутри или снаружи кармана. Результат этого моделирования использовали для конструирования точечных мутаций, оказывающих влияние на функцию A1M, как описано ниже. Обоснование для выбора конечных 11 гомологов (см. табл. 2) базировалось на комбинации широко распространенного эволюционного представления, методологической осуществимости, потенциально повышенной экологической нагрузки с точки зрения окислительного стресса в среде обитания видов, наличия или отсутствия функциональных A1M-специфических групп и отсутствия гликозилирования. 15 вариантов A1M с точечными мутациями были выбраны по следующим соображениям. Восемь вариантов были мутированы в стратегических аминокислотах, связанных с проявлением функциональных свойств, и семь вариантов в гидрофильных положениях для повышения стабильности/растворимости (табл. 2). Восемь функциональных мутаций были выбраны, поскольку они 1) имели место у других видов в положениях в 3D-структурной модели (см. выше), которые потенциально могли влиять на функцию A1M и/или 2) теоретически должны уменьшать pKa цистеина 34 и/или 3) теоретически будут обеспечивать дополнительный сайт захвата радикалов.

Прогнозируемые данные для всех вариантов рассчитывали с использованием инструмента http://www.alphalyse.com/gpmaw_lite.html (табл. 3).

Таблица 2. Варианты, экспрессированные и анализируемые в фазе I
проекта по исследованию вариантов А1М

Номер *	Название	Системное название	Последовательность белка	Идентификатор гена Info	Цель мутации	Обоснование	N-концевая метка
60	человек wt	<i>Homo sapiens</i>	NP_001624	gi:4502067			M8H4DK
1	мышь	<i>Mus musculus</i>	NP_031469	gi:311703	Вид	только грызуны, лабораторные животные, были антитела	M8H5GIEGR
2	голый землекоп	<i>Heterocephalus glaber</i>	XP_004885260	gi:512843527	Вид	долгожители, низкая частота опухолей предполагает наличие хороших эндогенных антиоксидантов	M8H5GIEGR
3	лягушка	<i>Xenopus laevis</i>	NP_001080820	gi:147905774	Вид	отсутствие прогнозируемого углевода предполагает высокую растворимость полипептида, 1 дополнительный Cys, высокое значение pI	M8H5GIEGR
4	цыпленок	<i>Gallus gallus</i>	NP_001264627	gi:478732996	Вид	только у птиц	M8H5GIEGR
5	кролик	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	XP_008271622	gi:655878696	Вид	лабораторные животные, были антитела	M8H5GIEGR
6	беличья обезьяна	<i>Saimiri boliviensis</i>	XP_0039252551	gi:403266141	Вид	два примата, меньше замен по сравнению с человеком, более легкое считывание	M8H5GIEGR
7	морж	<i>Odobenus rosmarus</i>	XP_004397010	gi:472354701	Вид	неравномерное окисление за счет деления	M8H5GIEGR
8	ламантин	<i>Trichechus manatus</i>	XP_004372191	gi:0471363267	Вид	неравномерное окисление за счет деления	M8H5GIEGR
9	камбала	<i>Pleuronectes platessa</i>	2021284A	gi:1091607	Вид	неравномерное окисление за счет деления	M8H5GIEGR
10	орангутанг	<i>Pongo abelii</i>	NP_001127069	gi:197102775	Вид	одна замена - H122R - в представляющем интерес положении: редуктаза и связывание гема	M8H5GIEGR
11	человек R35K				Функция	а) встречается у птиц и лягушек, б) может снижать pKa C34, с) может быть местом захвата радикалов	M8H5GIEGR
12	человек M41K				Функция	а) встречается у многих видов, б) может снижать pKa C34, с) может быть местом захвата радикалов	M8H5GIEGR
13	человек R66H				Функция	встречается у многих видов, см. грызуны и кролики	M8H5GIEGR
14	человек T75K				Функция	а) может снижать pKa C34, б) может быть местом захвата радикалов	M8H5GIEGR
15	человек T75Y				Функция	может быть местом захвата радикалов	M8H5GIEGR
16	человек M99K				Функция	а) может снижать pKa C34, б) может быть местом захвата радикалов	M8H5GIEGR
17	человек S101Y				Функция	может быть местом захвата радикалов	M8H5GIEGR
18	человек K69, 92, 118, 130R				Функция	может быть местом захвата радикалов	M8H5GIEGR
19	латимерия	<i>Latimeria chalumnae</i>	XP_005994505.1	gi:556972695	Вид	идентифицированная самая примитивная последовательность А1М	M8H5GIEGR
21	человек L89T				Растворимость	гидрофильное положение, повышенная гидрофильность, имеет место у многих видов	M8H5GIEGR
22	человек N17, 96D				Растворимость	углеводные фрагменты, повышенная гидрофильность	M8H5GIEGR
23	человек T45K				Растворимость	гидрофильное положение, повышенный заряд, имеет место у многих видов	M8H5GIEGR
24	человек A135E				Растворимость	гидрофильное положение, повышенный заряд, имеет место у многих видов	M8H5GIEGR
25	человек V170S				Растворимость	гидрофильное положение, гидрофильность, имеет место у многих видов	M8H5GIEGR
26	человек V148D				Растворимость	гидрофильное положение, гидрофильность, имеет место у многих видов	M8H5GIEGR
27	человек G172Q				Растворимость	гидрофильное положение, гидрофильность, имеет место у птиц	M8H5GIEGR
• Нумерация соответствует последовательностям, указанным выше							

Таблица 3. Прогнозируемые данные для вариантов в фазе I

#	Вариант	# аминокисл от	Молекулярн ая масса (Да)	pI	Суммарны й заряд (D+E) – (R+K)	Коэффици ент экстинк ции 280nm (cm ⁻¹)	Индекс гидрофобно сти
60	человечески й wt	197	22561	6,4	-5	1,47	-0,64
1	мышь	200	22732	6,6	-4	1,46	-0,60
2	голый землекоп	201	22741	9,2	2	1,40	-0,73
3	лягушка	197	22660	8,0	0	1,22	-0,79
4	цыпленок	197	22302	6,5	-3	1,40	-0,76
5	кролик	201	22911	6,9	-2	1,45	-0,61
6	беличья обезьяна	201	23066	7,3	-1	1,68	-0,69
7	морж	201	22837	6,6	-4	1,39	-0,63
8	ламантин	200	22469	6,6	-3	1,47	-0,54
9	камбала	202	22896	6,6	-4	0,89	-0,71
10	орангутанг	201	22733	7,2	-1	1,46	-0,58
11	человек P35K	201	22745	7,2	-1	1,46	-0,58
12	человек M41K	201	22711	7,2	-1	1,46	-0,60
13	человек R66H	201	22695	6,7	-3	1,46	-0,57
14	человек T75K	201	22741	7,2	-1	1,46	-0,59
15	человек T75Y	201	22776	6,9	-2	1,51	-0,58
16	человек M99K	201	22711	7,2	-1	1,46	-0,60
17	человек S101Y	201	22790	6,9	-2	1,51	-0,57
18	человек K69,92,118, 130R	201	22826	6,9	-2	1,45	-0,58
19	латимерия	198	22741	6,7	-3	1,38	-0,78
21	человек L89T	201	22702	6,9	-2	1,46	-0,59
22	человек N17,96D	201	22716	6,5	-4	1,46	-0,57
23	человек T45K	201	22741	7,2	-1	1,46	-0,59
24	человек A135E	201	22772	6,7	-3	1,45	-0,60
25	человек V170S	201	22702	6,9	-2	1,46	-0,60
26	человек V148D	201	22730	6,7	-3	1,46	-0,61
27	человек G172Q	201	22785	6,9	-2	1,45	-0,59

Фаза I.

Варианты экспрессировали в параллельных встряхиваемых колбах. Имела место вариация уровней экспрессии, и для нескольких вариантов A1M экспрессию повторяли несколько раз, чтобы получить приемлемые количества белка. Хорошая экспрессия и относительно большие количества после очистки (>10 мг/л культуры) были получены для белков мыши, беличьей обезьяны, моржа, орангутанга, M41K, R66H, T75Y, M99K, N17,96D, T45K и V148D. Экспрессия и количество очищенного белка были сходны с ранее полученными выходами для человеческого wt A1M (12 мг/л), экспрессированного и выделенного в аналогичных условиях. Варианты с более низкими уровнями экспрессии, что приводило к более низким выходам (1-10 мг/л), представляли белки от голого землекопа, лягушки, кролика, ламантина, P35K, T75K, S101Y, L89T, V170S и G172Q. A1M от цыпленка, камбалы и латимерии имели субоптимальные уровни экспрессии, в результате чего достигался выход выделения <1 мг/л культуры. Человеческий му-

тант с четырьмя мутациями K69,92,118,130R хорошо экспрессировался, но невозможно было успешно провести рефолдинг. Также T75K-A1M показывал повышенную тенденцию к преципитации при очистке.

Все варианты очищали до чистоты >99% согласно данным SDS-PAGE, за исключением A1M цыпленка и камбалы, очистка которых обеспечивала чистоту на уровне 95%. По результатам SDS-PAGE все варианты содержали максимум 0,5% ковалентных димеров без существенных различий между вариантами. Результаты кругового дихроизма показали примерно структуры 2% альфа-спирали и 40% структуры β-листа для всех вариантов без существенных различий между ними, ожидаемые значения для A1M (Kwasek et al., 2007). После очистки все варианты анализировали, как обобщенно в табл. 4. Сначала анализировали стабильность и растворимость. Тенденцию к агрегации и термостабильность сразу же после оттаивания, без приложения напряжения 0,1 мМ растворов белка анализировали с использованием динамического рассеяния света (DLS), PAGE (агрегация) и дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) (термостабильность). Кроме того, была исследована тенденция к агрегации в ответ на сдвигающие силы или концентрирование до 1 мМ. Человеческий wt A1M относительно хорошо проявлял себя в этих анализах (табл. 4), но некоторые варианты были даже еще лучше в отношении свойств стабильности/растворимости: A1M цыпленка, A1M ламантина и N17,96D-A1M. A1M цыпленка и ламантина отличались от человеческого wt A1M по многим положениям, чтобы допустить предположение об отдельных аминокислотах, пригодных для человеческого A1M, и не использовались в дальнейших исследованиях. Когда исследовали функциональные свойства, то было обнаружено, что M41K и R66H имеют одинаковые (R66H) или улучшенные (M41K) функции. Поскольку данные варианты также имели более высокую термостабильность и лишь незначительно более высокую тенденцию к агрегации, чем большинство других вариантов, то они были отобраны для дальнейшего исследования. Следовательно, исследование N17,96D-A1M, M41K-A1M и R66H-A1M было продолжено в фазе II настоящего проекта.

Таблица 4. Растворимость, стабильность и функциональные свойства вариантов в фазе I

		Стабильность и растворимость						Функциональные свойства				
		Агрегация при 0,1 мМ		Термостаби- льность	Стабильность к сдвигу при 0,1 мМ		Агрегация при 1 мМ	Свободные тиолы	Связывание гема	Восстановление гема	Восстановление ABTS	
		PAGE	DLS		DSF	DLS		PAGE				
		Агрегаты (%)	Средний радиус (нм)	Испол- зова- нные измерения (# из 6)	T _m	Средний радиус (нм)	Испол- зова- нные измерения (# из 6)	Агрегаты (%)	нмоль L- цистеин/ нмоль A1M	мкМ связанного /мкМ добавленно- го	Пик λ (380-420 нм)	Средняя максимальная общая AUC
No	Название											
60	человеческий wt	4,8	3,2	6	46,6	3,8	4	22,3	0,6	0,81	405	-1,84 to -2,04
1	мышь	45,8	20	6	43	32,8	6	93,7	0,3	0,71	393	-1,43
2	голый землекоп	54,8	2,7	6	51,6	3	6	80,1	0,1	0,69	397	-1,42
3	лягушка	9,9	2,8	5	NM	3	1	24,1	0,1	0,81	410	-1,33
4	цыпленок	22,42,4	3,3	5	67,6767775 67,67,55	3,4	6	3,5	0,1	0,66	391	-1,98
5	кролик	50,2	33	6	4848,748.77	43,4	6	28,2	0,1	0,65	395	-1,50
6	беличья обезьяна	20,2	3,2	6	4949,99	3	6	38,3	0,3	0,72	407	-1,98
7	морж	4,0	3,8	3	NM	3,9	1	52,3	0,3	0,81	398	-1,33
8	ламантин	1,7	3,5	6	535453,23,2	3,6	5	2,0	0,1	0,80	391	-1,81
9	камбала	6,6	3,1	6	NM	3,1	6	30,0	0,0	0,73	388	-1,25
10	орангутанг	18,3	3,1	6	45,9	3	4	29,7	0,6	0,77	401	-2,06
11	человек р35к	94,5	29,2	6	44,6	40,9	6	86,7	0,1	0,81	396	-1,29

12	человек M41K	20,5	3,2	3	44947,87.9	3,2	5	27,5	0,4	0,92	414	-1,87	
13	человек R66H	13,6	3,1	4	44949,97.8	19	6	37,0	0,7	0,79	405	-2,19	
14	человек T75K	60,0	42,3	6	43,3	82	6	96,3	0,3	0,76	393	-1,28	
15	человек T75Y	36,1	35,7	6	49,8	32,4	6	45,7	0,4	0,87	392	-2,08	
16	человек M99K	37,7	65,8	6	45,9	56,4	6	44,8	0,4	0,69	397	-1,71	
17	человек S101Y	36,8	2,7	6	46,1	3	3	70,7	0,4	0,79	403	-1,63	
		Стабильность и растворимость							Функциональные свойства				
		Агрегация при 0,1 mM		Термостабильность	Стабильность к сдвигу при 0,1 mM		Агрегация при 1 mM	Свободные тиолы	Связывание гема	Восстановление гема	Восстановление ABTS		
		PAGE	DLS		DSF	DLS		PAGE					
		Агрегаты (%)	Средний радиус (нм)	Исползованные измерения (# из 6)	T _m		Средний радиус (нм)	Исползованные измерения (# из 6)	Агрегаты (%)	нмоль L-цистеин/ нмоль A1M	мкМ связанного /мкМ добавленно го	Пик λ (380-420 нм)	Средняя максимальная общая AUC
№	Название												
60	человеческий, wt	4,8	3,2	6	46,6	3,8	4	22,3	0,6	0,81	405	от -1,84 до -2,04	
19	латимерия	4,1	3,7	6	NM	3,8	6	38,2	0,2	0,68	396	-2,00	
21	человек L89T	42,1	2,9	1	46,1	25,7	6	51,6	0,5	0,96	403	-1,69	
22	человек N17,96D	2,9	3,1	6	49,6	3,7	4	9,9	0,6	0,80	409	-2,48	
23	человек T45K	91,2	48,5	6	42,8	86,9	6	89,9	0,3	0,94	394	-1,29	
24	человек A135E	54,6	23,9	6	46,1	17,5	6	90,7	0,3	0,70	400	-1,47	
25	человек V170S	40,1	3	6	46	23,7	6	58,8	0,4	0 0,90,90	399	-2,04	
26	человек V148D	35,8	3	6	46	3	2	44,9	0,6	0 0,86,86	402	-2,16	
27	человек G172Q	93,4	36,1	6	44,1	34,2	6	89,5	0,2	0,81	396	-1,95	

Свойства варианта, которые оцениваются как превосходящие человеческий wt A1M, отмечены синим цветом с белым жирным шрифтом. Свойства, которые рассматриваются как уступающие человеческому wt A1M, отмечены красным цветом. Все остальные свойства рассматриваются как аналогичные с человеческим wt A1M.

В PAGE варианты с достоверно более высоким процентом крупных агрегатов оцениваются как уступающие человеческому wt A1M.

В DLS средний радиус >>3 нм рассматривается как указывающий на наличие агрегатов, а также трудности с регистрацией измерений (это видно по меньшему количеству измерений, используемых для расчетов).

В DSF T_m >3 S.D человеческого wt A1M рассматривается как более высокая или более низкая.

Свободные тиолы человеческого wt A1M обычно находятся в диапазоне 0,6-0,8, все, что достоверно ниже этого показателя, рассматривается как уступающие.

В анализе связывания тема человеческий wt A1M связывается на ≈80% в данном анализе. Связывание других вариантов ниже 75% и выше 85% рассматривается как отличающееся.

В анализе восстановления тема максимум пика полосы Сорета <400 нм считается более низким по сравнению с человеческим wt A1M, и сдвиг >409 нм считается лучше, чем у человеческого wt A1M.

В анализе ABTS считается, что Р-значение в t-тесте <0,2 является показателем уступающей активности восстановления ABTS.

Фаза II.

Цель фазы II проекта заключалась в том, чтобы объединить полезные мутации (M41K, R66H и N17,96D), для исследования того, можно ли сконструировать еще более стабильные варианты с аналогичной или улучшенной функцией. Кроме того, вводили аналогичную N-концевую метку (M8N4DK), которую использовали для человеческого wt A1M (табл. 5). Таким образом, новые комбинированные варианты M8N4DK сравнивали с M8N4DK-человеческим wt.

Таблица 5. Варианты, экспрессированные в фазе II, с прогнозируемыми данными

#	Вариант	# амино кислот	Молекулярная масса (Да)	pI	Суммарный заряд (D+E) – (R+K)	Коэффициент экстинкции 280 нм (см ⁻¹)	Индекс гидрофобности
12	M8H5GIEGR- M41K	201	22711	7,2	-1	1,46	-0,60
13	M8H5GIEGR- R66H	201	22695	6,7	-3	1,46	-0,57
22	M8H5GIEGR- N17,96D	201	22716	6,5	-4	1,46	-0,57
60	M8H4DK-wt	197	22561	6,4	-5	1,47	-0,64
33	M8H4DK-M41K+R66H	197	22539	6,4	-5	1,47	-0,67
34	M8H4DK-M41K+N17,96D	197	22560	6,2	-6	1,47	-0,67
35	M8H4DK-R66H+N17,96D	197	22544	6,1	-8	1,47	-0,64
36	M8H4DK-M41K- R66H+N1796D	197	22541	6,2	-7	1,47	-0,67

Все четыре новых варианта (M8H4DK-M41K+R66H, M8H4DK-M41K+N17,96D, M8H4DK-R66H+N17,96D и M8H4DK-M41K+R66H+N17,96D) очень хорошо экспрессировались и давали 29, 13, 37 и 15 мг чистого белка/л. Четыре новых варианта очищали до чистоты >99% согласно данным SDS-PAGE, и показали такой же или более низкий процент ковалентных димеров, за исключением M8H4DK-M41K+R66H, который показал наличие примерно 2% ковалентных димеров.

Анализировали показатели солюбилизации/стабильности (табл. 6а). Полученные данные показали, что комбинация M41K и R66H была субоптимальной в отношении термостабильности. С другой стороны, мутация N17,96D была в целом полезной для обеспечения солюбилизации и стабильности, и комбинация с R66H (т.е. M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M) обеспечивала еще более высокую солюбилизацию и стабильность.

Анализировали функциональные свойства (табл. 6б). Данные показали, что мутация M41K повышала способность к восстановлению гема, но снижала связывание гема. Однако когда мутацию M41K объединяли с N17,96D, то она показывала более низкий потенциал для спасения клеток от гибели, индуцированной гемом. Комбинация R66H+N17,96D давала аналогичные результаты по сравнению с wt-A1M во всех исследованных функциональных аспектах. Таким образом, M8H4DK-меченный R66H+N17,96D A1M является перспективным кандидатом после проведения фазы II, тогда как мутация M41K в данном случае менее перспективна.

Таблица 6а. Растворимость, стабильность и функциональные свойства вариантов в фазе II

		Стабильность и растворимость								
		Агрегация при 0,1 мМ			Термостабильность	Стабильность к сдвигу при 0,1 мМ		Агрегация при 1 мМ		
		PAGE	DLS		SEC-FPLC	DSF	DLS		PAGE	SEC-FPLC
		Агрегаты (%)	Средний радиус (нм)	Использованные измерения (# из 6)	Мономер (%)	T _m	Средний радиус (нм)	Использованные измерения (# из 6)	Агрегаты (%)	Мономер (%)
No	Название									
60	M8H4DK-wt	1-2	3,0	6	87-94	46,6	3,0	2	8	80-87
12	M8H5GIEGR-M41K	34	6,0	3	ND	51,8	4,1	2	33	ND
13	M8H5GIEGR-R66H	25	3,2	6	ND	47,3	10,3	1	51	ND
22	M8H5GIEGR-N1796D	1	3,0	4	94	49,9	6,5	2	4,2	82
33	M8H4DK-M41K+R66H	19	3,4	1	ND	34,3	13,7	5	42,9	ND
34	M8H4DK-M41K+N1796D	1	3,4	6	96	52,7	3,2	5	1,0	77
35	M8H4DK-R66H+N1796D	0,4	3,3	6	93	51,6	3,1	66	0,4	89
36	M8H4DK-M41K+R66H+N1796D	0,8	3,3	5	82	37,4	3,6	66	1,1	63

Свойства варианта, которые оцениваются как превосходящие человеческий wt A1M, отмечены синим цветом с белым жирным шрифтом. Свойства, которые рассматриваются как уступающие человеческому wt A1M, отмечены красным цветом. Все остальные свойства рассматриваются как аналогичные с человеческим wt A1M.

В PAGE варианты с достоверно более высоким процентом крупных агрегатов оцениваются как уступающие человеческому wt A1M.

В DLS средний радиус >> 3 нм рассматривается как указывающий на наличие агрегатов, а также трудности с регистрацией измерений (это видно по меньшему количеству измерений, используемых для расчетов).

В DSF T_m >3 S.D человеческого wt A1M рассматривается как более высокая или более низкая.

Таблица 6b. Функциональные свойства вариантов в фазе II

		Функциональные свойства			
		Связывание с гем-агарозой	Красное смещение пика связывания гема	Восстановление ABTS	Спасение от гибели клеток, индуцированной гемом
		мкМ связанного /мкМ добавленного	Пик λ (нм)	Средняя максимальная общая AUC	Визуальное наблюдение в двух отдельных экспериментах
№	Название				
60	M8H4DK-wt	0,85	415	-2,1	
12	M8H5GIEGR-M41K	0,81	408	-1,2	Аналогично дикому типу
13	M8H5GIEGR-R66H	0,84	ND	-1,5	Аналогично дикому типу
22	M8H5GIEGR-N1796D	0,82	415	-2,2	Аналогично дикому типу
33	M8H4DK-M41K+R66H	0,68	417	-1,8	Аналогично дикому типу
34	M8H4DK-M41K+N1796D	0,74	419	-2,2	Слабее чем дикого типа
35	M8H4DK-R66H+N1796D	1,07	413	-2,1	Аналогично дикому типу
36	M8H4DK-M41K+R66H+N1796D	1,13	412	-2,0	Аналогично дикому типу

В анализе связывания с гем-агарозой человеческий wt A1M связывается на 80%. Связывание других вариантов ниже 75% и выше 85% рассматривается как отличающееся.

В анализе связывания гема красное смещение $\lambda < 400$ нм считается более низким по сравнению с человеческим wt A1M, и смещение ≥ 409 нм считается лучше, чем у человеческого wt A1M.

В анализе ABTS считается, что Р-значение в t-тесте $< 0,2$ является показателем уступающей активности восстановления ABTS.

Фаза III.

Первой целью фазы III было сравнение M8H4DK-меченых R66H+N17,96D-A1M с wt-A1M и перспективных одиночных мутаций с M8H4DK-меткой в фазе I и II при параллельной экспрессии в идентичных условиях. Вторая цель заключалась в исследовании влияния метки на стабильность, растворимость и функциональные свойства. N-концевая метка человеческого wt-A1M (M8H4DK) состоит из 8 гистидиновых меток, за которыми следует сайт расщепления энтерокиназой. Сайт расщепления позволяет отщеплять гистидиновую метку после экспрессии и очистки. Следовательно, wt-A1M и R66H+N17,96D-A1M были экспрессированы с N-концевыми метками M8H4DK- и M8H и без метки. Третья цель состояла в том, чтобы более детально сравнить свойства M8H4DK-wt A1M (Wt-A1M) и M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M (35-A1M). Все экспрессированные варианты фазы III с прогнозируемыми данными приведены в табл. 7.

Таблица 7. Варианты, экспрессированные в фазе III с прогнозируемыми данными

#	Вариант	# аминокислот	Молекулярная масса (Да)	pI	Суммарный заряд (D+E) – (R+K)	Коэффициент экстинкции 280 нм (см ⁻¹)	Индекс гидрофобности
60	M8H4DK-wt	197	22561	6,4	-5	1,47	-0,64
35	M8H4DK-R66H+N1796D	197	22544	6,1	-8	1,47	-0,64
37	M8H4DK-M41K	197	22558	6,5	-4	1,47	-0,67
38	M8H4DK-R66H	197	22542	6,3	-8	1,47	-0,64
39	M8H4DK-N17.96D	197	22563	6,1	-7	1,47	-0,64
40	M8H-wt	192	21973	6,9	-2	1,51	-0,57
41	M8H-R66H+N1796D	192	21956	6,4	-5	1,51	-0,56
42	M-R66H+N1796D	184	20859	5,6	-5	1,59	-0,45
61	M-wt	184	20876	6,3	-2	1,59	-0,45

Параллельная экспрессия и очистка позволили более точно сравнить уровни экспрессии и выходы при выделении. Было обнаружено, что бактерии, экспрессирующие все варианты A1M, растут с одинаковой скоростью (не показано) и с одинаковым относительно хорошим выходом (фиг. 2). Единственное отличие заключалось в более медленной экспрессии немеченных вариантов (# 60 и # 42) по сравнению с остальными. Из экспрессии 2×750 мл можно было выделить 20-60 мг каждого варианта (фиг. 3а). Все варианты с гистидиновой меткой очищали до чистоты >99%, в то время как немеченные варианты (# 61 и # 42) демонстрировали несколько более низкую чистоту (примерно 90%) (фиг. 3б). Все имели небольшое количество ковалентных димеров. Анализ PAGE показал наличие менее 1-2% крупных агрегатов во всех вариантах, за исключением M8H-wt (40) и немеченного wt-A1M (# 61) (фиг. 3с). Таким образом, можно получить все варианты A1M с одиночными и многочисленными M8H4DK-метками, M8H-метками и без метки.

Агрегацию и термостабильность 100 мкМ растворов анализировали обращеннофазовой ВЭЖХ, динамическим рассеянием света и дифференциальной сканирующей флуориметрией (табл. 8). M8H4DK-меченные варианты элюировались в ОФ-ВЭЖХ примерно через 12 мин с 87-90% белка в основном пике. Единственным исключением был M8H4DK-M41K, который появлялся со временем удерживания 9,8 мин и только 80% белка было в основном пике. Данные еще раз указывают на то, что мутация M41K придает белку A1M неожиданные свойства и является субоптимальной. Изменение метки на M8H или полное удаление метки приводило к увеличению времени удерживания до 12,2 и 12,9 мин соответственно, указывая на большее количество гидрофобных молекул, как и ожидалось. Меньше белка проявлялось в основном пике M8H-wt и обоих немеченных вариантах, что, возможно, отражает несколько более низкую чистоту, наблюдаемую в SDS-PAGE для этих вариантов. Данные DLS указывают средний радиус, равный примерно 3 у всех вариантов, и возможность собрать данные из всех 6 измерений. Все варианты имели одинаковую или более высокую термостабильность по сравнению с M8H4DK-wt A1M. Более высокая стабильность наблюдалась для всех вариантов, несущих мутацию N17,96D.

Таблица 8. Агрегация и термостабильность не подвергшихся напряжению вариантов в фазе III

#	Вариант	ОФ-ВЭЖХ		DLS		DSF
		RT [мин]	Основной пик (% общего)	Средний радиус (нм)	Использованные измерения (# из 6)	
60	M8H4DK-wt	12,1	87	2,9	6	46,6
35	M8H4DK-R66H+N1796D	12,1	89	3,2	6	49,8
37	M8H4DK-M41K	9,8	80	3,3	6	46,8
38	M8H4DK-R66H	12,1	89	2,9	6	46,4
39	M8H4DK-N1796D	12,1	90	3,0	6	49,7
40	M8H-wt	12,2	78	3,2	6	47,1
41	M8H-R66H+N1796D	12,2	88	3,2	6	50,2
61	M-wt	12,9	81	3,8	6	46,3
42	M-R66H+N1796D	12,9	82	3,4	6	50,2

Варианты фазы III были подвергнуты воздействию сдвигающих сил пипетированием 80 раз в узком наконечнике пипетки. Агрегацию, вызванную напряжением сдвига, анализировали с помощью DLS. В общем, все варианты с мутацией N17,96D показали высокую устойчивость к напряжению сдвига (табл. 9), за исключением M8H-меченного варианта R66H+N1796D (# 41). Кроме того, исследовали устойчивость к напряжению, вызванному концентрированием до 1 мМ в различных буферах. Все варианты концентри-

ровали до 1 мМ в 20 мМ Трис-НСl+0,125 М NaCl, рН 8,0 или 7,4, и сразу же анализировали с помощью PAGE (фиг. 4а, табл. 10). 0,1 мМ и 1 мМ образцы также анализировали с помощью PAGE после одного цикла замораживания-оттаивания в Трис-буферах или PBS (фиг. 4б, табл. 10). Среди М8Н4ДК-меченых вариантов все несущие N17,96D-мутации, демонстрировали повышенную устойчивость к концентрированию, замораживанию-оттаиванию, снижению рН и изменению буфера (на PBS) по сравнению с wt А1М. Добавление мутации R66H еще больше повышало стабильность и растворимость. Только одна мутация R66H обеспечивала примерно такую же устойчивость, как и у wt А1М, тогда как мутация M41K давала достоверно более низкую устойчивость. Укорочение или удаление N-концевой метки оказывало отрицательное влияние на устойчивость, что было более выражено для wt А1М по сравнению с соответствующими вариантами R66H+N17,96D.

Таблица 9. Устойчивость к сдвигу вариантов в фазе III

#	Вариант	Средний радиус (нм)	Использованные измерения (#из 6)
60	M8H4DK-wt	2,9	3
35	M8H4DK-R66H+N1796D	3,0	6
37	M8H4DK-M41K		0
38	M8H4DK-R66H		0
39	M8H4DK-N1796D	3,1	6
40	M8H-wt	3,1	1
41	M8H-R66H+N1796D		0
61	M-wt	3,9	5
42	M-R66H+N1796D	3,4	6

Таблица 10. Стабильность при концентрировании и замораживании-оттаивании вариантов в фазе III в различных буферах

Large aggregates (%)								
#	Вариант	0,1 мМ рН 8,0	1 мМ рН 8,0	1 мМ рН 8,0, 1х замораживание-оттаивание	0,1 мМ рН 7,4	1 мМ рН 7,4	1 мМ рН 7,4, 1х замораживание-оттаивание	1 мМ PBS рН 7,4, 1х замораживание-оттаивание
60	M8H4DK-wt	0,3	1,1	2,0	0,4	1,2	3,1	13,2
35	M8H4DK-R66H+N1796D	0,2	0,3	0,1	0,4	0,2	0,3	1,3
37	M8H4DK-M41K	1,3	4,1	4,8	0,8	7,9	11,9	15,6
38	M8H4DK-R66H	0,6	0,5	1,0	0,2	0,7	2,4	16,0
39	M8H4DK-N1796D	0,7	1,1	0,1	0,2	0,1	0,7	2,5
40	M8H-wt	0,8	7,2	3,6	8,4	10,2	11,4	14,0
41	M8H-R66H+N1796D	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4	1,2	7,6
61	M-wt	0,4	2,0	2,3	9,1	1,6	3,9	17,9
42	M-R66H+N1796D	0,4	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	1,6

Функциональную активность всех вариантов в фазе III исследовали по расширенной программе для охвата всех возможных аспектов известных функций А1М. Восстановительную способность, не связанную с гемом, исследовали на синтетическом радикале ABTS и в коммерчески доступном анализе объема поглощения кислородных радикалов (ORAC) (фиг. 5). М8Н4ДК-меченный N17,96D-А1М и R66H+N17,96D-А1М показали одинаковую восстановительную способность с wt А1М, в то время как М8Н4ДК-меченный M41K-А1М и R66H-А1М демонстрировали несколько более низкую восстановительную способность для ABTS (фиг. 5А). Укорочение или удаление метки оказывало незначительное влияние, но варианты R66H-N17,96D демонстрировали тенденцию к более высокой способности к восстановлению, чем wt А1М с М8Н-меткой и в отсутствии метки. Функциональную активность М8Н4ДК-меченного wt А1М в анализе ORAC устанавливали на 100%, и другие варианты сравнивали по отношению к нему. Все варианты М8Н4ДК показали аналогичные результаты в ORAC, что и М8Н4ДК-wt, за исключением М8Н4ДК-R66H+N17,96D, который имел достоверно более высокую активность (фиг. 5б). Также М8Н-меченный и немеченный R66H+N17,96D-А1М показали несколько более высокую восстановительную активность в ORAC, чем wt-А1М. Также исследовали восстановительную активность в анализе восстановления цитохрома С (фиг. 6). Большинство вариантов показало несколько более низкую восстановительную активность в более низких концентрациях по сравнению с wt-А1М, и для N17,96D и R66H+N17,96D эта тенденция была достоверной (при 0,3-0,6 мкМ) (фиг. 6А). Значение этого не понятно. Укорочение и удаление метки не повлияло на данное свойство.

Связывание гема исследовали в анализе включения свободного гема и в анализе связывания с гем-агарозой (фиг. 6). Включение и координация свободного гема проявляется в виде появления пика поглощения примерно при 410-415 нм, так называемой полосы Сорета (Karnaukhova et al., 2014; Rutardottir et al., 2016). Гем обычно имеет пик поглощения при 380-390 нм, и это можно увидеть, когда его растворяют один или смешивают и инкубируют с несвязывающим контрольным белком, таким как овальбумин. Однако когда гем смешивают с wt А1М, то пик поглощения появляется между 410-415 нм, давая так называемое красное смещение (т.е. смещение пика в сторону более высоких длин волн) и повышенное соотношение поглощения (413/386). Было показано, что степень красного смещения и отношение поглощений (413/386) связаны с функцией связывания гема А1М (Rutardottir et al., 2016). Следовательно, эти

свойства сравнивали для всех вариантов в фазе III (фиг. 6b). Среди M8H4DK-меченных вариантов все показали примерно одинаковое красное смещение, что и wt A1M, за исключением вариантов M41K, которые имели более сильное смещение. Интересно, что укорочение метки до M8H увеличило красное смещение, в то время как удаление метки уменьшало красное смещение. Очевидно, что метка оказывала сильное влияние на это свойство. Связывание гема с A1M исследовали как связывание серийных разведений A1M с гем-агарозой по сравнению со связыванием с контрольной агарозой. Как правило, контрольный белок, такой как овальбумин, не демонстрирует связывания с гем-агарозой выше фонового связывания с контрольной агарозой (фиг. 6C). Как правило, 70-80% добавленного M8H4DK-wt A1M (35-A1M) связывалось с гем-агарозой, тогда как отсутствие связывания наблюдали для контрольной агарозы. Связывание сравнивали для всех вариантов в фазе III. Все показали сходную степень связывания с гем-агарозой (66-72%), тогда как овальбумин не проявлял связывания.

Затем анализировали связывание гема M8H4DK-wt A1M (wt-A1M) и M8H4DK-35-A1M (35-A1M) (фиг. 11) с использованием комбинации изменения миграции и анализа флуоресценции (Karnaukhova et al., 2014). В результате включения гема миграция wt-A1M и 35-A1M в анализе нативным PAGE замедлялась при соотношении гем:белок <1 и ускорялась при соотношении гем:белок >1, проявляя аналогичную зависимость от концентрации гема (фиг. 11A и B). В высоких концентрациях гема оба варианта проявляли тенденцию к олигомеризации, что подтверждает предыдущие результаты для wt-A1M (Karnaukhova et al., 2014). Аналогично включение гема индуцировало гашение флуоресценции триптофана как в wt-A1M, так и в 35-A1M с аналогичной кинетикой (фиг. 11B). Ранее было показано, что координация гема в A1M индуцировала формирование пика поглощения в УФ-свете при 415 нм (Ruttarsdottir et al., 2016; Karnaukhova et al., 2014). Наблюдали аналогичные УФ-спектры поглощения комплексов wt-A1M/- и 35-A1M/гем (фиг. 11C) с небольшим красным смещением пика 35-A1M (415→417 нм).

Исследовали скорость восстановления радикалов ABTS под действием wt-A1M и 35-A1M [10], и она была аналогичной для wt-A1M и 35-A1M с использованием свежеприготовленных белков без приложения напряжения (фиг. 12A). После хранения в течение 7 суток wt-A1M проявлял более медленную скорость восстановления после концентрирования до 1 мМ и при 22°C (фиг. 12B), что указывало на потерю активности белка в дополнение к агрегации, отмеченной в этих условиях (табл. 11). Восстановление цитохрома C 35-A1M (фиг. 12C) (Allhorn et al., 2005) проходило несколько медленнее, в то время как антиоксидантная способность, измеренная анализом ORAC, была несколько выше для 35-A1M (фиг. 12D).

Таблица 11. Физико-химические свойства M8H4DK-wt A1M (wt-A1M) и M8H4DK-35-A1M (35-A1M)

Условия ¹	Концентрация	Метод	Параметр	wt-A1M	35-A1M
Без напряжения ²	0,1 мМ	ВЭЖХ	Время элюирования (мин)	12,1	12,1
			Мономер (%)	87	89
			Радиус (нм)	2,9	3,2
			Агрегаты (%)	1,5	0,4
			Мономер (%)	87	93
С напряжением	0,1 мМ	DSF	T _m (°C)	46,6	51,6
			Агрегаты (%)	1,1	0,4
			Агрегаты (%)	1,2	0,4
			Агрегаты (%)	2,0	0,4
			Агрегаты (%)	13,2	7,6
Длительное хранение ⁴	4°C - 1 сутки	SEC	Извлечение ⁵ (%)	100	100
			Агрегаты (%)	17,9	3,9
	4°C - 7 суток	SEC	Извлечение (%)	100	100
			Агрегаты (%)	12,1	3,7
	RT - 7 суток	SEC	Извлечение (%)	44	100
			Агрегаты (%)	0,2	0,1
	37°C - 1,5 ч	SEC	Извлечение (%)	67	100
			Агрегаты (%)	53	28
	37°C - 4,5 ч	SEC	Извлечение (%)	0	44
			Агрегаты (%)	ND ⁶	15

Примечания:

1) комнатная температура, если не указано иное;

2) 20 мМ Трис-HCl, 0,125 М NaCl, pH 8,0;

3) 20 мМ Трис-HCl, 0,125 М NaCl, pH 7,4;

4) PBS;

5) рассчитано после центрифугирования при 10000×g от общей площади пиков по сравнению с исходным материалом;

6) не определяли

Проводили биологический анализ, в котором была исследована способность вариантов A1M в отношении спасения клеток K562 от гибели, индуцированной гемом (фиг. 7). Степень гибели клеток, которую определяли по высвобождению лактатдегидрогеназы, устанавливали на 100% для клеток, инкубированных с гемом без A1M. Все M8H4DK-меченные варианты, включая wt-A1M, показали почти 100% спасение при 10 мкМ (фиг. 7), без достоверных различий между вариантами. M8X-меченные варианты демонстрировали почти одинаковую способность к спасению клеток, в то время как для немеченных вариантов наблюдали несколько более низкий потенциал.

Способность M8H4DK-wt A1M (35-A1M) и M8H4DK-35-A1M (wt-A1M) защищать клетки

Способность двух вариантов A1M защищать клетки тестировали на клетках K562 и линии эпителиальных клеток проксимальных канальцев почки человека (НК-2), подвергнутых воздействию свободного тема и свободного железа. На фиг. 12 показано, что оба варианта A1M полностью ингибировали гибель клеток, измеренную по внеклеточному высвобождению цитозольного маркера ЛДГ, на клетках K562, подвергнутых воздействию 0,1 мМ гема. Кривые доза-реакция wt-A1M и 35-A1M перекрываются почти полностью, что указывает на аналогичную способность защищать клетки.

Данные по защите клеток НК-2 приведены на фиг. 14. Сначала повреждение клеток индуцировали реакцией Фентона, смесью свободного железа, аскорбата и перекиси водорода, которая генерирует гидроксильные радикалы. Жизнеспособность клеток, измеренная с помощью анализа WST-1, восстанавливалась под действием обоих вариантов A1M, о чем свидетельствует наложение кривых зависимости доза-ответ (фиг. 14A). Повышающая регуляция гемоксигеназы-1 (HO-1), хорошо известного биомаркера ответа на окислительный стресс (Alam et al., 1999), достоверно подавлялась под действием wt-A1M и 35-A1M в одинаковой степени (фиг. 14B). Повреждение клеток НК-2 также индуцировали инкубацией с гемом, и оно подавлялось вариантами A1M (фиг. 14C и 14D). Вновь, жизнеспособность клеток, измеренная методом WST-1, восстанавливалась под действием обоих белков с аналогичной степенью, при использовании двух концентраций гема, 10 и 30 мкМ (фиг. 14C). Повышающая регуляция гена HO-1 и другого гена ответа на клеточный стресс, Hsp70, ингибировалась в одинаковой степени обоими вариантами A1M (фиг. 14D).

Распределение *in vivo* M8H4DK-wt A1M (wt-A1M) и M8H4DK-35-1M (35-A1M) у мышей

Ранее было показано, что после внутривенного введения A1M быстро подвергался клиренсу из крови и преимущественно локализовался в почках и печени у крыс и мышей (Larsson et al., 2001; Ahlstedt et al., 2015). Сравнивали скорости клиренса в крови и распределение в органах wt-A1M и 35-A1M (фиг. 15). Аналогичные скорости обмена наблюдали в течение первых 60 мин, тогда как 35-A1M выделялся быстрее через 1 ч. Распределение A1M в анализированных органах через 10 и 30 мин не выявило достоверных различий между двумя белками. Оба wt-A1M и 35-A1M были обнаружены преимущественно в почках, и меньшие количества отмечали в сердце, печени, легких, коже и селезенке, в то время как в головном мозгу были обнаружены незначительные количества.

Защита *in vivo* почек M8H4DK-wt A1M (wt-A1M) и M8H4DK-35-A1M (35-A1M)

Ранее было показано, что A1M проявляет терапевтические эффекты *in vivo* на животных моделях, на которых индуцировали связанные с гемом и окислительным стрессом повреждения почек (Wester-Rosenlöf et al., 2014; Nääv et al., 2015; Sverrisson et al., 2014). Исследовали защитные эффекты *in vivo* двух вариантов A1M на мышинной модели рабдомиолиза, индуцированного инъекцией глицерина, где острые повреждения почек (AKI) развиваются в результате повреждения мышечной ткани с высвобождением миоглобина, свободного тема, радикалов и других компонентов ткани. Инъекция глицерина приводила к массивной повышающей регуляции генов HO-1 и Hsp70, двух биомаркеров клеточного стресса (фиг. 16A и B), и большая часть повышающей регуляции ингибировалась одновременной инъекцией wt-A1M или 35-A1M. Достоверного различия между двумя вариантами A1M не наблюдали в использованных дозах (7 мг/кг массы тела животных).

Таким образом, исследования в фазе III показали, что мутации A1M, включающие N17,96D, достоверно повышали стабильность молекулы A1M, которая дополнительно увеличивалась при добавлении мутации R66H. Кроме того, M8H4DK-меченные варианты A1M были более стабильными, чем варианты с более короткой меткой или без метки. Следовательно, метка служит не только средством очистки, но также обеспечивает A1M повышенной стабильностью, и стабильность не мешает проявлению функций. Молекула M8H4DK-R66H+N1796D (35-A1M) обладает аналогичными или лучшими функциональными свойствами, возможно, за исключением восстановления цитохрома C. В заключение следует отметить, что исследования стабильности/растворимости и функциональных свойств показывают, что M8H4DK-R66H+N17,96D (35-A1M) обладает улучшенными молекулярными свойствами по сравнению с M8H4DK-wt A1M (wt-A1M), и оба wt-A1M, так и 35-A1M показывают *in vivo* защитные эффекты для почек с использованием модели рабдомиолиза, индуцированного инъекцией глицерина, острой почечной недостаточности.

Дополнительные исследования стабильности на M8H4DK-R66H+N1796D
по сравнению с M8H4DK-wt

Для дополнительного сравнения M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M и wt-A1M агрегацию и функциональные свойства тестировали с использованием SEC-FPLC и анализа восстановления ABTS после циклов

замораживания-оттаивания и хранения при +4°C и комнатной температуре (фиг. 8). Образцы (100 мкМ) wt-A1M и R66H+N17,96D-A1M очень хорошо выдерживали 5 циклов замораживания-оттаивания. Как было показано выше, wt-A1M демонстрировал более высокий уровень агрегации после концентрирования до 1 мМ, чем R66H+N17,96D-A1M, и аналогичные результаты наблюдали после хранения в течение 1 недели по сравнению с хранением в течение ночи. Повышенная агрегация wt-A1M не влияла на восстановительную активность для ABTS 2 мкМ образцов. Визуальные исследования показывают полностью прозрачные растворы обоих вариантов после замораживания-оттаивания, концентрирования и хранения в течение 1 недели при +4°C. Для того, чтобы подвергнуть растворы A1M дополнительному напряжению, 100 мМ и 1 мМ растворы хранили при комнатной температуре в течение 1 недели. Визуальное исследование 100 мкМ растворов свидетельствовало о наличии небольшого помутнения wt-A1M, но раствор R66H+N17,96D-A1M оставался прозрачным. Результаты SEC-FPLC показали уменьшенную площадь под кривой wt-A1M до 80% исходного вещества, что указывает на потерю wt-A1M, несмотря на то, что не наблюдали повышения образования крупных агрегатов. Потери, скорее всего, были вызваны выпадением в осадок белка и удалением фильтрацией перед анализом FPLC. Для R66H+N17,96D-A1M можно было наблюдать некоторую повышенную агрегацию, но без потери белка после хранения при комнатной температуре в течение одной недели при концентрации 100 мкМ. В анализе восстановления ABTS R66H+N17,96D-A1M все еще проявлял полную активность, в то время как небольшое снижение наблюдали для wt-A1M. Визуальное исследование 1 мМ растворов, хранящихся в течение 1 недели, выявило наличие помутнения обоих вариантов, но раствор wt-A1M оказался более мутным. Когда растворы разбавляли в 10 раз для загрузки на SEC, то осадок R66H+N17,96D-A1M, но не wt-A1M, растворялся. В SEC наблюдали очень небольшое количество агрегатов, но оставалось только 44% исходного вещества wt-A1M. Напротив, оставалось 100% R66H+N17,96D-A1M. В анализе восстановления ABTS активность wt-A1M существенно снижалась, тогда как активность R66H+N17,96D-A1M оставалась без изменений. Результаты этого исследования показывают, что M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M может выдерживать хранение при высоких концентрациях при комнатной температуре, тогда как wt-A1M не может.

Исследована стабильность 1 мМ растворов при 37°C. Образцы инкубировали в течение 1,5; 2,5 и 4,5 ч и затем осматривали визуально, анализировали SEC-FPLC и анализом восстановительной активности для ABTS (фиг. 9). После инкубации в течение 1,5 ч оба раствора все еще были прозрачными при осмотре, но анализ SEC-FPLC выявил большее количество агрегатов в растворе wt-A1M (53%) по сравнению с раствором R66H+N17,96D-A1M (28%). Только 67% исходного вещества элюировалось в SEC wt-A1M, и 100% элюировалось R66H+N17,96D-A1M, что определяли по площади под кривой. Оба варианта показали полную активность в анализе восстановления ABTS. Через 2,5 ч инкубации раствор wt-A1M становился мутным, в котором частички было невозможно растворить. 40% исходного вещества было обнаружено в SEC, и активность в восстановлении ABTS достоверно снижалась. Раствор R66H+N17,96D-A1M все еще был прозрачным и показал полную активность в анализе восстановления ABTS, но образование крупных агрегатов повышалось с 28 до 38% по данным SEC-FPLC. Через 4,5 ч wt-A1M превратился в мутное вещество, которое невозможно было пипетировать. Следовательно, далее его не анализировали. R66H+N17,96D-A1M стал мутным, но все еще его можно было набирать пипеткой. Некоторое количество осадка оставалось после разбавления. Количество белка, элюированного в SEC, составляло 44% от исходного вещества, и наблюдали пониженную активность в анализе восстановления ABTS. На основании результатов исследования можно предположить, что после инкубации при +37°C A1M сначала образует растворяющиеся агрегаты, затем он образует необратимые агрегаты, и имеет место потеря активности в анализе восстановления ABTS. Через 2,5 ч инкубации наблюдали полное необратимое осаждение wt-A1M, частичное необратимое осаждение наблюдали только через 4,5 ч для M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M. Следовательно, M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M более устойчивы к хранению при +37°C, чем M8H4DK-wt-A1M.

Ссылки.

Ahlstedt J., Tran T.A., Strand F., Holmqvist B., Strand S.-
E., Gram M. and Åkerström B. Biodistribution and

pharmacokinetics of recombinant α_1 -microglobulin and its potential use in radioprotection of kidneys. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.*, 5(4): 333-347, 2015.

Alam J., Stewart D., Touchard C., Boinapally S., Choi A.M., and Cook J.L. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme-oxygenase gene. *J. Biol. Chem.*, 274: 26071-26078, 1999.

Allhorn M., Berggård T., Nordberg J., Olsson M.L., Åkerström B. Processing of the lipocalin α_1 -microglobulin by hemoglobin induces heme-binding and heme-degradation properties. *Blood*, 99; 2002: 1894-1901.

Allhorn M., Klapyta A., Åkerström B. Redox properties of the lipocalin α_1 -microglobulin: reduction of cytochrome c, hemoglobin, and free iron. *Free Radic. Biol. Med.*, 38; 2005: 557-567.

Anderson U.D., Rutardottir S., Centlow M., Olsson M.G., Kristensen K., Isberg P.E., Thilaganatan B., Åkerström B., Hansson S.R. Fetal hemoglobin and α_1 -microglobulin as first and early second trimester predictive biomarkers of preeclampsia. *Am. J. Obst. Gynecol.*, 204; 2011: 520.e1-520.e5

Berggård T., Cohen A., Persson P., Lindqvist A., Cedervall T., Silow M., Thøgersen I.B., Jönsson J.-Å., Enghild J.J., Åkerström B. α_1 -Microglobulin chromophores are located to three lysine residues semiburied in the lipocalin pocket and associated with a novel lipophilic compound. *Protein Sci.*, 8; 1999: 2611-2620.

Berggård T., Thelin N., Falkenberg C., Enghild J.J., Åkerström B. Prothrombin, albumin and immunoglobulin A form covalent complexes with α_1 -microglobulin in human plasma. *Eur. J. Biochem.*, 245; 1997: 676-683.

Bratt T., Olsson H., Sjöberg E.M., Jergil B., Åkerström B. Cleavage of the α_1 -microglobulin -bikunin precursor is localized to the Golgi apparatus of rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1157; 1993: 147-154.

Centlow M., Carninci P., Nemeth K., Mezey E., Brownstein

M., Hansson S.R. Placental expression profiling in preeclampsia: local overproduction of hemoglobin may drive pathological changes. *Fertility and sterility*, 90; 2008: 1834-1843.

Ekström B., Berggård I. Human α_1 -microglobulin: Purification procedure, chemical and physicochemical properties. *J. Biol. Chem.*, 252(22); 1977: 8048-8057.

Escribano J., Lopez-Otin C., Hjerpe A., Grubb A., Mendez E. Location and characterization of the three carbohydrate prosthetic groups of human protein HC. *FEBS Lett.*, 266(1-2); 1990: 167-170.

Flower D.R. The lipocalin family. *Biochem. J.*, 318; 1996: 1-14.

Gram M., Anderson U.D., Johansson M.E., Edström-Hägerwall A., Larsson I., Jälmby M., Hansson S.R., and Åkerström B. The human endogenous protection system against cell-free hemoglobin and heme is overwhelmed in preeclampsia and provides potential biomarkers and clinical indicators. *PloS. One.*, 10(9): e0138111, 2015.

Hansson S.R., Gram M. and Åkerström B. Fetal hemoglobin in preeclampsia: a new etiological tool for prediction/diagnosis and a potential target for therapy. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 25(6); 2013: 448-455.

Karnaukhova E., Rutardottir S., Majabi M., Wester Rosenlöf L., Alayash A.I., Åkerström B. Characterization of heme binding to recombinant α_1 -microglobulin. *Front. Physiol.*, 5; 2014: 465. doi: 10.3389/fphys.2014.00465.

Kaumeyer J.F., Polazzi J.O., Kotick M.P. The mRNA for a proteinase inhibitor related to the HI-30 domain of inter-alpha-trypsin inhibitor also encodes α_1 -microglobulin (protein HC). *Nucleic Acids Res.*, 14(20); 1986: 7839-7850.

Kwasek A., Osmark P., Allhorn M., Lindqvist A., Åkerström B., Wasylewski Z. Production of recombinant human α_1 -microglobulin and mutated forms involved in chromophore formation. *Prot. Expr. Purif.*, 53; 2007: 145-152.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the

assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227; 1970: 680-685.

Larsson J., Wingårdh K., Berggård T., Davies J.R., Lögdberg L., Strand S.-E., Åkerström B. Distribution of ^{125}I -labelled α_1 -microglobulin in rats after intravenous injection. *J. Lab. Clin. Med.*, 137: 165-175, 2001

Lindqvist A., Bratt T., Altieri M., Kastern W., Åkerström B. Rat α_1 -microglobulin: co-expression in liver with the light chain of inter-alpha-trypsin inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1130; 1992: 63-67.

May K., Rosenlöf L., Olsson M.G., Centlow M., Mörgelin M., Larsson I., Cederlund M., Rutardottir S., Schneider H., Siegmund W., Åkerström B., Hansson S.R. Perfusion of human placenta with haemoglobin introduces preeclampsia-like injuries that are prevented by α_1 -microglobulin. *Placenta*, 32(4); 2011: 323-332.

Meining W., Skerra A. The crystal structure of human α_1 -microglobulin reveals a potential haem-binding site. *Biochem. J.*, 445(2); 2012: 175-82.

Nälv Å., Erlandsson L., Axelsson J., Larsson I., Johansson M., Wester Rosenlöf L., Mörgelin M., Casslén V., Gram M., Åkerström B., Hansson S.R. AlM ameliorates preeclampsia-like symptoms in placenta and kidney induced by cell-free fetal hemoglobin in rabbit. *PloS One*, 10(5); 2015: e0125499.

Olsson M.G., Allhorn M., Larsson J., Cederlund M., Lundqvist K., Schmidtchen A., Sørensen O.E., Mörgelin M., Åkerström B. Up-regulation of AlM/ α_1 -microglobulin in skin by heme and reactive oxygen species gives protection from oxidative damage. *PLoS One*, 6(11); 2011: e27505.

Olsson M.G., Centlow M., Rutardottir S., Stenfors I., Larsson J., Hosseini-Maaf B., Olsson M.L., Hansson S.R., Åkerström B. Increased levels of free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger α_1 -microglobulin in preeclampsia. *Free Rad. Biol. Med.*, 48; 2010: 284-291.

Olsson M.G., Olofsson T., Tapper H., Åkerström B. The lipocalin α_1 -microglobulin protects erythroid K562 cells against

oxidative damage induced by heme and reactive oxygen species. Free Rad. Res., 42; 2008: 725-736.

Olsson M.G., Rosenlöf L.W., Kotarsky H., Olofsson T., Leanderson T., Mörgelin M., Fellman V., Åkerström B. The radical-binding lipocalin A1M binds to a Complex I subunit and protects mitochondrial structure and function. Antiox. Redox. Signal., 18(16); 2013: 2017-2028.

Rutardottir S., Karnaukhova E., Nantasenamat C., Songtawe N., Prachayasittikul V., Rajabi M., Wester Rosenlöf L., Alayash A.I., Åkerström B. Studies of two heme binding sites in A1M/ α_1 -microglobulin using site-directed mutagenesis and molecular simulation. Biochim. Biophys. Acta, 1864(1); 2016: 29-41.

Sala A., Campagnoli M., Perani E., Romano A., Labó S., Monzani E., Minchiotti L., Galliano M. Human α_1 -microglobulin is covalently bound to kynurenine-derived chromophores. J. Biol. Chem., 279(49); 2004: 51033-51044.

Sverrisson K., Axelsson J., Rippe A., Gram M., Åkerström B., Hansson S.R., Rippe B. Extracellular fetal hemoglobin (HbF) induces increases in glomerular permeability. Inhibition with α_1 -microglobulin (A1M) and Tempol. Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 306(4); 2014: F442-448.

Wester-Rosenlöf L., Casslén V., Axelsson J., Edström-Hägerwall A., Gram M., Holmquist M., Johansson M.E., Larsson I., Ley D., Marsal K., Mörgelin M., Rippe B., Rutardottir S., Shohani B., Åkerström B., Hansson S.R. A1M/ α_1 -microglobulin protects from heme-induced placental and renal damage in a pregnant sheep model of preeclampsia. PLoS One, 9(1); 2014: e86353.

Åkerström B., Borregaard N., Flower D., Salier J.P. Lipocalins, an introduction. In Lipocalins. Eds. Åkerström B., Borregaard N., Flower D., Salier J.P., Landes Bioscience, Georgetown TX.

Åkerström B., Gram M. A1M, an extravascular tissue cleaning and house-keeping protein. Free Rad. Biol. Med., 74; 2014: 274-282.

Åkerström B., Maghzal G.J., Winterbourn C.C., Kettle A.J. The lipocalin α_1 -microglobulin has radical scavenging activity. J. Biol. Chem., 282; 2007: 31493-31503.

Åkerström B., Bratt T., Enghild J.J. Formation of the α_1 -microglobulin chromophore in mammalian and insect cells: a novel post-translational mechanism? FEBS Lett., 362, 50-54, 1995.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, полученный из альфа-1-микроглобулина, выбранный из аминокислотной последовательности, состоящей из формулы I:

X¹-X²-X³-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷-X⁸-X⁹-X¹⁰-X¹¹-X¹²-X¹³-X¹⁴-GPVPTPPDN IQVQENF-X¹⁵-IS RIYGKQWYNLA IGSTCPWLKK I-X¹⁶-DRMTVSTL VLGEATEAE ISMTST-X¹⁷-WRK GVCEETSGAY EKTDTDGKFL

YHNSKW-X¹⁸-ITM ESYVVHTNYD EYAIFLTCKF SRHHGPTITA KLYGRAPQLR ETLLQDFRVV
AQGVGIPEDS IFTMADRGEV VPGEQEPEPI LIPR (SEQ ID NO: 10),

и аминокислотной последовательности, состоящей из формулы II:

X¹-X²-X³-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷-X⁸-X⁹-X¹⁰-X¹¹-X¹²-X¹³-X¹⁴-GPVTPPDN IQVQENF-X¹⁵-IS RIYGKWNLA
IGSTCPWLKK I-X¹⁶-DRMTVSTL VLGEATEAE ISMTST-X¹⁷-WRK GVCEETSGAY EKTDTDGKFL
YHNSKW-X¹⁸-ITM ESYVVHTNYD EYAIFLTCKF SRHHGPTITA KLYGRAPQLR ETLLQDFRVV
AQGVGIPEDS IFTMADRGEV VPGEQEPEPI (SEQ ID NO: 17),

где присутствует по меньшей мере один из X¹-X¹⁴, и

X¹ отсутствует или представляет Met или N-формил-Met ;

X² отсутствует или представляет His;

X³ отсутствует или представляет His;

X⁴ отсутствует или представляет His;

X⁵ отсутствует или представляет His;

X⁶ отсутствует или представляет His;

X⁷ отсутствует или представляет His;

X⁸ отсутствует или представляет His;

X⁹ отсутствует или представляет His;

X¹⁰ отсутствует или выбран из Asp, Glu, Lys и Arg;

X¹¹ отсутствует или выбран из Asp, Glu, Lys и Arg;

X¹² отсутствует или выбран из Asp, Glu, Lys и Arg;

X¹³ отсутствует или выбран из Asp, Glu, Lys и Arg;

X¹⁴ отсутствует или выбран из Asp, Glu, Lys и Arg;

X¹⁵ представляет Asp или Asn;

X¹⁶ представляет Met, или Lys, или Arg;

X¹⁷ представляет Arg, или His, или Lys;

X¹⁸ представляет Asp или Asn;

или его фармацевтически приемлемая соль,

при условии, что последовательность не представляет SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2,

где указанный белок обладает улучшенными стабильностью и/или растворимостью при сохраненной или улучшенной функции по сравнению с альфа-1-микроглобулином человека дикого типа (SEQ ID NO:1).

2. Белок по п.1, где

X¹ представляет Met или N-формил-Met;

X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷ представляют His;

X⁸ и X⁹ отсутствуют;

X¹⁰, X¹¹, X¹² и X¹³ представляют Asp;

X¹⁴ представляет Lys;

и X¹⁵-X¹⁸ имеют значения, определенные выше.

3. Белок по п.1, где

X¹ представляет Met или N-формил-Met;

X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷, X⁸ и X⁹ представляют His;

X¹⁰, X¹¹, X¹² и X¹³ представляют Asp;

X¹⁴ представляет Lys;

и X¹⁵-X¹⁸ имеют значения, определенные выше.

4. Белок по п.1, где

X¹ представляет Met;

X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷, X⁸, X¹⁰, X¹¹, X¹², X¹³ и X¹⁴ отсутствуют;

X¹⁵ представляет Asp;

X¹⁶ представляет Met;

X¹⁷ представляет His;

X¹⁸ представляет Asp.

5. Белок по п.4, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 18.

6. Белок по п.1, где

X¹ представляет Met;

X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷, X⁸, X¹⁰, X¹¹, X¹², X¹³ и X¹⁴ отсутствуют;

X¹⁵ представляет Asn;

X¹⁶ представляет Lys;

X¹⁷ представляет Arg;

X¹⁸ представляет Asp.

7. Белок по п.6, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 19.

8. Белок по п.1, где

X¹ представляет Met или N-формил-Met;
 X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷ представляют His;
 X⁸ и X⁹ отсутствуют;
 X¹⁰, X¹¹, X¹² и X¹³ представляют Asp;
 X¹⁴ представляет Lys;
 X¹⁵ представляет Asp;
 X¹⁶ представляет Met;
 X¹⁷ представляет His;
 X¹⁸ представляет Asp.

9. Белок по п.8, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 5
 или SEQ ID NO: 20.

10. Белок по п.1, где
 X¹ представляет Met или N-формил-Met;
 X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷ представляют His;
 X⁸ и X⁹ отсутствуют;
 X¹⁰, X¹¹, X¹² и X¹³ представляют Asp;
 X¹⁴ представляет Lys;
 X¹⁵ представляет Asn;
 X¹⁶ представляет Lys;
 X¹⁷ представляет Arg;
 X¹⁸ представляет Asn.

11. Белок по п.10, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 6
 или SEQ ID NO: 21.

12. Белок по п.1, где
 X¹ представляет Met или N-формил-Met;
 X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷, X⁸ и X⁹ представляют His;
 X¹⁰, X¹¹, X¹² и X¹³ представляют Asp;
 X¹⁴ представляет Lys;
 X¹⁵ представляет Asp;
 X¹⁶ представляет Met;
 X¹⁷ представляет His;
 X¹⁸ представляет Asp.

13. Белок по п.12, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 7
 или SEQ ID NO: 22.

14. Белок по п.1, где
 X¹ представляет Met или N-формил-Met;
 X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷, X⁸ и X⁹ представляют His;
 X¹⁰, X¹¹, X¹² и X¹³ представляют Asp;
 X¹⁴ представляет Lys;
 X¹⁵ представляет Asn;
 X¹⁶ представляет Lys;
 X¹⁷ представляет Arg;
 X¹⁸ представляет Asn.

15. Белок по п.14, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 8
 или SEQ ID NO: 23.

16. Белок по любому из предшествующих пунктов, где указанный белок является антиоксидантом.

17. Белок по любому из предшествующих пунктов, где указанный белок связывает гем.

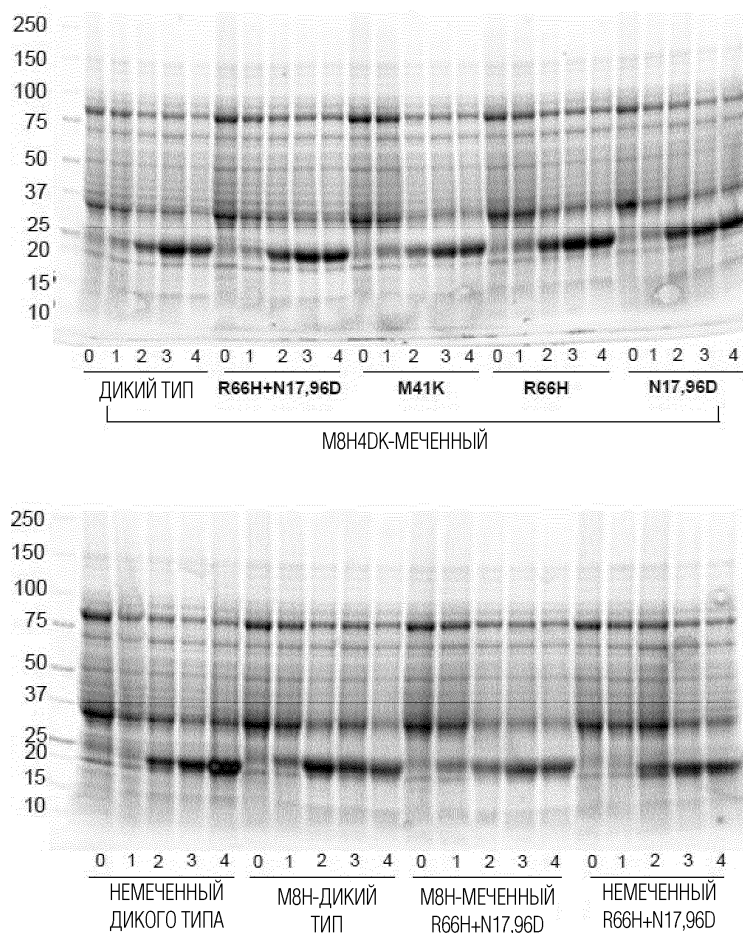
18. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из пп.1-17, и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.

19. Применение белка по любому из пп.1-17 в качестве антиоксиданта в медицине.

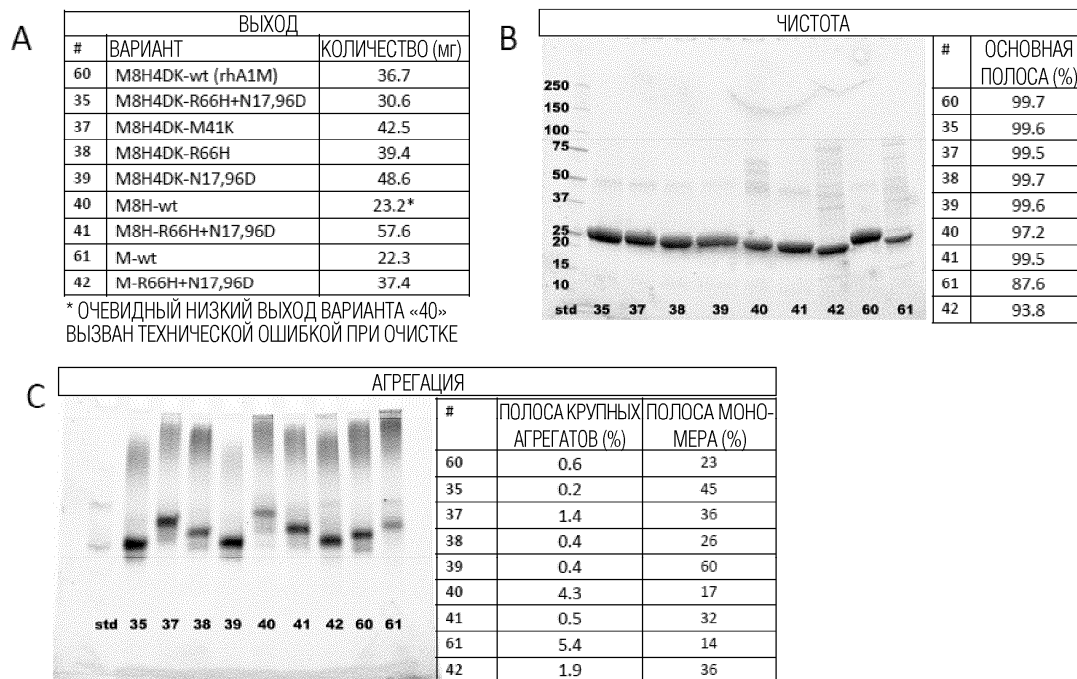
gi 4502067 ЧЕЛОВЕК	GPVPTFPDNIQVQENFISRLDGKWNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLV	50
gi 197102775 ОРАНГУТАНГ	GPVPTFPDNIQVQENFISRLDGKWNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLV	50
gi 403266141 БЕЛИЧЬЯ ОБЕЗЬЯНА	SPVPTFPPEGIQVQENFISRLDGKWNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLV	50
gi 311703 МЫШЬ	DPASTLP-DIQVQENFESSESLDGKWNLAIGSTCPWLSRIKIDMSVQTLV	49
gi 655878696 КРОЛИК	DFVPTLPDDIQVQENFELSRLDGKWNLAIGSTCPWLKRIKIDMAVSTLV	50
gi 512843527 nm КРЫСА	NFVPMFPDNIQVQENFDESRLDGKWNLAIGSTCPWLKRIKIDALSVMSTMV	50
gi 472354701 МОРЖ	SPVLTFPDAIQVQENFDISRLDGKWFHVMAGSTCPWLKKFMDRMSMSTLV	50
gi 471363267 ЛАМАНТИН	SPVKTSLNDIQVQENFDLPRLDGKWFNIAIGSTCPWLKRLKAGPTMSTLV	50
gi 478732996 ЦЫПЛЕНОК	TFVGDQDEDIQVQENFEPERMDGKWNLDVAVGTTCKMMKNYKFKFMSMTLV	50
gi 556972695 ЛАТИМЕРИЯ	-GSPLRDEDIQVQENFDLPRLDGKWFYDIAIASTCPWVKNNHKDMFMGMTMV	49
gi 147905774 ЛЯГУШКА	CSPIQFEDNIQVQENFDLQRLDGKWNLDIAIGSTCKWLKHHKFKFNMGTLE	50
gi 1091607 КАМБАЛА	-LPVLPFPLVPTQENFDLTFVGTWHDVALTSQPHMQRNRAAAGKLV	49
gi 4502067 ЧЕЛОВЕК	LGEGATEAEISMSTSRWRKGTCEETSGAYEKDITDCKFLYHKSMMWITME	100
gi 197102775 ОРАНГУТАНГ	LGEGATEAEISMSTSRWRKGTCEETSGAYEKDITDCKFLYHKSMMWITME	100
gi 403266141 БЕЛИЧЬЯ ОБЕЗЬЯНА	LGEGATEAEISMSTSRWRKGTCEETSGAYEKDITDCKFLYHKSMMWITME	100
gi 311703 МЫШЬ	LQEGATEAEISMSTSRWRKGTCEETSGAYEKDITDCKFLYHKSMMWITME	99
gi 655878696 КРОЛИК	LGEGTSETEISMSTSRWRKGTCEETSGAYEKDITDCKFLYHKSMMWITME	100
gi 512843527 nm КРЫСА	LKGKTTETQISTTTTHWRKGTCEETSGAYEKDITDCKFLYHKSMMWITME	100
gi 472354701 МОРЖ	LGEGATDGEISMSTSRWRKGTCEETSGAYEKDITDCKFLYHKSMMWITME	100
gi 471363267 ЛАМАНТИН	LGEGATDTEISMSTSRWRKGTCEETSGAYEKDITDCKFLYHKSMMWITME	100
gi 478732996 ЦЫПЛЕНОК	LGPSPSADQISTTSTRLPQGTCKRVSGEYQKIDTPGKYTYVNPMDVSIK	100
gi 556972695 ЛАТИМЕРИЯ	LQEGEQSDRISTTSTRIPDGTCSQITGYUTLITTPGKFATHNSMMWLDVN	99
gi 147905774 ЛЯГУШКА	LSDGETDGEVRIVNTMRHGTCSQIVGSTQKIDTPGKFDYFNARWGTTIQ	100
gi 1091607 КАМБАЛА	LEK-DTGKCLKVTRRLRHGTQVEMSGEVELSTPGRIFYHIDRDADVD	98
gi 4502067 ЧЕЛОВЕК	SYVVDHNDENAIIFLTKNFSPRHNGPTITAKLNGRAPQLRETLQLDERVVA	150
gi 197102775 ОРАНГУТАНГ	SYVVDHNDENAIIFLTKNFSPRHNGPTITAKLNGRAPQLRETLQLDERVVA	150
gi 403266141 БЕЛИЧЬЯ ОБЕЗЬЯНА	SYVVDHNDENAIIFLTKNFSPRHNGPTITAKLNGRAPQLRETLQLDERVVA	150
gi 311703 МЫШЬ	SYVVDHNDENAIIFLTKNSSHHNGLTITAKLNGRAPQLRDSLLQEPKDV	149
gi 655878696 КРОЛИК	SYVVDHNDENAIIFLTKNFSPRHNGPTITAKLNGRAPQLRDSLLQEPREVA	150
gi 512843527 nm КРЫСА	SYVVDHNDENAIIFLTKNFSPRHNGPTITAKLNGRAPQLRDSLLQEPREMA	150
gi 472354701 МОРЖ	SYVVDHNDENAIIFLTKNFSPRHNGPTITAKLNGRAPQLRDSLLQEPRELA	150
gi 471363267 ЛАМАНТИН	SYVVDHNDENAIIFLTKNFSPR-YGLTITAKLNGRAPQVQVRESLLEEFREFA	149
gi 478732996 ЦЫПЛЕНОК	SYVLRNDENAVIILMKNTSN-FGPTTTTLKNGRAPPELREELTEAFQQLA	149
gi 556972695 ЛАТИМЕРИЯ	SYVVDHNDENSIIVMAMQYKKS-SNSTTTTVRLNGRTQELRDSLHAEFKFA	148
gi 147905774 ЛЯГУШКА	NVIIVTNDENSVIMQMANKKG-SETTTTVKLNGRAPDLPTLVDEPRQFA	149
gi 1091607 КАМБАЛА	ATVVDHNDENAIITMSKQKTSGENSTSLKNSRTMSVSDTVIDDEKTLV	148
gi 4502067 ЧЕЛОВЕК	QGVGIPEDSIFTMADRGEVVEGEQEPEPILIPR---	183
gi 197102775 ОРАНГУТАНГ	QGVGIPEDSIFTMADRGEVVEGEQEPEPILIPR---	183
gi 403266141 БЕЛИЧЬЯ ОБЕЗЬЯНА	QGVGIPEDSIFTMANRGEVVEGEQEPEPILHRR---	183
gi 311703 МЫШЬ	LNVGISENSIIFMPDRGEVVEGDREVEPTSIAR---	182
gi 655878696 КРОЛИК	LGVGIPENSIFTMIDRGEVVEGQGEPEKPAVLA---	183
gi 512843527 nm КРЫСА	LGVGIPEDSIFTMANRGEVVEGDQAPESTPAPR---	183
gi 472354701 МОРЖ	LGVGIPEDSIFTMANRGEVVEGEQEPEPSPHMR---	183
gi 471363267 ЛАМАНТИН	LGVGIPEDSIFTTADKGEVVEGEQEPEPTAALR---	182
gi 478732996 ЦЫПЛЕНОК	LEMGIADSVFILANKGEVVEQETATAPER-----	179
gi 556972695 ЛАТИМЕРИЯ	LDQSIDEDSIYILPKRDEVEGERPKAESLMAR----	180
gi 147905774 ЛЯГУШКА	LAQGIPEDSIVMLPNNGECSGEIEVVRPR-----	179
gi 1091607 КАМБАЛА	RHQEMSDDTIILKQNKGDQIGGEQVGEAPSQPEPKR	184

ИДЕНТИЧНОСТЬ: 100%

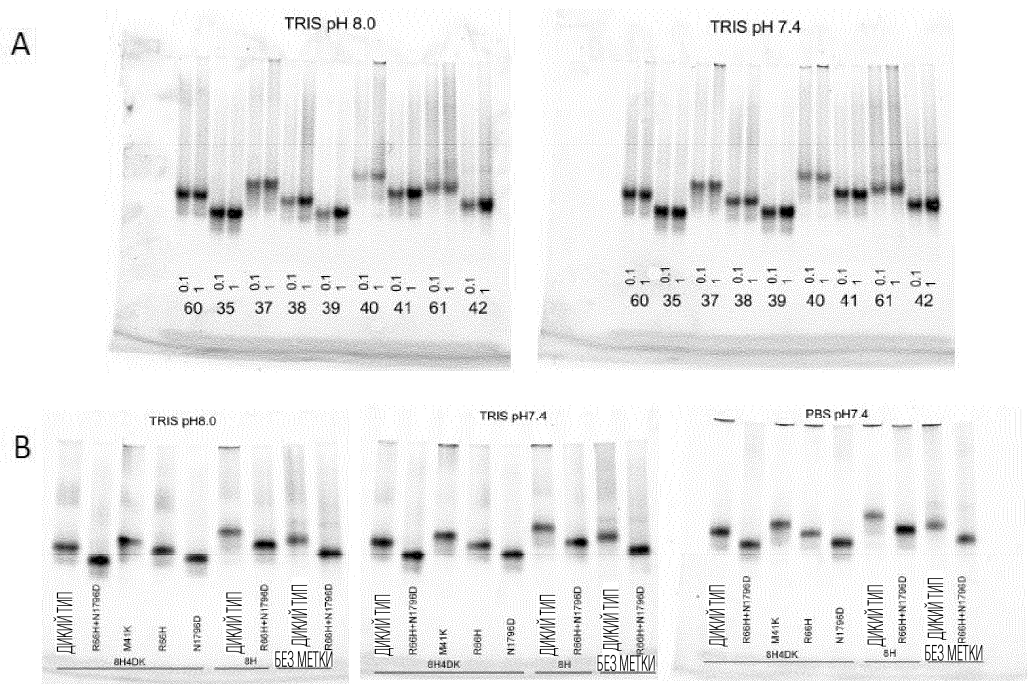
Фиг. 1



Фиг. 2

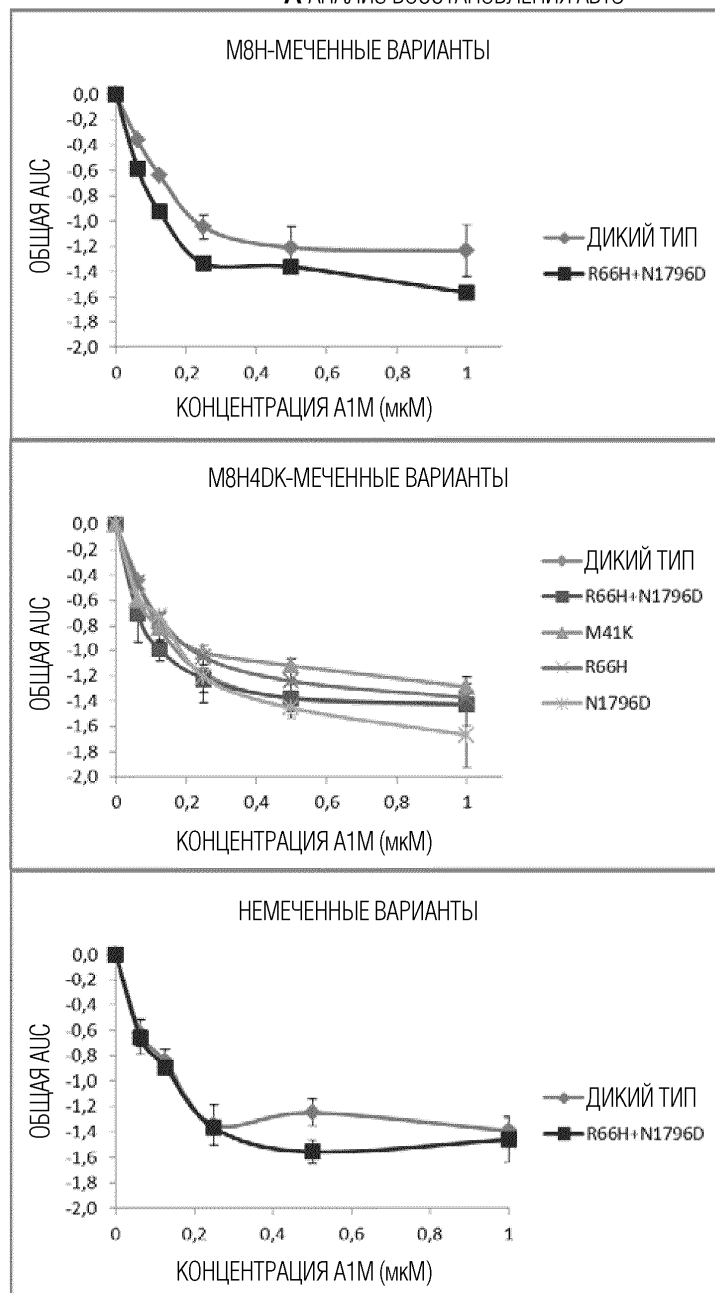


Фиг. 3

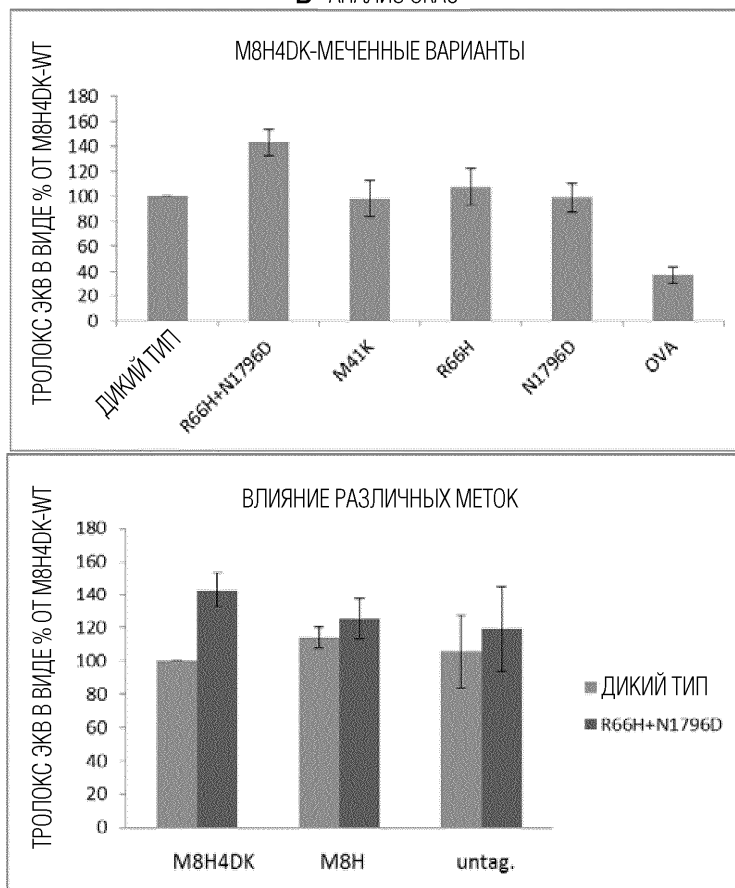


Фиг. 4

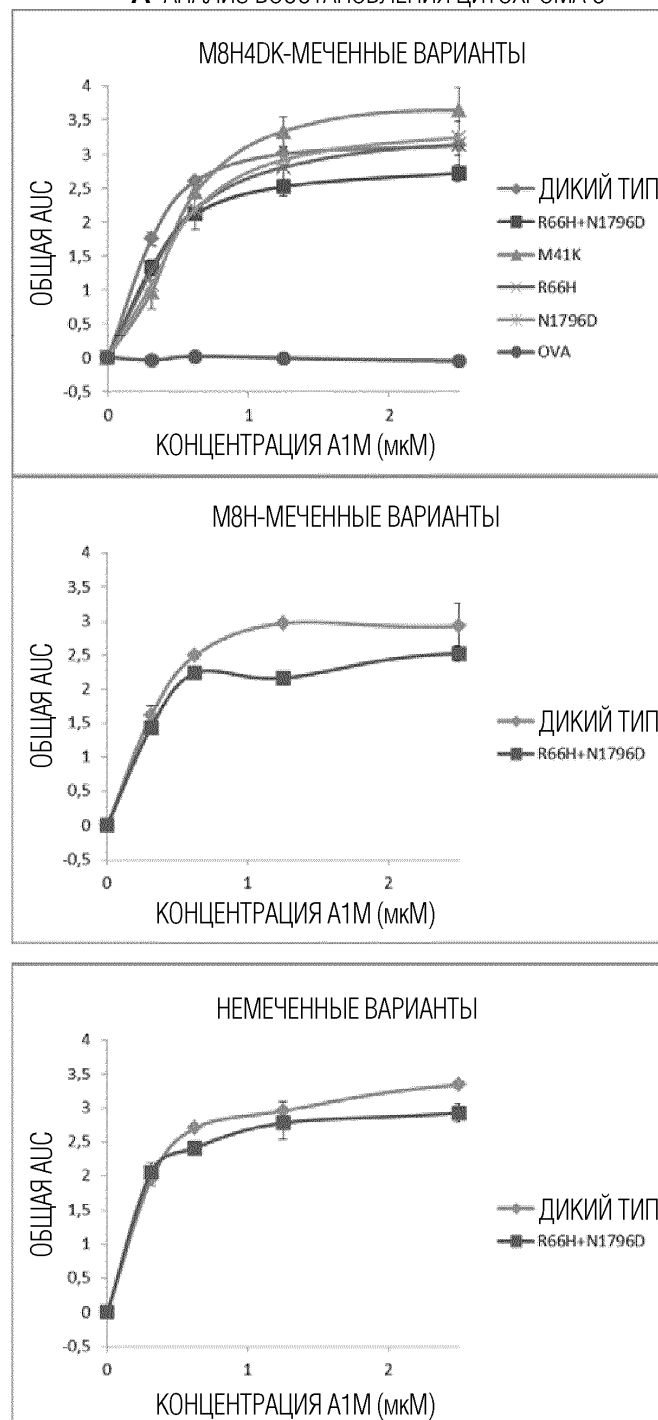
А АНАЛИЗ ВОССТАНОВЛЕНИЯ АВТС



В АНАЛИЗ ORAC

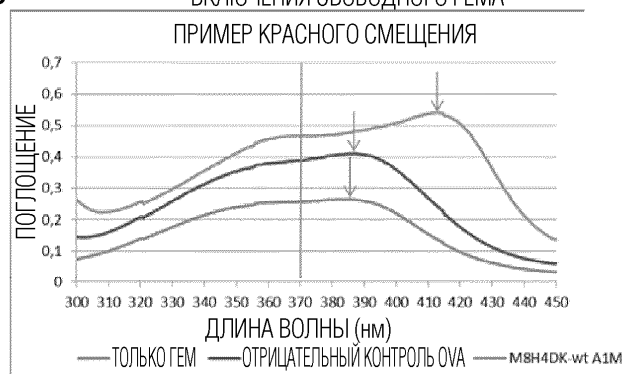


Фиг. 5

А АНАЛИЗ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЦИТОХРОМА C

АНАЛИЗ КРАСНОГО СМЕЩЕНИЯ ЗА СЧЕТ ВОССТАНОВЛЕНИЯ/
ВКЛЮЧЕНИЯ СВОБОДНОГО ГЕМА

В

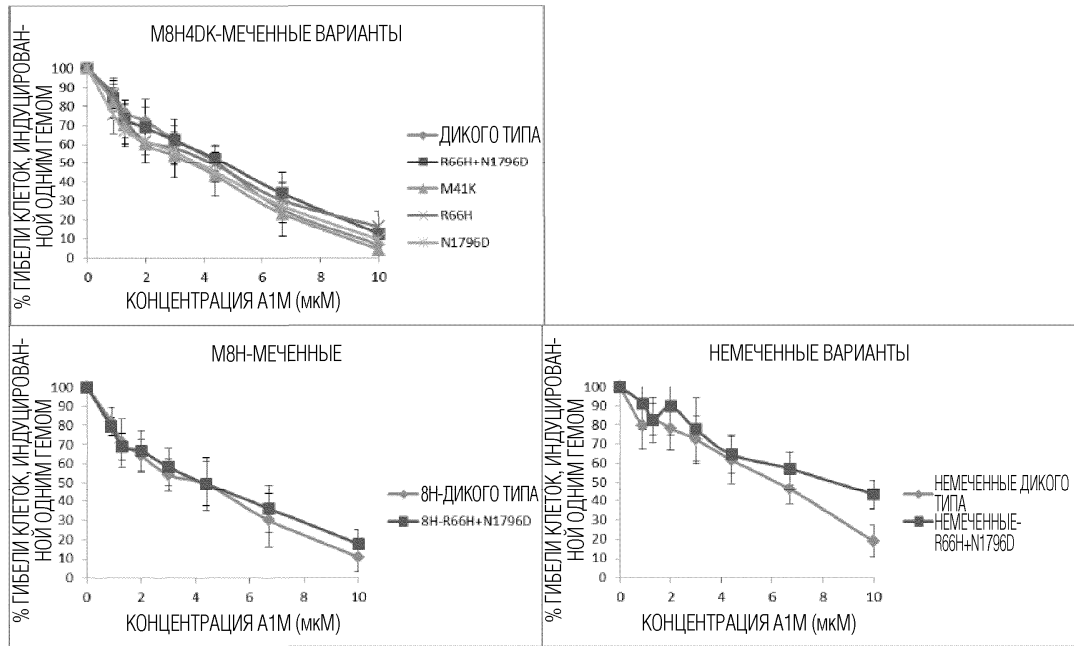


#	ВАРИАНТ	МАКСИМАЛЬНОЕ (370-450 нм)	СООТНОШЕ- НИЕ 413:386
	ТОЛЬКО ГЕМ	386	0.52
	OVA	387	0.59
60	M8H4DK-wt (rhA1M)	413	1.13
35	M8H4DK-R66H+N17,96D	411	1.11
37	M8H4DK-M41K	415	1.27
38	M8H4DK-R66H	412	1.12
39	M8H4DK-N17,96D	413	1.15
40	M8H-wt	415	1.34
41	M8H-R66H+N17,96D	415	1.41
61	M-wt	386	0.87
42	MR66H+N1796D	387	0.76

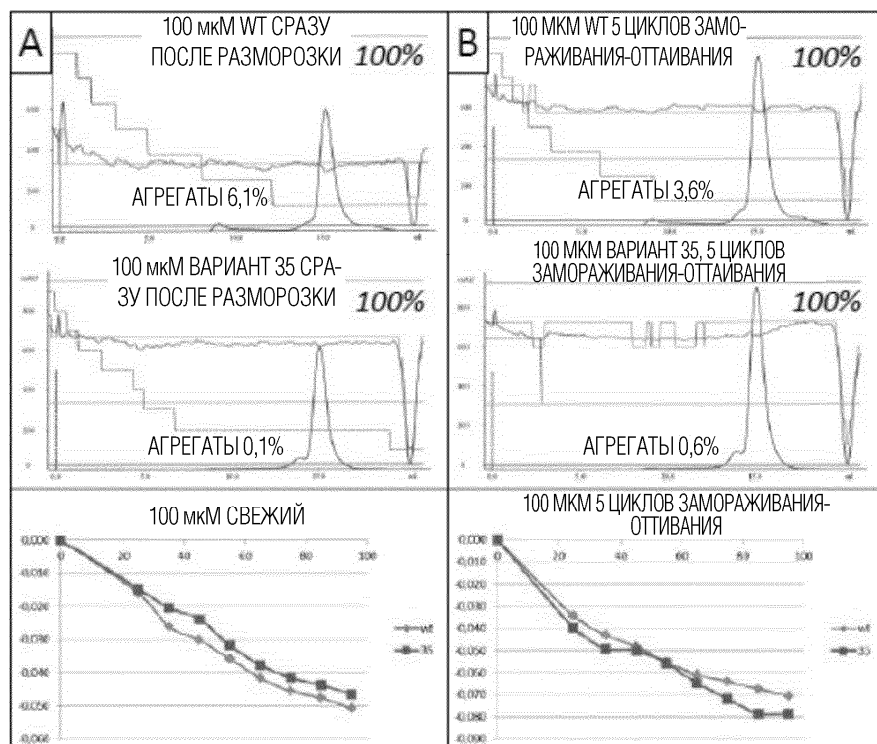
С СВЯЗЫВАНИЕ С ГЕМ-АГАРОЗОЙ

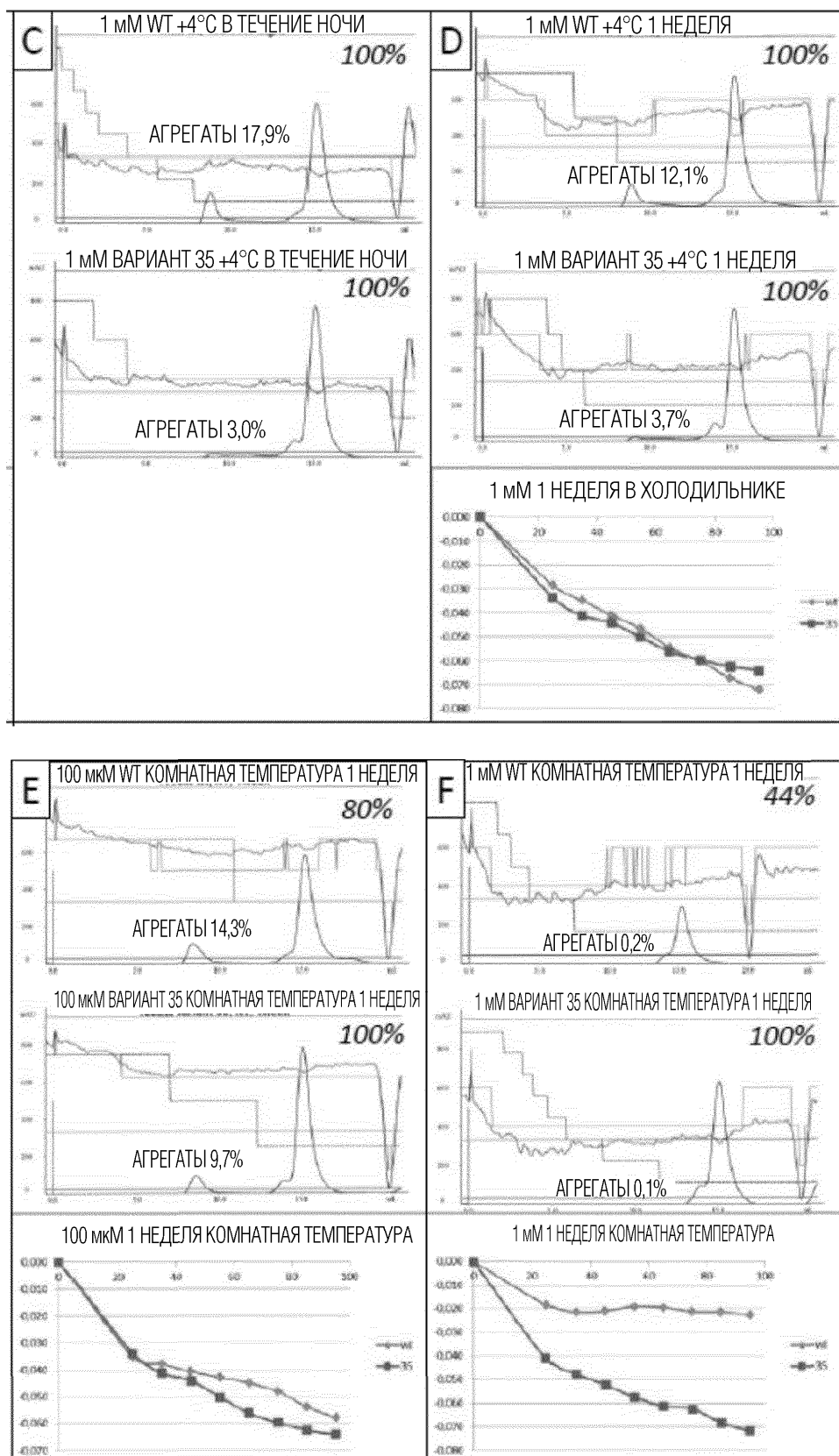
#	ВАРИАНТ	мкМ СВЯЗАННО- ГО/мкМ БЕЛКА
	OVA	0.008
60	M8H4DK-wt (rhA1M)	0.71
35	M8H4DK-R66H+N17,96D	0.72
37	M8H4DK-M41K	0.76
38	M8H4DK-R66H	0.66
39	M8H4DK-N17,96D	0.69
40	M8H-wt	0.68
41	M8H-R66H+N17,96D	0.72
61	M-wt	0.68
42	MR66H+N17,96D	0.66

Фиг. 6

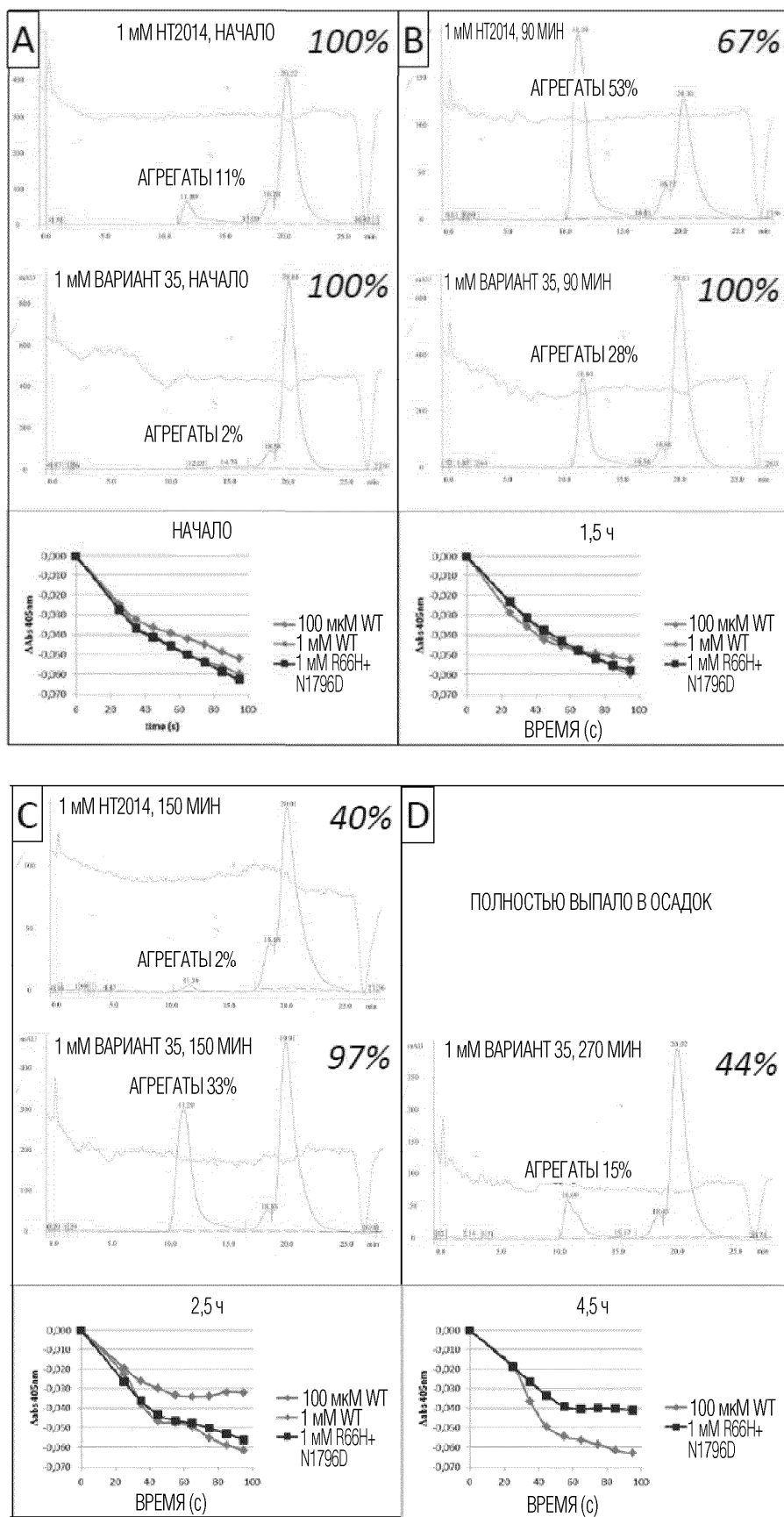


Фиг. 7

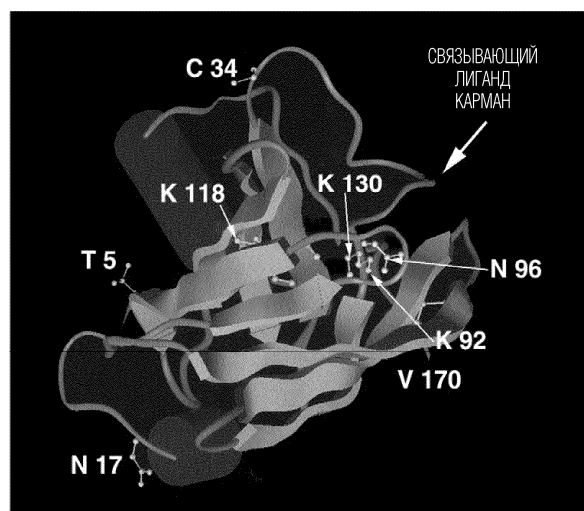




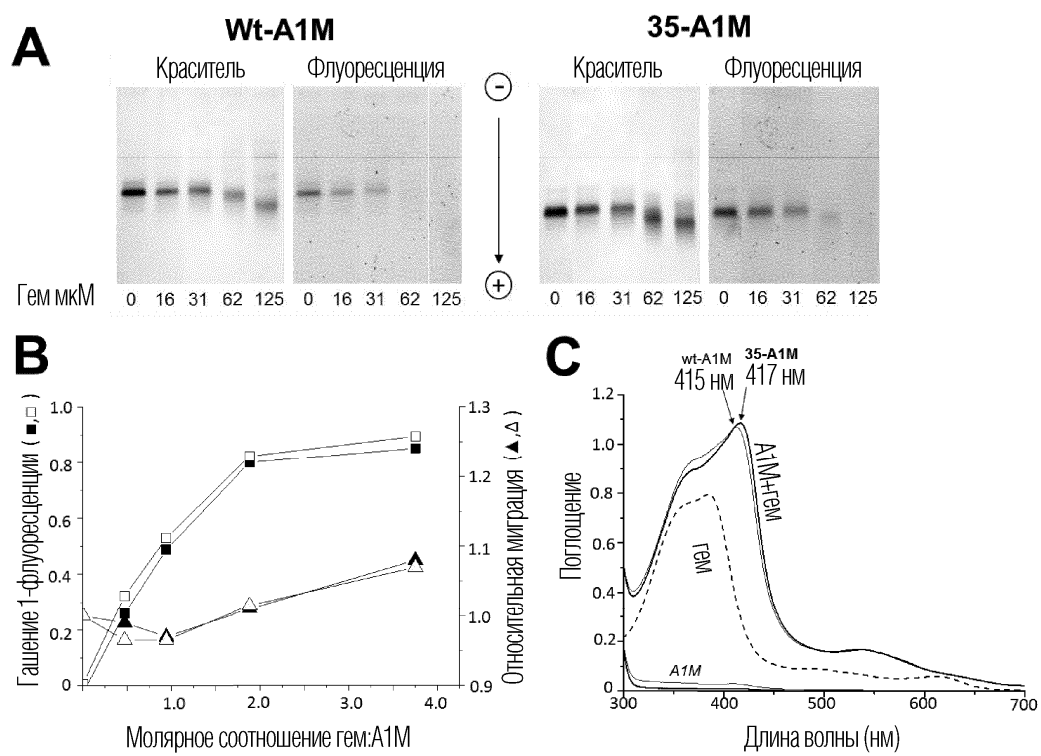
Фиг. 8



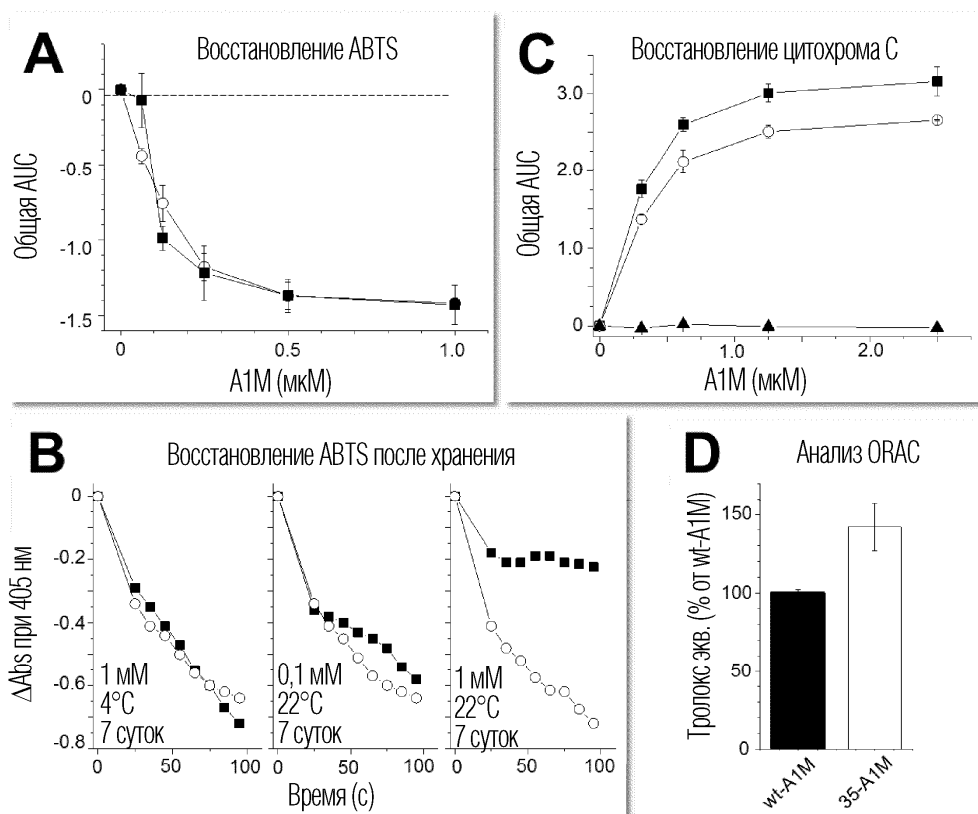
Фиг. 9



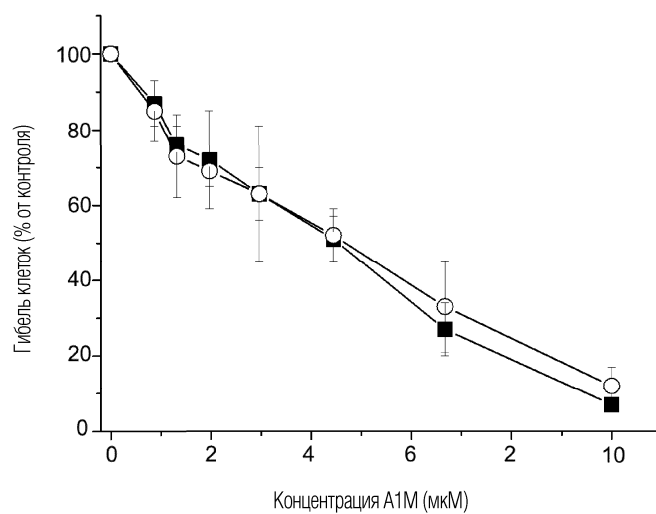
Фиг. 10



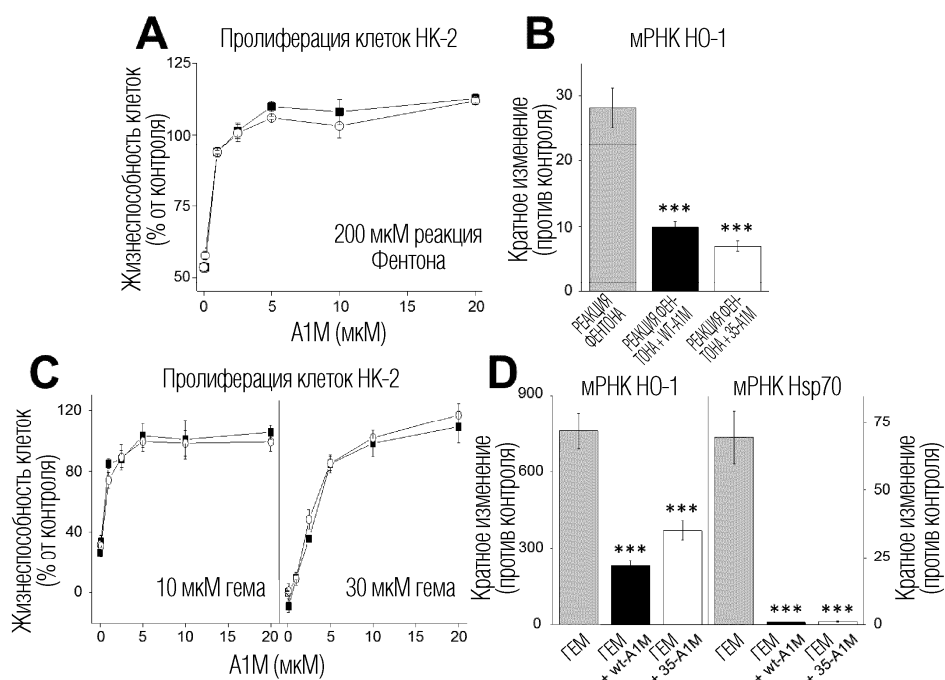
Фиг. 11



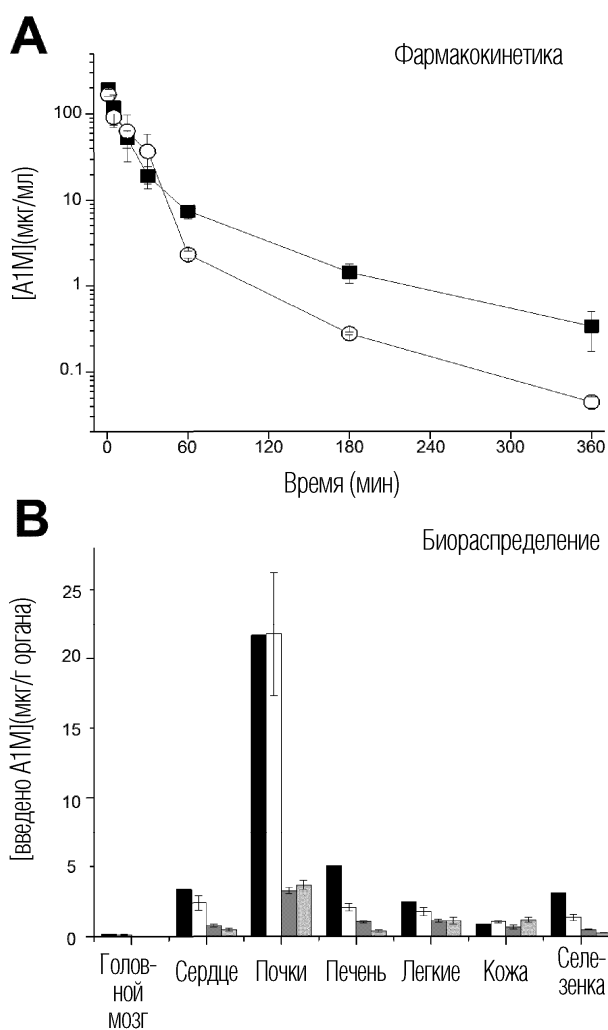
Фиг. 12



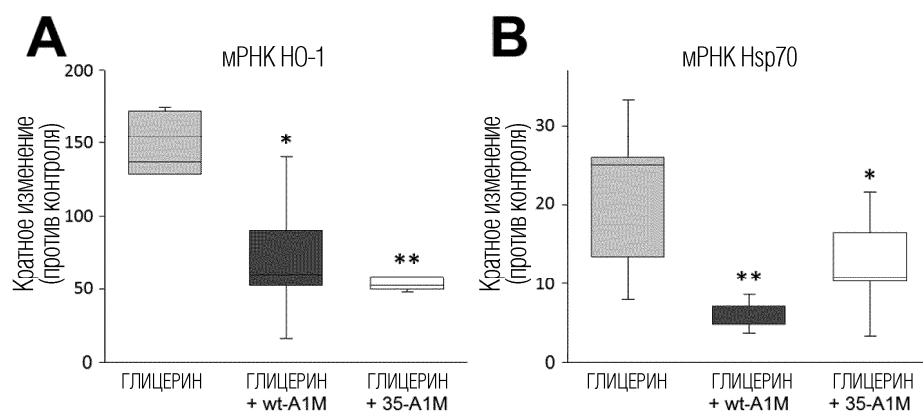
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2