

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047857**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.20

(51) Int. Cl. *C12Q 1/37* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Номер заявки
202190355

(22) Дата подачи заявки
2019.08.07

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ ЖХ-МС/МС ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ БИОМАРКЕРОВ**

(31) **62/715,973**

(32) **2018.08.08**

(33) **US**

(43) **2021.05.25**

(86) **PCT/US2019/045494**

(87) **WO 2020/033537 2020.02.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Е Соок Йен, Цю Хайбо, Ли Нин (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) Cambridge: "PeptiQuant(TM) Biomarker Assessment Kit (BAK-76)", Research products, 23 April 2015 (2015-04-23), pages 1-3, XP055640126, Retrieved from the Internet: URL:https://www.si-science.co.jp/product/data/2015product-2.pdf [retrieved on 2019-11-07] page 1 - page 3

EP-A1-2821076

US-A1-2015111220

Billy Joe Molloy: "A Semi Quantitative Method for Analysis of Tryptic Peptides in Human Serum: A Rapid, Targeted UPLC-MS/MS Approach Using Biognosys Plasma Drive kit", Application Note, 28 August 2018 (2018-08-28), pages 1-5, XP055640107, Retrieved from the Internet: URL:https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006323en.pdf [retrieved on 2019-11-07] the whole document

Billy Joe Molloy: "SINGLE HIGH-THROUGHPUT UPLC-MS-MS PLATFORM FOR TARGETED METABOLOMIC, LIPIDOMIC AND PROTEOMIC STUDIES (TARGETED MULTI-OMICS)", 22 January 2018 (2018-01-22), XP055640157, Retrieved from the Internet: URL:https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/2018msacl_molloy_multi-omics.pdf [retrieved on 2019-11-07] See methods and results; figure 3c
WO-A1-2012037603

SEBASTIEN GALLIEN ET AL: "Selected reaction monitoring applied to proteomics", JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY, vol. 46, no. 3, 1 March 2011 (2011-03-01), pages 298-312, XP055050958, ISSN: 1076-5174, DOI: 10.1002/jms.1895 page 303 - page 309; figures
WO-A1-2013151726

MANUEL MAYR ET AL: "Proteomics, Metabolomics, and Immunomics on Microparticles Derived From Human Atherosclerotic Plaques", CIRCULATION: CARDIOVASCULAR GENETICS, vol. 2, no. 4, 1 August 2009 (2009-08-01), pages 379-388, XP055640132, US ISSN: 1942-325X, DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.108.842849
supplementary material table II; page 379 - page 386; table II

WO-A2-2015103645

Biognosys ET AL: "Reference Peptides Kit for Human Plasma Table of Contents", 24 April 2017 (2017-04-24), XP055641074, Retrieved from the Internet: URL:https://www.biognosys.com/media.ashx/plasmadiverefpep-manual.pdf [retrieved on 2019-11-11] page 2 - page 6; table 1

(57) Согласно настоящему изобретению предложены способы и композиции для определения содержания и/или концентрации белковых биомаркеров в биологическом образце.

047857 B1

047857 B1

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество согласно предварительной заявке США № 62/715973, поданной 8 августа 2018 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в формате ASCII через EFS-Web и полностью включен в данный текст посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 29 июля 2019 г., называется "REGE-015-001WO_SeqList_ST25.txt" и имеет размер 50295 байтов.

Уровень техники

C1q является важным белком, на который может быть мишенью лекарственных средств и который вовлечен в систему комплемента врожденной иммунной системы. В настоящее время существуют иммунологические способы определения концентрации C1q в биологических образцах, происходящих из организма человека. Однако существует ограниченное количество иммунореагентов для анализа содержания C1q в образцах, происходящих из организма приматов, отличных от человека, важного модельного организма в доклинических научных работах и исследованиях. Таким образом, в данной области техники существует потребность в способах и композициях, направленных на определение концентрации C1q в образцах, происходящих из организма человека, примата, отличного от человека, и других модельных организмов, которые являются быстрыми, специфичными и точными, а также не требуют дорогостоящей и длительной разработки иммунореагентов. Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этих потребностей.

Краткое описание

Согласно настоящему изобретению предложен анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце; и (2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (МВР-МС) для измерения содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

Предыдущий анализ также может включать между этапом (1) и этапом (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента C1q, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q.

Измерение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q в предыдущем анализе может включать сравнение сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептиду C1q, полученного с помощью МВР-МС, со стандартной кривой.

Согласно настоящему изобретению предложен анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце; (2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (МВР-МС) с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q; и (3) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

Предшествующий анализ также может включать между этапом (1) и этапом (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q, и между этапом (2) и этапом (3) выполнение МВР-МС с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному меченому синтетическому пептиду.

Биологический образец может представлять собой образец крови. Биологический образец может представлять собой человеческий человеческий образец. Биологический образец может представлять собой образец примата, отличного от человека.

По меньшей мере один пептидный фрагмент может содержать по меньшей мере 5 аминокислот. По меньшей мере один пептидный фрагмент может содержать пептид, выбранный из табл. 2.

По меньшей мере один пептидный фрагмент может содержать SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). По меньшей мере один пептидный фрагмент может содержать по меньшей мере два из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). По меньшей мере один пептидный фрагмент может содержать SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36).

Масс-спектрометрия с мониторингом выбранных реакций может представлять собой ЖХ-МВР-МС/МС.

По меньшей мере один протеолитический фермент может представлять собой трипсин.

Стандартная кривая может быть получена с применением способа, включающего: (а) приготовле-

ние по меньшей мере двух стандартов концентрации C1q путем смешивания известных количеств очищенного белка C1q и сыворотки, истощенной по C1q; (b) добавление к указанным по меньшей мере двум стандартам концентрации C1q по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, который, как ожидается, будет получен после приведения стандарта концентрации C1q в контакт с протеолитическим ферментом; (c) приведение по меньшей мере двух меченых стандартов концентрации C1q в контакт с протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q; (d) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций для определения интенсивности сигнала, который соответствует по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, и интенсивности сигнала, который соответствует по меньшей мере одному меченому синтетическому пептидному фрагменту, в каждом из по меньшей мере двух меченых стандартов концентрации C1q; и (e) определение стандартной кривой с использованием сигналов и известных количеств белка C1q.

Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, причем указанная композиция содержит по меньшей мере один выделенный синтетический пептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из белка C1q.

Композиция, содержащая по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, причем указанная композиция содержит по меньшей мере один выделенный синтетический пептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из белка C1q, при этом указанная аминокислотная последовательность, выбранная из белка C1q, представляет собой последовательность пептидного фрагмента C1q, полученного путем приведения C1q в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом.

Белок C1q может быть получен из организма человека. Белок C1q может быть получен из организма примата, отличного от человека.

По меньшей мере один выделенный синтетический пептид может содержать по меньшей мере 5 аминокислот.

Аминокислотная последовательность, выбранная из белка C1q, может представлять собой последовательность пептидного фрагмента C1q, полученного путем приведения C1q в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом. По меньшей мере один протеолитический фермент может представлять собой трипсин.

По меньшей мере один выделенный синтетический пептид может содержать метку.

По меньшей мере один выделенный синтетический пептид может содержать пептид, выбранный из табл. 2.

По меньшей мере один выделенный синтетический пептид может содержать SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). Цистеин в синтетическом пептиде SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26) может быть модифицирован. Модификация может представлять собой карбамидометилирование.

Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая по меньшей мере одну переходную пару ионов, причем указанная композиция содержит по меньшей мере одну переходную пару ионов белка C1q, при этом указанная по меньшей мере одна переходная пара ионов состоит из иона-предшественника с соответствующим m/z и иона-фрагмента с соответствующим m/z иона.

Белок C1q может быть получен из организма человека. Белок C1q может быть получен из организма примата, отличного от человека.

Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая по меньшей мере одну переходную пару ионов, причем указанная композиция содержит по меньшей мере одну переходную пару ионов белка C1q, при этом указанная по меньшей мере одна переходная пара ионов состоит из иона-предшественника с соответствующим m/z и иона-фрагмента с соответствующим m/z иона, и при этом указанная переходная пара ионов выбрана из переходной пары предшественника SLGF(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41) 571,8-942,3, переходной пары предшественника IAFSATR (SEQ ID NO: 29) 383,1-581,1 и переходной пары предшественника QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) 487,0-350,3. Любой из указанных выше аспектов может быть объединен с любым другим аспектом.

Если не указано иное, все технические и научные термины используются в настоящем изобретении в значении, соответствующем обычному пониманию специалиста в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В данном описании формы единственного числа также включают множественное число, если контекст явно не указывает иное; в качестве примеров, подразумевается, что термины, обозначающие артикли (соотв. "a", "an" и "the" в исходном тексте на английском языке) относятся к единственному или множественному числу, и подразумевается, что термин "или" является включающим. Например, "элемент" означает один или более элементов. По всему описанию слово "содержащий" или его варианты, такие как "содержит" или "содержащий", следует понимать, как подразумевающие включение указанного элемента, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов, но не исключение любого другого элемента, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов. "Примерно" можно понимать, как в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01% от указанного значения. Если иное не ясно из контекста, все числовые значения, представленные в настоящей заявке, модифицированы термином "примерно".

Несмотря на то, что при реализации или тестировании настоящего изобретения можно применять способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем изобретении, полностью включены посредством ссылки. Ссылки, цитированные в настоящем изобретении, не считаются предшествующим уровнем техники заявленного изобретения. В случае противоречия преимущественную силу будет иметь данное описание, включая определения. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут понятны на основании следующего подробного описания и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Вышеупомянутые и дополнительные признаки будут более понятны на основании следующего подробного описания, рассматриваемого вместе с сопроводительными чертежами.

Фиг. 1 представляет собой выравнивание аминокислотной последовательности субъединицы А С1q человека, обезьяны, мыши и крысы.

Фиг. 2 представляет собой выравнивание аминокислотной последовательности субъединицы В С1q человека, обезьяны, мыши и крысы.

Фиг. 3 представляет собой выравнивание аминокислотной последовательности субъединицы С С1q человека, обезьяны, мыши и крысы.

Фиг. 4 представляет собой калибровочную кривую, полученную с применением способов согласно настоящему изобретению и пептида, происходящего из субъединицы А белка С1q.

Фиг. 5 представляет собой калибровочную кривую, полученную с применением способов согласно настоящему изобретению и пептида, происходящего из субъединицы В белка С1q.

Фиг. 6 представляет собой калибровочную кривую, полученную с применением способов согласно настоящему изобретению и пептида, происходящего из субъединицы С белка С1q.

Фиг. 7 представляет собой ряд хроматограмм ЖХ-МВР-МС/МС отобранных пептидов, происходящих из субъединиц А, В и С С1q в образце контрольного гидролизата, образце для двойного контроля, контрольном образце и образце для оценки нижнего предела количественного определения (LLOQ).

Фиг. 8 представляет собой ряд хроматограмм ЖХ-МВР-МС/МС отобранных пептидов, происходящих из субъединиц А, В и С С1q, в образцах для оценки предела обнаружения (LOD) и LLOQ, показывающих соотношение сигнал/шум и значения ответа для выделенных пиков.

Фиг. 9 представляет собой ряд хроматограмм ЖХ-МВР-МС/МС отобранных пептидов, происходящих из субъединиц А, В и С С1q, в образцах контрольного гидролизата до и после анализа образца для оценки верхнего предела количественного определения (ULOQ).

Фиг. 10 показывает хроматограммы ЖХ-МВР-МС/МС отобранных пептидов, происходящих из субъединиц А, В и С С1q, в стандартных растворах для двойного контроля (L00) с добавлением 2000 мкг/мл биспецифичного антитела, 20 мкг/мл биспецифичного антитела или без биспецифичного антитела, а также в образце LLOQ.

Фиг. 11 представляет собой ряд диаграмм, показывающих относительный ответ С1q в образцах, инкубированных с биспецифичным антителом, измеренный с применением способов согласно настоящему изобретению.

Фиг. 12 представляет собой ряд диаграмм, показывающих относительный ответ, измеренный для эндогенного С1q в образцах, разведенных при различных коэффициентах разведения в различных разбавителях, с применением способов согласно настоящему изобретению.

Фиг. 13 представляет собой ряд диаграмм, показывающих относительный ответ, измеренный для С1q в образцах, разведенных при различных коэффициентах разведения в различных разбавителях, с применением способов согласно настоящему изобретению.

Фиг. 14 представляет собой ряд диаграмм, показывающих точность концентрации С1q в образцах, подвергнутых трем циклам замораживания-оттаивания или хранившихся в автоматическом пробоотборнике в течение 48 часов, измеренной с применением способов согласно настоящему изобретению.

Фиг. 15 показывает диаграмму, изображающую зависимость концентрации С1q от времени в образцах крови обезьян, получавших дозу, определенную с применением способов согласно настоящему изобретению и отобранного пептида, происходящего из субъединицы А С1q.

Фиг. 16 показывает диаграмму, изображающую зависимость концентрации С1q от времени в образцах крови обезьян, получивших дозу, определенную с применением способов согласно настоящему изобретению и отобранного пептида, происходящего из субъединицы В С1q.

Фиг. 17 показывает диаграмму, изображающую зависимость концентрации С1q от времени в образцах крови обезьян, получавших дозу, определенную с применением способов согласно настоящему изобретению и отобранного пептида, происходящего из субъединицы С С1q.

Подробное описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложены способы и композиции для определения содержания и/или концентрации белковых биомаркеров в биологическом образце. Согласно некоторым аспектам белковый биомаркер представляет собой белок С1q. Согласно некоторым аспектам способы согласно

настоящему изобретению включают анализ с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с мониторингом выбранных реакций (ЖХ-МВР-МС).

Компонент комплемента C1q (C1q) представляет собой белковый комплекс, вовлеченный в систему комплемента, которая является частью врожденной иммунной системы. C1q вместе с C1r и C1s образует комплекс C1. C1q представляет собой белок массой 400 кДа, состоящий из 18 полипептидных субъединиц: шести А-субъединиц, шести В-субъединиц и шести С-субъединиц. Ингибиторы комплемента успешно используются в лечении нескольких заболеваний. Моноклональные антитела, нацеленные на C1q, являются перспективными в качестве терапии аутоиммунных заболеваний, вовлекающих классический путь комплемента. Для разработки подходов к лечению, нацеленному на C1q, необходимы способы определения концентрации уровней C1q в биологических образцах во время лабораторных научных работ и клинических исследований. В настоящее время определение содержания C1q в образцах человека требует использования иммуноанализов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Кроме того, существует ограниченное количество иммунореагентов для анализа C1q в образцах приматов, отличных от человека, которые являются важным аспектом доклинических научных работ и исследований. Таким образом, существует потребность в улучшенном анализе для определения концентрации C1q в биологических образцах, происходящих из организма человека, приматов, отличных от человека, и других модельных организмов.

Способы жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с мониторингом выбранных реакций (ЖХ-МВР-МС) являются особенно подходящими, поскольку способы ЖХ-МВР-МС обеспечивают как абсолютную структурную специфичность в отношении целевого белка, так и относительное или абсолютное измерение концентрации целевого белка при использовании подходящих внутренних стандартов.

Способы согласно настоящему изобретению.

В настоящем документе подробно описаны различные способы согласно настоящему изобретению.

Согласно настоящему изобретению предложен способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце; и (2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (МВР-МС) для измерения содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

Согласно некоторым аспектам предыдущий способ также может включать между этапом (1) и этапом (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента C1q, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце; (2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (МВР-МС) с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q; и (3) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

Согласно некоторым аспектам предыдущий способ также может включать между этапом (1) и этапом (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q, и между этапом (2) и этапом (3) выполнение МВР-МС с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному меченому синтетическому пептиду.

Согласно некоторым аспектам биологический образец может представлять собой образец крови. Согласно предпочтительным аспектам биологический образец может представлять собой образец сыворотки. Согласно некоторым аспектам биологический образец может представлять собой человеческий образец. В качестве альтернативы биологический образец может представлять собой образец примата, отличного от человека. Примат, отличный от человека, может представлять собой *Macaca fascicularis* или *Macaca mulatta*.

Согласно некоторым аспектам белок C1q может представлять собой белок C1q человека. Согласно другим аспектам белок C1q представляет собой белок C1q *Macaca fascicularis*. Согласно другому аспекту белок C1q может представлять собой белок C1q *Macaca mulatta*. Белок C1q может содержать любую из последовательностей, показанных в табл. 1.

Последовательности белков C1q

Вид	Субъединица	Регистрационный № NCBI	Последовательность	SEQ ID NO
Человек (Homo sapiens)	A	NP_057075	MEGPRGWLVLVLAISL ASMVTEDLCRAPDGKK GEAGRPGRRGRPGLKGE QGEPGAPGIRTGIQGLK GDQGEPPSGNPGKVG YPPSGPLGARGIPGIKG	1
			TKGSPGNIKDQPRPAFSA IRRNPPMGGNVVIFDTVI TNQEEPYNHSGRFVCT VPGYYYFTFQVLSQWEI CLSIVSSSRGQVRRSLGF CDTTNGLFQVVSAGM VLQLQQGDQVWVEKDP KKGHIYQGSEADSVFSG FLIFPSA	
	B	NP_000482	MMMKIPWGSIPVLMLLL LLGLIDISQAQLSCTGPP AIPGIPGIPGTPGPDGQPG TPGIKGEKGLPGLAGDH GEFGEKGDPIGNPGK VGPKGPMGPKGGPGAP GAPGPKGESGDYKATQ KIAFSATRINVPLRRDQ TIRFDHVITNMNNNYEP RSGKFTCKVPGLYYFTY HASSRGNLCVNLMRGR ERAQKVVTFCDYAYNT FQVTTGGMVLKLEQGE NVFLQATDKNSLLGME GANSIFSGFLLFPDMEA	2
	C	NP_758957	MDVGPSSPLHLGLKLLL LLLLLPLRGQANTGCYG IPGMPGLPGAPGKDGYP GLPGPKGEPGIPAIPGIRG PKGQKGEPLPGHPGKN GPMGPPGMPGVPGPMGI PGEPGEEGRYKQKFQSV FTVTRQTHQPPAPNSLIR FNAVLTNPQGDYDTSTG KFTCKVPGLYYFVYHAS	3

			HTANLCVLLYRSGVKV VTFCGHTSKTNQVNSGG VLLRLQVGEEVWLAVN DYYDMVGIQGSDSVFSG FLLFPD	
Яванская макака (Macaca fasciculari s)	A	XP_015296582	MEGPQGWLVCVLAISL ASIVTQNVCRAPDGKNG VAGRPGRPGRPGLKGER GEPGAPGIRTGIQGLKG DQGEPGPGSNPGKVGYP GPSGPLGDRGIPGIKGIK GNPGNIKDQPRPAFSAIR RNPPMGGNVVIFDMVIT NQEOPYQNHSGRFVCTV PGYYYFTFQVVSEREICL SIVSSSRGQVRRSLGFCD TTNKGLFQVVSAGMVL QLQRGDQVWVEKDPRK GNIYQGLEADSVFSGFLI FPSS	4
	B	XP_005544557	MMMKILWGSIPVLMMLL LLLGLLDVSWAQGSCTG PPAIPGTPGIPGTPGSDG QPGTPGIKGEKGLPGLA GDHGEFGEKGDPIPGN PGKVGPKGPMGPKGGP GAPGAPGPKGESGDYK ATQKIAFSATRTVNTPLR RDQTIRFDHVITNMNN YEPRSGKFTCRVPGLYY FTYHASSRGNLCVKLMR GRERPQKVVTFCDYAY NTFQVTTGGMVLKLEQ GENVFLQATDKNSLLG MEGANSIFSGFLLFPDVE	5

			A	
	C	XP_015296579	MDVGPSSLPHLGLKLLL LLLLLPLRGQANTGCYG IPGMPGLPGAPGKDGHD GLPGPKGEPGIPAIPGTR GPKGQKGEPGTPGHGPK NGPMGPPGMPGVPGPM GIPGEPGEEGRYKQKYQ SVFTVARQTHQPPAPNS LIRFNAVLNTPQGDYDT STGKFTCKVPLYFVY HASHTANLCVLLYRGG VKVVTFCGHTSQANQV NSGGVLLRLQVGEEVW LGVNDYYDMVGIQGS SVFSGFLLFPD	6
Макака- резус (Macaca mulatta)	A	XP_014985904	MEGPQGWLVCVLAISL ASIVTQNVCRAPDGKNG VAGRPGRPGRPGLKGER GEPGAPGIRTGIQGLKG DQGEPGSPGNPGKVGYP GPSGPLGDRGIPGIKGIK GNPGNIKDQPRPAFSAIR RNPPMGGNVVIFDMVIT NQEOPYQNHSGRFVCTV PGYYYFTFQVVSEREICL SIVSSSRGQVRRSLGFCD TTNKGLFQVVS GGMVL QLQRGDQVWVEKDPRK GNIYQGLEADSVFSGFLI FPST	7
	B	XP_014985910	MMMKILWGSIPVLMMLL	8

			LLLGLLDVSWAQQSCTG PPAIPGTPGIPGTPGSDG QPGTPGIKGEKGLPGLA GDHGEFGEKGDPIPGN PGKVGPKGPMGPKGGP GAPGAPGPKGESGDYK ATQKIAFSATRINTPLR RDQTIRFDHVITNMNNN YEPRSGKFTCRVPGLYY FTYHASSRGNLCVKLMR GRERPQKVVTFCDYAY NTFQVTTGGMVLKLEQ GENVFLQATDKNSLLG MEGANSIFSGFLLFPDVE A	
	C	NP_001253737	MDVGPSSLPHLGLKLLL LLLLLPLRGQANTGCYG IPGMPI.PGAPGKDGH GLPGPKGEPGIPAIPGTR GPKGQKGEPTGHPGK NGPMGPPGMPGVPGPM GIPGEPGEEGRYKQKYQ SVFTVARQTHQPPAPNS LIRFNAVLNTPQGDYDT STGKFTCKVPGLYYFVY HASHTANLCVLLYRGG VKVVTFCGHTSQANQV NSGGVLLRLQVGEEVW LGVNDYYDMVGIQGS SVFSGFLLFPD	9
Мышь (Mus musculus)	A	NP_031598	METSQGWLVAACVLTMT LVWTVAEVCRAPNGK DGAPGNPGRPGRPGLKG ERGEPGAAGIRTGIRGFK GDPGESGPPGKPGNVGL	10

			PGPSGPLGDSGPQGLKG VKGNPQNIRDQPRPAFS AIRQNPMTLGNVVIFDK VLTNQESPYQNHTGRFI CAVPGFYFNFQVISKW DLCLFIKSSSGGQPRDSL SFSNTNNKGLFQVLAGG TVLQLRRGDEVWIEKDP AKGRIYQGTEADSIFSGF LIFPSA	
	B	NP_033907	MKTQWGEVWTHLLLLL LGFLHVSWAQSSCTGPP GIPGIPGVPGVPGSDGQP GTPGIKGEKGLPGLAGD LGEFGEKGDPIPGTPG KVGPKGPVGPKGTPGPS GPRGPKGDSGDYGATQ KVAFSALRTINSPLRPNQ VIRFEKVITNANENYEPR NGKFTCKVPLYFYFTYH ASSRGNLCVNLVRGRDR DSMQKVVTFCDYAQNT FQVTTGGVVLEQEEV VHLQATDKNSLLGIEGA NSIFTGFLFPMDMA	11
	C	NP_031600	MVVGPSQPCCGLCLLL LFLALPLRSQASAGCY GIPGMPGMPGAPGKDG HDGLQGPKGEPGIPAVP GTRGPKGQKGEPMMPG HRGKNGPRGTSGLPGDP GPRGPPGEPGVEGRYKQ KHQSVFTVTRQTTQYPE ANALVRFNSVVTNPQG	12

			HYNPSTGKFTCEVPGLY YFVYYTSHANLCVHLN LNLARVASFCDHMFNSK QVSSGGVLLRLQRGDEV WLSVNDYNGMVGIEGS NSVFSGFLLFPD	
Крыса (Rattus norvegicus)	A	NP_001008515	METSQGWLVA CVLAVT LVWTV AEDVCRAPNGK DGVAGIPGRPGRPGLKG ERGEPGAAGIRTGIRGLK GDMGESGPPGKPGNVG FPGPTGPLGNSGPQGLK GVKGNPGNIRDQPRPAF SAIRQNPPTYGNVVVFD KVLTNQENPYQNRTHGF ICAVPGFYFTFQVISKW DLCLSIVSSSRGQPRNSL GFCDTNSKGLFQVLAGG TVLQLQRGDEVWIEKDP AKGRIYQGTEADSIFSGF LIFPSA	13
	B	NP_062135	MKTQWSEILTPLLLLLL GLLHVSWAQSSCTGSPG IPGVPGIPGVPGSDGKPG TPGIKGEKGLPGLAGDH GELGEKGDAGIPGIPGK VGPKGPGVGPKGAPGPPG PRGPKGGSGDYKATQK VAFSALRTVNSALRPNQ AIRFEKVITNVNDNYEPR SGKFTCKVPGLYYFTYH ASSRGNLCVNIVRGRDR DRMQKVLTFCDYAQNT FQVTTGGVVLKLEQEEV	14

			VHLQATDKNSLLGVEG ANSIFTGFLFPDMDV	
	C	NP_001008524	MVVGTSQCPQHGLYLL LLLLALPLRSQANAGCY GIPGMPGLPGTPGKDGH DGLQGPKEGEPGIPAIPGT QGPKGQKEGPGMPGHR GKNGPMGTSGSPGDPGP RGPPGEPGEEGRYKQKH QSVFTVTRQTAQYPAAN GLVKFNSAITNPQGDYN TNTGKFTCKVPGLYYFV HHTSQANLCVQLLNN AKVTSFCDHMSNSKQVS SGGVLLRLQRGDEVWL AVNDYNGMVGTEGSDS VFSGFLFPD	15
Собака (Canis lupus familiaris)	A	XP_535367	MEAPWGWLALCVLATS LASAVTQDVCRALDGR DGAAGTPGRPGRPGLKG EQGEPGAPGMRTGIRGL KGDQGDGPPGNPGNM GFPGPSGLMGLPGIPGRR GPKGNPGNIRDQPRPAF SAIRRNPTGGNVVIFDT VITNQEGPYQNHSGRFIC AVPGYYYFTFQVVSKW DICLSIVSSGRAQIRRSLG FCDTNSKGIFQVVSGGM ALQLQQGDQVWIEKDPI KGRIYQGPEADSIFSGFLI FPSL	16
	B	XP_544507	MKTPRGGILALLPLLL GLEVSWAQSCTGHPAI	17

			PGIPGIPGAPGTDGTPGT PGTKGEKGLPGLAGDH GEFGEKGDPGIPGTPGK VGPKGPVGPKGSPGPPG ARGAKGESGDYKATQKI AFSAMRTINIPLRRDQTI RFDHIVTNENRNYEPRS GKFTCNVPGIYYFAYHA SSRGNLCVNVMRGRER MQKVVTFCDYVQNTFQ VTTGSVVLKLSQGENVY LQATDKNSLLGMEGAN SIFSGFLLFPDAEA	
	C	XP_003433793	MDTGPSWPHLGLNLLL LLLALPLGGQASTGCYG IPGMPGLPGAPKDGHD GLPGPKGEPGIPAIPGTR GPKGQKGEPGTPGYPGK NGPMGTPGIPGVPGPVG PPGEPGEEGRYKQKHQS VFTVTRQTAQYPLANNL VKFNTVITNPQGDYDTS TGKFTCKVPLYYFVYH TSLTSNLCVHLYRSGTR VTTFCDHMSNSKQVSSG GVLLRLQMGEQVWLAV NDYNGMVGTEGSDSVF SGFLLFPD	18
Данио (Danio rerio)	A	ACN62221	MQPSAFFAFLWAGALFP FSFCQDECVKHGRNGA DGPNGRDGLPGPKGEK GEPALQVKLSSIALEELK GDMGVRGPPGEPGLEGL MGAIGPRGPLGPAGPRG SSVGADGAKASEKPAFS	19

			VLRNEASQAQYKQPVTF NDKLSDANDDFQIKTGY FTCKVPGVYYFVFHASS EGRCLRLKSTSAPPVSL SFCDFNSKSVSLVVSGG AVLTLLKGDKVWIEPFA GDGGVGQMPKRLYAVF NGFLIYRNAE	
	B	ACN62222	MLFALMSAHVVPQLAI MLLLVTSSMSETCAGNK GFPGTPGIPGVPGTDGK DGAKEKGDPGENEVQ MTGPKGDPGKPLPGRP GVKGPEGPQPPGPPGP KGQRGVLSGKVAPDQY FVFSYKKSQKLEKILQD KLVVFDVPLITGIDGULD GEGYFDVTITGMYIISY QISFQQSACLKIQIGAE KVKFCDSPKLILGTAAS VVLKLNKGDKVSQST GESTVFSRDTDCTFTGF MLFPIK	20
	C	ACN62223	MFGGHLILVSLLSASLCL CLASADTCPAGAMPGLP GIPGFPGRDGRQGMKGE KGDGPIPIKPGDTVKKG ERGAFLKGPGRGPH GDPGIMGPPGPPGEPGE AGLVDVSGSQLQSAFSV SRHTRIPPDANKVIRFSK VITNPQGHFSTDESKFVC KIPGTYFVLHASSHDK KLCVILVHDDKNLVSFC DHTQRGSQQVSSGGLSL	21
			YLKENEK VWLMTNALN GMYATADRADSVFSGF LIHAN	

Согласно некоторым аспектам предыдущих способов по меньшей мере один пептидный фрагмент белка C1q содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 20 аминокислот.

Согласно некоторым аспектам предыдущих способов по меньшей мере один пептидный фрагмент белка C1q содержит пептид, выбранный из табл. 2. Согласно другим аспектам по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит триптический пептид белка C1q.

Таблица 2

Последовательности пептидов C1q

Последовательность пептида	Субъединица C1q	SEQ ID NO
VGYPGPGSGLGAR	A	22
DQPRPAFSAIR*	A	23
NPPMGGNVVIFDTVITNQEEPQNHSGR	A	24
FVCTVPGYYYYFTFQVLSQWEICLSIVSSSR	A	25
SLGFCDTTNK*	A	26
GLFVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPK	A	27
GHIYQGSEADSVFSGFLIFPSA	A	28
IAFSATR*	B	29
TINVPLRR	B	30
FDHVITNMNNNYEPR*	B	31
VPGLYYFTYHASSR*	B	32
GNLCVNLMR	B	33
LEQGENVFLQATDK*	B	34
FQSVFTVTR	C	35
QTHQPPAPNSLIR*	C	36
FNAVLTNPQGDYDTSTGK*	C	37
VPGLYYFVYHASHTANLCVLLYR*	C	38
VVTFCGHTSK	C	39
TNQVNSGGVLLR	C	40

*обозначает общий пептид C1q человека/обезьяны.

Согласно некоторым аспектам предыдущих способов по меньшей мере один пептидный фрагмент белка C1q содержит SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). Согласно другим аспектам по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит по меньшей мере два из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). Согласно другим аспектам по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит каждый из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36).

Таким образом, настоящее изобретение включает способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце, причем указанный по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит каждый из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); (2) выполнение MBP-МС с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, причем указанные сигналы MBP-МС соответствуют переходным парам ионов, содержащим каждую из переходной пары предшественника SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26) 571,8-942,3, переходной пары предшественника IAFSATR (SEQ ID NO: 29) 383,1-581,1 и переходной пары предшественника QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) 487,0-350,3; и (3) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

Настоящее изобретение также включает способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце, причем указанный по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит каждый из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности каждого из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); (3) выполнение MBP-МС с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пеп-

нием сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, причем указанные сигналы MBP-МС соответствуют переходным парам ионов, содержащим переходную пару предшественника QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) 487,0-350,3; и (3) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

Настоящее изобретение также включает способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце, причем указанный по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); (3) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (MBP-МС) с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, причем указанные сигналы MBP-МС соответствуют переходным парам ионов, содержащим переходную пару предшественника QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) 487,0-350,3, и сигнал, соответствующий по меньшей мере одному меченому синтетическому пептиду; и (4) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

Согласно некоторым аспектам способов согласно настоящему изобретению масс-спектрометрия с мониторингом выбранных реакций представляет собой ЖХ-МВР-МС/МС.

Согласно некоторым аспектам способов согласно настоящему изобретению по меньшей мере один протеолитический фермент представляет собой трипсин. Другие подходящие протеолитические ферменты будут известны специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, протеазу Glu-C, протеазу Lys-N, протеазу Lys-C, протеазу Asp-N или химотрипсин.

Согласно некоторым аспектам способов согласно настоящему изобретению стандартная кривая может быть получена с применением способа, включающего: (a) приготовление по меньшей мере двух стандартов концентрации C1q путем смешивания известных количеств очищенного белка C1q и сыворотки, истощенной по C1q; (b) добавление к указанным по меньшей мере двум стандартам концентрации C1q по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, который, как ожидается, будет получен после приведения стандарта концентрации C1q в контакт с протеолитическим ферментом; (c) приведение по меньшей мере двух меченых стандартов концентрации C1q в контакт с протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q; (d) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций для определения интенсивности сигнала, который соответствует по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, и интенсивности сигнала, который соответствует по меньшей мере одному меченому синтетическому пептидному фрагменту, в каждом из по меньшей мере двух меченых стандартов концентрации C1q; и (e) определение стандартной кривой с использованием сигналов и известных количеств белка C1q.

Согласно некоторым аспектам стандартная кривая может быть получена с использованием по меньшей мере трех или по меньшей мере четырех, или по меньшей мере пяти, или по меньшей мере шести, или по меньшей мере семи, или по меньшей мере восьми, или по меньшей мере девяти, или по меньшей мере десяти стандартов концентрации C1q. Согласно некоторым аспектам приготовление стандарта концентрации C1q может включать разведение, или последовательное разведение, очищенного белка C1q в сыворотке, истощенной по C1q, причем коэффициент разведения может составлять 1:1, 1:1,5 или 1:2, или 1:2,5, или 1:3, или 1:3,5, или 1:4, или 1:5, или 1:6, или 1:7, или 1:8, или 1:9, или 1:10, или 1:100, или 1:1000, или любой коэффициент разведения в диапазоне от 1:1 до 1:10000.

Согласно некоторым аспектам способов согласно настоящему изобретению по меньшей мере один меченый синтетический пептидный фрагмент может быть добавлен к биологическому образцу до приведения биологического образца в контакт с протеолитическим ферментом.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения по меньшей мере один меченый синтетический пептидный фрагмент можно применять для устранения проблем способов согласно настоящему изобретению.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения сигнал, который соответствует по меньшей мере одному меченому синтетическому пептидному фрагменту, можно применять для нормирования сигнала по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, которому соответствует меченый синтетический пептидный фрагмент.

Согласно некоторым аспектам способов согласно настоящему изобретению стандартную кривую C1q можно применять для измерения содержания C1q в биологических образцах. Можно установить содержание пептидов C1q в заранее определенных стандартных образцах, а результаты сравнить с результатами ЖХ-МВР-МС для соответствующего пептида C1q, обнаруженного в биологическом образце. Это

позволяет рассчитать содержание пептида в биологическом образце. Таким образом, зная содержание пептида в образце, определяют содержание белка, которому он соответствует.

Композиции согласно настоящему изобретению.

В настоящем документе подробно описаны различные композиции согласно настоящему изобретению.

Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, причем указанная композиция содержит по меньшей мере один выделенный синтетический пептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из белка C1q.

Синтетические пептиды могут быть получены с применением любого способа, известного в данной области техники. Эти способы могут включать методики рекомбинантной экспрессии, такие как экспрессия в бактериях или экспрессия *in vitro* в лизате эукариотических клеток. Эти способы также могут включать твердофазный синтез.

Синтетические пептиды могут быть помечены изотопами. Изотопы, которыми они могут быть помечены, включают C^{13} , H^2 , N^{15} и O^{18} . Меченый пептид может содержать по меньшей мере один C^{13} -меченый и/или N^{15} -меченый остаток лизина или по меньшей мере один C^{13} -меченый и/или N^{15} -меченый остаток аргинина. Пептиды также могут включать полярный растворитель. Полярные растворители могут включать воду и смеси этанола и воды.

Согласно некоторым аспектам композиций согласно настоящему изобретению белок C1q может представлять собой белок C1q человека. Согласно другим аспектам белок C1q представляет собой белок *Mascaca fascicularis*. Согласно другому аспекту белок C1q может представлять собой белок *Mascaca mulatta*. Белок C1q может содержать любую из последовательностей, показанных в табл. 1.

Согласно некоторым аспектам композиции согласно настоящему изобретению по меньшей мере один выделенный синтетический пептид содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 20 аминокислот.

Согласно некоторым аспектам композиции согласно настоящему изобретению выделенный синтетический пептид содержит последовательность пептидного фрагмента C1q, полученную при приведении C1q в контакт с протеолитическим ферментом. Согласно предпочтительным аспектам протеолитический фермент представляет собой трипсин. Таким образом, в предпочтительных аспектах выделенный синтетический пептид представляет собой триптический пептид C1q.

Согласно некоторым аспектам композиции согласно настоящему изобретению выделенный синтетический пептид содержит метку. Выделенные синтетические пептиды могут быть помечены изотопами. Изотопы, которыми они могут быть помечены, включают, но не ограничиваются ими, C^{13} , H^2 , N^{15} и O^{18} . Пептиды также могут включать полярный растворитель. Полярные растворители могут включать воду, смеси этанола и воды, а также ацетонитрил.

Согласно некоторым аспектам композиции согласно настоящему изобретению выделенный синтетический пептид содержит пептид, выбранный из табл. 2. Согласно другим аспектам композиция содержит любые два пептида, описанные в табл. 2. Согласно другим аспектам композиция содержит любые 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 пептидов, описанных в табл. 2.

В предпочтительном аспекте композиция согласно настоящему изобретению может содержать по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, содержащий SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). Композиция может содержать по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, содержащий по меньшей мере два из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). Согласно другим аспектам композиция может содержать по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, содержащий каждый из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36).

Согласно некоторым аспектам композиций согласно настоящему изобретению цистеин в синтетическом пептиде SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26) может быть модифицирован. Модификация может представлять собой карбамидометилирование.

Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая по меньшей мере одну переходную пару ионов, причем указанная композиция содержит по меньшей мере одну переходную пару ионов белка C1q, при этом указанная по меньшей мере одна переходная пара ионов состоит из иона-предшественника с соответствующим m/z и иона-фрагмента с соответствующим m/z иона.

Согласно некоторым аспектам композиций согласно настоящему изобретению белок C1q может представлять собой белок C1q человека. Согласно другим аспектам белок C1q представляет собой белок *Mascaca fascicularis*. Согласно другому аспекту белок C1q может представлять собой белок *Mascaca mulatta*. Белок C1q может содержать любую из последовательностей, показанных в табл. 1.

Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая по меньшей мере одну переходную пару ионов, причем указанная композиция содержит по меньшей мере одну переходную пару ионов белка C1q, при этом указанная по меньшей мере одна переходная пара ионов состоит из иона-предшественника с соответствующим m/z и иона-фрагмента с соответствующим m/z иона, и при этом

указанная переходная пара ионов выбрана из переходной пары предшественника SLGFC(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41) 571,8-942,3, переходной пары предшественника IAFSATR (SEQ ID NO: 29) 383,1-581,1 и переходной пары предшественника QTHQPPAPNSLR (SEQ ID NO: 36) 487,0-350,3.

Определения.

В настоящем изобретении термин "m/z" обозначает отношение массы к заряду иона.

В настоящем изобретении термин "МС/МС" представляет собой тандемную масс-спектрометрию, которая представляет собой тип масс-спектрометрии, включающий несколько этапов массового анализа с некоторой формой фрагментации, происходящей между этапами.

В настоящем изобретении термин "ЖХ-МВР-МС" является сокращением для "мониторинга выбранных реакций" и может использоваться взаимозаменяемо с "ЖХ-МНР-МС" или "ЖХ-МВР-МС/МС".

ЖХ-МВР-МС представляет собой высокоселективный способ тандемной масс-спектрометрии, который может эффективно отфильтровывать все молекулы и примеси, кроме целевого(ых) аналита(ов). Это особенно предпочтительно, если анализируемый образец представляет собой сложную смесь, которая может содержать несколько изобарических молекул в пределах определенного аналитического окна. В способах ЖХ-МВР-МС может использоваться тройной квадрупольный масс-спектрометр, который, как известно в данной области техники, содержит три набора квадрупольных стержней. Первый этап отбора по массе выполняется в первом наборе квадрупольных стержней, а селективно прошедшие ионы фрагментируются во втором наборе квадрупольных стержней. Полученные переходные ионы (продукты) передаются в третий набор квадрупольных стержней, с помощью которого выполняют второй этап отбора по массе. Ионы-продукты, прошедшие через третий набор квадрупольных стержней, измеряются детектором, который генерирует сигнал, представляющий количество селективно прошедших ионов-продуктов. Потенциалы RF и DC, приложенные к первому и третьему квадрупольям, настраиваются для отбора (соответственно) ионов-предшественников и ионов-продуктов, значения m/z которых лежат в пределах узких заданных диапазонов. Задав соответствующие переходы (значения m/z ионов-предшественников и ионов-продуктов), пептид, соответствующий целевому белку, может быть измерен с высокой степенью чувствительности и селективности. Отношение сигнал/шум в ЖХ-МВР-МС часто превосходит эксперименты с использованием стандартной тандемной масс-спектрометрии (МС/МС), которые не нацелены селективно (не фильтруют) на определенные аналиты, а скорее направлены на исследование всех аналитов в образце.

Масс-спектрометрия ЖХ-МВР-МС включает фрагментацию ионов в газовой фазе и осуществляется между различными этапами массового анализа. Существует много способов, используемых для фрагментации ионов, которые могут привести к различным типам фрагментации и, следовательно, к разной информации о структуре и составе молекулы. Переходные ионы, наблюдаемые в спектре ЖХ-МВР-МС, появляются в результате нескольких различных факторов, которые включают, но не ограничиваются ими, первичную последовательность, количество внутренней энергии, способы приложения энергии и состояние заряда. Для обнаружения переходы должны нести хотя бы один заряд. Ион классифицируется как a, b или c, если заряд находится на этапе перехода, включающего исходный N-конец пептида, в то время как ион классифицируется как x, y или z, если заряд находится на этапе перехода, включающего исходный C-конец пептида. Нижний индекс указывает положение остатков при переходе (например, первый пептидный остаток в x_1 от C-конца, второй пептидный остаток в y_2 от C-конца и третий пептидный остаток в z_3 от C-конца и т.д.).

В общем повторяющемся звене пептида, представленном -N-C(O)-C-, ион x и ион a возникают в результате расщепления связи карбонил-углерод (т.е. C(O)-C). Ион x представляет собой ацилий-ион, а ион a представляет собой иминий-ион. Ион y и ион b возникают в результате расщепления связи карбонил-азот (т.е. C(O)-N, также известной как амидная связь). В этом случае ион y представляет собой ион аммония, а ион b представляет собой ацилий-ион. И наконец, ион z и ион c возникают в результате расщепления связи азот-углерод (т.е. CN). Ион z представляет собой карбокатион, а ион c представляет собой ион аммония.

Верхние индексы иногда используются для обозначения нейтральных потерь в дополнение к фрагментации остова, например, * используется для потери аммиака и ° используется для потери воды. Помимо протонов, ионы с и ионы у могут отщеплять дополнительный протон от пептида-предшественника. При ионизации электрораспылением триптические пептиды могут нести более одного заряда.

Внутренние переходы возникают из-за двойного расщепления остова. Они могут быть образованы при комбинировании расщепления b-типа и y-типа (т.е. расщепления с получением ионов b и y). Ионы, полученные в результате внутреннего расщепления, также могут быть образованы при комбинировании расщепления a-типа и y-типа. Внутренний переход с одной боковой цепью, образованный в результате комбинации расщепления a-типа и y-типа, называется иминий-ионом (иногда также называемым ионом имония или иммониевым ионом). Эти ионы обозначаются однобуквенным кодом для соответствующей аминокислоты.

Низкоэнергетическая CID (т.е. диссоциация, вызванная столкновением в тройном квадруполье или ионной ловушке) включает фрагментацию пептида, несущего положительный заряд, в первую очередь вдоль его остова, с получением в основном ионов a, b и y.

Один или более этапов очистки с помощью жидкостной хроматографии (ЖХ) выполняют перед последующим этапом анализа ЖХ-МВР-МС. Стандартный анализ методом ЖХ основан на химических взаимодействиях между компонентами образца и материалами наполнителя колонки, где ламинарный поток образца через колонку является основой для отделения аналита, представляющего интерес, от тестируемого образца. Квалифицированный специалист поймет, что разделение в таких колонках является диффузионным процессом. Для хроматографического разделения образцов доступны различные материалы наполнителей колонок, и выбор соответствующего протокола разделения является эмпирическим процессом, который зависит от характеристик образца, представляющего интерес аналита, присутствующих препятствующих веществ и их характеристик и т.д. Можно применять различные химические соединения наполнителя в зависимости от потребностей (например, структуры, полярности и растворимости очищаемых соединений). В различных аспектах колонки представляют собой полярные, ионообменные (как катионные, так и анионные), с гидрофобными взаимодействиями, фенильные, С-2, С-8, С-18 колонки, с полярным покрытием на пористом полимере или другие, которые доступны коммерчески. Во время хроматографии на разделение материалов влияют такие переменные как выбор элюента (также известного как "подвижная фаза"), выбор градиентного элюирования и условий градиента, температуры и т.д. Согласно определенным аспектам анализ может быть очищен путем внесения образца в колонку в условиях, при которых представляющий интерес аналит обратимо удерживается материалом наполнителя колонки, в то время как один или более других материалов не удерживаются. В этих аспектах можно применять первое условие подвижной фазы, при котором представляющий интерес аналит удерживается колонкой, и впоследствии можно применять второе условие подвижной фазы для удаления удерживаемого материала из колонки, поскольку не удерживаемые материалы вымываются из колонки. В качестве альтернативы, аналит может быть очищен путем внесения образца в колонку в условиях подвижной фазы, при которых представляющий интерес аналит элюируется с разной скоростью по сравнению с одним или более другими материалами. Как обсуждалось выше, такие процедуры могут увеличить количество одного или более представляющих интерес аналитов по сравнению с одним или более другими компонентами образца.

Следующие параметры используют для установления условий ЖХ-МВР-МС анализа белка в конкретной системе ЖХ-МВР-МС: (1) триптический пептид белка; (2) время удерживания (RT) пептида; (3) значение m/z иона-предшественника пептида; (4) потенциал декластеризации, используемый для ионизации иона-предшественника; (5) значение m/z иона-фрагмента, полученного из иона-предшественника пептида; и (6) энергия столкновения (CE), используемая для фрагментации иона-предшественника пептида, которая оптимизирована для конкретного пептида.

В настоящем изобретении термин "ISP" относится к "пептидам внутреннего стандарта".

Чтобы облегчить точную количественную оценку пептидных переходов с помощью способов, раскрытых в настоящем изобретении, набор меченых изотопами синтетических вариантов пептидов, представляющих интерес, может быть добавлен в известных количествах к образцу для использования в качестве внутренних стандартов. Поскольку меченые изотопами пептиды имеют физические и химические свойства, идентичные соответствующему суррогатному пептиду, они совместно элюируются из хроматографической колонки и легко идентифицируются по полученному масс-спектру. Добавление меченых стандартов может происходить до или после протеолитического расщепления. Способы синтеза меченых изотопами пептидов будут известны специалистам в данной области техники. Таким образом, в некоторых аспектах экспериментальные образцы содержат пептиды внутреннего стандарта. Согласно другим аспектам для количественной оценки пептидов можно применять внешние стандарты или другие вспомогательные средства.

В настоящем изобретении термин "триптический пептид" относится к пептиду, который образуется в результате обработки белка трипсином.

В настоящем изобретении термин "стандартная кривая" может использоваться взаимозаменяемо с термином "калибровочная кривая".

В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа (соответственно, "a", "an" и "the" в исходном тексте на английском языке) включают множественное число объектов, если контекст явно не указывает иное.

Если конкретно не указано или не очевидно из контекста, в настоящем описании термин "или" следует понимать, как включающий и охватывающий как "или", так и "и".

Если конкретно не указано или не очевидно из контекста, в настоящем описании термин "примерно" следует понимать, как в пределах диапазона нормального допуска в данной области техники, например, в пределах 2 стандартных отклонений от среднего. "Примерно" можно понимать, как в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01% от указанного значения. Если иное не ясно из контекста, все числовые значения, представленные в настоящем изобретении, модифицированы термином "примерно".

Если не указано иное, все технические и научные термины используются в настоящем описании в значении, соответствующем обычному пониманию специалиста в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что при реализации настоящего изобретения можно использо-

вать другие зонды, композиции, способы и наборы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, в настоящем изобретении описаны предпочтительные материалы и способы. Следует понимать, что используемая в настоящем изобретении терминология, предназначена только для цели описания конкретных аспектов и не предназначена для ограничения.

Примеры

Пример 1. Определение стандартной кривой концентрации C1q с применением способов согласно настоящему изобретению.

Способы согласно настоящему изобретению применяли для получения стандартных кривых, также называемых калибровочными кривыми, с использованием набора эталонных растворов C1q с известными концентрациями C1q, включая стандарт C1q и образцы для контроля качества (QC). Также тестировали чувствительность и точность способов согласно настоящему изобретению.

Калибровочные кривые получали с использованием стандартных образцов C1q, которые готовили и применяли в соответствии со следующими рекомендациями:

очищенный белок C1q разводили в том же биологическом матриксе, что и экспериментальные образцы;

набор протестированных эталонных растворов C1q состоял из двойного контроля, контроля и по меньшей мере 6 ненулевых концентраций C1q;

нижний предел количественного определения (LLOQ) определяется как концентрация белка C1q, при которой измеренный ответ образца LLOQ по меньшей мере в 5 раз превышает ответ контрольного образца так, что точность находится в пределах 25% от номинальной концентрации и коэффициент вариации составляет менее 25%;

верхний предел количественного определения (ULOQ) определяется таким образом, чтобы точность находилась в пределах 20% от номинальной концентрации, а коэффициент вариации составлял менее 20%.

Калибровочные кривые получали с использованием образцов C1q QC, которые готовили и применяли в соответствии со следующими рекомендациями:

для калибровки готовили и использовали по меньшей мере 3 концентрации образцов QC;

каждый образец QC готовили с двумя повторами;

образцы QC охватывали низкий, средний и высокий диапазон количественного определения анализа, а образец с низким содержанием аналита для QC (LQC) был в пределах 3-кратной концентрации LLOQ;

точность по меньшей мере 67% образцов QC была в пределах 20% от номинальной концентрации;

точность по меньшей мере 50% образцов QC на каждом уровне была в пределах 20% от номинальной концентрации;

минимальное количество образцов QC было равно или превышало по меньшей мере 5% от количества неизвестных образцов или 6 общих образцов QC;

образцы QC были приготовлены с маточным раствором C1q, который был независим от маточного раствора для приготовления эталонных растворов C1q.

Материалы:

очищенный белок комплемента человека C1q (Quidel, товар № A400).

Сыворотка, истощенная по C1q комплемента, человеческая (Sigma-Aldrich, № по каталогу 234401-1ML).

SLGFC(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41) (New England Peptide).

IAFSATR (SEQ ID NO: 29) (New England Peptide).

QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) (New England Peptide).

Биспецифичное моноклональное антитело в качестве лекарственного средства-кандидата.

Модифицированный трипсин категории для секвенирования, поставляемый с буфером для ресуспендирования (Promega, № по каталогу V5117).

Ультрачистый 1,0 М трис-HCl pH=7,5 (Invitrogen, № по каталогу 15567-027).

Ультрачистый 1,0 М трис-HCl pH=8,0 (Invitrogen, № по каталогу 15568-025).

Ультрачистый 1,0 М трис-HCl pH=8,5 (Alfa Aesar, № по каталогу J61038).

Мочевина (Sigma Aldrich, № по каталогу U5128-100G).

ТСЕР HCL (Thermo Scientific; № по каталогу 20491).

Йодацетамид (Sigma-Aldrich; № по каталогу A3221-10VL).

Муравьиная кислота (Thermo Scientific; № по каталогу 28905).

Ацетонитрил (Fisher Chemical, № по каталогу A955-4).

Колонка ACQUITY UPLC BEH130 C18, 1,7 мкм, 2,1 мм×50 мм (Waters, деталь № 1860035554).

96-луночный планшет, 0,5 мл, полипропилен (Agilent, деталь № 5042-1386).

Одноразовый 25 мл резервуар для реагентов (VistaLab, деталь № 3054-1004).

Масс-спектрометр TripleQuad (Agilent, модель № 6495).

Система ЖХ 1290 Infinity II (Agilent, модель № 1290).

Приготовление образца.

200 мкг/мл маточный раствор C1q готовили в сыворотке человека, истощенной по C1q, и аналитическом буфере для разведения (ADB), содержащем 20 мкг/мл биспецифичного моноклонального антитела в качестве лекарственного средства-кандидата. Маточный раствор C1q последовательно разводили в соотношении 1:3, шесть раз, чтобы приготовить шесть стандартных растворов C1q (L6-L1). Образцы для LLOQ (нижнего предела количественного определения), образцы с низким содержанием аналита для QC (LQC), образцы со средним содержанием аналита для QC (MQC), образцы с высоким содержанием аналита для QC (HQC) и образцы для ULOQ (верхнего предела количественного определения) готовили в ADB независимо от маточного раствора C1q. Аликвоту ADB резервировали как образец L0 (контрольный). Концентрации стандарта C1q и растворов QC приведены в табл. 3.

Таблица 3

Концентрации стандарта C1q и растворов QC	
Уровень/QC	Концентрация (мкг/мл)
L1/LLOQ	0,27
L2	0,82
L3	2,47
L4	7,41
L5	22,22
L6/ULOQ	66,67
LQC	0,78
MQC	6,25
HQC	50

Следующие меченые изотопами пептиды внутреннего стандарта (ISP) восстанавливали до 6-12 мМ в 30% ацетонитриле в 0,1% муравьиной кислоте, чтобы получить меченые изотопами растворы ISP: SLGFC(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36).

Каждый образец C1q разводили в 50 раз в 100 мМ трис-HCl, pH=7,5 и 20 мкг/мл биспецифичного антитела. Затем 5 мкл каждого разведенного образца C1q денатурировали и восстанавливали в 20 мкл 8 М мочевины и 10 мМ трис-(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP) при 56°C и встряхивании в течение 30 минут. После этого к каждому образцу добавляли 5 мкл 50 мМ йодацетамида, а затем образцы инкубировали в темноте при 25°C и встряхивании в течение 30 минут. Затем к каждому образцу добавляли 10 мкл соответствующего раствора ISP, меченого изотопом. После добавления ISP к каждому образцу также добавляли 100 мкл 0,01 мкг/мкл трипсина. Затем образцы инкубировали при 37°C в темноте при встряхивании в течение 4 часов. К образцам добавляли 5 мкл 20% муравьиной кислоты, чтобы нейтрализовать реакцию триптического расщепления. Образцы смешивали и центрифугировали при 4680 об/мин в течение 5 минут перед анализом с помощью ЖХ-МВР-МС/МС.

Анализ ЖХ-МВР-МС.

Анализ ЖХ-МВР-МС выполняли на масс-спектрометре TripleQuad (Agilent, модель № 6495) с системой для ЖХ 1290 Infinity II (Agilent, модель № 1290). Использованный градиент для ЖХ описан в табл. 4, при этом буфер А состоял из 0,1% муравьиной кислоты в воде, а буфер В состоял из 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Таблица 4

Градиент для ЖХ			
Время (минуты)	Буфер А (%)	Буфер В (%)	Поток (мл/минуту)
0,5	97	3	0,4
8,0	75	25	0,4
8,1	10	90	0,4
10,5	10	90	0,4
10,6	97	3	0,4
13,0	97	3	0,4

Анализ МВР-МС позволял осуществлять одновременный мониторинг нативных пептидных фрагментов C1q и меченых изотопами пептидов в образцах. Площади пиков для двух переходов (нативный и с тяжелой меткой) получали и регистрировали как для нативных, так и для меченых изотопами пептидов C1q. Для каждого стандарта C1q и образцов QC выходные данные для белка C1q, проанализированные с помощью ЖХ-МВР-МС, привели к получению шести измерений, состоящих из измерений двух переходов (нативный и с тяжелой меткой) для каждого из трех отобранных пептидов, представленных в табл. 5 ниже.

Таблица 5

Переход m/z и энергия столкновения целевых пептидов C1q

Субъединица C1q	Последовательность пептида	SEQ ID NO	Переход m/z	Энергия столкновения (В)
A	SLGFC(Cam)DTTNK	41	571,8 > 942,3	18
B	IAFSATR	29	383,1 > 581,1	10
C	QTHQPPAPNSLIR	36	487,0 > 350,3	13

Каждый из трех пептидов в табл. 5 происходит из различной субъединицы C1q. Пептидный фрагмент, происходящий из субъединицы B, использовали в качестве пептида для количественного определения (называемого в настоящем изобретении пептидом субъединицы B), а пептидные фрагменты, происходящие из субъединиц A (называемые в настоящем изобретении пептидом субъединицы A) и C (называемые в настоящем изобретении пептидом субъединицы C) использовали в качестве подтверждающих пептидов. Меченые изотопами ISP имеют аминокислотные последовательности, которые идентичны каждому из трех отобранных пептидов, и называются в настоящем изобретении меченым изотопом контрольным пептидом субъединицы A, меченым изотопом контрольным пептидом субъединицы B и меченым изотопом контрольным пептидом субъединицы C.

Три пептида, перечисленные в табл. 5, отбирали на основе предыдущих результатов, которые показали, что эти пептиды представляли собой наилучшие пептиды для количественного определения концентрации C1q в анализе ЖХ-МВР-МС/МС. Отбор этих пептидов был частично основан на консервативности пептидной последовательности между человеком и обезьяной (*Macaca fascicularis*). На фиг.1 показано выравнивание последовательностей субъединицы A C1q человека, обезьяны (*Macaca fascicularis*), мыши и крысы, с выделением пептида субъединицы A. На фиг. 2 показано выравнивание последовательностей субъединицы B C1q человека, обезьяны (*Macaca fascicularis*), мыши и крысы, с выделением пептида субъединицы B. На фиг. 3 показано выравнивание последовательностей субъединицы C C1q человека, обезьяны (*Macaca fascicularis*), мыши и крысы, с выделением пептида субъединицы C. Первоначально тестировали несколько триптических пептидов из каждой из субъединиц A, B и C C1q. Протестированные пептиды перечислены в табл. 2.

Результаты.

Каждый стандартный образец C1q и каждый образец C1q QC анализировали с использованием ЖХ-МВР-МС/МС. Для каждого образца регистрировали 6 сигналов: сигнал, соответствующий нативному пептиду субъединицы A, сигнал, соответствующий нативному пептиду субъединицы B, сигнал, соответствующий нативному пептиду субъединицы C, сигнал, соответствующий меченому изотопом контрольному пептиду субъединицы A, сигнал, соответствующий меченому изотопом контрольному пептиду субъединицы B, и сигнал, соответствующий меченому изотопом контрольному пептиду субъединицы C. Данные для меченых изотопами пептидов использовали в качестве внутренних контролей с целью устранения проблем с рабочими характеристиками анализа.

Для каждого из трех отобранных пептидов (пептид субъединицы A, пептид субъединицы B и пептид субъединицы C) калибровочную кривую получали путем построения графика зависимости нормированного сигнала ЖХ-МВР-МС, зарегистрированного для стандартных образцов C1q, от соответствующих номинальных концентраций этих образцов. На фиг. 4 показана калибровочная кривая, полученная с использованием сигнала, соответствующего пептиду субъединицы A. На фиг. 5 показана калибровочная кривая, полученная с использованием сигнала, соответствующего пептиду субъединицы B. На фиг. 6 показана калибровочная кривая, полученная с использованием сигнала, соответствующего пептиду субъединицы C. На фиг. 4-6 черные точки представляют стандартные образцы C1q при концентрациях L1-L6. Синие треугольники представляют образцы C1q QC при концентрациях LLOQ, LQC, MQC, HQC и ULOQ.

Далее после получения калибровочной кривой определяли концентрации образцов QC путем сравнения сигнала ЖХ-МВР-МС/МС каждого из трех целевых пептидов в образцах QC с соответствующей калибровочной кривой. Точность анализа оценивали путем сравнения определенных концентраций с номинальными концентрациями образцов QC. Результаты сравнения представлены в табл. 6-8.

Таблица 6
Точность анализа с использованием целевого пептида SLGFC(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41),
происходящего из субъединицы A C1q

Стандарты	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Номинальная конц. (мкг/мл)	0,27	0,82	2,47	7,41	22,22	66,67
Точность (%)	103	91	104	100	104	99
QC (N=3)	LLOQ	LQC	MQC	HQC	ULOQ	
Номинальная конц. (мкг/мл)	0,27	0,78	6,25	50	66,67	
Точность (%) - набор1	96	99	97	95	97	
Точность (%) - набор2	102	94	100	96	102	
Точность (%) - набор3	71	101	101	97	104	
%RSD (N=3)	19%	4%	2%	1%	4%	

Таблица 7

Точность анализа с использованием целевого пептида IAFSATR (SEQ ID NO: 29),
происходящего из субъединицы B C1q

Стандарт	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Номинальная конц. (мкг/мл)	0,27	0,82	2,47	7,41	22,22	66,67
Точность (%)	101	95	106	98	99	100
QC (N=3)	LLOQ	LQC	MQC	HQC	ULOQ	
Номинальная конц. (мкг/мл)	0,27	0,78	6,25	50	66,67	
Точность (%) - набор1	98	95	97	105	96	
Точность (%) - набор2	94	94	100	106	111	
Точность (%) - набор3	99	94	95	109	113	
%RSD (N=3)	3%	1%	3%	2%	9%	

Таблица 8

Калибровка анализа C1q на основе целевого пептида QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36),
происходящего из субъединицы C C1q

Стандарт	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Номинальная конц. (мкг/мл)	0,27	0,82	2,47	7,41	22,22	66,67
Точность (%)	101	95	103	100	101	100
QC (N=3)	LLOQ	LQC	MQC	HQC	ULOQ	
Номинальная конц. (мкг/мл)	0,27	0,78	6,25	50	66,67	
Точность (%) - набор1	98	98	99	106	99	
Точность (%) - набор2	104	101	103	105	110	
Точность (%) - набор3	93	97	102	107	111	
%RSD (N=3)	6%	2%	2%	1%	6%	

Эти результаты демонстрируют, что анализ является как точным, так и чувствительным. Они также демонстрируют, что использование пептида IAFSATR (SEQ ID NO: 29), происходящего из субъединицы B C1q, обеспечило наилучшие результаты, поскольку с помощью ЖХ-МВР-МС/МС был зарегистрирован сильный ответ и сигнал не имел фоновых помех.

LLOQ и предел обнаружения (LOD).

Как показано на левой и средней панелях фиг. 7, масс-хроматограмма, зарегистрированная при концентрации LLOQ (0,27 мкг/мл) для пептида субъединицы А и пептида субъединицы В, показала незначительные фоновые пики, или их отсутствие, расположенные в той же временной точке сбора данных, что и пики пептида в контрольном образце и образце для двойного контроля. Однако, как показано на правой панели фиг. 7, масс-хроматограмма, зарегистрированная для пептида субъединицы С, показала фоновые пики в контрольном образце и образце для двойного контроля. Площадь под кривой для фоно-

вого пика в контрольном образце составила приблизительно 5% от площади под кривой для пика образца. В целом, как показано на фиг. 8, отношения сигнал/шум для пептида субъединицы А, пептида субъединицы В и пептида субъединицы С при концентрации LLOQ составили 51, 36, 94, соответственно, а при концентрации предела обнаружения (LOD) составили 7, 9 и 6, соответственно.

Пример 2. Тестирование переноса остатка предыдущей пробы прибора для способов согласно настоящему изобретению.

Поскольку способы согласно настоящему изобретению можно применять для выполнения последовательных экспериментов на одном и том же приборе, важно убедиться, что перенос остатка предыдущей пробы не будет препятствовать анализу следующего образца. Измеряли перенос остатка предыдущей пробы прибора при реализации способов согласно настоящему изобретению.

Сначала регистрировали хроматограмму ЖХ-МВР-МС для образца контрольного гидролизата. Непосредственно после этого на этом же приборе регистрировали масс-хроматограмму образца С1q QC при концентрации ULOQ (66,7 мкг/мл). Наконец, после анализа образца ULOQ на этом же приборе анализировали второй образец контрольного гидролизата. Как показано на фиг. 9, отсутствовало значительное изменение хроматограмм контрольного гидролизата до или после анализа образца ULOQ для пептида субъединицы А, субъединицы В или субъединицы С. Эти результаты демонстрируют, что перенос остатка предыдущей пробы прибора для способов согласно настоящему изобретению является минимальным.

Пример 3. Тестирование устойчивости к лекарственным средствам способов согласно настоящему изобретению.

Чтобы исследовать, препятствует ли присутствие лекарственных антител способам согласно настоящему изобретению, различные концентрации (0, 20 мкг/мл или 2000 мкг/мл) биспецифичного антитела добавляли к эталонным образцам С1q в двойной контрольной (только контрольный матрикс, без внутреннего стандарта; L00) концентрации. Как показано на фиг. 10, добавление биспецифичного антитела не вызывало каких-либо значительных изменений зарегистрированной масс-хроматограммы.

Эталонные образцы С1q при концентрациях LQC, MQC и HQC (0,8 мкг/мл, 6,3 мкг/мл и 50,0 мкг/мл, соответственно) инкубировали в отсутствие биспецифичного антитела или с 0 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл или 2000 мкг/мл биспецифичного антитела и анализировали с помощью ЖХ-МВР-МС/МС. Эти концентрации биспецифичного антитела в анализе С1q соответствовали 1 мг/мл, 2 мг/мл или 100 мг/мл биспецифичного антитела в чистой сыворотке. Чтобы соотнести эти концентрации с фармакокинетикой, при введении в дозировке 50 мг/кг, максимальная сывороточная концентрация (С_{max}) биспецифичного антитела 6 составляет 1,25-1,5 мг/мл. Как показано на фиг. 11, добавление биспецифичного антитела фактически улучшает выявление сигнала для пептидов субъединицы А, субъединицы В и субъединицы С. На фиг. 11 розовый или первый столбик в каждой группе соответствует образцам, инкубированным в отсутствие биспецифичного антитела; желтый или второй столбик в каждой группе соответствует образцам, инкубированным с 20 мкг/мл биспецифичного антитела; зеленый или третий столбик в каждой группе соответствует образцам, инкубированным с 40 мкг/мл биспецифичного антитела; синий или четвертый столбик в каждой группе соответствует образцам, инкубированным с 2000 мкг/мл биспецифичного антитела.

Пример 4. Тестирование выявления разведения и линейности разведения способов согласно настоящему изобретению.

Выявление сигнала эндогенного С1q в способах согласно настоящему изобретению также тестировали на образцах, разведенных в различных разбавителях и с различными коэффициентами разведения. Тестируемые разбавители включали 2% истощенную сыворотку человека, инкубированную с 20 мкг/мл биспецифичного антитела, 2% истощенную сыворотку человека, 0,1% БСА и раствор трис-НСl. Эти образцы разводили в 20, 50 и 100 раз, и для анализа разведений использовали ЖХ-МВР-МС/МС. Как показано на фиг.12, добавление биспецифичного антитела улучшает выявление сигналов пептидов субъединицы А, субъединицы В и субъединицы С даже при более высоких коэффициентах разведения. В образцах, разведенных 0,1% БСА и Трис-НСl, выявление сигнала было ниже. На фиг.12 синий или первый столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным 2% истощенной сывороткой человека, инкубированной с 20 мкг/мл биспецифичного антитела; оранжевый или второй столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным 2% истощенной сывороткой человека; зеленый или третий столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным 0,1% БСА; фиолетовый или четвертый столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным трис-НСl.

Также тестировали выявление сигнала от эталонных стандартов С1q с использованием различных разбавителей. Эталонные образцы С1q при концентрациях LQC, MQC и HQC (0,8 мкг/мл, 6,3 мкг/мл и 50,0 мкг/мл, соответственно) разводили либо 2% истощенной сывороткой человека, инкубированной с 20 мкг/мл биспецифичного антитела, 2% истощенной сывороткой человека или 0,1% БСА. Как показано на фиг. 13, биспецифичное антитело улучшило выявление сигналов пептидов субъединицы А, субъединицы В и субъединицы С. На фиг. 13 синий или первый столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным 2% истощенной сывороткой человека, инкубированной с 20 мкг/мл биспецифичного антитела; оранжевый или второй столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным 2% истощенной сывороткой человека; зеленый или третий столбик в каждой группе соответствует образцам,

разведенным 0,1% БСА.

Для тестирования линейности разведения способов согласно настоящему изобретению объединенные образцы сыворотки человека, самцов обезьян и самок обезьян разводили в 20 раз, 50 раз и 100 раз. Концентрации эндогенного C1q в этих разведенных образцах определяли с применением способов согласно настоящему изобретению. Результаты этого теста показаны в табл. 9 ниже.

Таблица 9

Тест линейности разведения с использованием эндогенного C1q

Образец	Коэф. разведения	По C1Q-A		По C1Q-B		По C1Q-C	
		Рассчитанная	%	Рассчитанная	%	Рассчитанная	%
		конц. (мкг/мл)	RSD	конц. (мкг/мл)	RSD	конц. (мкг/мл)	RSD
Объединенная сыворотка человека	100X	89		80		78	
	50X	70	12,4%	72	5,3%	70	6,0%
	20X	87		74		74	
Самец обезьяны	100X	87		59		61	
	50X	81	8,7%	58	0,8%	60	2,7%
	20X	96		58		58	
Самка обезьяны	100X	70		56		55	
	50X	67	2,1%	49	6,2%	50	8,7%
	20X	69		54		59	

Пример 5. Воспроизводимость приготовления образца и стабильность образца в способах согласно настоящему изобретению.

Воспроизводимость приготовления образца способами согласно настоящему изобретению тестировали с использованием образцов C1q QC при концентрациях LLOQ, LQC, MQC, HQC и ULOQ. Для тестирования воспроизводимости впрыскивания аликвоты одного и того же образца QC впрыскивали в прибор для анализа либо в один и тот же день (в пределах суток), либо в разные дни (межсуточный). Для тестирования воспроизводимости приготовления образца образцы готовили из растворов QC либо в один и тот же день (в пределах суток), либо в разные дни (межсуточный). Тестировали 3 образца для каждого условия, и относительное стандартное отклонение 3 образцов для каждого условия показано в табл. 10 ниже.

Таблица 10

Воспроизводимость впрыскивания и приготовления образца способов согласно настоящему изобретению

C1Q	QC (n=3)	% RSD			
		В пределах суток Дозатор	Межсуточный Дозатор	В пределах суток Приготовление образца	Межсуточный Приготовление образца
C1Q-A	LLOQ	0,6	10,2	3,0	14,0
	LQC	7,8	7,1	9,2	13,7
	MQC	1,2	5,4	2,7	4,3
	HQC	1,2	1,3	0,9	1,3
	ULOQ	2,5	2,0	2,0	2,0
C1Q-B	LLOQ	4,8	5,0	0,8	6,0
	LQC	4,4	9,3	2,0	4,6
	MQC	1,8	6,2	1,5	3,9
	HQC	0,5	2,0	1,2	1,8
	ULOQ	0,4	0,8	1,2	1,7
C1Q-C	LLOQ	6,8	6,2	4,6	5,6
	LQC	1,3	1,6	3,3	5,6
	MQC	2,3	2,0	3,2	2,9
	HQC	1,3	2,2	1,6	2,5
	ULOQ	1,0	1,9	1,9	2,7

Для тестирования стабильности образца образцы C1q QC при концентрациях LLOQ, LQC, MQC, HQC и ULOQ (0,3 мкг/мл, 0,8 мкг/мл, 6,3 мкг/мл, 50,0 мкг/мл и 66,7 мкг/мл, соответственно) подвергли либо трем циклам замораживания-оттаивания, либо хранили в автоматическом пробоотборнике в течение 48 часов до определения в них концентрации C1q с помощью анализа C1q. Как показано на фиг. 14, три цикла замораживания-оттаивания или 48-часовое хранение в автоматическом пробоотборнике не оказывали существенного влияния на точность способов согласно настоящему изобретению. В верхнем ряду диаграмм на фиг. 14 первый столбик в каждой группе соответствует образцам, которые были проанализированы свежими перед замораживанием; второй столбик в каждой группе соответствует образцам, которые были подвергнуты трем циклам замораживания-оттаивания. В нижнем ряду диаграмм на фиг. 14 первый столбик в каждой группе соответствует образцам, которые были проанализированы свежими; второй столбик в каждой группе соответствует образцам, которые были проанализированы после 48 часов хранения в автоматическом пробоотборнике.

В отдельных экспериментах также тестировали хранение в течение 72 часов, при этом не наблюдали разрушение или потерю образца.

Пример 6. Вариант анализа, относящийся к пептидам внутреннего стандарта в способах согласно настоящему изобретению.

Меченые тяжелыми изотопами пептиды, называемые пептидами внутреннего стандарта (ISP), имеют идентичные аминокислотные последовательности с пептидами субъединицы А, субъединицы В и субъединицы С. Образцы C1q QC при концентрациях LLOQ, LQC, MQC, HQC и ULOQ (0,3 мкг/мл, 0,8 мкг/мл, 6,3 мкг/мл, 50,0 мкг/мл и 66,7 мкг/мл, соответственно) анализировали в присутствии и в отсутствие каждого ISP. Результаты этого анализа показаны в табл. 11. Включение ISP не препятствовало анализу. Таким образом, меченые изотопами пептиды использовали с целью подтверждения времени удерживания, калибровки рабочих характеристик прибора и устранения проблем.

Таблица 11

Варианты анализа C1q с использованием меченых изотопами пептидов
внутреннего стандарта или без них

QC (n=3)	%RSD для QC (n=3)					
	C1QA		C1QB		C1QC	
	- ISP	+ ISP	- ISP	+ ISP	- ISP	+ ISP
LLOQ	8%	12%	4%	2%	2%	8%
LQC	11%	11%	4%	2%	2%	1%
MQC	2%	6%	3%	5%	2%	4%
HQC	2%	6%	1%	4%	0%	8%
ULOQ	2%	3%	1%	1%	2%	7%

Пример 7. Количественное определение C1q в образцах крови от обработанных обезьян с применением способов согласно настоящему изобретению.

Способы согласно настоящему изобретению применяли для количественного определения концентрации белка C1q, присутствующего в образцах крови обезьян, получивших биспецифичное антитело. Обозначение групп обезьян и уровни дозы показаны в табл. 12.

Таблица 12

Обозначение групп обезьян и уровни дозы

Группа	Кол-во животных (самцы)	Уровень дозы (мг/кг)	Концентрация дозы (мг/мл)
1 (контроль изотипа)	3	50	25
2 (низкий)	3	2	1
3 (средний)	3	10	5
4 (высокий)	3	50	25

Группе 1 вводили разведенное антитело для контроля изотипа путем медленной внутривенной болюсной инъекции при объеме дозы 2 мл/кг. Группам 2, 3 и 4 вводили разведенное биспецифичное антитело путем медленной внутривенной болюсной инъекции при дозе 2 мл/кг. Образцы крови объемом 0,5 мл собирали в соответствии со следующим графиком: образец перед введением дозы и образец приблизительно через 5 минут после введения дозы собирали на День 1; последующие образцы собирали через 24 часа, 72 часа и 168 часов после введения дозы; образцы также собирали один раз в каждый из Дня 14 после введения дозы, Дня 42 после введения дозы и Дня 56 после введения дозы. Образцы крови центрифугировали в течение 1 часа после сбора, и собранные образцы сыворотки разделяли на 4 аликвоты по 50 мкл каждая.

Каждый образец сыворотки обезьяны разводили в 50 раз в 100 мМ Трис-НСl, pH=7,5 и 20 мкг/мл биспецифичного антитела. Затем 5 мкл каждого разведенного образца сыворотки обезьяны денатурировали и восстанавливали в 20 мкл 8 М мочевины и 10 мМ трис-(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР) при 56°C и встряхивании в течение 30 минут. После этого к каждому образцу добавляли 5 мкл 50 мМ йодацетамида, и затем образцы инкубировали в темноте при 25°C и встряхивании в течение 30 минут. 10 мкл раствора соответствующего меченого изотопом пептида внутреннего стандарта (см. пример 1) добавляли перед добавлением 100 мкл 0,01 мкг/мкл трипсина к каждому образцу. Затем образцы инкубировали при 37°C в темноте при встряхивании в течение 4 часов. К образцам добавляли 5 мкл 20% муравьиной кислоты, чтобы нейтрализовать реакцию триптического расщепления. Образцы смешивали и центрифугировали при 4680 об/мин в течение 5 минут перед их анализом с помощью ЖХ-МВР-МС/МС.

Для каждого образца сыворотки обезьяны использовали ЖХ-МВР-МС/МС, чтобы зарегистрировать сигнал, соответствующий пептиду субъединицы А, пептиду субъединицы В и пептиду субъединицы С, а также сигналы, соответствующие меченым изотопами пептидам внутреннего стандарта.

Затем определяли концентрации C1q в каждом из образцов сыворотки обезьян, получивших дозу, путем сравнения сигналов пептидов субъединицы А, субъединицы В и субъединицы С с калибровочными кривыми (полученными, как описано в примере 1). Концентрации C1q, определенные с помощью пептида субъединицы А, пептида субъединицы В и пептида субъединицы С, показаны в табл. 13-15. Динамика концентраций C1q в крови обезьян после введения дозы показана на фиг.15-17. На фиг. 15 показана концентрация C1q в образцах обезьян, получивших дозу, определенная количественно с использованием пептида субъединицы А. На фиг. 16 показана концентрация C1q в образцах обезьян, получивших дозу, определенная количественно с использованием пептида субъединицы В. На фиг. 17 показана концентрация C1q в образцах обезьян, получивших дозу, определенная количественно с использованием

пептида субъединицы С. На фиг.15-17 синяя линия соответствует обезьянам в группе 1, красная линия соответствует обезьянам в группе 2, зеленая линия соответствует обезьянам в группе 3, а фиолетовая линия соответствует обезьянам в группе 4.

Таблица 13

Количественное определение концентрации С1q в образцах крови обезьян, получивших дозу, с применением целевого пептида SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), происходящего из субъединицы А С1q

Временная точка	Концентрация С1q по субъединице А (мкг/мл)											
	Группа 1 (контроль изотипа)			Группа 2 (низкая доза)			Группа 3 (средняя доза)			Группа 4 (высокая доза)		
	P0001	P0002	P0003	P0101	P0102	P0103	P0201	P0202	P0203	P0301	P0302	P0303
До введения дозы	124	87	102	89	93	76	114	120	90	59	92	92
5 мин	102	88	94	78	81	72	90	91	74	43	70	67
24 ч	118	83	108	78	89	74	84	102	66	4*	58	9*
72 ч	112	76	96	80	79	64	93	96	67	5*	53	13*
168 ч	116	80	96	81	86	79	106	106	81	8*	67	28
D14	105	77	99	78	100	70	120	93	79	25	71	63
D42	106	81	96	74	103	80	85	106	91	56	83	99
D56	109	91	96	79	104	74	105	117	92	53	86	94

*Расчетная концентрация С1q. Концентрация ниже LLOQ (0,27 мкг/мл), но выше LOD (0,027 мкг/мл).

Таблица 14

Количественное определение концентрации С1q в образцах крови обезьян, получивших дозу, с применением целевого пептида IAFSATR (SEQ ID NO: 29), происходящего из субъединицы В С1q

Временная точка	Концентрация С1q по субъединице В (мкг/мл)											
	Группа 1 (контроль изотипа)			Группа 2 (низкая доза)			Группа 3 (средняя доза)			Группа 4 (высокая доза)		
	P0001	P0002	P0003	P0101	P0102	P0103	P0201	P0202	P0203	P0301	P0302	P0303
До введения дозы	99	72	88	69	79	67	90	93	67	49	75	74
5 мин	82	67	80	61	69	59	71	77	58	34	58	55
24 ч	90	66	82	66	75	62	65	76	51	1*	44	5*
72 ч	90	63	75	59	75	59	72	73	53	2*	44	7*
168 ч	88	67	74	66	77	62	82	81	64	6*	50	19
D14	85	68	75	62	77	66	85	78	63	17	60	49
D42	86	65	76	61	79	67	75	80	69	46	66	76
D56	82	76	82	63	88	68	84	85	74	44	69	73

*Расчетная концентрация С1q. Концентрация ниже LLOQ (0,27 мкг/мл), но выше LOD (0,027 мкг/мл).

Количественное определение концентрации С1q в образцах крови обезьян, получивших дозу, с применением целевого пептида QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36), происходящего из субъединицы С С1q

Временная точка	Концентрация С1q по субъединице С (мкг/мл)											
	Группа 1 (контроль изотипа)			Группа 2 (низкая доза)			Группа 3 (средняя доза)			Группа 4 (высокая доза)		
	P0001	P0002	P0003	P0101	P0102	P0103	P0201	P0202	P0203	P0301	P0302	P0303
До введения дозы	94	66	78	65	73	62	94	88	66	51	41	73
5 мин	76	59	70	53	60	54	68	73	61	37	31	52
24 ч	88	63	76	57	68	58	62	75	51	6*	23	9*
72 ч	87	58	64	57	61	54	69	70	54	7*	24	12*
168 ч	79	62	72	62	69	58	79	81	60	8*	28	22
D14	86	67	73	61	77	59	79	74	62	21	34	48
D42	82	60	73	53	74	62	71	76	66	45	39	77
D56	78	73	78	58	82	62	85	80	74	47	39	75

*Расчетная концентрация С1q. Концентрация ниже LLOQ (0,27 мкг/мл), но выше LOD (0,027 мкг/мл).

Перечень последовательностей

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
E, Sook Yen
Qiu, Haibo
Li, Ning

<120> Применение ЖХ-МС/МС для количественного определения белковых биомаркеров

<130> REGE-015/001WO

<150> US 62/715,973

<151> 2018-08-08

<160> 41

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 245

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Gly Pro Arg Gly Trp Leu Val Leu Cys Val Leu Ala Ile Ser
1 5 10 15

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

Lys Gly Glu Ala Gly Arg Pro Gly Arg Arg Gly Arg Pro Gly Leu Lys
35 40 45

Gly Glu Gln Gly Glu Pro Gly Ala Pro Gly Ile Arg Thr Gly Ile Gln
50 55 60

Gly Leu Lys Gly Asp Gln Gly Glu Pro Gly Pro Ser Gly Asn Pro Gly
65 70 75 80

Lys Val Gly Tyr Pro Gly Pro Ser Gly Pro Leu Gly Ala Arg Gly Ile
85 90 95

Pro Gly Ile Lys Gly Thr Lys Gly Ser Pro Gly Asn Ile Lys Asp Gln
100 105 110

Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Arg Asn Pro Pro Met Gly Gly
115 120 125

Asn Val Val Ile Phe Asp Thr Val Ile Thr Asn Gln Glu Glu Pro Tyr
130 135 140

Gln Asn His Ser Gly Arg Phe Val Cys Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Tyr
145 150 155 160

Phe Thr Phe Gln Val Leu Ser Gln Trp Glu Ile Cys Leu Ser Ile Val
165 170 175

Ser Ser Ser Arg Gly Gln Val Arg Arg Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr
180 185 190

Thr Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln
195 200 205

Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro Lys Lys Gly
210 215 220

His Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Ala Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe Leu
225 230 235 240

Ile Phe Pro Ser Ala
245

<210> 2

<211> 253

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 2

047857

Met Met Met Lys Ile Pro Trp Gly Ser Ile Pro Val Leu Met Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Ile Asp Ile Ser Gln Ala Gln Leu Ser Cys Thr
20 25 30

Gly Pro Pro Ala Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly
35 40 45

Pro Asp Gly Gln Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Pro Gly Leu Ala Gly Asp His Gly Glu Phe Gly Glu Lys Gly Asp Pro
65 70 75 80

Gly Ile Pro Gly Asn Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Met Gly
85 90 95

Pro Lys Gly Gly Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Lys Gly Glu
100 105 110

Ser Gly Asp Tyr Lys Ala Thr Gln Lys Ile Ala Phe Ser Ala Thr Arg
115 120 125

Thr Ile Asn Val Pro Leu Arg Arg Asp Gln Thr Ile Arg Phe Asp His
130 135 140

Val Ile Thr Asn Met Asn Asn Tyr Glu Pro Arg Ser Gly Lys Phe
145 150 155 160

Thr Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser
165 170 175

Arg Gly Asn Leu Cys Val Asn Leu Met Arg Gly Arg Glu Arg Ala Gln
180 185 190

Lys Val Val Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Tyr Asn Thr Phe Gln Val Thr
195 200 205

Thr Gly Gly Met Val Leu Lys Leu Glu Gln Gly Glu Asn Val Phe Leu
210 215 220

Gln Ala Thr Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Met Glu Gly Ala Asn Ser
225 230 235 240

047857

Ile Phe Ser Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Met Glu Ala
 245 250

<210> 3
 <211> 245
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Asp Val Gly Pro Ser Ser Leu Pro His Leu Gly Leu Lys Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Arg Gly Gln Ala Asn Thr Gly Cys
 20 25 30

Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly Lys Asp
 35 40 45

Gly Tyr Asp Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Ile Pro Gly Ile Arg Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Leu
 65 70 75 80

Pro Gly His Pro Gly Lys Asn Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Met Pro
 85 90 95

Gly Val Pro Gly Pro Met Gly Ile Pro Gly Glu Pro Gly Glu Glu Gly
 100 105 110

Arg Tyr Lys Gln Lys Phe Gln Ser Val Phe Thr Val Thr Arg Gln Thr
 115 120 125

His Gln Pro Pro Ala Pro Asn Ser Leu Ile Arg Phe Asn Ala Val Leu
 130 135 140

Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asp Thr Ser Thr Gly Lys Phe Thr Cys
 145 150 155 160

Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Ala Ser His Thr Ala
 165 170 175

Asn Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg Ser Gly Val Lys Val Val Thr Phe
 180 185 190

Cys Gly His Thr Ser Lys Thr Asn Gln Val Asn Ser Gly Gly Val Leu

Phe Thr Phe Gln Val Val Ser Glu Arg Glu Ile Cys Leu Ser Ile Val
 165 170 175

Ser Ser Ser Arg Gly Gln Val Arg Arg Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr
 180 185 190

Thr Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln
 195 200 205

Leu Gln Arg Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro Arg Lys Gly
 210 215 220

Asn Ile Tyr Gln Gly Leu Glu Ala Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe Leu
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Ser Ser
 245

<210> 5
 <211> 253
 <212> БЕЛОК
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 5

Met Met Met Lys Ile Leu Trp Gly Ser Ile Pro Val Leu Met Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Leu Asp Val Ser Trp Ala Gln Gly Ser Cys Thr
 20 25 30

Gly Pro Pro Ala Ile Pro Gly Thr Pro Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly
 35 40 45

Ser Asp Gly Gln Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu
 50 55 60

Pro Gly Leu Ala Gly Asp His Gly Glu Phe Gly Glu Lys Gly Asp Pro
 65 70 75 80

Gly Ile Pro Gly Asn Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Met Gly
 85 90 95

Pro Lys Gly Gly Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Lys Gly Glu
 100 105 110

047857

Ser Gly Asp Tyr Lys Ala Thr Gln Lys Ile Ala Phe Ser Ala Thr Arg
 115 120 125

Thr Val Asn Thr Pro Leu Arg Arg Asp Gln Thr Ile Arg Phe Asp His
 130 135 140

Val Ile Thr Asn Met Asn Asn Asn Tyr Glu Pro Arg Ser Gly Lys Phe
 145 150 155 160

Thr Cys Arg Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser
 165 170 175

Arg Gly Asn Leu Cys Val Lys Leu Met Arg Gly Arg Glu Arg Pro Gln
 180 185 190

Lys Val Val Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Tyr Asn Thr Phe Gln Val Thr
 195 200 205

Thr Gly Gly Met Val Leu Lys Leu Glu Gln Gly Glu Asn Val Phe Leu
 210 215 220

Gln Ala Thr Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Met Glu Gly Ala Asn Ser
 225 230 235 240

Ile Phe Ser Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Val Glu Ala
 245 250

<210> 6
 <211> 245
 <212> BEJOK
 <213> Macaca fascicularis

<400> 6

Met Asp Val Gly Pro Ser Ser Leu Pro His Leu Gly Leu Lys Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Arg Gly Gln Ala Asn Thr Gly Cys
 20 25 30

Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly Lys Asp
 35 40 45

Gly His Asp Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

047857

Ile Pro Gly Thr Arg Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Thr
65 70 75 80

Pro Gly His Pro Gly Lys Asn Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Met Pro
85 90 95

Gly Val Pro Gly Pro Met Gly Ile Pro Gly Glu Pro Gly Glu Glu Gly
100 105 110

Arg Tyr Lys Gln Lys Tyr Gln Ser Val Phe Thr Val Ala Arg Gln Thr
115 120 125

His Gln Pro Pro Ala Pro Asn Ser Leu Ile Arg Phe Asn Ala Val Leu
130 135 140

Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asp Thr Ser Thr Gly Lys Phe Thr Cys
145 150 155 160

Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Ala Ser His Thr Ala
165 170 175

Asn Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg Gly Gly Val Lys Val Val Thr Phe
180 185 190

Cys Gly His Thr Ser Gln Ala Asn Gln Val Asn Ser Gly Gly Val Leu
195 200 205

Leu Arg Leu Gln Val Gly Glu Glu Val Trp Leu Gly Val Asn Asp Tyr
210 215 220

Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe
225 230 235 240

Leu Leu Phe Pro Asp
245

<210> 7

<211> 245

<212> BEJOK

<213> Macaca mulatta

<400> 7

Met Glu Gly Pro Gln Gly Trp Leu Val Val Cys Val Leu Ala Ile Ser
1 5 10 15

Leu Ala Ser Ile Val Thr Gln Asn Val Cys Arg Ala Pro Asp Gly Lys

047857

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

<210> 8

<211> 253
 <212> BEJOK
 <213> Macaca mulatta

<400> 8

Met Met Met Lys Ile Leu Trp Gly Ser Ile Pro Val Leu Met Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Leu Asp Val Ser Trp Ala Gln Gly Ser Cys Thr
 20 25 30

Gly Pro Pro Ala Ile Pro Gly Thr Pro Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly
 35 40 45

Ser Asp Gly Gln Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu
 50 55 60

Pro Gly Leu Ala Gly Asp His Gly Glu Phe Gly Glu Lys Gly Asp Pro
 65 70 75 80

Gly Ile Pro Gly Asn Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Met Gly
 85 90 95

Pro Lys Gly Gly Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Lys Gly Glu
 100 105 110

Ser Gly Asp Tyr Lys Ala Thr Gln Lys Ile Ala Phe Ser Ala Thr Arg
 115 120 125

Thr Ile Asn Thr Pro Leu Arg Arg Asp Gln Thr Ile Arg Phe Asp His
 130 135 140

Val Ile Thr Asn Met Asn Asn Tyr Glu Pro Arg Ser Gly Lys Phe
 145 150 155 160

Thr Cys Arg Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser
 165 170 175

Arg Gly Asn Leu Cys Val Lys Leu Met Arg Gly Arg Glu Arg Pro Gln
 180 185 190

Lys Val Val Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Tyr Asn Thr Phe Gln Val Thr
 195 200 205

Thr Gly Gly Met Val Leu Lys Leu Glu Gln Gly Glu Asn Val Phe Leu
 210 215 220

047857

Gln Ala Thr Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Met Glu Gly Ala Asn Ser
 225 230 235 240

Ile Phe Ser Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Val Glu Ala
 245 250

<210> 9
 <211> 245
 <212> BEJOK
 <213> Macaca mulatta

<400> 9

Met Asp Val Gly Pro Ser Ser Leu Pro His Leu Gly Leu Lys Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Arg Gly Gln Ala Asn Thr Gly Cys
 20 25 30

Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly Lys Asp
 35 40 45

Gly His Asp Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Ile Pro Gly Thr Arg Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Thr
 65 70 75 80

Pro Gly His Pro Gly Lys Asn Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Met Pro
 85 90 95

Gly Val Pro Gly Pro Met Gly Ile Pro Gly Glu Pro Gly Glu Glu Gly
 100 105 110

Arg Tyr Lys Gln Lys Tyr Gln Ser Val Phe Thr Val Ala Arg Gln Thr
 115 120 125

His Gln Pro Pro Ala Pro Asn Ser Leu Ile Arg Phe Asn Ala Val Leu
 130 135 140

Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asp Thr Ser Thr Gly Lys Phe Thr Cys
 145 150 155 160

Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Ala Ser His Thr Ala
 165 170 175

047857

Asn Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg Gly Gly Val Lys Val Val Thr Phe
 180 185 190

Cys Gly His Thr Ser Gln Ala Asn Gln Val Asn Ser Gly Gly Val Leu
 195 200 205

Leu Arg Leu Gln Val Gly Glu Glu Val Trp Leu Gly Val Asn Asp Tyr
 210 215 220

Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe
 225 230 235 240

Leu Leu Phe Pro Asp
 245

<210> 10
 <211> 245
 <212> BEJOK
 <213> Mus musculus

<400> 10

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

Leu Val Trp Thr Val Ala Glu Asp Val Cys Arg Ala Pro Asn Gly Lys
 20 25 30

Asp Gly Ala Pro Gly Asn Pro Gly Arg Pro Gly Arg Pro Gly Leu Lys
 35 40 45

Gly Glu Arg Gly Glu Pro Gly Ala Ala Gly Ile Arg Thr Gly Ile Arg
 50 55 60

Gly Phe Lys Gly Asp Pro Gly Glu Ser Gly Pro Pro Gly Lys Pro Gly
 65 70 75 80

Asn Val Gly Leu Pro Gly Pro Ser Gly Pro Leu Gly Asp Ser Gly Pro
 85 90 95

Gln Gly Leu Lys Gly Val Lys Gly Asn Pro Gly Asn Ile Arg Asp Gln
 100 105 110

Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Gln Asn Pro Met Thr Leu Gly
 115 120 125

047857

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

Gln Asn His Thr Gly Arg Phe Ile Cys Ala Val Pro Gly Phe Tyr Tyr
 145 150 155 160

Phe Asn Phe Gln Val Ile Ser Lys Trp Asp Leu Cys Leu Phe Ile Lys
 165 170 175

Ser Ser Ser Gly Gly Gln Pro Arg Asp Ser Leu Ser Phe Ser Asn Thr
 180 185 190

Asn Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Leu Ala Gly Gly Thr Val Leu Gln
 195 200 205

Leu Arg Arg Gly Asp Glu Val Trp Ile Glu Lys Asp Pro Ala Lys Gly
 210 215 220

Arg Ile Tyr Gln Gly Thr Glu Ala Asp Ser Ile Phe Ser Gly Phe Leu
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Ser Ala
 245

<210> 11
 <211> 253
 <212> BEJIOK
 <213> Mus musculus

<400> 11

Met Lys Thr Gln Trp Gly Glu Val Trp Thr His Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Gly Phe Leu His Val Ser Trp Ala Gln Ser Ser Cys Thr Gly Pro
 20 25 30

Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Ser Asp
 35 40 45

Gly Gln Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly
 50 55 60

Leu Ala Gly Asp Leu Gly Glu Phe Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Ile
 65 70 75 80

Pro Gly Thr Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Val Gly Pro Lys

047857

85

90

95

Gly Thr Pro Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Pro Lys Gly Asp Ser Gly
 100 105 110

Asp Tyr Gly Ala Thr Gln Lys Val Ala Phe Ser Ala Leu Arg Thr Ile
 115 120 125

Asn Ser Pro Leu Arg Pro Asn Gln Val Ile Arg Phe Glu Lys Val Ile
 130 135 140

Thr Asn Ala Asn Glu Asn Tyr Glu Pro Arg Asn Gly Lys Phe Thr Cys
 145 150 155 160 165

Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser Arg Gly
 165 170 175

Asn Leu Cys Val Asn Leu Val Arg Gly Arg Asp Arg Asp Ser Met Gln
 180 185 190

Lys Val Val Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Gln Asn Thr Phe Gln Val Thr
 195 200 205

Thr Gly Gly Val Val Leu Lys Leu Glu Gln Glu Glu Val Val His Leu
 210 215 220

Gln Ala Thr Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Ile Glu Gly Ala Asn Ser
 225 230 235 240

Ile Phe Thr Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Met Asp Ala
 245 250

<210> 12

<211> 246

<212> BEJOK

<213> Mus musculus

<400> 12

Met Val Val Gly Pro Ser Cys Gln Pro Pro Cys Gly Leu Cys Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Leu Ala Leu Pro Leu Arg Ser Gln Ala Ser Ala Gly
 20 25 30

Cys Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Met Pro Gly Ala Pro Gly Lys
 35 40 45

Asp Gly His Asp Gly Leu Gln Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro
50 55 60

Ala Val Pro Gly Thr Arg Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly
65 70 75 80

Met Pro Gly His Arg Gly Lys Asn Gly Pro Arg Gly Thr Ser Gly Leu
85 90 95

Pro Gly Asp Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Val Glu
100 105 110

Gly Arg Tyr Lys Gln Lys His Gln Ser Val Phe Thr Val Thr Arg Gln
115 120 125

Thr Thr Gln Tyr Pro Glu Ala Asn Ala Leu Val Arg Phe Asn Ser Val
130 135 140

Val Thr Asn Pro Gln Gly His Tyr Asn Pro Ser Thr Gly Lys Phe Thr
145 150 155 160

Cys Glu Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr Tyr Thr Ser His Thr
165 170 175

Ala Asn Leu Cys Val His Leu Asn Leu Asn Leu Ala Arg Val Ala Ser
180 185 190

Phe Cys Asp His Met Phe Asn Ser Lys Gln Val Ser Ser Gly Gly Val
195 200 205

Leu Leu Arg Leu Gln Arg Gly Asp Glu Val Trp Leu Ser Val Asn Asp
210 215 220

Tyr Asn Gly Met Val Gly Ile Glu Gly Ser Asn Ser Val Phe Ser Gly
225 230 235 240

Phe Leu Leu Phe Pro Asp
245

<210> 13

<211> 245

<212> BEJOK

<213> Rattus norvegicus

<400> 13

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

Ile Phe Pro Ser Ala
245

<210> 14
<211> 253
<212> BEJOK
<213> Rattus norvegicus

<400> 14

Met Lys Thr Gln Trp Ser Glu Ile Leu Thr Pro Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Gly Leu Leu His Val Ser Trp Ala Gln Ser Ser Cys Thr Gly Ser
20 25 30

Pro Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Ser Asp
35 40 45

Gly Lys Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly
50 55 60

Leu Ala Gly Asp His Gly Glu Leu Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Ile
65 70 75 80

Pro Gly Ile Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Val Gly Pro Lys
85 90 95

Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Asp Tyr Lys Ala Thr Gln Lys Val Ala Phe Ser Ala Leu Arg Thr Val
115 120 125

Asn Ser Ala Leu Arg Pro Asn Gln Ala Ile Arg Phe Glu Lys Val Ile
130 135 140

Thr Asn Val Asn Asp Asn Tyr Glu Pro Arg Ser Gly Lys Phe Thr Cys
145 150 155 160

Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser Arg Gly
165 170 175

Asn Leu Cys Val Asn Ile Val Arg Gly Arg Asp Arg Asp Arg Met Gln
180 185 190

047857

Lys Val Leu Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Gln Asn Thr Phe Gln Val Thr
 195 200 205

Thr Gly Gly Val Val Leu Lys Leu Glu Gln Glu Glu Val Val His Leu
 210 215 220

Gln Ala Thr Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Val Glu Gly Ala Asn Ser
 225 230 235 240

Ile Phe Thr Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Met Asp Val
 245 250

<210> 15
 <211> 245
 <212> BEJOK
 <213> Rattus norvegicus

<400> 15

Met Val Val Gly Thr Ser Cys Gln Pro Gln His Gly Leu Tyr Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Leu Arg Ser Gln Ala Asn Ala Gly Cys
 20 25 30

Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Leu Pro Gly Thr Pro Gly Lys Asp
 35 40 45

Gly His Asp Gly Leu Gln Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Ile Pro Gly Thr Gln Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Met
 65 70 75 80

Pro Gly His Arg Gly Lys Asn Gly Pro Met Gly Thr Ser Gly Ser Pro
 85 90 95

Gly Asp Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Glu Glu Gly
 100 105 110

Arg Tyr Lys Gln Lys His Gln Ser Val Phe Thr Val Thr Arg Gln Thr
 115 120 125

Ala Gln Tyr Pro Ala Ala Asn Gly Leu Val Lys Phe Asn Ser Ala Ile
 130 135 140

Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asn Thr Asn Thr Gly Lys Phe Thr Cys

047857

Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Arg Asn Pro Pro Thr Gly Gly
 115 120 125

Asn Val Val Ile Phe Asp Thr Val Ile Thr Asn Gln Glu Gly Pro Tyr
 130 135 140

Gln Asn His Ser Gly Arg Phe Ile Cys Ala Val Pro Gly Tyr Tyr Tyr
 145 150 155 160

Phe Thr Phe Gln Val Val Ser Lys Trp Asp Ile Cys Leu Ser Ile Val
 165 170 175

Ser Ser Gly Arg Ala Gln Ile Arg Arg Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr
 180 185 190

Asn Ser Lys Gly Ile Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Ala Leu Gln
 195 200 205

Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Ile Glu Lys Asp Pro Ile Lys Gly
 210 215 220

Arg Ile Tyr Gln Gly Pro Glu Ala Asp Ser Ile Phe Ser Gly Phe Leu
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Ser Leu
 245

<210> 17

<211> 250

<212> BEJOK

<213> Canis lupus

<400> 17

Met Lys Thr Pro Arg Gly Gly Ile Leu Ala Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Gly Leu Leu Glu Val Ser Trp Ala Gln Ser Cys Thr Gly His Pro
 20 25 30

Ala Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ala Pro Gly Thr Asp Gly
 35 40 45

Thr Pro Gly Thr Pro Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly Leu
 50 55 60

047857

Ala Gly Asp His Gly Glu Phe Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Ile Pro
65 70 75 80

Gly Thr Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Val Gly Pro Lys Gly
85 90 95

Ser Pro Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Ala Lys Gly Glu Ser Gly Asp
100 105 110

Tyr Lys Ala Thr Gln Lys Ile Ala Phe Ser Ala Met Arg Thr Ile Asn
115 120 125

Ile Pro Leu Arg Arg Asp Gln Thr Ile Arg Phe Asp His Ile Val Thr
130 135 140

Asn Glu Asn Arg Asn Tyr Glu Pro Arg Ser Gly Lys Phe Thr Cys Asn
145 150 155 160

Val Pro Gly Ile Tyr Tyr Phe Ala Tyr His Ala Ser Ser Arg Gly Asn
165 170 175

Leu Cys Val Asn Val Met Arg Gly Arg Glu Arg Met Gln Lys Val Val
180 185 190

Thr Phe Cys Asp Tyr Val Gln Asn Thr Phe Gln Val Thr Thr Gly Ser
195 200 205

Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Gly Glu Asn Val Tyr Leu Gln Ala Thr
210 215 220

Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Met Glu Gly Ala Asn Ser Ile Phe Ser
225 230 235 240

Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Ala Glu Ala
245 250

<210> 18

<211> 245

<212> BEJOK

<213> Canis lupus

<400> 18

Met Asp Thr Gly Pro Ser Ser Trp Pro His Leu Gly Leu Asn Leu Leu
1 5 10 15

047857

Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Leu Gly Gly Gln Ala Ser Thr Gly Cys
 20 25 30

Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly Lys Asp
 35 40 45

Gly His Asp Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Ile Pro Gly Thr Arg Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Thr
 65 70 75 80

Pro Gly Tyr Pro Gly Lys Asn Gly Pro Met Gly Thr Pro Gly Ile Pro
 85 90 95

Gly Val Pro Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Glu Glu Gly
 100 105 110

Arg Tyr Lys Gln Lys His Gln Ser Val Phe Thr Val Thr Arg Gln Thr
 115 120 125

Ala Gln Tyr Pro Leu Ala Asn Asn Leu Val Lys Phe Asn Thr Val Ile
 130 135 140

Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asp Thr Ser Thr Gly Lys Phe Thr Cys
 145 150 155 160

Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Thr Ser Leu Thr Ser
 165 170 175

Asn Leu Cys Val His Leu Tyr Arg Ser Gly Thr Arg Val Thr Thr Phe
 180 185 190

Cys Asp His Met Ser Asn Ser Lys Gln Val Ser Ser Gly Gly Val Leu
 195 200 205

Leu Arg Leu Gln Met Gly Glu Gln Val Trp Leu Ala Val Asn Asp Tyr
 210 215 220

Asn Gly Met Val Gly Thr Glu Gly Ser Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe
 225 230 235 240

Leu Leu Phe Pro Asp
 245

047857

<210> 19
 <211> 247
 <212> BEJOK
 <213> Danio rerio

<400> 19

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

Pro Phe Ser Phe Cys Gln Asp Glu Cys Val Lys His Gly Arg Asn Gly
 20 25 30

Ala Asp Gly Pro Asn Gly Arg Asp Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu
 35 40 45

Lys Gly Glu Pro Ala Leu Gln Val Lys Leu Ser Ser Ile Ala Leu Glu
 50 55 60

Glu Leu Lys Gly Asp Met Gly Val Arg Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly
 65 70 75 80

Leu Glu Gly Leu Met Gly Ala Ile Gly Pro Arg Gly Pro Leu Gly Pro
 85 90 95

Ala Gly Pro Arg Gly Ser Ser Val Gly Ala Asp Gly Ala Lys Ala Ser
 100 105 110

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

Tyr Lys Gln Pro Val Thr Phe Asn Asp Lys Leu Ser Asp Ala Asn Asp
 130 135 140

Asp Phe Gln Ile Lys Thr Gly Tyr Phe Thr Cys Lys Val Pro Gly Val
 145 150 155 160

Tyr Tyr Phe Val Phe His Ala Ser Ser Glu Gly Arg Leu Cys Leu Arg
 165 170 175

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

Asn Ser Lys Ser Val Ser Leu Val Val Ser Gly Gly Ala Val Leu Thr
 195 200 205

Leu Leu Lys Gly Asp Lys Val Trp Ile Glu Pro Phe Ala Gly Asp Gly

047857

210 215 220

Gly Val Gly Gln Met Pro Lys Arg Leu Tyr Ala Val Phe Asn Gly Phe
 225 230 235 240

Leu Ile Tyr Arg Asn Ala Glu
 245

<210> 20
 <211> 242
 <212> BEJOK
 <213> Danio rerio

<400> 20

Met Leu Phe Ala Leu Met Ser Ala His Val Val Pro Gln Leu Ala Ile
 1 5 10 15

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Ser Met Ser Glu Thr Cys Ala Gly Asn
 20 25 30

Lys Gly Phe Pro Gly Thr Pro Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Thr Asp
 35 40 45

Gly Lys Asp Gly Ala Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Glu Asn Glu
 50 55 60

Val Gln Met Thr Gly Pro Lys Gly Asp Pro Gly Lys Pro Gly Leu Pro
 65 70 75 80

Gly Arg Pro Gly Val Lys Gly Pro Glu Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly
 85 90 95

Pro Pro Gly Pro Lys Gly Gln Arg Gly Val Leu Ser Gly Lys Val Ala
 100 105 110

Pro Asp Gln Tyr Phe Val Phe Ser Tyr Lys Lys Ser Gln Lys Leu Glu
 115 120 125

Lys Ile Leu Gln Asp Lys Leu Val Val Phe Asp Val Pro Leu Ile Thr
 130 135 140

Gly Ile Asp Gly Val Leu Asp Gly Glu Gly Tyr Phe Asp Val Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Gly Met Tyr Tyr Ile Ser Tyr Gln Ile Ser Phe Gln Gln Ser Ala
 165 170 175

Cys Leu Lys Ile Gln Ile Gly Ala Glu Glu Lys Val Lys Phe Cys Asp
180 185 190

Ser Pro Lys Leu Ile Leu Gly Thr Ala Ala Ser Val Val Leu Lys Leu
195 200 205

Asn Lys Gly Asp Lys Val Ser Val Gln Ser Thr Gly Glu Ser Thr Val
210 215 220

Phe Ser Arg Asp Thr Asp Cys Thr Phe Thr Gly Phe Met Leu Phe Pro
225 230 235 240

Ile Lys

<210> 21

<211> 244

<212> BEJOK

<213> Danio rerio

<400> 21

Met Phe Gly Gly His Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

Cys Leu Cys Leu Ala Ser Ala Asp Thr Cys Pro Ala Gly Ala Met Pro
20 25 30

Gly Leu Pro Gly Ile Pro Gly Phe Pro Gly Arg Asp Gly Arg Gln Gly
35 40 45

Met Lys Gly Glu Lys Gly Asp Leu Gly Ile Pro Ile Lys Pro Gly Asp
50 55 60

Thr Val Lys Lys Gly Glu Arg Gly Ala Phe Gly Leu Lys Gly Pro Pro
65 70 75 80

Gly Lys Arg Gly Pro His Gly Asp Pro Gly Ile Met Gly Pro Pro Gly
85 90 95

Pro Pro Gly Glu Pro Gly Glu Ala Gly Leu Val Asp Val Ser Gly Ser
100 105 110

Gln Leu Gln Ser Ala Phe Ser Val Ser Arg His Thr Arg Ile Pro Pro
115 120 125

047857

Asp Ala Asn Lys Val Ile Arg Phe Ser Lys Val Ile Thr Asn Pro Gln
 130 135 140

Gly His Phe Ser Thr Asp Glu Ser Lys Phe Val Cys Lys Ile Pro Gly
 145 150 155 160

Thr Tyr Tyr Phe Val Leu His Ala Ser Ser His Asp Lys Lys Leu Cys
 165 170 175

Val Ile Leu Val His Asp Asp Lys Asn Leu Val Ser Phe Cys Asp His
 180 185 190

Thr Gln Arg Gly Ser Gln Gln Val Ser Ser Gly Gly Leu Ser Leu Tyr
 195 200 205

Leu Lys Glu Asn Glu Lys Val Trp Leu Met Thr Asn Ala Leu Asn Gly
 210 215 220

Met Tyr Ala Thr Ala Asp Arg Ala Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe Leu
 225 230 235 240

Ile His Ala His

<210> 22
 <211> 13
 <212> БЕЖОК
 <213> Macaca fascicularis

<400> 22

Val Gly Tyr Pro Gly Pro Ser Gly Pro Leu Gly Ala Arg
 1 5 10

<210> 23
 <211> 11
 <212> БЕЖОК
 <213> Macaca fascicularis

<400> 23

Asp Gln Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg
 1 5 10

<210> 24
 <211> 28
 <212> БЕЖОК
 <213> Macaca fascicularis

<400> 24

Asn Pro Pro Met Gly Gly Asn Val Val Ile Phe Asp Thr Val Ile Thr
 1 5 10 15

Asn Gln Glu Glu Pro Tyr Gln Asn His Ser Gly Arg
 20 25

<210> 25

<211> 30

<212> БЕЛЮК

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 25

Phe Val Cys Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Tyr Phe Thr Phe Gln Val Leu
 1 5 10 15

Ser Gln Trp Glu Ile Cys Leu Ser Ile Val Ser Ser Ser Arg
 20 25 30

<210> 26

<211> 10

<212> БЕЛЮК

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 26

Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr Thr Asn Lys
 1 5 10

<210> 27

<211> 26

<212> БЕЛЮК

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 27

Gly Leu Phe Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln Leu Gln Gln Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro Lys
 20 25

<210> 28

<211> 22

<212> БЕЛЮК

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 28

Gly His Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Ala Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe
 1 5 10 15

Leu Ile Phe Pro Ser Ala
20

<210> 29
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Macaca fascicularis

<400> 29

Ile Ala Phe Ser Ala Thr Arg
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Macaca fascicularis

<400> 30

Thr Ile Asn Val Pro Leu Arg Arg
1 5

<210> 31
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Macaca fascicularis

<400> 31

Phe Asp His Val Ile Thr Asn Met Asn Asn Asn Tyr Glu Pro Arg
1 5 10 15

<210> 32
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Macaca fascicularis

<400> 32

Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser Arg
1 5 10

<210> 33
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Macaca fascicularis

<400> 33

Gly Asn Leu Cys Val Asn Leu Met Arg
1 5

<210> 34
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 34

Leu Glu Gln Gly Glu Asn Val Phe Leu Gln Ala Thr Asp Lys
 1 5 10

<210> 35
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 35

Phe Gln Ser Val Phe Thr Val Thr Arg
 1 5

<210> 36
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 36

Gln Thr His Gln Pro Pro Ala Pro Asn Ser Leu Ile Arg
 1 5 10

<210> 37
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 37

Phe Asn Ala Val Leu Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asp Thr Ser Thr
 1 5 10 15

Gly Lys

<210> 38
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 38

Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Ala Ser His Thr Ala Asn
 1 5 10 15

Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg
20

<210> 39
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Macaca fascicularis

<400> 39

Val Val Thr Phe Cys Gly His Thr Ser Lys
1 5 10

<210> 40
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Macaca fascicularis

<400> 40

Thr Asn Gln Val Asn Ser Gly Gly Val Leu Leu Arg
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Модифицированный пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (5)
<223> Карбамидометилирование

<400> 41

Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr Thr Asn Lys
1 5 10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения концентрации C1q в образце крови, включающий:

(1) приведение образца крови в контакт с трипсином с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в образце крови, где по меньшей мере один пептидный фрагмент имеет аминокислотную последовательность QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); и

(2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (МВР-МС) для измерения содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q из стадии (1) путем сравнения сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептиду C1q, полученного с помощью МВР-МС, со стандартной кривой,

причем содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q из стадии (1) определяет концентрацию C1q в образце крови.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что стандартную кривую получают с применением способа, включающего:

(а) приготовление по меньшей мере двух стандартов концентрации C1q путем смешивания известных количеств очищенного белка C1q и сыворотки, истощенной по C1q;

(b) добавление к по меньшей мере двум стандартам концентрации C1q по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента, где по меньшей мере один пептидный фрагмент имеет аминокислотную последовательность QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36);

(c) приведение по меньшей мере двух меченых стандартов концентрации C1q в контакт с трипсином с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q, имеющего аминокислотную последовательность QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36);

(d) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций для определения интенсивности сигнала, который соответствует по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, и интенсивности сигнала, который соответствует по меньшей мере одному меченому синтетическому пептидному фрагменту, в каждом из по меньшей мере двух меченых стандартов концентрации C1q; и

(e) определение стандартной кривой с применением сигналов и известных количеств белка C1q.

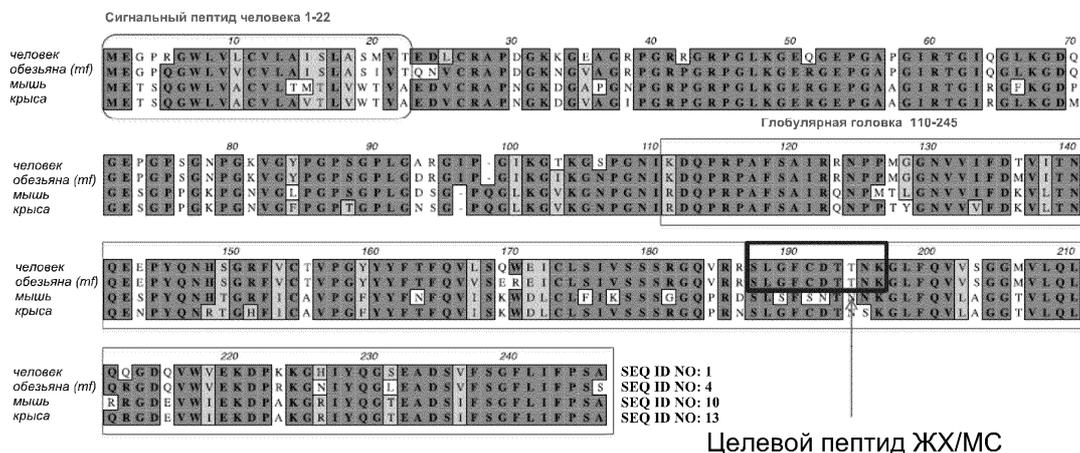
3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что образец крови представляет собой образец сыворотки.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором образец крови представляет собой человеческий образец или образец примата, отличного от человека.

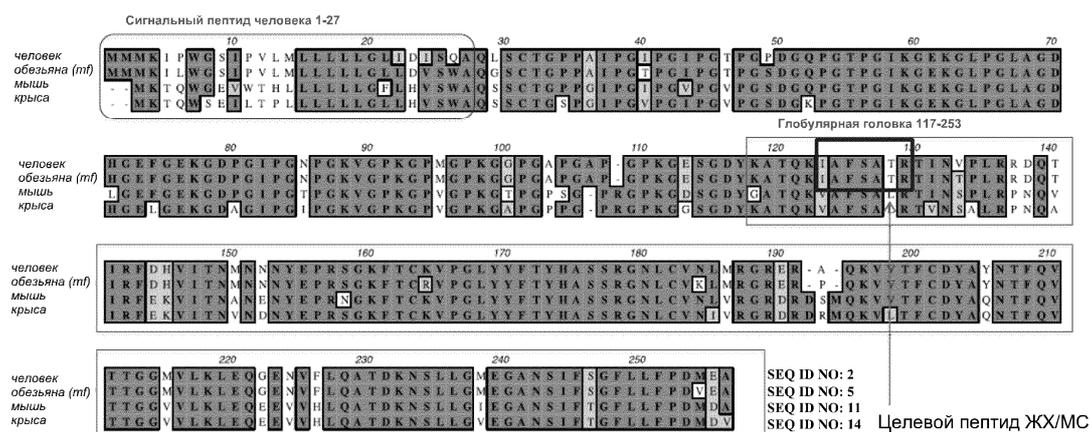
5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что масс-спектрометрия с мониторингом выбранных реакций представляет собой ЖХ-МВР-МС/МС.

6. Композиция для использования в способе по любому из пп.1-5, содержащая по меньшей мере один выделенный синтетический пептид с аминокислотной последовательностью QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36).

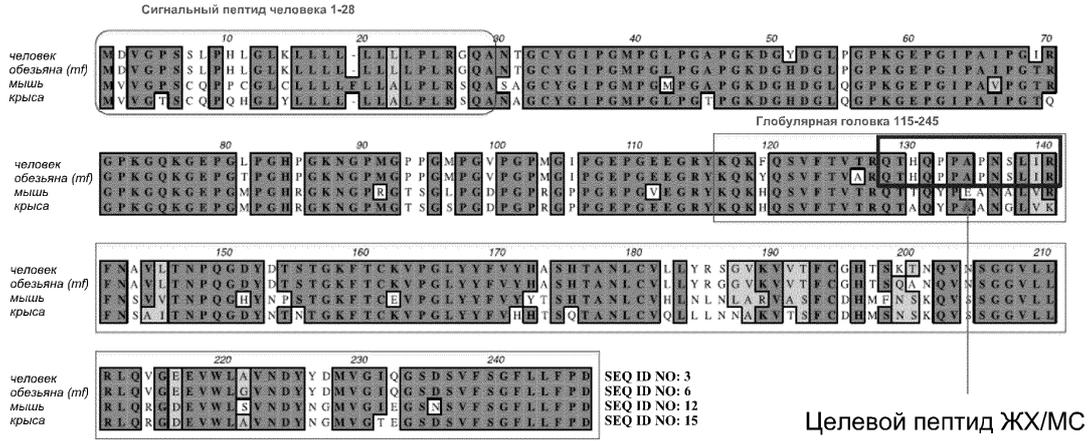
7. Композиция для использования по п.6, отличающаяся тем, что по меньшей мере один выделенный синтетический пептид содержит метку.



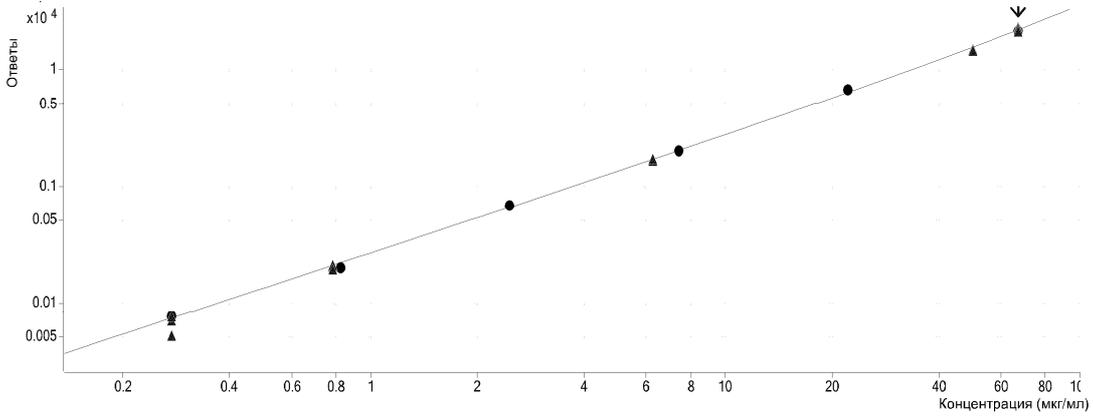
Фиг. 1



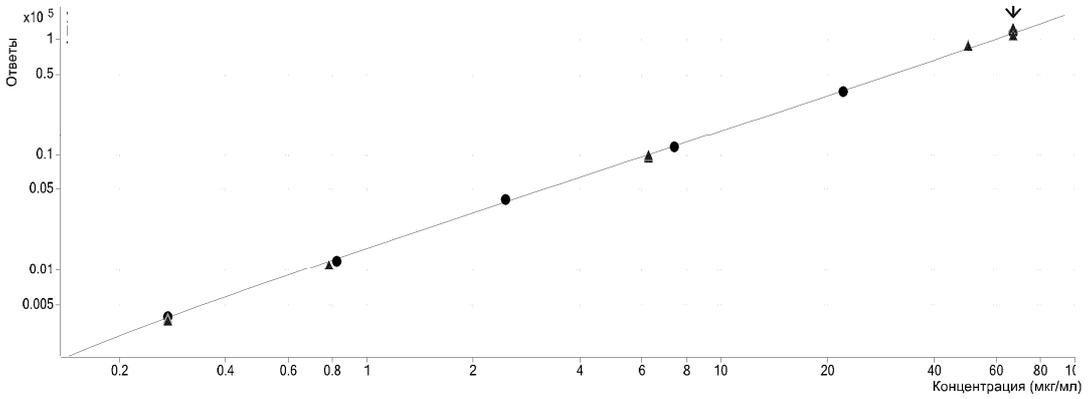
Фиг. 2



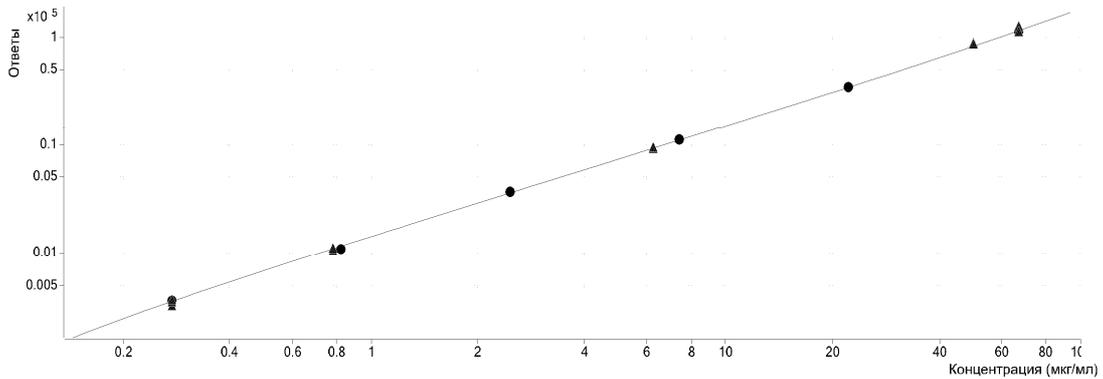
Фиг. 3



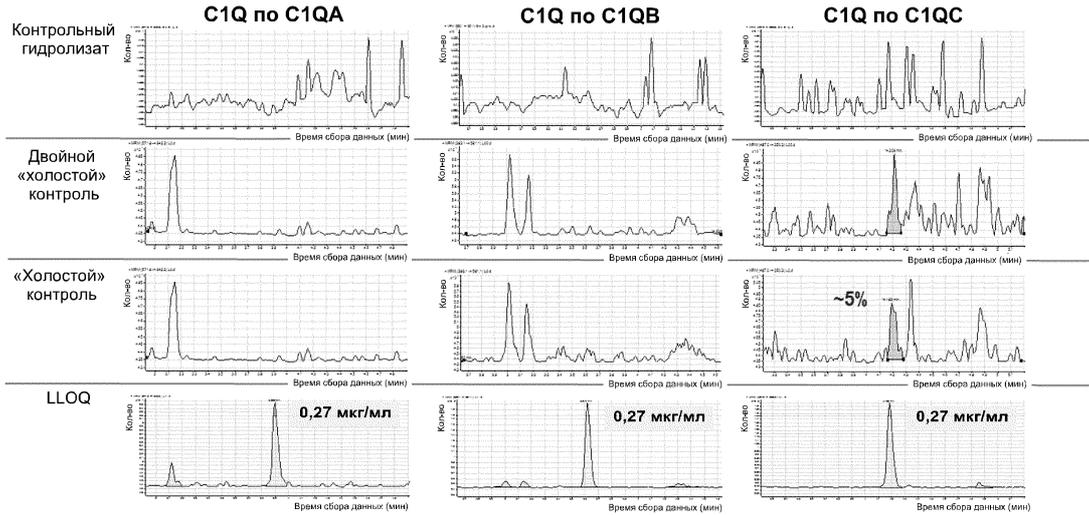
Фиг. 4



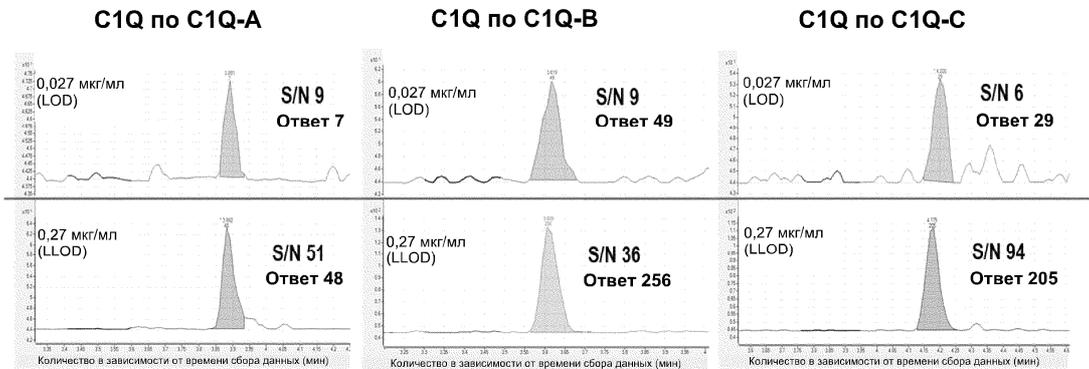
Фиг. 5



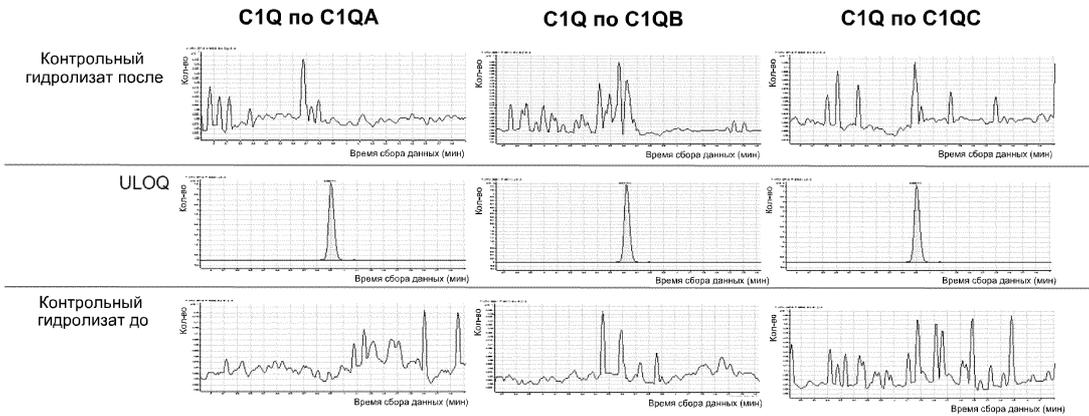
Фиг. 6



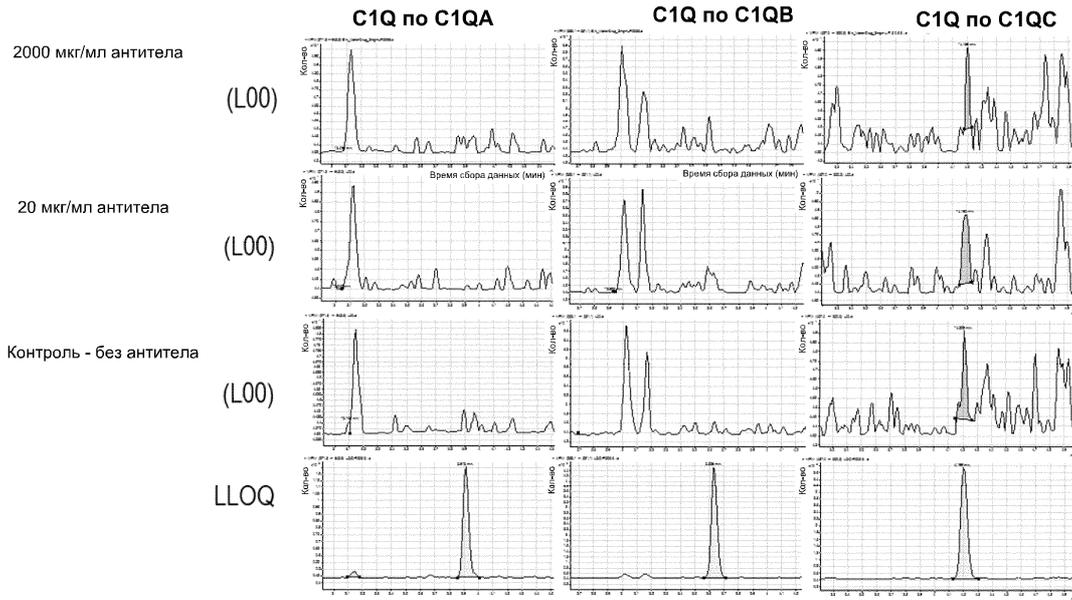
Фиг. 7



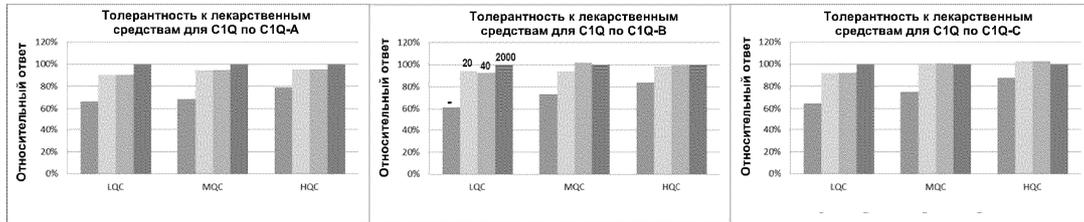
Фиг. 8



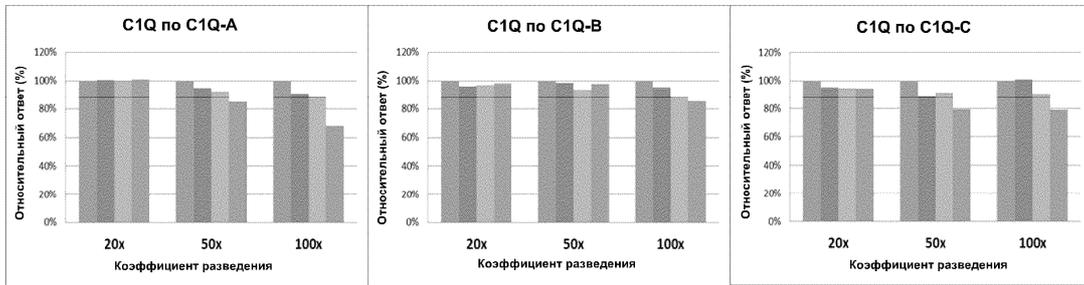
Фиг. 9



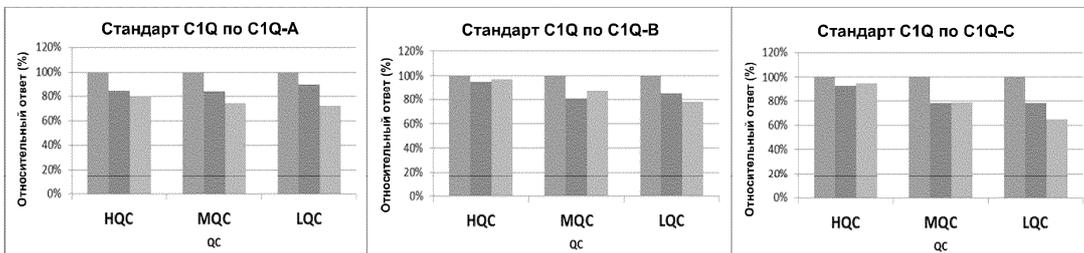
Фиг. 10



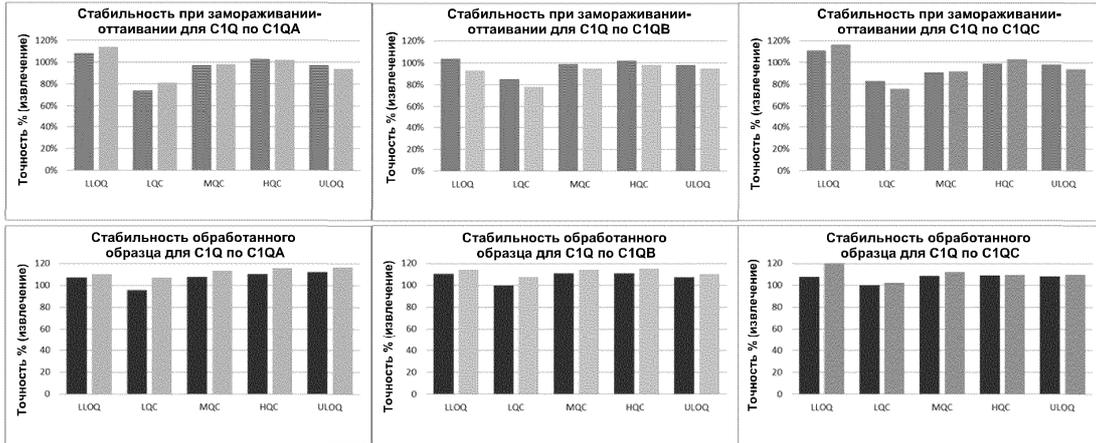
Фиг. 11



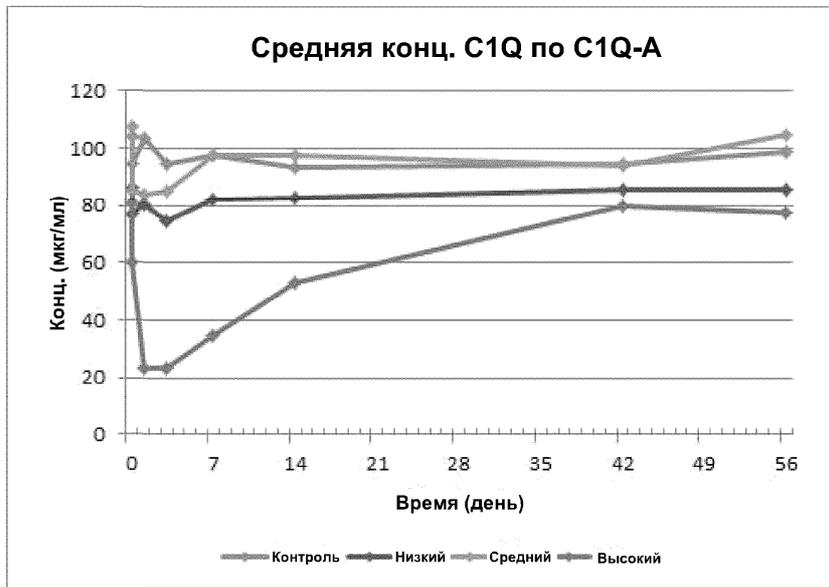
Фиг. 12



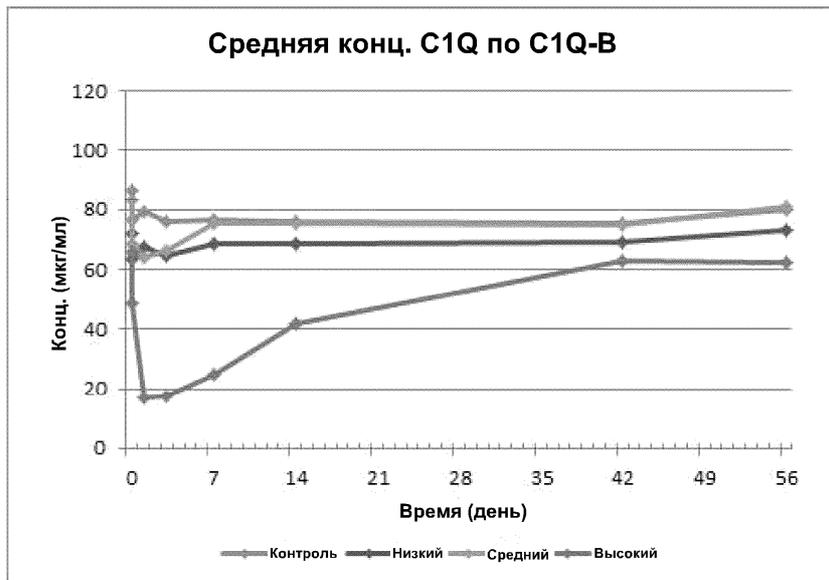
Фиг. 13



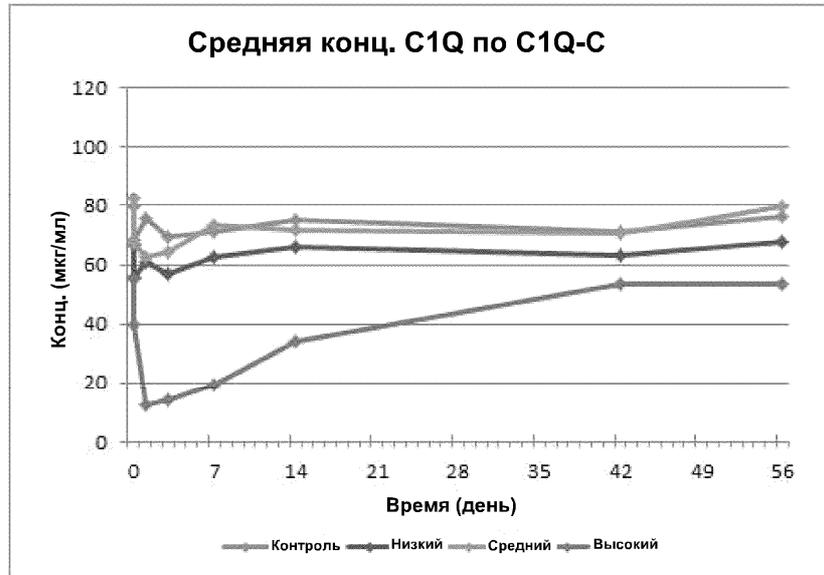
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

