

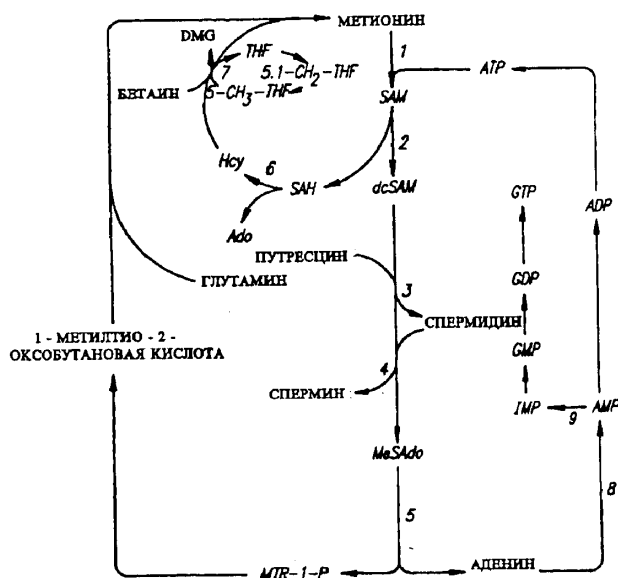
**(12) Описание изобретения**
К ПАТЕНТУ

1

2

(21) 96000320
(22) 22.12.94
(31) 08/176,413
(32) 29.12.93
(33) US
(46) 30.03.2001, Бюл.№1 (21)
(86) PCT/US 94/14919 (22.12.94)
(71) Дзе Ридженс оф дзе Университи оф Калифор-
ния (US)
(72) НОБОРИ, Цутому, КАРСОН Деннис, А. (US)
(71) Дзе Ридженс оф дзе Университи оф Калифор-
ния (US)
(56) WO 92/00757, 23.01.92. Dushange et al. Structure
of Met. IBLF... J. Biol. Chem. - 1983. 258, p. 14868 -
14871.
(54) СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ СЕЛЕКТИВ-
НОГО МЕТИОНИНОВОГО ГОЛОДАНИЯ КЛЕ-
ТОК В ОРГАНИЗМЕ МЛЕКОПИТАЮЩЕГО,
ПОЛИНУКЛЕОТИД, КАТАЛИТИЧЕСКИ АК-
ТИВНЫЙ ПОЛИПЕПТИД РЕКОМБИНАНТНОЙ
МЕТАЗЫ

(57) Изобретение относится к области медицины. В частности, описан усовершенствованный способ химиотерапии злокачественных клеток млекопитающих, которые имеют абсолютную потребность в метионине, но не содержат метилтиоаденозинфосфориллазу (МТАазу). Способ предусматривает детекцию МТАза-отрицательных клеток в организме млекопитающих, введение метионин-у-лиазы в достаточном количестве для снижения объема МТАза-отрицательных клеток в организме млекопитающего и совместное введение метилтиоаденозина в количестве, достаточном для постоянной доступности метионина для незлокачественных клеток млекопитающего. Предложены также каталитически активный полипептид рекомбинантной МЕТазы и полинуклеотид, кодирующий этот полипептид. Технический результат изобретения - расширение арсенала средств для борьбы со злокачественными клетками. 3 с. и 17 з.п. ф-лы, 2 табл., 4 фиг.



Фиг. 1

Изобретение относится к способу избирательного разрушения злокачественных клеток в организме млекопитающего на основе различий метаболизма в злокачественных и незлокачественных (нормальных) клетках. В частности, оно предусматривает голодание злокачественных клеток, которые не имеют фермента, необходимого для превращения метилтиoadенозина в метионин посредством деградации метионина и гомоцистеина плазмы.

Аминокислота метионин (MET) необходима для роста нормальных и злокачественных клеток. Для некоторых злокачественных клеток это требование является абсолютным, например без адекватного снабжения метионином эти клетки погибают.

Клетки млекопитающих получают MET из трех источников. Он может быть получен из пищи или при биохимическом синтезе MET из L-гомоцистеина (гомоцистеина) или метилтиoadенозина (MTA) (как продукт пути биосинтеза полиаминов). В последнем случае MTA превращается в MET с помощью метилтиoadенозинфосфорилазы (MTAазы).

За последнее десятилетие исследователи идентифицировали много линий злокачественных клеток, которые не имеют MTAазы и не могут вследствие этого превращать MTA в MET. Например, Katamari и соавт., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 78: 1219-1213(1981) сообщают, что 23% из 3 линий клеток злокачественных опухолей человека не имели определяемой MTAазы, при этом активность MTAазы имела в каждой из 16 изученных линий. MTAаза-отрицательные клетки удовлетворяют свою потребность в MBT конверсией гомоцистеина. Однако при недоступности гомоцистеина эти клетки погибают.

L-Метионин-L-дезаминио-у-меркаптометанлиаза (ED 4.4.1.11; METаза), как известно, разлагает не только MET, но и гомоцистеин. Вследствие этого теоретически возможно заставить голодать злокачественные клетки, не имеющие MTAазы (т.е., MTAаза-отрицательные клетки), разложением MET плазмы и гомоцистеина с помощью METазы. При этом ожидается, что нормальные MTAаза-положительные клетки будут удовлетворять потребность в MET постоянным превращением MTA в MET.

Разработка этого подхода была начата в 1972 г. Kreis в *Cancer Treat. Rpts.*, 63: 1069-1072 (1972). Используя 11 линий злокачественных клеток в культурах, не содержащих MET, Kreis ингибировал рост ряда злокачественных клеток введением в культуры MTAазы. Он также обнаружил, что 2 линии нормальных клеток были частично "излечены" от эффектов MET-голодания при добавлении в культуры гомоцистеина. Однако, несмотря на обнадеживающие результаты исследований *in vitro*, Kreis описал ряд препятствий, стоящих на пути успешного применения MTAазы в химиотерапии *in vivo*, в том числе недоступность средств,

обеспечивающих выживание нормальных клеток *in vivo*, потенциальную иммуногенность очищенного или частично очищенного фермента и необходимость получения фермента, устойчивого к разложению протеолитическими ферментами *in vivo* (Kreis, *Chemotherapy* (Muggia, FM, ed. The Hague, Boston and London: Martinus-Nijhoff, 1983) стр. 219- 248). Другим препятствием разработки успешного подхода к MET-голоданию злокачественных клеток оказалась необходимость идентификации злокачественных новообразований, являющихся подходящими мишенями для терапии, т.е. определение MTAаза-отрицательных злокачественных новообразований. В соответствии с этим был разработан способ анализа, который определяет, является ли злокачественное новообразование MTAаза-отрицательным, по определению, проявляется ли какая-либо каталитическая активность в культуре клеток (Seidenfeld et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95: 1861-1866, 1980). Однако, вследствие промышленной недоступности необходимого для анализа радиохимического субстрата, его применение в рутинных определениях в настоящее время неосуществимо. Более того, анализ не объясняет каталитическую активность MTAазы *in vitro*, поскольку с его помощью нельзя определить, присутствует ли в культуре клеток какой-либо фермент, независимо от определения, является ли он каталитически активным во время проведения анализа.

Этого ограничения в анализе активности можно избежать, разработав способ иммуноанализа, который с значительно большей чувствительностью определяет относительно малые количества фермента. Однако, выделение фермента MTAазы из природных источников для получения антител, применяющихся в иммунологической детекции MTAазы, оказалось трудоемким процессом, который дает относительно низкий выход (Rangion et al., *J. Biol. Chem.*, 261: 12324-12329/1986).

Даже в случае разработки адекватных способа детекции MTAаза-отрицательных клеток получение адекватного количества METазы из природных источников остается таким же сложным, как и получение MTAазы. Получение METазы средствами, отличными от выделения нативного фермента, пока не достигнуто, что отчасти объясняется неполным секвенированием гена METазы (Nakayama et al., *Biochem.* 27: 1587-1592, 1988).

В связи с указанными причинами, эффективный подход к осуществлению *in vivo* MET-голодания MTAаза-отрицательных злокачественных клеток остается нереализованным. В данном изобретении предлагается разработка этого подхода.

Изобретение предусматривает усовершенствованный способ селективного голодания MTAаза-отрицательных клеток в сочетании со средствами детекции MTAаза-отрицательных клеток. Согласно этому способу, злокачественные

новообразования, которые были идентифицированы как являющиеся МТАаза-отрицательными, обрабатывают терапевтически эффективным количеством МЕТаза, предпочтительно рекомбинантной МЕТаза, наиболее предпочтительно рекомбинантной МЕТаза, конъюгированной с полиэтиленгликолем или эквивалентной молекулой. В частности, МЕТазу вводят млекопитающим (предпочтительно человеку) в дозе, которая снижает уровень МЕТ в плазме до уровня, вызывающего метиониновое голодание МТАаза-отрицательных клеток (обычно не более 10% дотерапевтического уровня метионина). Нормальные (МТАаза-положительные) клетки получают метионин посредством введения МТА.

Изобретение также предусматривает способ детекции МТАаза-отрицательных клеток в злокачественных новообразованиях, в частности получение антител (в том числе моноклональных антител) и их применение в иммуноанализе МТАазы. Изобретение также позволяет определять наличие гена, который кодирует МТАазу, применяя способ на основе амплификации нуклеиновых кислот, в частности полимеразно-цепьевую реакцию (ПЦР).

Изобретение также относится к рекомбинантной МЕТазе, полученной при выделении и клонировании гена, кодирующего МЕТазу, что обеспечивает получение значительных количеств МЕТаза для применения в способах, предлагаемых в данном изобретении.

На фиг. 1 показана схема пути метаболизма при синтезе полиаминов и восстановление МТА с помощью МТАазы.

Фиг. 2 представляет сравнение МТАаза-положительных и МТАаза-отрицательных человеческих и других линий клеток, определенных иммуноблоттингом.

Фиг. 3 представляет сравнение МТАаза-положительных и МТАаза-отрицательных линий клеток человека и первичных клонов, определенных иммуноблоттингом.

Фиг. 4 представляет сравнение роста МТАаза-отрицательных клеток человека, обработанных МЕТазой, и таких же клеток, выросших в среде, богатой метионином.

Способ детекции МТАаза-отрицательных клеток.

На фиг. 1 схематически представлены пути метаболизма при синтезе *in vivo* МЕТ из МТА и деградации МЕТ МЕТазой. Как указано выше, для успешной терапии рака метиониновым голоданием необходима детским МТА-отрицательных клеток в целевом злокачественном новообразовании. Для этой цели предложен описанный ниже способ детекции МТАазы, пригодный для применения в способах по изобретению.

А. Способ иммуноанализа МТАазы

1. Получение антигенных МТАазы и пептидов МТАазы.

Антитела, специфичные к МТАазе, получают иммунизацией животных антигенными МТАазой или пептидами МТАазы. В основном антигенные

пептиды МТАазы выделяют и очищают из тканей млекопитающих способом, описанным (Rangion et al., J. Bid. Chem., 265: 6241-6246 (1990)). Пример, иллюстрирующий применение этого способа, представлен ниже. Аминокислотная последовательность полной МТА представлена в SEQ. ID. № 1.

2. Иммунизация антигенными пептидами МТАазы для получения антител против МТАазы.

При наличии антигенных пептидов антитела против иммунизирующих пептидов получают введением пептидов млекопитающим, например кроликам, мышам или крысам. Для иллюстрации последовательности аминокислот двух антигенных пептидов МТАазы приведены в Списке последовательностей в приложении, приведенном в конце описания, как SEQ. ID. № 2 и № 3. Антитела, образованные кроликами, иммунизированными этими пептидами, проявили 50%, максимального ответа на очищенную МТАазу, соответственно в разведениях 1:1500 и 1:4000.

Протокол множественной инъекционной иммунизации предпочтителен для использования при иммунизации животных антигенными пептидами МТАазы (см., например, Langone et al., eds., "Production of Antisera with Small Doses of Immunogen: Multiple Intradermal Injections", Methods of Enzymology (Acad. Press, 1981)). Например, хороший иммунный ответ получают у кроликов при внутрикожной инъекции 1 мг антигенного пептида МТАазы, эмульгированного в Полном адьюванте Фрейнда, с последующими одной-несколькими вторичными инъекциями этого же антигена в указанный адьювант через несколько недель.

При желании иммунизирующий пептид может быть связан с белком-носителем посредством конъюгации с помощью известных способов. Обычно используют носители, химически связанные с пептидом, включая гемоцианин лимфы улитки (KLH), тироглобулин, бычий сывороточный альбумин (BSA) и токсин столбняка. Связанный белок применяют затем для иммунизации животного, например мыши или кролика. Поскольку считается, что МТАаза является консервативной для видов млекопитающих, предпочтительно применение белков-носителей для повышения иммуногенности белка МТАазы.

Поликлональные антитела, образуемые животными, могут быть очищены, например, связыванием с матриксом, с которым были связаны пептиды, соответствующие антителам, и последующей элюцией с него. Исследователям известны различные иммунологические способы очистки и/или концентрирования поликлональных антител и моноклональных антител (см., например Coligan et al., Unit 9, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991).

Для детекции МТАаза-отрицательных клеток предпочтительно применение моноклональных антител, вследствие их специфичности и простоты

получения. Для получения моноклональных антител предпочтительна иммунизация мышей или крыс. Термин “антитело” применяют в настоящем изобретении для обозначения интактных молекул и их фрагментов, например Fab и F(ab')₂, которые способны связывать эпитопную детерминанту. Также в данном контексте термин “mAb’s изобретения” означает моноклональные антитела, специфичные к МТАазе.

Основным способом получения гибридом, секретирующих моноклональные антитела (mAb’s), является известный способ, предложенный Kohler and Milstein, *Nature*, 256: 495/1975). Он предусматривает выделение лимфоцитов из региональных лимфоузлов пяти различных онкологических больных с меланомой, тератокарциномой или раком шейки матки, глиомы или легкого. Лимфоциты получали из хирургического материала, смешивали их и сливали с SHFP-I. Гибридомы отбирали по продукции антител, связанных с линиями раковых клеток. Для получения и идентификации mAb’s со специфичностью к МТАазе можно использовать эквивалентные способы.

Подтверждение специфичности к МТАазе среди mAb’s изобретения получают с помощью относительно рутинных способов скрининга, например твердофазного иммуноферментного анализа ELISA, для определения элементарных реакционных образцов mAb.

Возможно установление идентичности специфичности mAb со специфичностью mAb изобретения без проведения экспериментов, определяющих, препятствуют ли тестируемые mAb связыванию mAb изобретения с МТАазой. Если тестируемые mAb конкурируют в связывании с mAb изобретения, вероятно, что эти два моноклональных антитела связывают один и тот же или близкие эпитопы.

Иным путем установления идентичности специфичности mAb со специфичностью mAb изобретения является предварительное инкубирование mAb изобретения с антигеном, который в норме реактивен, и определение, ингибируется ли способность тестируемых mAb связывать антиген. В случае ингибирования тестируемых mAb, вероятно, что они имеют такую же или близкую эпитопную специфичность, как mAb изобретения.

3. Способ иммуноанализа для детекции МТАаза-отрицательных клеток

Полученные, как описано выше, подходящие антитела используют для детекции МТАазы в злокачественных новообразованиях. Пример иммуноанализа для этой цели (например, способ иммуноблоттинга) представлен в примере 1 ниже. Однако, специалистам известны иные описанные в других источниках способы иммуноанализа для детекции антител, применяющие жидкую или твердую фазы (при связывании с носителем). Детекция МТАазы с помощью антител против МТАазы может быть осуществлена способами иммуноанализа, которые проводят предваритель-

но, после или одновременно, в том числе иммуногистохимическими способами анализа физиологических образцов. Подходящие способы иммуноанализа содержат конкурентный и неконкурентный способы, которые проводят прямым или непрямым образом. Примерами способов иммуноанализа являются радиоиммуноанализ (RIA) и сэндвичевый (иммунометрический) анализ. Исследователям известны также иные способы иммуноанализа.

Кроме того, в антитела, применяемые в иммуноанализах, может быть введена определяемая метка. Метка представляет собой вещество, которое ковалентно связано или прочно ассоциировано с зондом нуклеиновой кислоты, что обеспечивает детекцию зонда. Например, метка может представлять собой радиоизотоп, ферментный субстрат или ингибитор, фермент, контрастное вещество (в том числе коллоидные металлы), люминофоры, хемолуминесцентные молекулы, липосомы, содержащие любую из указанных меток, или члены специфично связывающихся пар. Подходящая метка не теряет определяемости в течение амплификации.

Специалистам в области диагностики известны соответствующие определяемые метки для использования в детекционных анализах *in vitro*. Например, подходящими радиоизотопами для применения *in vitro* являются ³H, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³²P, ¹⁴C, ³⁵S. Амплифицированные фрагменты с радиоизотопными метками определяют непосредственно с помощью счетчика гамма-излучения, авторадиографией или саузерн-блоттингом амплифицированных фрагментов в сочетании с денситометрией. Примерами подходящих хемолуминесцентных молекул являются акридины и люминал. Целевые последовательности, гибридизованные с зондами, деривированными акридиновым эфиром, защищены от гидролиза интеркаляцией. Примерами подходящих люминофоров служат флуоресцеин, фикобилипротеин, хелаты редкоземельных металлов, дансил или родамин.

Примерами подходящих ферментных субстратов или ингибиторов являются соединения, которые специфично связывают пероксидазу хрена, глюкозооксидазу, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназу, β-галактозидазу, пируваткиназу или щелочную фосфатазу ацетилхолинэстеразу. Примерами контрастных веществ служат коллоидное золото или магнитные частицы.

Специфично связывающиеся пары содержат две различные молекулы. На поверхности или в полости одной из них имеется область, которая специфично связывается с другой молекулой, обладающей определенной пространственной и полярной организацией. Членов специфично связывающейся пары часто называют лиганд и рецептор или лиганд и антилиганд. Например, если рецептор представлен антителом, лигандом является соответствующий антиген. Иные специфично

связывающиеся пары представлены парами гормон-рецептор, фермент-субстрат, биотин-авидин и гликопротеин-рецептор. Сюда же относятся фрагменты и часта специфично связывающихся пар, сохраняющие специфичность связывания, например фрагменты иммуноглобулинов, в том числе фрагменты Fab и т.п. Антитела могут быть моно- и поликлональными. При использовании члена специфично связывающейся пары в качестве метки, предпочтительным способом разделения является аффинная хроматография.

Антитела могут быть также связаны с носителем. Примерами известных носителей являются стекло, полистирол, полипропилен, полиэтилен, декстран, нейлон, амилозы, природные или модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, агарозы и магнетит. Носитель может быть растворимым или нерастворимым в зависимости от целей изобретения. Исследователям известны иные носители для связывания антител, их также можно получить обычными способами.

В. Детекция МТАаза-отрицательных клеток с помощью анализа на основе ПЦР.

С целью упрощения и ускорения детекции МТАаза-отрицательных клеток предпочтительно проведение анализа с использованием описанных МТАаза-специфичных антител. Однако, известны иные средства для детекции наличия МТАаза-отрицательных клеток в злокачественных новообразованиях. Например, используя описание нуклеиновой кислоты в SEQ. ID. № 1, исследователь может сконструировать олигонуклеотидные зонды, гибридизующиеся с ДНК МТАазы, присутствующей в образце клеток. Кроме того, поскольку считается, что недостаточность МТАазы обусловлена геномной делецией гена, кодирующего белок МТАазы, можно заключить, что определение в образце клеток отсутствия гена, кодирующего МТАазу, указывает на то, что эти клетки являются МТАаза-отрицательными.

Детальное описание способа амплификации и детекции гена МТАазы приведено в находящейся на рассмотрении заявке США № 08/176855 от 29 декабря 1993 г., содержание которой в части, относящейся к способу, включено в данное описание путем отсылки.

С. МТАаза-отрицательные кандидаты для терапии МТАазным голоданием.

Для терапии согласно изобретению (терапии МЕТ-голоданием) отбирают злокачественные новообразования, в которых не определяется каталитически активный или каталитически неактивный белок МТАазы. Во всех исследованных к настоящему времени линиях злокачественных клеток МТАаза-отрицательность (при ее наличии) является отличительным признаком клеточной популяции. Иными словами, если некоторые клетки злокачественного новообразования являются МТАаза-отрицательными, можно ожидать, что все клетки новообразования будут МТАаза-отрицательными. Это соответствует имеющимся

представлениям, что недостаточность МТАазы является результатом делеции гена, а не мутации. Гомогенность злокачественных новообразований по МТАаза-недостаточности значительно повышает эффективность МЕТ-голодания в качестве средства противораковой терапии по сравнению с терапевтическими способами, основанными на гетерогенных признаках, например на терапии моноклональными антителами против опухолевых антигенов. Однако, для целей изобретения важно, чтобы злокачественное новообразование имело существенную недостаточность МТАазы, например не содержало определяемых количеств белка МТАазы.

К злокачественным новообразованиям человека, которые, как полагают в настоящее время, отличаются существенной недостаточностью МТАазы, относятся новообразования, приведенные в табл.1.

С помощью описанных способов детекции исследователи могут определить недостаточность МТАазы в иных злокачественных новообразованиях без чрезмерных экспериментов.

II. Терапия с помощью МЕТ-голодания

A. Получение МЕТазы

Для реализации способов изобретения необходимы источники МТА и МЕТазы. Средства для получения МТА описаны выше. В данном изобретении МЕТазу выделяют из микроорганизмов, в том числе *Trichomonas vaginalis* (Lockwood et al., J. Biochem. 279: 675-682, 1991), *Clostridium sporogenes* (Kries et al., supra, 1867, EC4.4.1.11) и *Pseudomonas putida* (Nakayama et al., Biochem., 27: 1587-1591, 1988).

С помощью библиотеки к ДНК, сконструированной из *P. putida*, идентифицировали полную нуклеотидную последовательность МЕТазы. Она приведена в Списке последовательностей SEQ. ID. № 4, аминокислотная последовательность приведена в SEQ. ID. № 5.

Эта информация дает возможность легко синтезировать МЕТазу или экспрессировать ее из клона ДНК с помощью известных способов, описанных выше применительно к МТАазе. Пример клонирования МЕТазы и ее экспрессии в *E.coli* представлен ниже в примерах II и III.

Очищенную, частично очищенную, синтезированную или рекомбинантную МЕТазу применяют в терапевтическом способе согласно изобретению. Предпочтительна рекомбинантная МЕТаза, поскольку ее легко получить и она обладает относительно низкой иммуногенностью. Иммуногенность фермента может быть дополнительно понижена связыванием его с полиэтиленгликолем (ПЭГ) или эквивалентной биологически совместимой молекулой. Связывание с ПЭГ может также снизить период полужизни конъюгата МЕТазы *in vivo*.

Конъюгат ПЭГ-МЕТаза получают ковалентным связыванием ПЭГ с ферментом, как описано для L-аспарагина (Benedich et al., *in Exp.*

lalmunol. 48: 273-278, 1982). Способы связывания ПЭГ с белками известны, и не описываются детально в данной заявке. Результаты, полученные при лечении больных с лимфомой Неходжкинса L-аспарагиназой, связанной с ПЭГ, не предполагают значительного снижения активности МЕТазы *in vivo* при связывании с ПЭГ (см. результаты, полученные *in vivo* с ПЭГ-L-аспарагиназой, представленные Muss et al., Invest. New Drugs, 8: 125-130 (1990). Исследователям известны иные средства увеличения периода полужизни белков *in vivo*, которые могут быть использованы в случае МЕТазы, в том числе, но не ограничены ими, это гликозилирование и сукцинирование.

В. Терапевтические способы

Злокачественные новообразования с значительной недостаточностью МЕТазы лечат согласно представленному в изобретении способу применения МЕТазы. Предпочтителен выбор злокачественных новообразований, в отношении которых может быть использована региональная химиотерапия, например злокачественных новообразований, локализованных или содержащихся в области тела, которая доступна для внутриартериального, наружного, чрескожного или эквивалентного им способу введения МЕТазы непосредственно в место новообразования. Примерами злокачественных новообразований, чувствительных к региональной терапии, являются меланомы, рак яичников (введение через перитонеальный катетер) и рак мочевого пузыря (введение через уретральный катетер). Онкологам также известны другие злокачественные новообразования, которые, если они МТАаза-отрицательные, можно лечить с помощью региональной химиотерапии по изобретению.

Специалисты оценят возможность системного применения предлагаемых в изобретении терапевтических препаратов. Однако, дозы препаратов должны быть приведены в соответствие с их клиренсом и потенциальной токсичностью в отношении нормальных клеток. В частности, необходимы мониторинг клинических проявлений метионинового голодания нормальных клеток и его компенсация введением дополнительных количеств МТА.

Злокачественные новообразования с существенной недостаточностью МТАазы предпочтительно лечат согласно изобретению, как описано ниже.

МЕТазу вводят млекопитающим (в частности, человеку) парентерально, предпочтительно внутриартериально. МЕТазу вводят в фармацевтически приемлемом носителе, который может содержать стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, например оливковое масло, и пригодные для инъекций органические эфиры, например этилаллеат. Водные носители включают воду, водно-спиртовые растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевые и буферные среды. Как указано выше, для снижения

иммуногенности предпочтительно использование конъюгата МЕТазы с ПЭГ.

Носители для парентерального введения представлены раствором хлорида натрия, декстрозой Рингера, декстрозой и хлоридом натрия, маслами Рингера с лактозой или иммобилизованными. Носители для внутривенного введения представлены жидкостями, питательными наполнителями и электролитными наполнителями, например на основе декстрозы Рингера, и т.п. Возможно введение консервантов и иных добавок, например антимикробных агентов, антиоксидантов, хелатирующих агентов, инертных газов и т.п.

Доза МЕТазы составляет 10-20000, предпочтительно 5000-6000 ед/м² (или ниже при внутриартериальном введении) при одном - нескольких введениях в неделю в течение одного - нескольких дней. МЕТаза обычно выводится из организма млекопитающего в течение 24 час после введения. При использовании средств, пролонгирующих период полужизни фермента, например конъюгации с ПЭГ, этот период может быть увеличен на несколько часов - несколько дней. Вследствие этого необходим мониторинг уровня метионина в плазме млекопитающего и введение дополнительных доз МЕТазы для получения терапевтически значимого снижения концентрации метионина в плазме млекопитающего. Это снижение должно быть достаточным для индукции заметного уменьшения объема МТАаза-отрицательных клеток, например уменьшения объема злокачественных клеток или опухоли у млекопитающего. Доза, обеспечивающая такой результат, является терапевтически эффективной дозой. Исследования на грызунах *in vivo* с использованием частично очищенной МЕТазы показали, что терапевтически эффективной дозой является доза, снижающая уровень метионина в плазме до содержания не более 10% от предтерапевтического уровня.

Мониторинг уровня метионина в плазме (и его изменений) можно проводить с помощью периодических (желательно ежедневных) анализов *in vitro* образцов крови пациента, получающего МЕТазу, в течение курса лечения. На основании результатов исследований, проведенных на грызунах, можно ожидать снижения уровня метионина в плазме до не более 10%, через один час после введения МЕТазы. Способы анализа метионина в плазме известны. Например, концентрацию метионина в плазме определяют способом газожидкостной хроматографии этерифицированных аминокислот (н-бутиловый эфир) (Roach et al., J. Chromatog. 44: 269-278 (1969)). Известны также иные способы определения метионина в плазме.

Следует отметить, что МТАаза не может разрушать внутриклеточный метионин, поэтому адекватное поступление МТА для образования внутриклеточного метионина обеспечивает выживание МТАаза-положительных клеток при снижении уровня экзогенного метионина МЕТазой. Однако, без введения экзогенного метионина (или L-

гомоцистеина как субстрата для образования метионина, также разлагаемого МЕТазой) МТАаза-отрицательные клетки с абсолютной потребностью в метионине не выживут при отсутствии метионина в плазме.

Подтверждение и мониторинг эффективности терапии можно проводить на основании клинических данных об уменьшении клеточного объема злокачественного новообразования, получаемых известными способами, а также по данным периодического определения объема МТА-отрицательных клеток в злокачественном новообразовании описанными в данной заявке средствами. На основании клинических данных, полученных при использовании L-аспарагиназы для лечения онкологических больных, можно ожидать, что токсичность МЕТазы будет очень низкой и выраженной в основном в аллергических реакциях, которые лечат известными способами, например введением эпинефрина.

Поэтому МТА следует вводить млекопитающим совместно с МЕТазой, при этом предпочтительно одновременное введение. Поскольку МТА не является субстратом для МЕТазы, их можно смешивать в одном фармацевтически приемлемом носителе. Альтернативно МТА можно вводить через 24 час после введения МЕТазы (предпочтительно раньше) с целью “поддержания” МТАаза-положительных клеток с истощающимся запасом эндогенного метионина.

Доза МТА, необходимая для поддержания нормальных клеток, зависит от ряда клинических факторов, в том числе локализации злокачественного новообразования, объема МТАаза-отрицательных клеток в новообразовании, продолжительности МТАаза-терапии и доступности для пациента МЕТ в пище. В общем случае МТА вводят в дозах, достаточных для поддержания уровня метионина в плазме до значения 1-10 МКМ.

Примеры, иллюстрирующие полное описание изобретения на практике, даны ниже. Эти примеры, однако, не ограничивают объем изобретения, который определен прилагаемой формулой изобретения.

В примерах мин означает минуты, час - часы, а для обозначения единиц измерения, например мл, используются принятые сокращения.

Пример I

Способ иммуноанализа МТАазы

A. Получение антител против МТАазы

МТАазу выделили из бычьей печени, как описано Rangione et al., см. выше. Ряд трипептидов из выделенного фермента секвенировали известными способами. На основе полученных последовательностей пептиды 40 (из 18 аминокислот, SEQ. ID. № 2) и 51 (из 14 аминокислот, SEQ. ID. № 3) синтезировали модифицированным твердофазным способом Merrifield (Chen et al., Proc Nat'l Acad. Sci. USA, 81: 1784-1788, 1984). Все пептиды

содержали остаток цистеина на С-конце для облегчения связывания с белком-носителем, KLH, с помощью эфира m-малеимидобензоил-K-гидроксисукцимида.

Новозеландских белых кроликов (два кролика на пептид) иммунизировали в течение двух месяцев конъюгатами пептид-KLH. Первичные инъекции содержали 1 мг синтетического конъюгата пептид-KLH, эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда. Вторичные инъекции содержали 1 мг антигена в неполном адъюванте Фрейнда. После 3-4 инъекций сыворотки частично очищали 50% насыщенным раствором сульфата аммония и исследовали на наличие антипептидной и анти-МТАазной реакции с помощью ELISA.

В частности, планшеты для микротитрования предварительно покрывали пептидами или МТАазой в концентрации 10 мкг/мл в BBS (0,2 М бората натрия - 0,15 М NaCl, pH 8,5) и выдерживали в течение ночи при 4°C. Затем планшеты однократно промывали BBS, содержащим 0,05% Твин 20, и инкубировали в течение 4 час с BBS, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина, для блокирования неспецифичных сайтов связывания. Затем контрольную сыворотку и индуцированную пептидом антисыворотку в различных разведениях вносили в 0,1 мл аликвотах и инкубировали в течение ночи. Планшеты дважды промывали BBS, содержащим 0,05% Tween 20, и в течение 1 час обрабатывали меченым щелочной фосфатазой иммуноглобулином козы против кролика F(ab')₂ (Jackson Laboratories, Inc., West Grove, PA) в разведении 1:1000 в BBS. Затем планшеты промывали и добавляли в каждую лунку 0,2 мл -0,1 М динатриевой соли p-нитрофенилфосфата в 0,1 М растворе бикарбоната натрия, pH 9,0. Поглощение измеряли при длине волны 40,5 нм через 30 мин.

B. Способ иммуноблоттинга иммунореактивной МТАазы

Было определено присутствие МТАаза-отрицательных клеток в ряде линий клеток человека и биопсий опухолей (см. табл. 1, случаи, помеченные “иммуноанализ”). Другими МТАаза-положительными образцами оказались BV-173 (хронический миелогенный лейкоз, CML), Molt-16 (острый лимфолейкоз, ALL), Malt-4 (ALL), U397 (гистиоцитарная лимфома), SUP-TS (ALL), U-373MG (глиобластома) и T98G (глиобластома).

Клеточные экстракты, полученные из фермент-положительных клеток, подвергли электрофорезу в 12,5% полиакриламидном геле, содержащем 0,1% додецилсульфата натрия, вместе с нанесением различных количеств МТАазы, выделенной из бычьей печени, как описано выше.

В частности, неочищенные клеточные экстракты (10-150 мкг на 1 дорожку) разделили электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле, содержащем 0,1% додецилсульфата натрия. После электропереноса на нитроцеллюлозные мембраны (0,45 мм, Bio-Rad, Richmond, CA) неспецифические сайты связывания блокировали 3% порошко-

выми молоком в BBS. Белки обрабатывали в течение 16 час при комнатной температуре антисывороткой, разведенной 1:500 в BBS, содержащем 3% порошковое молоко. Затем белки промыли избытком BBS и провели детекцию реактивных бэндов по связыванию ¹²⁵I-белка А (ICN Radiochemicals, Irvine, CA) в течение 1 час. Мембраны промыли, наложили на бумажные полотенца и экспонировали на пленке Kodak XAR-5 (tm) при 70°C.

Бэнды на авторадиограммах сканировали денситометром (Bio-Rad) и определили их количество с помощью калибровочной кривой, полученной при определении иммунореактивных бэндов очищенного фермента.

С. Результаты

В 67% (4 из 6) линий и биопсий нелегочных клеток, например в глиомах, отмечена полная недостаточность в иммунореактивном ферменте (фиг. 2). 5 из 6 последовательных образцов биопсий из глиом человека с различными гистологическими характеристиками (табл. 1) были с полной недостаточностью (фиг. 3). Контрольные опыты показали, что в норме мозг человека обладает значительной активностью МТАазы (фиг. 3, до-

17

294

рожка 7). Таким образом, полная недостаточность МТАазы является обычной и специфичной метаболической аномалией в глиомах человека.

Из 19 исследованных линий клеток немелкоклеточного рака легких МТАаза полностью отсутствовала в 6 линиях клеток (см. табл. 1 и фиг. 4).

Таблица 1

<u>Злокачественные новообразования</u>	<u>метод определения</u>
Немелкоклеточные раки легких: A-549 (Аденосаркома) Sk-Lu-1 (Аденосаркома) H322 (бронхоальвеолярный рак) H1334 (крупноклеточная карцинома) H1437 (аденосаркома) H1581 (крупноклеточная карцинома)	Иммуноанализ ♦
* Линии клеток опухолей мозга: A-172 U-87MG U-138MG Hs683	Иммуноанализ ♦
Первичные опухоли мозга: Астроцитомы Мультиформная глиобластома Олигосарцитомы	Иммуноанализ ♦
Лимфомы и лейкомы: СЕМ (острый лимфолейкоз) K-T-1 (острый лимфолейкоз) NALL-1 (острый лимфолейкоз)	Иммуноанализ ♦

K562 (хронический миелолейкоз) DHL-9 (злокачественная лимфома) HSB2 (острый лимфолейкоз) Другие: 256 сарциносаркома Уолкера Jurkat K562 Capan-1 (аденосаркома поджелудочной железы)	Клинические данные** Иммуноанализ*** Иммуноанализ*** Иммуноанализ****
--	--

Примечания:

*получены из Американской Коллекции Типовых культур, Роквилл, Мериленд.

**описано Kreis et al., Cancer Res., 33: 1866-1869 (1973)

***описано Rangione et al., Biochem. J. 281: 533-538 (1992)

****описано Kreis et al., Cancer Trmt. Rpts., 63: 1069-1072 (1979)

♦ недостаточность МТАазы во всех других злокачественных новообразованиях была определена и описана

18

Nobori et al., Cancer Res. 53: 1098-1101 (1993), Cancer Res. 51: 3193-3197 (1991).

Пример II

Клонирование МБТАзы из Pseudomonas putida

На основании частичной аминокислотной последовательности МБТАзы, опубликованной Wakayama et al., Biochem., 27: 1587- 1591, 1988), были сконструированы дегенерированные олигонуклеотидные праймеры, которые использовали в ПЦР при анализе гена МБТАзы.

С помощью ПЦР амплифицировали фрагмент из приблизительно 300 пар оснований, который был субклонирован в плазмидный вектор pBluescript II KS (Stratagene, San Diego). С помощью внутреннего олигонуклеотидного зонда этот субклонированный продукт ПЦР проанализировали с использованием саузерн-блоттинга с целью подтверждения идентичности фрагмента гена МБТАзы. Дальнейший анализ с помощью саузерн-блоттинга показал, что этот фрагмент, полученный при ПЦР, гибридизуется с фрагментом 5,0 т.п.н. Bgl II в ДНК Pseudomonas putida.

На основании этих результатов сконструировали бактериофаговую библиотеку геномной ДНК, содержащую геномную ДНК Pseudomonas putida. Расщепленную Bgl II ДНК Pseudomonas putida разделили электрофорезом в 0,8% в агарозном геле с низкой точкой плавления. Фрагменты Bgl II размером 4/т.п.н. - 6/т.п.н. были вырезаны и выделены из геля. С помощью фрагмента Klenow эти фрагменты Bgl II были частично заполнены и субклонированы в бактериофаговый вектор yFix II. Этот вектор расщепили Xho I и частично заполнили Klenow. Библиотеку упаковали в бактериофаговые частицы с помощью упаковывающего экстракта gigapack (Stratagene). После упа-

ковки библиотеку амплифицировали и оттитровали.

Для выделения полного гена МЕТазы провели скрининг библиотеки, используя фрагмент, полученный с помощью ПЦР. После скрининга 200000 клонов было отобрано 8 независимых первичных клонов, из которых только два были истинно положительными и уникальными. Первый клон содержал вставку 5,1 т.п.н., а второй клон содержал вставку 5,9 т.п.н. Эти вставки были субклонированы в pBluescript II KS с последующим картированием и секвенированием. Было установлено, что последовательность гена МЕТазы содержит 1651 пару осн. (см. SEQ. ID. № 4).

Пример III

Экспрессия рекомбинантной МЕТазы

Рекомбинантный ген МЕТазы экспрессировали в векторе С5. Этот же вектор применяли для экспрессии МТАазы (см. Пример VII заявки США № 08/176 855 от 29 декабря 1993). Единственную колонию рекомбинантной E.coli с клонированным С5 использовали для инокуляции 50 мл культуры. Была использована стандартная среда LB с добавкой 50 мкг/мл ампициллина в указанную культуру и бактериальную культуру большого объема. Инокулированную 50 мл культуру инкубировали при 37°C в течение ночи. Затем эту культуру разводили в 100 раз свежей средой LB. Клетки выращивали в культуре большого объема (11) в течение 1,5 час при сильном встряхивании при 37°C. Для индукции экспрессии МЕТазы в культуру большого объема добавляли изопропилтио-β-D-галактозид (IPTG) в конечной концентрации 0,01, 0,1 и 1 мМ, и культуру дополнительно инкубировали в течение 4 час. Оптимальная концентрация IPTG для экспрессии белка составляла 1 мМ.

Через четыре часа после добавления IPTG клетки отделяли центрифугированием при 19000 g в течение 10 мин при 4°C. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали и промывали холодным солевым раствором и повторно центрифугировали. Ресуспендированный осадок клеток промывали 100-200 мл 20 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7,5, содержащего 15 мкМ 2-меркаптоэтанол. Затем добавляли 1 мМ ЭДТК и 30 мкМ пиридоксаль-5'-фосфата (буфер А) и еще раз центрифугировали осадок. Отмытую ресуспендированную (в буфере) суспензию клеток помещали в устройство для разрушения клеток, которое проводили под давлением 155 кг/см² N₂ в течение 20 мин при 4°C. Лизированные клетки центрифугировали при 43000 g в течение 20 мин при 4°C. Супернатант, полученный из клеточного экстракта, очищали на колонке для аффинной хроматографии с красителями-лигандами.

Клеточный экстракт (10 мл) помещали на колонку с гелем "DYEMATRIX" (Orange A) (Amicon Inc., Beverly, MA.) (12x2,6 см). Колонку наполняли и уравнивали согласно инструкциям производителя. Затем образец, нанесенный на колонку,

промывала 5 объемами буфера А для удаления несвязанного материала. Связанный продукт элюировали линейным градиентом 0-1,5 М КСl в буфере А. Фракции по 10 мл собирали и анализировали с использованием у-лиазы. Фракции с основным пиком активности метионин у-лиазы объединяли и концентрировали до 2-3 мл с помощью "CENTRICON 30" (Amicon Inc.).

К концентрированным фракциям (0,314 г/мл) добавляли (NH₄)₂SO₄ в твердом виде, получая конечную концентрацию 2,4 М. Полученные образцы центрифугировали при 13000 g в течение 10 мин. Супернатант фильтровали с помощью 0,45 μ фильтра acrodis (Amicon Inc.) Колонку уравнивали 2,4 М (NH₄)₂SO₄, растворенным в буфере А. Связанный белок элюировали буфером с линейно понижающимся градиентом концентрации (NH₄)₂SO₄ (скорость 0,5 мл/мин). Фракции с активностью МЕТазы объединяли и концентрировали, как описано выше. Концентрацию белка определяли способом, предложенным Bradford.

Чистоту препарата фермента проверяли в SDS-10% глицин-трис 1 мм геле (Novex, San Diego, CA). Активность МЕТазы определяли измерением количества образующейся 2-кетомасляной кислоты способом Esaki & Skoda (Meth Enzymol. 143: 459 465 (1987), содержание которого включено в настоящее описание. Полученный фермент имел специфичную активность 300 ед/мл, где 1 ед = 1 мкМ продукта, получающегося в мин.

Пример IV

Селективное голодание МТАаза-отрицательных клеток в линиях клеток немелкоклеточного рака легких

МТАаза-отрицательные линии клеток немелкоклеточного рака легких, идентифицированные в примере 1, обрабатывали in vitro в культуре клеток МЕТазой и МТА в соответствии с терапевтическим способом, предложенным в изобретении. Фермент-положительные (SK-MES-1) и фермент-отрицательные (A-549) линии клеток культивировали, в течение 4 дней в следующих средах: а) метионин-содержащей среде с добавлением 10% диализованной лошадиной сыворотки, б) среде с пониженным содержанием метионина с добавлением 10% диализованной лошадиной сыворотки, в) среде с пониженным содержанием метионина с добавлением 10% диализованной лошадиной сыворотки и 16 мкМ MeSAdo. Пролиферация указанных клеточных линий, особенно фермент-отрицательных клеток A- 549, значительно задерживалась в среде без метионина (27 и 3,3%) от роста в контроле для SK-MES-1 и A-549, соответственно). Добавление МТА в указанную среду усиливало рост фермент-положительных клеток SK-MES-1 (77% от роста в контроле). Однако, пролиферация фермент-отрицательных клеток A-549 не усиливалась в присутствии МТА (4,3%, от роста в контроле) (табл. 2).

Эти данные показывают, что рост MeSAdo-фосфорилаза-отрицательных клеток может быть селективно блокирован в среде с пониженным содержанием метионина с добавлением MeSAdo.

Таблица 2

Линия клеток	Наличие фермента ^a	Рост (% к контролю) ^b	
		Без метионина	
		Без MeSAdo	С MeSAdo
SK-MES-1	+	27 ± 2.6	77 ± 4.7
A-549	-	3.3 ± 0.6	4.3 ± 1.1

^a +, наличие; - отсутствие.

^b Процент роста в контроле = 100 x (рост клеток на среде с пониженным содержанием метионина с или без МТА)/(рост клеток на среде с метионином).

Пример V

Метиониновое голодание злокачественных клеток человека, обусловленное рекомбинантной МЕТазой

Для изучения антипролиферативных эффектов рекомбинантной МТАазы, полученной, как описано в примерах II и III, клетки DMEM SK-

MES-1 и A-549 культивировали в среде и 10% диализованной эмбриональной бычьей сыворотке с добавлением 0,06 ед/мл рекомбинантной МЕТазы. Через три дня определяли наличие пролиферации клеток. Эффект МЕТазы выражали в процентах относительно роста клеток в среде без фермента.

Как показано на фиг. 4, рост клеток фермент-положительной (SK-MES-1) и фермент-отрицательной (A-549) линий в средах с добавлением МЕТазы усиливался на 26,6 и 2,96%, соответственно. Однако, при добавлении 20 мкг МТА в качестве альтернативного источника клеточного метионина рост клеток восстанавливался до 61,4%, от уровня контроля у фермент-положительных клеток, тогда как рост фермент-отрицательных клеток снижался до 2%.

Список последовательностей:

SEQ. ID. № 1 - последовательность аминокислот полной МТАазы.

SEQ. ID. № 2 - последовательность аминокислот антигенного пептида МТАазы.

SEQ. ID. № 3 - последовательность аминокислот антигенного пептида МТАазы, отличная от последовательности аминокислот пептида SEQ. ID. № 2.

SEQ. ID. № 4- последовательность нуклеотидов полинуклеотида, кодирующего МЕТазу.

SEQ. ID. № 5 - последовательность аминокислот МЕТазы, выведенная на основе последовательности нуклеотидов SEQ. ID. № 4.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ осуществления селективного метионинового голодания клеток в организме млекопитающих, которые предположительно являются метилтиоаденозинфосфорилаза (МТАаза) - отрицательными, *отличающийся* тем, что определяют, являются ли клетки МТАаза отрицательными, при этом используют средства детекции как каталитически активной, так и каталитически неактивной МТАазы в образцах клеток, и вводят терапевтически эффективное количество L-метионин-L-дезамино Y-меркаптометанлиазы (МЕТазы) млекопитающему при практически одновременном введении ему терапевтически эффективного количества метилтиоаденозина (МТА), при этом МЕТазу и МТА вводят в фармацевтически приемлемых носителях.

2. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что МЕТаза представлена рекомбинантным микробным белком, который специфично разрушает метионин млекопитающих *in vivo*.

3. Способ по п.2, *отличающийся* тем, что МЕТаза имеет последовательность аминокислот SEQ ID № 5;

4. Способ по п.2, *отличающийся* тем, что МЕТазу экспрессируют с помощью полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID № 4;

5. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что МЕТаза связана с полиэтиленгликолем.

6. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что МЕТазу и МТА одновременно вводят млекопитающему.

7. Способ по п.6, *отличающийся* тем, что МЕТаза и МТА смешаны в одном фармацевтически приемлемом носителе.

8. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что средства детекции наличия или отсутствия каталитически активной и каталитически неактивной МТАаза включают иммуноанализ.

9. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что детекция наличия или отсутствия каталитически активной и каталитически неактивной МТАазы проводится анализом, включающим получение пригодного для анализа образца клеток, предположительно являющихся МТАаза-отрицательными, добавление олигонуклеотидных зондов, которые специфично гибридизуются с нуклеиновой кислотой, кодирующей МТАазу, к образцу в условиях, обеспечивающих определяемую гибридизацию зондов с любой такой нуклеиновой кислотой, присутствующей в образце, и детекцию присутствия нуклеиновой кислоты в образце.

10. Способ по п.9, *отличающийся* тем, что образец помещают в условия, способствующие селективной амплификации в образце любой нуклеиновой кислоты, кодирующей МТАазу.

11. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что предусматривает этап определения уровня содержания метионина в плазме млекопитающего перед и после введения ему МЕТаза.

12. Способ по п.11, *отличающийся* тем, что терапевтически эффективное количество МЕТаза, составляющее 10-20000 ед/м², вводят по меньшей мере однократно в общем количестве, достаточном для уменьшения числа МТАаза-отрицательных клеток в организме млекопитающего.

13. Способ по п.12, *отличающийся* тем, что терапевтически эффективное количество МЕТаза представлено количеством, которое снижает уровень содержания метионина в плазме млекопитающего приблизительно до $\leq 10\%$ от уровня, предшествовавшего введению МЕТаза.

14. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что терапевтически эффективное количество МТА

представлено количеством, достаточным для поддержания концентрации МТА в плазме млекопитающего на уровне 1 - 10 мкМ.

15. Полинуклеотид, кодирующий каталитически активный полипептид МЕТаза.

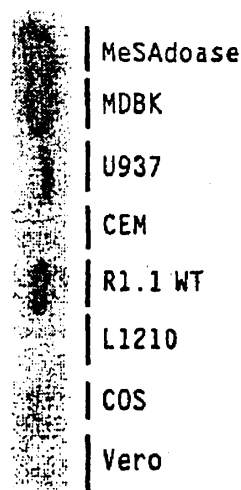
16. Полинуклеотид по п.15, *отличающийся* тем, что он имеет последовательность нуклеотидов (SEQ ID № 4).

17. Каталитически активный полипептид рекомбинантной МЕТаза.

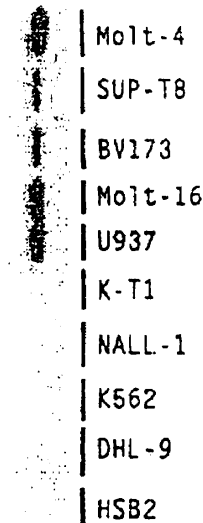
18. Полипептид по п.17, *отличающийся* тем, что он получен при экспрессии полинуклеотида по п.15 или 16.

19. Полипептид по п.18, *отличающийся* тем, что имеет последовательность аминокислот (SEQ ID № 5).

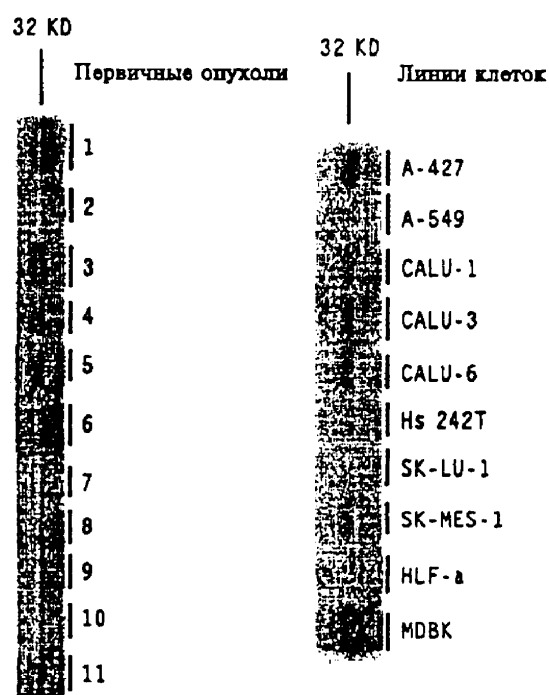
20. Полипептид по п.18, *отличающийся* тем, что получен при экспрессии полинуклеотида в прокариотах.



Фиг. 2А

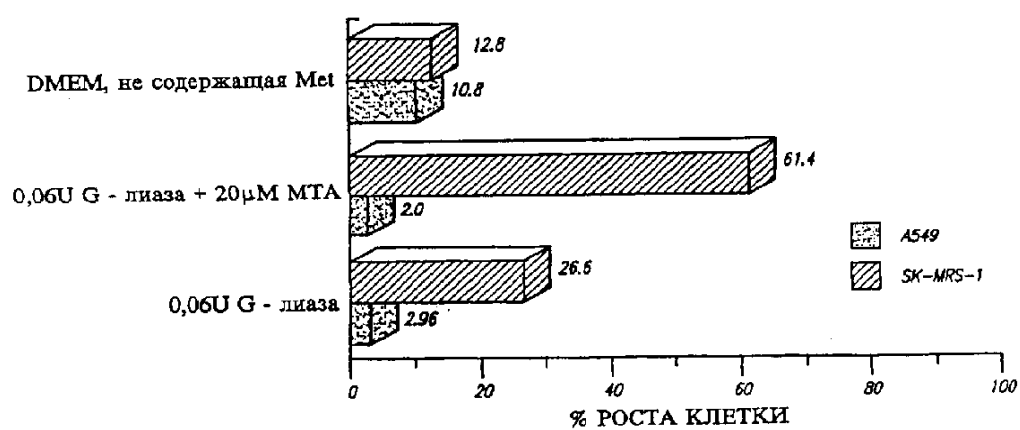


Фиг. 2Б



Фиг. 3Б

Фиг. 3А



Фиг. 4

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) ОСНОВНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

(I) Заявитель: Зе Риджентс оф зи Юнивесити оф Кэлифорнья

(II) Название изобретения: СПОСОБ СЕЛЕКТИВНОГО МЕТИОНИНОВОГО ГОЛОДАНИЯ
КЛЕТОК, МОЛЕКУЛА ДНК, КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ ПОЛИПЕПТИД РЕКОМБИНАНТНОЙ
МЕТАЗЫ, ПОЛИНУКЛЕОТИД, КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ ПОЛИПЕПТИД МЕТАЗЫ (ВАРИАНТЫ)

(III) Число последовательностей: 5

(IV) КОНТАКТНЫЙ АДРЕС:

(A) Получатель: Robbins, Berliner & Carlson

(B) Улица: 201 N. Figueroa Street, 5th Floor

(C) Город: Los Angeles

(D) Штат: California

(E) Страна: USA

(F) Zip: 90012

(V) Машиночитаемая форма:

(A) Тип среды: гибкий диск

(B) Компьютер: IBM PC совместимый

(C) Оперативная система: PC-DOS/MS-DOS

(D) Программное обеспечение: Patentin Release #1.0, версия #1.25

(VI) Текущие данные по заявке:

(A) Номер заявки: US

(B) Дата заполнения:

(C) Классификация:

(VII) Информация о патентном поверенном/ агента:

(A) Имя: Berliner, Robert

(B) Номер регистрации: 20, 121

(C) Номер: 5555-288

(IX) Информация о телекоммуникации:

(A) ТЕЛЕФОН: 213-977-1001

(B) ТЕЛЕФАКС: 213-977-1003

(1) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID №:1:

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 2763 пар осн.

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) НИТЬ: одинарная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(II) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(VI) НЕПОСРЕДСТВЕННЫЙ ИСТОЧНИК:

(B) КЛОН: метилдеинозинфосфатаза

(IX) СВОЙСТВА:

(A) НАЗВАНИЕ/КЛЮЧ: CDS

(B) РАСПОЛОЖЕНИЕ: 1...2763

(X) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №:1:

TTTATACAGA	GCATGACAGT	GGGGTCCTCA	CTAGGGTCTG	TCTGCCACTC	TACATATTTG	60
AAACAGGAGT	GGCTTCTCAG	AATCCAGTGA	ACCTAAATTT	TAGTTTTAGT	TGCTCACTGG	120
ACTGGGTTCT	AGGAGACCCC	CTGTGTAGT	CTGTGGTCAT	TGCTAGSAGA	ATCACTTAAT	180
TTTTCTAGA	CTCTAGGAGA	AAACAGTTGG	TGGTGTACTC	ATCACGGGTT	AACAATTTCT	240
TCTCTCCTTC	CATAGGCATG	GAAGGCAGCA	CACCATCATG	CCTTCAAAGG	TCAACTACCA	300
GGCGAACATC	TGGGCTTTGA	AGGAAGAGGG	CTGTACACAT	GTCATAGTGA	CCACAGCTTG	360
TGGCTCCTTG	AGGGAGGAGA	TTACGCCCGG	CGATATTGTC	ATTATTGATC	AGTTCAITGA	420
CANNNNNNNN	MNNNNNMNNN	GAGGTGACG	GTATCGATAA	GCTTTGTAAA	CAATTGTCTT	480
TAGCTTATCC	AGAGGAATTG	AGTCTGGAGT	AAAGACCCAA	ATATTGACCT	AGATAAAGTT	540
GACTCACCAG	CCCTCGGAGG	ATGGAAAGAT	GGCCTTAAAA	TAAAACAAAC	AAAAACCTTT	600
TTTGCTTTAT	TTTGTAGGAC	CACATGAGA	CCTCAGTCCT	TCTATGATGG	AAGTCATTCT	660
TGTGCCAGAG	GAGTGTGCCA	TATTCCAATG	GCTGAGCCGT	TTTGCCCCAA	AACGAGAGAG	720
GTGTGTAGTC	TTTCTGGAAG	GTGTACCAGA	ATAAATCATG	TGGGCTTGGG	GTGGCATCTG	780
GCAITTTGGTT	AATTGGCAGA	CGGAGTGGCC	CCATACCCCTC	ACTCAAGTTT	GCTTTGTATT	840
ATGCAAGTTT	ATGGAGAGTT	ATTTCTGTGT	GCTAATAATT	TNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	900
AAGTCAGCC	TTAAGTTGTG	CATGTGCTAG	TATGTTTTGA	AGTTTCTGGT	TTTTCTTTTC	960
TAGGTTCTTA	TAGAGACTGC	TAAGAAGCTA	GGACTCCGGT	GCCACTCAAA	GGGGACAATG	1020

GTCACAATCG	AGGGACCTCG	TTTTAGCTCC	CGGGCAGAAA	GCTTCATGTT	CCGCACCTGG	1080
GGGGGGGATG	TTATCAACAT	GACCACAGTT	CCAGAGGTGG	TTCTTGCTAA	GGAGGCTGGA	1140
ATTTGTTACG	CAAGTATCGC	CATGGGCACA	GATTATGACT	GCTGGAAGGA	GCACGAGGAA	1200
GCAGTAGGTG	GAATTCTTTT	CTAAGCACAT	ATAGCATGGG	TTTCTGGGTG	CCAATAGGGT	1260
GTCTTAAGTG	TTTGTTCCTA	TTACGTTAGT	TTGAGAAAGT	GCCTTCTTAC	AAGGTTTTGA	1320
AGTTGTTAAT	ATTTCTGTAT	GTTCCATTGG	AAGGTAAGAA	CAAAGATCAA	AAGAAAGAAA	1380
GAGAGACTTT	TACCCAAGGA	TCAGTAGTGA	AAATAGTACA	TTGTAGGCAT	GTAGATGTGT	1440
TGAGAATCAT	ACTAAGACTT	GGGCCTTANN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNTACCCCTAC	1500
ATTGAGGATT	CGGTTTCAGC	AGATAAATTT	GAGGGACACA	AACATTTAGG	CTGTAGCAAG	1560
GCTGGAGCTC	AGAAAAATGT	TTTATGACAA	GCAGTGAAT	TTTAAGTCT	AGTAACCTCC	1620
AGTGCTATTG	TTCTCTAGG	TTTGGGTGGA	CCGGGTCTTA	AAGACCCCTGA	AAGAAAACGC	1680
TAATAAAGCC	AAAAGCTTAC	TGCTCACTAC	CATACCTCAG	ATAGGGTCCA	CAGAAATGGTC	1740
AGAAACCCCTC	CATAACCTGA	AGGTAAGTGC	AGCCATGGAC	AATCAGGCAT	GTCTGTAGAC	1800
TCTGTATTGT	CTTCTTTTCT	TACTTGCAAT	TCACCTTTGG	TCCTCATGTA	TTTTTTGCCA	1860
GCCTAGATGT	TTTCAACAAG	TTTTTGTGAG	ATCTACTACT	ACCATACCAA	CCACTTGTGA	1920
AACTGAGTAG	TCTTATTTTC	TTGGCTGGTA	GTGCAGANNN	NNNNNNNNNN	NNAATAAACA	1980
ATAATCCAGG	CTGGGCTGGT	ATGGCAATAA	GTGATTATCA	GAACAATGCT	CTGAGATAAG	2040
CATTATTAACT	CTCACTTTAC	AGGAAAGGGA	GGTGAGGAAC	CAAGAGTTTA	GAGTACCCGA	2100
AGTTCCACAT	CTGGTTAGTG	AACTTGAAAA	TTTTCTGTAG	AATTTATTTA	AAGTGTATGT	2160
TTCTGCGTGC	CTCACTTTGA	TCTAGAAAAT	CAAAATCTGT	TTTTTTTTTT	AACAAACATC	2220
TCAGTAATTA	CGCCAACATG	TGAATATCAC	TGCCCTCCTT	CTTCCTTTCA	GAATATGGCC	2280
CAGTTTTCTG	TTTTATTACC	AAGACATTAA	AGTAGCATGG	CTGCCCAGGA	GAAAAGAAGA	2340
CATTCTAATT	CCAGTCATTT	TGGGAATTCC	TGCTTAACCT	GAAAAAATA	TGGGAAAGAC	2400
ATGCAGCTTT	CATGCCCTTG	CCTATCAAAG	AGTATGTTGT	AAGAAAGACA	AGACATTGTG	2460
TGTATAGAGA	CTCCTCAATG	ATTTAGACAA	CTTCAAAATA	CAGAAGAAAA	GCAAATGACT	2520
AGTAACATGT	GGGAAAAAAT	ATTACATTTT	AAGGGGGAAA	AAAAACCCCA	CCATTGCTTT	2580
CTCCCCCTAT	TAAATTTGCA	ACAATAAAGG	GTGGAGGGTA	ATCTCTACTT	TCCTATACTG	2640
CCAAAGAATG	TGAGGAAGAA	ATGGGACTCT	TTGGTTATTT	ATTGATGCCA	CTGTAAATTG	2700
GTACAGTATT	TCTGGAGGGC	AATTTGGTAA	AATGCATCAA	AAGACTTAAA	AATACGGACG	2760
TAC						2763

(1) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID №2:

(II) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 17 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(C) НИТЬ: одинарная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(vii) НЕПОСРЕДСТВЕННЫЙ ИСТОЧНИК:

(B) КЛОН: пептиды метиладенозинфосфатазы

(ix) СВОЙСТВА:

(A) НАЗВАНИЕ/КЛЮЧ: пептид

(B) РАСПОЛОЖЕНИЕ: 1...17

(x) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №:2:

Ile	Gly	Ile	Ile	Gly	Gly	Thr	Gly	Leu	Asp	Asp	Pro	Glu	Ile	Leu	Glu
1				5					10					15	
Gly															

(1) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID №:3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 13 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(C) НИТЬ: одинарная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(vii) НЕПОСРЕДСТВЕННЫЙ ИСТОЧНИК:

(B) КЛОН: пептиды метиладенозинфосфатазы

(ix) СВОЙСТВА:

(A) НАЗВАНИЕ/КЛЮЧ: пептид

(B) РАСПОЛОЖЕНИЕ: 1...13

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №:3:

Leu	Leu	Leu	Thr	Thr	Ile	Pro	Gln	Ile	Gly	Ser	Met	Glu
1				5					10			

(1) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID №4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 1815 пар осн.

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) НИТЬ: одинарная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(vi) НЕПОСРЕДСТВЕННЫЙ ИСТОЧНИК:

(B) КЛОН: метионин-гамма-лиаза

(ix) СВОЙСТВА:

(A) НАЗВАНИЕ/КЛЮЧ: CDS

(B) РАСПОЛОЖЕНИЕ: 304...1497

(x) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №4:

ATAGGATGGC		CTGGTAGCCA		GTGATATAGC		CGTTGTCTTC		CAGCAGCTTG		ACCCGGCGCC				60			
AGCAGGGGCG		AGGTGGTCAA		TGCCACCTGG		TCGGCAAGTT		CGGCGACGGT		TAGGCGGGCG				120			
TTGTCTGCA		AGGCGGCGAG		CAGGGCGCGG		TCGGTBCGGT		CGAGGCTTGA		AGGCATGTTT				180			
TGCCCTCCTG		GTCCGTTAAT		TATTGTTTTT		GTTCCAGCAA		GCACGCAGAT		GCGTGGGCAA				240			
TTTTGAAAA		AATCGGGCAG		CTCGGTBGCA		TAAGCTTATA		ACAAACCACA		AGAGGCTGTT				300			
GCC		ATG	CGC	GAC	TCC	CAT	AAC	AAC	ACC	GGT	TTT	TCC	ACA	CGG	GCC	ATT	348
		Met	Arg	Asp	Ser	His	Asn	Asn	Thr	Gly	Phe	Ser	Thr	Arg	Ala	Ile	15
		1				5					10						
CAC		CAC	GGC	TAC	GAC	CCG	CTT	TCC	CAC	GGT	GGT	GCC	TTG	GTG	CCA	CCG	396
His		His	Gly	Tyr	Asp	Pro	Leu	Ser	His	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Pro	Pro	20
					20					25					30		
GTG		TAC	CAG	ACC	GCG	ACC	TAT	GCC	TTC	CCG	ACT	GTC	GAA	TAC	GGC	GCT	444
Val		Tyr	Gln	Thr	Ala	Thr	Tyr	Ala	Phe	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Gly	Ala	35
					35				40					45			
GCG		TGC	TTC	GCC	GGG	GAG	GAG	GCG	GGG	CAC	TTC	TAC	AGC	CGC	ATC	TCC	492
Ala		Cys	Phe	Ala	Gly	Glu	Glu	Ala	Gly	His	Phe	Tyr	Ser	Arg	Ile	Ser	50
			50					55					60				
AAC		CCC	ACC	CTG	GCC	TTG	CTC	GAG	CAA	CGC	ATG	GCC	TCG	TTG	GAG	GGT	540
Asn		Pro	Thr	Leu	Ala	Leu	Leu	Glu	Gln	Arg	Met	Ala	Ser	Leu	Glu	Gly	65
		65					70					75					
GGT		GAG	GCG	GGA	TTG	GCG	CTG	GCG	TCG	GGG	ATG	GGA	GCC	ATT	ACT	TCG	588
Gly		Glu	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Ser	Gly	Met	Gly	Ala	Ile	Thr	Ser	80
						85					90						95

ACC Thr	CTC Leu	TGG Trp	ACC Thr	CTG Leu 100	CTG Leu	CGG Arg	CCT Pro	GGT Gly	GAT Asp 105	GAG Glu	CTG Leu	ATC Ile	GTG Val	GGG Gly 110	CGC Arg	636
ACC Thr	TTG Leu	TAT Tyr	GGC Gly 115	TGC Cys	ACC Thr	TTT Phe	GCG Ala	TTC Phe 120	CTG Leu	CAC His	CAT His	GGC Gly	ATT Ile 125	GGC Gly	GAG Glu	684
TTC Phe	GGG Gly	GTC Val 130	AAG Lys	ATC Ile	CAC His	CAT His	GTC Val 135	GAC Asp	CTT Leu	AAC Asn	GAT Asp	GCC Ala 140	AAG Lys	GCC Ala	CTG Leu	732
AAA Lys	GCG Ala 145	GCG Ala	ATC Ile	AAC Asn	AGC Ser	AAA Lys 150	ACG Thr	CGG Arg	ATG Met	ATC Ile	TAC Tyr 155	TTC Phe	GAA Glu	ACA Thr	CCG Pro	780
GCC Ala 160	AAC Asn	CCC Pro	AAC Asn	ATG Met	CAA Gln 165	CTG Leu	GTG Val	GAT Asp	ATA Ile	GCG Ala 170	GCG Ala	GTC Val	GTC Val	GAG Glu	GCA Ala 175	828
GTG Val	CGG Arg	GGG Gly	AGT Ser	GAT Asp 180	GTG Val	CTT Leu	GTG Val	GTG Val	GTC Val 185	GAC Asp	AAC Asn	ACC Thr	TAC Tyr	TGC Cys 190	ACG Thr	876
CCC Pro	TAC Tyr	CTG Leu	CAG Gln 195	CGG Arg	CCA Pro	CTG Leu	GAA Glu	CTG Leu 200	GGG Gly	GCA Ala	GAC Asp	CTG Leu	GTG Val 205	GTG Val	CAT His	924
TCG Ser	GCA Ala	ACC Thr 210	AAG Lys	TAC Tyr	CTC Leu	AGT Ser	GGC Gly 215	CAT His	GGC Gly	GAC Asp	ATC Ile	ACT Thr 220	GCG Ala	GGC Gly	CTG Leu	972
GTG Val	GTG Val 225	GGG Gly	CGC Arg	AAG Lys	GCT Ala	TTG Leu 230	GTC Val	GAC Asp	CGC Arg	ATT Ile	CGG Arg 235	CTG Leu	GAA Glu	GGG Gly	CTG Leu	1020
AAA Lys 240	GAC Asp	ATG Met	ACC Thr	GGG Gly	GCA Ala 245	GCC Ala	TTG Leu	TCA Ser	CCG Pro	CAT His 250	GAC Asp	GCT Ala	GCG Ala	TTG Leu	TTG Leu 255	1068
ATG Met	CGC Arg	GGC Gly	ATC Ile	AAG Lys 260	ACC Thr	CTG Leu	GCG Ala	CTG Leu	CGC Arg 265	ATG Met	GAC Asp	CGG Arg	CAT His	TGC Cys 270	GCC Ala	1116
AAC Asn	GCC Ala	CTG Leu	GAG Glu 275	GTC Val	GCG Ala	CAG Gln	TTC Phe	CTG Leu 280	GCC Ala	GGG Gly	CAG Gln	CCC Pro	CAG Gln 285	GTG Val	GAG Glu	1164
CTG Leu	ATC Ile	CAC His 290	TAC Tyr	CCG Pro	GGC Gly	TTG Leu	CCG Pro 295	TCG Ser	TTT Phe	GCC Ala	CAG Gln	TAC Tyr 300	GAA Glu	CTG Leu	GCA Ala	1212
CAG Gln	CGG Arg 305	CAG Gln	ATG Met	CGT Arg	TTG Leu	CCG Pro 310	GGC Gly	GGG Gly	ATG Met	ATT Ile	GCC Ala 315	TTT Phe	GAG Glu	CTC Leu	AAG Lys	1260
GGC Gly 320	GGT Gly	ATC Ile	GAG Glu	GCC Ala	GGG Gly 325	CGC Arg	GGC Gly	TTC Phe	ATG Met	AAT Asn 330	GCC Ala	CTG Leu	CAG Gln	CTT Leu	TTT Phe 335	1308
GCC Ala	CGT Arg	GCG Ala	GTG Val	AGC Ser 340	CTG Leu	GGG Gly	GAT Asp	GCC Ala	GAG Glu 345	TCG Ser	CTG Leu	GCA Ala	CAG Gln	CAC His 350	CCG Pro	1356
GCG Ala	AGC Ser	ATG Met	ACG Thr 355	CAC His	TCC Ser	AGT Ser	TAC Tyr	ACG Thr 360	CCA Pro	CAA Gln	GAG Glu	CGG Arg	GCG Ala 365	CAT His	CAC His	1404

GGG Gly	ATA Ile	TCA Ser 370	GAG Glu	GGG Gly	CTG Leu	GTG Val	AGG Arg 375	TTG Leu	TCA Ser	GTG Val	GGG Gly	CTG Leu 380	GAG Glu	GAT Asp	GTG 1452 Val
GAG Glu	GAC Asp 385	CTG Leu	CTG Leu	GCA Ala	GAT Asp	ATC Ile 390	GAG Glu	TTG Leu	GCG Ala	TTG Leu	GAG Glu 395	GCG Ala	TGT Cys	GCA Ala	1497
TGAACCTGGC		TTGCAGGATC		GGGAACACTT		GCCCAATGCC		TCACGGGATC		AGGCGATGGC				1557	
ACTTTGGATG		AGCTGGTGAA		TTGGCCGGCT		TATCCAAGAG		GAGTTTAAAA		TGACCGTA				1615	

(1) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID №5:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 398 аминокислот
(B) ТИП: аминокислота
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №5:

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

Arg	Gly	Ser	Asp 180	Val	Leu	Val	Val	Val 185	Asp	Asn	Thr	Tyr	Cys 190	Thr	Pro
Tyr	Leu	Gln 195	Arg	Pro	Leu	Glu	Leu 200	Gly	Ala	Asp	Leu	Val 205	Val	His	Ser
Ala	Thr 210	Lys	Tyr	Leu	Ser	Gly 215	His	Gly	Asp	Ile	Thr 220	Ala	Gly	Leu	Val
Val 225	Gly	Arg	Lys	Ala	Leu 230	Val	Asp	Arg	Ile	Arg 235	Leu	Glu	Gly	Leu	Lys 240
Asp	Met	Thr	Gly	Ala 245	Ala	Leu	Ser	Pro	His 250	Asp	Ala	Ala	Leu	Leu 255	Met
Arg	Gly	Ile	Lys 260	Thr	Leu	Ala	Leu	Arg 265	Met	Asp	Arg	His	Cys 270	Ala	Asn
Ala	Leu	Glu 275	Val	Ala	Gln	Phe	Leu 280	Ala	Gly	Gln	Pro	Gln 285	Val	Glu	Leu
Ile	His 290	Tyr	Pro	Gly	Leu	Pro 295	Ser	Phe	Ala	Gln	Tyr 300	Glu	Leu	Ala	Gln
Arg 305	Gln	Met	Arg	Leu	Pro 310	Gly	Gly	Met	Ile	Ala 315	Phe	Glu	Leu	Lys	Gly 320
Gly	Ile	Glu	Ala	Gly 325	Arg	Gly	Phe	Met	Asn 330	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe 335	Ala
Arg	Ala	Val	* Ser 340	Leu	Gly	Asp	Ala	Glu 345	Ser	Leu	Ala	Gln	His 350	Pro	Ala
Ser	Met	Thr 335	His	Ser	Ser	Tyr	Thr 360	Pro	Gln	Glu	Arg	Ala 365	His	His	Gly
Ile	Ser 370	Glu	Gly	Leu	Val	Arg 375	Leu	Ser	Val	Gly	Leu 380	Glu	Asp	Val	Glu
Asp 385	Leu	Leu	Ala	Asp	Ile 390	Glu	Leu	Ala	Leu	Glu 395	Ala	Cys	Ala		