



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **84387** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**
A61K 38/00
C07K 14/52 (2006.01)
C12N 15/19

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ЛЮДСЬКИЙ ЦИТОКІН ЯК ЛІГАНД ЗАЛЬФА РЕЦЕПТОРА І ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ

1

(21) 2001106769
(22) 09.03.2000
(24) 27.10.2008
(86) PCT/US00/06067, 09.03.2000
(31) 09/264,908
(32) 09.03.1999
(33) US
(31) 09/265,992
(32) 11.03.1999
(33) US
(31) 60/142,013
(32) 01.07.1999
(33) US
(46) 27.10.2008, Бюл.№ 20, 2008 р.
(72) НОВАК ДЖУЛІЯ Е., ПРЕСНЕЛЛ СКОТТ Р., СПРІЧЕР СІНДІ А., ФОСТЕР ДОНАЛЬД К., ХОЛЛІ РІЧАРД Д., ГРОСС ДЖЕЙН А., ДЖОНСТОН ЖАНЕТ В., НЕЛСОН ЕНДРЮ ДЖ., ДІЛЛОН СТЕЙСІ Р., ХЕММОНД АНДЖЕЛА К.
(73) ЗАЙМОДЖЕНЕТИКС, ІНК.
(56) EMBL Database, Heidelberg, FRG Emest_Rod1 accession number AA764063 28 January 1998 MARRA, M. ET AL.: "w09e02.r1 Soares 2NbMT Mus musculus cDNA clone IMAGE:1243322 5', mRNA sequence" XP002145351.
PARRISH, J. ET AL.: "Cloning, expression analysis, genomic localization, and functional characterization of a novel Class I cytokine receptor expressed in cells of lymphoid origin" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 65, no. 4, 19 October 1999 (1999-10-19), page A378 XP000881702.
(57) 1. Виділений поліпептид, який має послідовність амінокислотних залишків, які щонайменше на 90 % ідентичні залишкам від 41 (Gln) до 148 (Ile), що показані послідовністю SEQ ID NO: 2, причому залишком у позиції 44 є Asp, залишком у позиції 47 є Asp, а залишком у позиції 135 є Glu, і який зв'язує рецептор, показаний послідовністю SEQ ID NO: 115.
2. Виділений поліпептид за п. 1, в якому амінокислотними залишками 71, 78, 122 та 125 є цистеїн.
3. Виділений поліпептид, який має послідовність амінокислотних залишків, які щонайменше на 95 % ідентичні залишкам від 41 (Gln) до 148 (Ile), що показані послідовністю SEQ ID NO: 2, і який зв'язує

2

рецептор, показаний послідовністю SEQ ID NO: 115.

4. Виділений поліпептид, який має послідовність амінокислотних залишків, які ідентичні залишкам від 41 (Gln) до 148 (Ile), що показані послідовністю SEQ ID NO: 2, і який зв'язує рецептор, показаний послідовністю SEQ ID NO: 115.

5. Виділений поліпептид, який має послідовність амінокислотних залишків, які щонайменше на 90 % ідентичні залишкам від 32 (Gln) до 148 (Ile), що показані послідовністю SEQ ID NO: 2.

6. Виділений поліпептид, який має послідовність амінокислотних залишків, які щонайменше на 95 % ідентичні залишкам від 32 (Gln) до 148 (Ile), що показані послідовністю SEQ ID NO: 2.

7. Виділений поліпептид, який має послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептиди, охарактеризовані в пп. 1, 3, 4, 5 або 6.

8. Експресійний вектор, що містить такі оперативно зв'язані елементи:

промотор транскрипції;
сегмент ДНК, охарактеризований в п. 1, і термінатор транскрипції.

9. Культивована клітина, що містить експресійний вектор, охарактеризований в п. 8.

10. Виділений поліпептид, що має послідовність амінокислотних залишків, яку показано послідовністю SEQ ID NO: 2 від залишку 32 (Gln) до залишку 162 (Ser) або послідовністю SEQ ID NO: 56 (миші) від залишку 23 (Gln) до залишку 146 (Ser).

11. Виділений поліпептид за п. 10, в якому послідовність амінокислотних залишків, показана послідовністю SEQ ID NO: 2, складається з залишків від 1 (Met) до 162 (Ser), а показана послідовністю SEQ ID NO: 56 (миші), складається з залишків від 1 (Met) до 146 (Ser).

12. Виділений поліпептид, що містить щонайменше 10 суміжних амінокислотних залишків послідовності SEQ ID NO: 2.

13. Виділений поліпептид за п. 12, в якому амінокислотні залишки вибрані з групи, яка складається з:

амінокислотних залишків 41-56 послідовності SEQ ID NO: 2; амінокислотних залишків 69-84 послідовності SEQ ID NO: 2; амінокислотних залишків 92-

C2
(13)

84387
(11)

UA
(19)

105 послідовності SEQ ID NO: 2 та амінокислотних залишків 135-148 послідовності SEQ ID NO: 2.

14. Конденсований білок, що включає щонайменше чотири поліпептиди, причому порядок поліпептидів від N-кінця до C-кінця такий:

перший поліпептид, що включає послідовність амінокислотних залишків від 41 до 56 послідовності SEQ ID NO: 2;

перший спейсер з амінокислотних залишків 6-27;

другий поліпептид, що включає послідовність амінокислотних залишків, вибрану з групи, що складається з:

залишків IL-2-спіралі B 53-75 послідовності SEQ ID NO: 111;

залишків IL-4-спіралі B 65-83 послідовності SEQ ID NO: 112;

залишків IL-15-спіралі B 84-101 послідовності SEQ ID NO: 113;

залишків GMCSF-спіралі B 72-81 послідовності SEQ ID NO: 114 та

амінокислотних залишків 69-84 послідовності SEQ ID NO: 2;

другий спейсер з амінокислотних залишків 5-11;

третій поліпептид, що включає послідовність амінокислотних залишків, вибраних з групи, що складається з:

залишків IL-2-спіралі C 87-99 послідовності SEQ ID NO: 111;

залишків IL-4-спіралі C 95-118 послідовності SEQ ID NO: 112;

залишків IL-15-спіралі C 107-119 послідовності SEQ ID NO: 113;

залишків GMCSF-спіралі C 91-102 послідовності SEQ ID NO: 114 та

амінокислотних залишків 92-105 послідовності SEQ ID NO: 2;

третій спейсер з амінокислотних залишків 3-29; та четвертий поліпептид, що включає послідовність амінокислотних залишків, вибрану з групи, що складається з:

залишків IL-2-спіралі D 103-121 послідовності SEQ ID NO: 111;

залишків IL-15-спіралі D 134-157 послідовності SEQ ID NO: 112;

залишків IL-4-спіралі D 134-160 послідовності SEQ ID NO: 113;

залишків GMCSF-спіралі D 120-131 послідовності SEQ ID NO: 114 та

амінокислотних залишків 135-148 послідовності SEQ ID NO: 2.

15. Виділена полінуклеотидна молекула, що має послідовність нуклеотидів, які кодують поліпептид, охарактеризований в п. 1.

16. Виділена полінуклеотидна молекула за п. 15, в якій нуклеотиди показано послідовністю SEQ ID NO: 1 від нуклеотиду 167 до нуклеотиду 490 або послідовністю SEQ ID NO: 3 від нуклеотиду 121 до нуклеотиду 444.

17. Виділена полінуклеотидна молекула, що має послідовність нуклеотидів, які кодують поліпептид, охарактеризований в п. 13.

18. Виділена полінуклеотидна молекула, що має послідовність нуклеотидів, які кодують поліпептид, який є таким, що показаний послідовністю SEQ ID NO: 2 від залишку 32 до залишку 162 або

послідовністю SEQ ID NO: 56 від залишку 23 до залишку 146.

19. Виділена полінуклеотидна молекула за п. 18, в якій нуклеотиди є такими, що показані послідовністю SEQ ID NO: 1 від нуклеотиду 140 до нуклеотиду 532 або послідовністю SEQ ID NO: 3 від нуклеотиду 94 до нуклеотиду 486.

20. Виділена полінуклеотидна молекула, що має послідовність нуклеотидів, які кодують поліпептид, який є таким, що показаний послідовністю SEQ ID NO: 2 від залишку 1 до залишку 162 або послідовністю SEQ ID NO: 56 від залишку 1 до залишку 146.

21. Виділена полінуклеотидна молекула за п. 20, в якій нуклеотиди є такими, що показані послідовністю SEQ ID NO: 1 від нуклеотиду 47 до нуклеотиду 532 або послідовністю SEQ ID NO: 3 від нуклеотиду 1 до нуклеотиду 486.

22. Спосіб виготовлення антитіла до поліпептиду ліганду α 1, що включає:

щеплення тварини поліпептидом, вибраним з групи, що включає:

поліпептид, який складається з 9 до 131 амінокислоти, причому поліпептид є ідентичним суміжній послідовності з амінокислотних залишків SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 32 (Gln) до амінокислоти за номером 162 (Ser);

поліпептид, охарактеризований в п. 1;

поліпептид, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 41 (Gln) до амінокислоти за номером 148 (Ile);

поліпептид, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 41 (Gln) до амінокислоти за номером 56 (Val);

поліпептид, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 69 (Thr) до амінокислоти за номером 84 (Leu);

поліпептид, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 92 (Asn) до амінокислоти за номером 105 (Arg);

поліпептид, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 135 (Glu) до амінокислоти за номером 148 (Ile);

поліпептид, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72;

поліпептид, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 73;

поліпептид, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 32 (Gln) до амінокислоти за номером 162 (Ser);

поліпептид, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 1 (Met) до амінокислоти за номером 162 (Ser);

поліпептид, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 1 до амінокислоти за номером 119;

поліпептид, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 101 до амінокислоти за номером 105;

поліпептид, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 126 до амінокислоти за номером 131;

поліпептид, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 113 до амінокислоти за номером 118;

поліпептид, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 2 від амінокислоти за номером 158 до амінокислоти за номером 162; і при цьому поліпептид викликає імунну реакцію у тварин для продукування антитіл; та виділення антитіла з тварини.

23. Антитіло, продуковане способом за п. 22, яке специфічно зв'язується з поліпептидом ліганду zalpha1.

Проліферація та диференціація клітин багато-клітинних організмів регулюються гормонами та поліпептидними факторами росту. Ці здатні до дифузії молекули дозволяють клітинам спілкуватися одна з одною та діяти у згоді з утворенням клітин, тканин та органів та відновлення пошкодженої тканини. Приклади гормонів та факторів росту включають стероїдні гормони (наприклад, естроген, тестостерон), паратиреоїдний гормон, стимулюючий фолікули гормон, інтерлейкіни, похідний з тромбоцитів фактор росту (PDGF), епідермальний фактор росту (EGF), стимулюючий колонії гранулоцитів-макрофагів фактор (GM-CSF), еритропоетин (EPO) та кальцитонін.

Гормони та фактори росту впливають на метаболізм клітин приєднанням до рецепторів. Рецептори можуть бути інтегрованими з мембраною білками, що зв'язані з шляхом сигналізації у клітині, як-то вторинні системи переносу. Іншими класами рецепторів є розчинні молекули, як-то фактори транскрипції.

Цитокіни загалом стимулюють проліферацію або диференціацію клітин кровотворної лінії диференціювання або приймаючих участь у механізмах імунної та запальної реакцій організму. Прикладами цитокінів, що впливають на кровотворення, є еритропоетин (EPO), що стимулює розвиток червоних клітин крові, тромбопоетин (TPO), що стимулює розвиток клітин лінії диференціювання мегакаріоцитів; та стимулюючий колонії гранулоцитів-макрофагів фактор (G-CSF), що стимулює розвиток нейтрофілів. Ці цитокіни є корисними при відновленні нормальних рівнів клітин крові у пацієнтів, що потерпають від анемії, тромбоцитопенії та нейтропенії чи застосуванні хімотерапії проти раку.

Інтерлейкіни є родиною цитокінів, що опосередковують імунні реакції, включаючи запалення. Інтерлейкіни опосередковують множинність запальних патологій. Центральними в імунній реакції є Т-клітини, що продукують багато цитокінів та адаптивний імунітет до антигенів. Цитокіни, продуковані Т-клітинами, класифіковані як типи 1 та 2 [Kelso, A. *Immun. Cell Biol.* 76:300-317, 1998]. Цитокіни типу 1 включають IL-2, IFN- γ , LT- α , та є включеними у реакції запалення, імунітет до вірусів, імунітет до внутрішньоклітинних паразитів та відторгнення алотрансплантатів. Цитокіни типу 2 включають IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 та IL-13, та є включеними у гуморальні реакції, імунітет до глистів та алергічну реакцію. Цитокіни, що належать до типів 1 та 2 включають IL-3, GM-CSF та TNF- α . Є деякі свідчення, що означають, що тип 1 та тип 2, які продукують популяції Т-клітин, преференційно мігрують до запалених тканин різних типів.

Зрілі Т-клітини можуть бути активованими, наприклад, антигеном чи іншими стимулами для продукування, наприклад, цитокінів, біохімічних сигнальних молекул або рецепторів, що крім того впливають на долю популяції Т-клітин.

В-клітини можуть бути активованими через рецептори на поверхні клітин, включаючи рецептор В-клітин та інші допоміжні молекули для виконання інших допоміжних функцій клітин, як-то продукування цитокінів.

Нативні кілерні (NK) клітини мають спільний клітинний попередник з Т-клітинами та В-клітинами і грають роль в імунному нагляді. NK-клітини, що включають до 15% лімфоцитів крові, не експресують антигенні рецептори, а тому не використовують МНС-розпізнавання, яке потрібне для приєднання до клітин-мішеней. NK-клітини є включеними у розпізнавання та знищення клітин деяких пухлин та інфікованих вірусами клітин. *In vivo*, NK-клітини, можна думати, потребують активації, однак, *in vitro*, NK-клітини виявили здатність знищувати деякі типи клітин пухлин без активації.

Продемонстрована *in vivo* активність родини цитокінів ілюструє величезний клінічний потенціал та необхідність у інших цитокінах, агоністах цитокінів, та антагоністах цитокінів. Представлений винахід спрямований на цю потребу забезпеченням нового цитокіну, що стимулює клітини кровотворної лінії диференціювання клітин, а також відповідних композицій та способів.

Згідно з винаходом запропоновано такі поліпептиди для цього та інших використань, що фахівці повинні зрозуміти з наведених тут пояснень.

Фігура є ілюстрацією складової укладки IL-2 людини, IL-15 людини, ліганду zalpha11 (SEQ ID NO: 2), IL-4 людини, IL-4 миші, GM-CSF людини та GM-CSF миші.

До детального опису винаходу може бути корисним для розуміння визначити наступні терміни:

Термін "афінна мітка" використано для позначення пептидного сегменту, що може бути приєднаним до поліпептиду для забезпечення очистки чи детектування поліпептиду, або забезпечення сайтів для приєднання поліпептиду до субстрату. В принципі, будь-який пептид або білок, для яких є антитіло або інший специфічний зв'язувальний засіб, можна використовувати як афінну мітку. Афінні мітки включають поліглістидинову ділянку, протеїн А [Nilsson et al., *EMBO J.*, 4:1075, 1985; Nilsson et al, *Methods Enzymol.* 198:3, 1991], глутатіон-8-трансферазу [Smith and Johnson, *Gene* 67:31, 1988], субстанцію P, пептид Flag™ [Hopp et al., *Biotechnology* 6: 1204-10, 1988; доступний від Eastman Kodak Co., New Haven, CT], зв'язуючий стрептавідин пептид, або інший антигенний епітоп

або зв'язувальний домен. [Дивися взагалі, Ford et al., Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991]. ДНК, що кодує афінні мітки, доступні від комерційних постачальників (наприклад, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Термін "алельна варіація" використано для позначення будь-якого з двох чи більше альтернативних форм гена, що займає той же самий хромосомний локус. Алельна варіація в природі відбувається внаслідок мутацій і може призводити до фенотипового поліморфізму в популяції. Генні мутації можуть бути мовчазними (тобто без зміни кодованого поліпептиду), або можуть кодувати поліпептид, що має змінену амінокислотну послідовність. Термін "алельний варіант" використано тут також для позначення кодованого алельним варіантом гена білку. Включено також такий же білок від того ж виду, який відрізняється від посиляльної амінокислотної послідовності внаслідок алельної варіації. Алельна варіація стосується природно існуючих відмінностей серед осіб в генах, що кодують даний білок.

Терміни "аміно-закінчення" та "карбокси-закінчення" використано тут для позначення позицій у поліпептиді та білку. Коли дозволяє контекст, ці терміни використовують з посиланням на конкретну послідовність або частину поліпептиду чи білку для позначення наближеності чи відносної позиції. Наприклад, певна послідовність, що розташована карбокси-термінально стосовно посиляльної послідовності у білку, розташована поблизу карбокси-закінчення посиляльної послідовності, але не обов'язково на карбокси-закінченні повного білку.

Термін "комплементарна/анти-комплементарна пара" використано тут для позначення неідентичних груп, що утворюють нековалентно асоційовану стабільну пару в прийнятних умовах. Наприклад, біотин та авідин(або стрептавідин) є прототиповими членами комплементарної/анти-комплементарної пари. Інші приклади комплементарних/анти-комплементарних пар включають пари рецептор/ліганд, пари антитіло/антиген (або гаптен чи епітоп), пари сенсорних/антисенсорних полінуклеотидів тощо. Коли бажана наступна дисоціація комплементарної/анти-комплементарної пари, комплементарна/анти-комплементарна пара переважно має спорідненість до зв'язування менше 10^{-9} M.

Термін "комплемента полінуклеотидних молекул" використано тут для позначення полінуклеотидної молекули, що має комплементарну послідовність основ та зворотну орієнтацію у порівнянні з посиляльною послідовністю, наприклад, послідовність 5' ATGCACGGG 3' є комплементарною стосовно 5' CCCGTGCAT 3'.

Термін, "вироджена нуклеотидна послідовність" використано тут для позначення послідовності нуклеотидів, що включає один чи більше вироджених кодонів (у порівнянні з посиляльною полінуклеотидною молекулою, що кодує поліпептид). Вироджені кодони включають відмінні триплети нуклеотидів, але кодують той же самий амінокислотний залишок (тобто, триплети GAU та GAC, кожен, кодує Asp).

Термін "експресійний вектор" використано тут для позначення молекули ДНК, лінійної чи циклічної, що містить сегмент, який кодує потрібний поліпептид, що оперативно зв'язаний з додатковими сегментами, які забезпечують її транскрипцію. Такі додаткові сегменти можуть включати промоторні та термінаторні послідовності та, як варіант, один чи більше початків реплікації, один чи більше придатних для селекції маркерів, енхансер, поліаденілаційний сигнал тощо. Експресійні вектори звичайно походять з плазмід чи вірусної ДНК, або можуть містити елементи обох.

Термін "виділений" при застосуванні до полінуклеотиду, позначає, що полінуклеотид видалено з його природного генетичного середовища, і тому він позбавлений інших чужинних чи небажаних кодуєчих послідовностей та існує у формі, що придатна для використання в генно-інженерній системі продукування білку. Такі виділені молекули є тими, що видалено з їх природного середовища, і включають кДНК та геномні клони. Виділені молекули ДНК згідно з винаходом позбавлені інших генів, з якими вони звичайно спряжені, але можуть включати природно існуючі 5' та 3' нетрансльовані регіони, як-то промотори та термінатори. Ідентифікація спряжених регіонів зрозуміла пересічним фахівцям [дивися, наприклад, Duna and Tijan, Nature 316:774-78. 1985].

"Виділений" поліпептид або білок є поліпептидом або білком, що отримано у відмінному від природного середовища, як-то поза кров'ю та тканиною тварини. У кращій формі виділений поліпептид по суті позбавлений інших поліпептидів, зокрема інших поліпептидів тваринного походження. Краще забезпечувати поліпептиди у високоочищеній формі, тобто з чистотою більше 95%, краще з чистотою більше 99%. При використанні в цьому контексті термін "виділений" не виключає присутність такого поліпептиду в альтернативних фізичних формах, як-то димери чи альтернативно глікозиловані або дериватизовані форми.

Термін "стосуються пухлин", при застосуванні до клітин, означає клітини, що піддалися новій та аномальній проліферації, зокрема у тканині, де проліферація є неконтрольованою та прогресуючою, що призводить до новоутворення. Клітини, що стосуються пухлин, можуть бути злоякісними, тобто інвазивними та метастатичними, або доброякісними.

Термін "оперативно зв'язаний" при застосуванні до нуклеотидних сегментів свідчить, що сегменти розташовано так, що вони функціонують у злагоді для їх цільового призначення, наприклад, транскрипція починається на промоторі та продовжується через кодуєчий сегмент до термінатора.

Термін "ортолог" позначає поліпептид або білок, що отримані від одного виду, який є функціональним аналогом поліпептиду або білку від відмінних видів. Відмінності послідовностей серед ортологів є результатом видоутворення.

"Паралоги" є відмінними, але структурно спорідненими білками, що виробляються організмом. Паралоги є, можна думати, виникають внаслідок подвоєння гена. Наприклад, α -глобін, β -глобін, та міоглобін є паралогами один одного.

Полінуклеотид - одно- чи дволанцюговий полімер дезоксирибонуклеотидних чи рибонуклеотидних основ при зчитуванні від 5' до 3' кінця. Полінуклеотиди включають РНК та ДНК і можуть бути виділені з природних джерел, синтезованими *in vitro*, або виготовленими з комбінації природних та синтетичних молекул. Розмір полінуклеотидів виражають як число пар основ (скорочено "по"), нуклеотидів ("нт"), або кілооснов ("ко"). Коли дозволяє контекст, останні два терміни можуть описувати полінуклеотиди, що є одно- чи дволанцюговими. Коли термін застосовано до дволанцюгових молекул, його використовують для позначення повної довжини і зрозуміло, що він еквівалентний терміну "пара основ". Фахівцям зрозуміло, що два ланцюга дволанцюгового полінуклеотиду можуть трохи відрізнятися за довжиною і що їх кінці можуть бути розташовані ступінчасто в результаті розщеплення ферментами, отже не всі нуклеотиди у дволанцюговому полінуклеотиді можуть бути спареними.

"Поліпептид" є полімером з'єднаних пептидними зв'язками амінокислотних залишків, що продукований природно чи синтетично. Поліпептиди менше приблизно 10 амінокислотних залишків звичайно позначають як "пептиди".

Термін "промотор" використано тут для позначення частини гена, що має послідовність ДНК, яка забезпечує приєднання РНК-полімерази та початок транскрипції. Промоторна послідовність звичайно, але не завжди, знаходиться у 5' некодируючих регіонах генів.

"Білок" є макромолекулою, що містить один поліпептидний ланцюг чи більше. Білок може включати також непептидні компоненти, як-то вуглеводні групи. Вуглеводи та інші непептидні замісники можуть бути доданими до білку клітиною, в якій продукується білок, та варіюють в залежності від типу клітин. Білки позначено тут в термінах структури їх амінокислотного скелету; такі замісники, як вуглеводні групи взагалі не уточнюють однак вони можуть бути присутніми.

Термін "рецептор" позначає асоційований з клітиною білок, або поліпептидний елемент такого білку, що приєднує біоактивну молекулу ("ліганд") та опосередковує дію ліганду на клітину. Зв'язані з мембраною рецептори характеризуються мультипептидною структурою, що містить екстрацелюлярний ліганд-зв'язуючий домен та інтрацелюлярний ефекторний домен, що звичайно залучений у передачу сигналу. Приєднання ліганду до рецептору призводить до конформаційних змін в рецепторі, що призводить до взаємодії між ефекторним доменом рецептору та іншими молекулами в клітині. Ці взаємодії в свою чергу призводять до змін метаболізму клітини. Пов'язані з взаємодіями рецептор-ліганд метаболічні перетворення включають транскрипцію генів, фосфорилювання, дефосфорилювання, проліферацію клітин, посилення продукування циклічного AMP, мобілізацію клітинного кальцію, мобілізацію мембранних ліпідів, адгезію клітин, гідроліз інозитних ліпідів та гідроліз фосфоліпідів. Взагалі, рецептори можуть бути зв'язаними з мембраною, цитозольними або ядерними; мономерними (наприклад, рецептор тироїдного стимулюючого гормону, бета-адренергічний рецептор) або мультимерними (наприклад, рецептор

PDGF, рецептор гормону росту, рецептор IL-3, рецептор GM-CSF, рецептор G-CSF, рецептор еритропоєтину та рецептор IL-6).

Термін "секреторна сигнальна послідовність" позначає послідовність ДНК, що кодує поліпептид ("секреторний пептид"), який як компонент більшого поліпептиду спрямовує більший поліпептид через секреторний шлях клітини, в якій його синтезовано. Більший поліпептид звичайно розщеплюють для видалення секреторного пептиду протягом транзиту через секреторний шлях.

Термін "сплайс-варіація" використано тут для позначення альтернативних форм транскрибованої з гена РНК. Сплайс-варіація виникає природно внаслідок використання альтернативних сайтів сплайсингу у транскрибованій молекулі РНК, або рідше між окремо транскрибованими молекулами РНК, та може призводити у деяких мРНК, транскрибованих з того ж самого гена. Сплайс-варіації можуть кодувати поліпептиди, що мають змінену амінокислотну послідовність. Термін сплайс-варіації використано тут також для позначення білку, кодованого сплайс-варіацією мРНК, транскрибованої з гена.

Молекулярні маси та довжини полімерів, що визначали приблизними аналітичними способами (наприклад, гель-електрофорезом) слід розуміти як приблизні величини. Коли таку величину виражають як "приблизно" X, визначена величина X, слід розуміти, визначена з похибкою $\pm 10\%$.

Усі цитовані тут посилання вставлені як нотатки у своїй цілісності.

Представлений винахід оснований, зокрема, на відкритті нової послідовності ДНК, що кодує білок, який має структуру цитокіну з чотирьох-спіральним жмутом. У процесі клонування, досліджень проліферації та вивчення приєднання, що детально описано тут, полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептиди нового ліганду, було ідентифіковано як ліганд з високою специфічністю стосовно попередньо ізолюваного рецептору $\alpha 11$. Цей поліпептидний ліганд, позначений як ліганд $\alpha 11$, виділяли з бібліотеки кДНК, створеної з активованих клітин периферійної крові людини (hPBC), які селекували стосовно CDS. CDS є маркером клітинної поверхні, унікальним стосовно клітин лімфоїдного походження, особливо T-клітин.

У наведених далі прикладах лінія клітин, що є залежною від зв'язаного з шляхом обміну ізолюваного рецептору $\alpha 11$ для виживання та росту у відсутності інших факторів росту, використовували для скринінгу на джерело кДНК, що кодує ліганд $\alpha 11$. Кращою лінією залежних від фактору росту клітин, що використовували для трансфекції та експресії рецептору $\alpha 11$ була BaF3 [Palacios та Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986]. Однак, придатними для цього є інші лінії залежних від фактору росту клітин, як-то FDC-P1 [Hapel et al. Blood 64: 786-790, 1984], та MO7e [Kiss et al., Leukemia 7: 235-240, 1993].

Амінокислотна послідовність рецептору $\alpha 11$ свідчить, що кодований рецептор належить до класу I надродини рецепторів цитокіну, що включає, але без обмеження, рецептори JL-2, IL-4,

IL-5, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF та G-CSF [для огляду дивися, Cosman, "The Hematopoietin Receptor Superfamily" (Надродина рецепторів гематопоетину) у *Cytokine* 5(2): 95-106, 1993]. Рецептор α 11 повністю описано у загальнодоступній [Патентній заявці PCT №US99/22149]. Аналіз тканинного розподілу мРНК рецептору α 11 виявив експресію у лімфатичному вузлі, лейкоцитах периферійної крові (PBL), кістковому мозку та тимусі. Більш того, мРНК було багато у лінії клітин Раджі (ATCC №CCL-86), похідних з лімфоми Буркітта. Тканинний розподіл рецептору свідчить, що метою для передбачуваного ліганду α 11 є лінія диференціювання кровотворних клітин, зокрема попередників лімфоїдних клітин та лімфоїдних клітин. Інші відомі цитокіни з чотирьох-спіральним жмутом, що діють на лімфоїдні клітини, включають IL-2, IL-4, IL-1, та IL-15. Для огляду цитокінів з чотирьох-спіральним жмутом, [дивися, Nicola et al. *Advances in Protein Chemistry* 52:1-65, 1999 та Kelso. A., *Immunol. Cell Biol.* 76:300-317, 1998].

Кондиційовані середовища (CM) з CD3+-відібраних, стимульованих РМА/іономіцином клітин периферійної крові людини підтримували ріст клітин BaF3, що експресували рецептор α 11, а в іншому відношенні були залежними від IL-3. Кондиційовані середовища з клітин, що не були: 1) стимульованими РМА/іономіцином; або не були: 2) CD3-відібраними (зі стимуляцією РМА/іономіцином чи без неї), не підтримували ріст рецепторних клітин BaF3/ α 11. Контрольні експерименти продемонстрували, що цю проліферативну активність не можна віднести до інших відомих факторів росту, і що здатність таких кондиційованих середовищ стимулювати проліферацію експресуючих рецептор α 11 клітин можна було б нейтралізувати розчинною формою рецептору.

Проліферацію експресуючих рецептор α 11 клітин BaF3, підданих дії CM, з CD3+-вибраних, стимульованих РМА/іономіцином клітин периферійної крові людини ідентифікували візуально дослідженням культур та/або проліферацією. Багато придатних досліджень проліферації відомі в рівні техніки та включають дослідження редукції барвнику, як-то аламар-блакитний (alarBlue™) (AccuMed International, Inc. Westlake, Ohio), бромід 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліуму [Mosman, J. *Immunol. Meth.* 65: 55-63, 1983]; гідроксид 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-5-3-карбоксиметоксифеніл-2Н-тетразоліуму; 2,3-біс(2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-5-[(феніламіно)карбоніл]-2Н-тетразоліуму; та хлорид ціанодитоліл-тетразоліуму (що є комерційно доступними від Polisciences, Inc., Warrington, PA); дослідження мітогенезису, як-то вимір включення ³H-тимідину; дослідження ексклюзії барвнику, використовуючи, наприклад, нафталін-чорний або трипан-блакитний; поглинання барвнику, використовуючи діацетилфлуоресцеїн; та вивільнення хрому. [Дивися, загалом, Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3rd ed., Wiley-Liss, 1994, що включені як посилання].

Бібліотеку кДНК виготовили з CD3+-відібраних, стимульованих РМА та іономіцином первинних клітин периферійної крові людини. Біб-

ліотеку кДНК CD3+-відібраних, стимульованих РМА та іономіцином первинних клітин периферійної крові людини ділили на об'єднання, що містять набір молекул кДНК, та трансфектували у лінію клітин хазяїна, наприклад, клітин ВНК 570 (ATCC №10314). Трансфектовані клітини хазяїна культивували у середовищі, що не містить екзогенних факторів росту та збирали кондиційоване середовище. Кондиційовані середовища досліджували на здатність стимулювати проліферацію клітин BaF3, трансфектованих рецептором α 11. Об'єднання кДНК, що продукують кондиційоване середовище, що стимульоване рецепторними клітинами BaF3/ α 11, ідентифікували. Цю об'єднану плазмідну кДНК електропорували в *E. coli*. кДНК виділяли з одиничних колоній та трансфектували окремо у клітини ВНК 570. Позитивні клони ідентифікували позитивним результатом у проліфераційному дослідженні рецептору BaF3/ α 11, а специфічність визначали нейтралізацією проліферації, використовуючи розчинний рецептор α 11.

Позитивний клон виділяли, і аналіз послідовності виявив, що полінуклеотидна послідовність, яка міститься в плазмідній ДНК, була новою. Секреторна сигнальна послідовність включає амінокислотні залишки від 1 (Met) до 31 (Gly), а цілком розвинений поліпептид включає амінокислотні залишки від 32 (Gln) до 162 (Ser) (як показано послідовністю SEQ ID NO: 2).

Загалом прогнозовано, що цитокіни мають структуру з чотирьох α -спіралей зі спіралями A, C та D, що є найважливішими у взаємодіях ліганд-рецептор, та є більш високо-збереженими серед членів родини. Відносячи до ліганду α 11 людини амінокислотну послідовність, показану у SEQ ID NO:2, групування амінокислотних послідовностей ліганду α 11 людини, IL-15 людини, IL-4 людини, та GM-CSF людини, прогнозовано, що спіраль A ліганду α 11 обмежена амінокислотними залишками 41-56; спіраль B амінокислотними залишками 69-84; спіраль C амінокислотними залишками 92-105; а спіраль D амінокислотними залишками 135-148; як показано послідовністю SEQ ID NO: 2. Структурним аналізом визначено, що петля A/B є довгою, петля B/C є короткою, а петля C/D є паралельно довгою. Ця структура з петлями призводить до спіральної будови уверх-униз-униз. Цистеїнові залишки є абсолютно збереженими між лігандом α 11 та IL-15, як показано на фігурі. Цистеїнові залишки, що є збереженими між IL-15 та лігандом α 11, відповідають амінокислотним залишкам 71, 78, 122 та 125 of SEQ ID NO: 2. Збереження деяких з цистеїнових залишків, як також виявлено, у IL-2, IL-4, GM-CSF та ліганді α 11 відповідає амінокислотним залишкам 78 та 125 послідовності SEQ ID NO:2, як показано на Фігурі. Узгоджене розміщення цистеїну є подальшим підтвердженням структури з чотирьох-спіральним жмутом. Також високозбереженою у родині, що містить IL-15, IL-2, IL-4, GM-CSF та ліганд α 11 є послідовність Glu-Phe-Leu, яку показано на послідовності SEQ ID NO: 2 на залишках 136-138, як на Фігурі.

Подальший аналіз ліганду α 11, що базується на множинності групувань (як показано на

фігурі), прогнозує, що амінокислотні залишки 44, 47 та 135 (як показано послідовністю SEQ ID NO: 2) грають важливу роль у приєднанні ліганду $\alpha 11$ до його спорідненого рецептору. Більш того, передбачувана амінокислотна послідовність ліганду $\alpha 11$ миші виявляє 57% ідентичності стосовно передбачуваного білку людини. На базі порівняння між послідовностями лігандів $\alpha 11$ людини та миші добре збережені залишки знайшли у регіонах, прогнозованих як кодує альфа-спіралі A та D. Відповідні поліпептиди, що кодують поліпептидні регіони, домени, сигнальні послідовності, залишки та послідовності ліганду $\alpha 11$, що описано тут, показані послідовністю SEQ ID NO:1.

Для IL-4 та IL-2, що є високо-спорідненими з лігандом $\alpha 11$, проведено детальний мутаційний аналіз. Аналіз IL-2 миші [Zurawski et al, EMBO J. 12:5113-5119, 1993] виявляє, що залишки у спіралях A та C є важливими для приєднання до IL-2R β ; критичними залишками є Asp₃₄, Asn₉₉, та Asn₁₀₃. Багато залишків у петлі A/B та спіралі B IL-2 миші є важливими для приєднання IL-2R α , при тому, що тільки одиничний залишок, Gln₁₄₁ у спіралі D, є суттєвим для приєднання до IL-2R α . Подібно, спіралі A та C є сайтами взаємодії між IL-4 та IL-4R α (структурно подібним до IL-2R α), а залишки у спіралі D є суттєвими для взаємодії з IL-2R α [Wang et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1657-1662, 1997; Kruse et al, EMBO J. 11:3237-3244, 1992]. Зокрема, мутація з заміною Tyr₁₂₄ на Asp у IL-4 людини створює антагоніст, який приєднується до IL-4R α , але не до IL-2R α , а тому не може сигналізувати [Kruse et al. вище, 1992].

При тому, що спіраль A є відносно добре збереженою для лігандів $\alpha 11$ людини та миші, спіраль C є більш дивергентною. При тому, що обидва види мають кислі амінокислоти домінуючими у цьому регіоні, відмінності можна пояснювати специфічністю видів у взаємодії між лігандом $\alpha 11$ та його рецептором $\alpha 11$ типу "бета". Петля A/B та спіраль B ліганду $\alpha 11$ є добре збереженою для виду; і хоча ще не ідентифіковано субелементів рецептору, відповідних IL-2R α , збереження у цьому регіоні означає, що він є функці-

онально значущим. D спіралі ліганду $\alpha 11$ людини та миші є також високозбереженими. Антагоністи рецептору $\alpha 11$ можуть бути створеними мутаціями у спіралі D ліганду $\alpha 11$. Вони можуть включати усікання білку від залишку Gln₁₄₅ (SEQ ID NO: 2), або мутацію заміною Gln₁₄₅, або Ile₁₄₈ (of SEQ ID NO: 2; що відповідає Tyr₁₂₄ у IL-4 людини) на залишки, як-то Ala або Asp. Будь-яка мутація, що розщеплює спіральну структуру ліганду $\alpha 11$ може анулювати приєднання до його рецептору, а тому інгібує передачу сигналу.

Цитокіни з чотирьох-спіральною жмутом також класифікують за довжиною спіралей їх компонентів. "Довго-спіральна" форма цитокінів загалом складається зі спіралі з 24-30 залишків та включає IL-6, війковий нейротропний фактор (CNTF), лейкоїчний інгібіторний фактор (LIF) та гормон росту людини (hGH). "Коротко-спіральна" форма цитокінів загалом складається зі спіралі з 18-20 залишків та включає IL-2, IL-4 та GM-CSF. Ліганд $\alpha 11$ є, можна вважати, новим членом коротко-спіральної форми групи цитокінів. Дослідження, використовуючи CNTF та IL-6, продемонструвало, що спіраль CNTF можна замінити на еквівалентну спіраль у IL-6, порівнюючи властивості приєднання до CTNF з химерою. Отже, виявлено, що функціональні домени чотирьох-спіральних цитокінів визначають на основі структурної гомології, незалежно від ідентичності послідовностей, і вони можуть підтримувати функціональну цілісність химери [Kallen et al., J. Biol. Chem. 274:11859-11867, 1999]. Відтак, спіральні домени ліганду $\alpha 11$ будуть корисними для виготовлення химерних конденсованих молекул, особливо з іншою коротко-спіральною формою цитокінів для визначення та модулювання специфічності приєднання рецептору. Особливий інтерес представляє конденсований білок, сконструйований зі спіраллю A та/або спіраллю D, та конденсований білок, що комбінує спіральні та петельні домени від інших коротких форм цитокінів, як-то IL-2, IL-4, IL-15 та GM-CSF. Амінокислотні залишки, які містять спіралі A, B, C, та D, та петлі A/B, B/C та C/D для ліганду $\alpha 11$, IL-2, IL-4, IL-15 та GM-CSF показані у таблиці 1.

Таблиця 1

	Спіраль A	A/B Петля	Спіраль B	B/C Петля	Спіраль C	C/D Петля	Спіраль D	
Залишки ліганду $\alpha 11$	41-56	57-68	69-84	85-91	92-105	106-134	135-148	SEQ ID NO: 2
Залишки IL-2	36-46	47-52	53-75	76-86	87-99	100-102	103-121	SEQ ID NO: 111
Залишки IL-4	29-43	44-64	65-83	84-94	95-118	119-133	134-151	SEQ ID NO: 112
Залишки IL-15	45-68	69-83	84-101	102-106	107-119	120-133	134-160	SEQ ID NO: 113
Залишки GM-CSF	30-44	45-71	72-81	82-90	91-102	103-119	120-131	SEQ ID NO: 114

Згідно з винаходом запропоновано поліпептидні молекули, включаючи молекули ДНК та РНК, що кодують розкриті тут поліпептиди ліганду $\alpha 11$. Фахівці легко здогадаються, що з точки зору виродженості генетичного коду серед цих поліпептидних молекул можливі значні варіації послідовностей. SEQ ID NO:3 є виродженою послідовністю ДНК, яка охоплює усі ДНК, котрі кодують поліпептиди ліганду $\alpha 11$ з послідовністю SEQ ID NO:2. Фахівці здогадаються, що виродже-

на послідовність SEQ ID NO:3 забезпечує також усі послідовності РНК, котрі кодують SEQ ID NO:2, заміною U на T. Отже, поліпептиди, що кодують поліпептиди ліганду $\alpha 11$, що містять нуклеотиди від 1 або 97 до нуклеотиду 486 послідовності SEQ ID NO:3 та їх РНК-еквіваленти, розглянуто у представленому винаході. Таблиця 2 представляє використовувані в SEQ ID NO:3 однолітерні коди для позначення вироджених нуклеотидних позицій. "Розділення" є позначеними літерним кодом

нуклеотидами. "Комплемент" показує код для комплементарного нуклеотиду. Наприклад, код Y позначає C або T, а його комплемент R позначає A або G, A є комплементарним стосовно T, а G є комплементарним стосовно C.

Таблиця 2

Нуклеотид	Розділення	Комплемент	Розділення
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T

Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

Використовувані в SEQID NO:3 вироджені кодони, що охоплюють усі можливі кодони для певної амінокислоти, представлено в Таблиці 3.

Таблиця 3

Амінокислота	Однолітерний	Кодони	Вироджений кодон
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG 3GT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAY
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Tie	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter		TAA TAG TGA	TRR
Asn Asp	B		RAY
Glu Gln	Z		SAR
Будь-яка	X		NNM

Пересічним фахівцям зрозуміло, що у визначенні виродженого кодону введено деяку невизначеність, яка характеризує усі можливі кодони, котрі кодують кожну амінокислоту. Наприклад, вироджений кодон для серину (WSN) може, в деяких випадках, кодувати аргінін (AGR), а вироджений кодон для аргініну (MGN) може, в деяких випадках, кодувати серину (AGY). Подібне співвідношення існує між колонами, що кодують фенілаланін та лейцин. Отже, деякі полінуклеотиди, що описані виродженими послідовностями, можуть кодувати варіантні амінокислотні послідовності, фахівці зможуть легко ідентифікувати такі варіантні послідовності порівнянням з амінокислотою послідовністю SEQ ED NO: 2. Варіантні послідовності можна легко тестувати за функціональністю, як тут описано.

Пересічний фахівець зрозуміє також, що відмінні види можуть виявляти "преференційне застосування кодону". Взагалі, [дивися, Grantham,

et al., Nuc. Acids Res. 8:1893-912, 1980; Haas, et al. Curr. Biol. 6:315-24. 1996; Wain-Hobson, et al., Gene 13: 355-64, 1981; Grosjean and Fiers, Gene 18:199-209, 1982; Holm, Nuc. Acids Res. 14:3075-87, 1986; Vsemura, J. Mol. Biol. 158:573-97. 1982]. Використовуваний тут термін "преференційне застосування кодону" або "преференційні кодони" є терміном в рівні техніки, що стосується кодонів трансляції білку, що найчастіше використовуються в клітинах певного виду, отже сприяючи одному чи кільком представникам можливих кодонів, що кодують кожну амінокислоту (дивися Таблицю 3). Наприклад, амінокислоту треонін (Thr) можуть кодувати ACA, ACC, ACG, або ACT, але у клітинах ссавців ACC є найчастіше використовуваним кодоном; в інших видах, наприклад, клітинах комах, дріжджів, вірусів або бактерій преференційними можуть бути відмінні кодони Thr. Преференційні для певного виду кодони можна ввести у полінуклеотиди згідно з винаходом різними відомими в

рівні техніки способами. Введення послідовностей преференційних кодонів у рекомбінантну ДНК, наприклад, посилює продукування білку здійсненням трансляції білку ефективнішою в певних типах чи видах клітин. Тому, розкриті в SEQ ID NO:3 послідовності вироджених кодонів слугують темплатами для оптимізації експресії полінуклеотидів в різних типах та видах клітин, що звичайно використовують в рівні техніки і розкриті тут. Послідовності, що містять преференційні кодони можна тестувати та оптимізувати для експресії в різних видах, та тестувати на функціональність, як розкрито тут.

Як вищезазначено, виділені полінуклеотиди згідно з винаходом включають ДНК та РНК. Способи виділення ДНК та РНК добре відомі в рівні техніки. Загалом РНК виділяють з тканини або клітин, що продукують велику кількість ліганду *zalpha11* РНК. Such тканини та клітини ідентифікують норзерн-блотингом [Thomas, Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:5201, 1980], або скринінгом кондиційованого середовища з різних типів клітин на активність на цільових клітинах або тканині. Як тільки активність або РНК, що продукують клітини або тканина, ідентифіковано, загальну РНК можна виготовити, екстракцію гуанідином-НСІ з наступним відділенням центрифугуванням в градієнтному CsCl [Chirgwin et al., Biochemistry 18:52-94, 1979]. Полі-(A)⁺-РНК виготовляють з загальної РНК, використовуючи спосіб Aviva та Ледера [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:1408-12, 1972]. Комплементарну ДНК (кДНК) виготовляють з полі-(A)⁺-РНК, використовуючи відомі способи. Полінуклеотиди, що кодують ліганд *zalpha11*, далі ідентифікують та виділяють, наприклад, гібридизацією або PCR.

Клон повної довжини, що кодує ліганд *zalpha11*, можна отримати звичайним клонуванням. Клони комплементарної ДНК (кДНК) є кращими, хоча для деяких застосувань (наприклад, експресії у трансгенній тварині) може бути кращим використовувати геномний клон, або модифікувати клон кДНК для включення щонайменше одного геномного інтрону. Способи виготовлення кДНК та геномних клонів добре відомі та знані пересічними фахівцями і включають використання розкритої тут послідовності, або її частини для зондування або праймування бібліотеки. Експресійні бібліотеки можна зондувати антитілами до фрагментів рецептору *zalpha11*, або іншими специфічно зв'язуючими партнерами.

Полінуклеотидні послідовності розкритого тут ліганду *zalpha11* можна також використовувати як зонди або праймери для клонування 5' некодуючих регіонів гена ліганду *zalpha11*. З точки зору спостереженої для ліганду *zalpha11* тканино-специфічної експресії цей регіон гена є очікуваним для забезпечення кровотворно- та лімфоїдно-специфічної експресії. Промотерні елементи з гена ліганду *zalpha11* тому можна було б використовувати для спрямування тканино-специфічної експресії гетерологічних генів у, наприклад, трансгенній тварині або лікуємих генно терапією пацієнтах. Клонування 5' фланкуючих послідовностей також полегшує продукування білку ліганду *zalpha11* "активацією гена" як розкрито у [патенті США №5641670]. Коротше, експресію ендегенного

гена ліганду *zalpha11* у клітині змінюють вставкою у локус ліганду *zalpha11* констракту ДНК, що містить щонайменше націлюючу послідовність, регуляторну послідовність, екзон та неспарений сплайс-донорний сайт. Націлююча послідовність є некодуючою послідовністю ліганду *zalpha11*, що дозволяє гомологічну рекомбінацію констракту з ендегенним локусом ліганду *zalpha11*, причому послідовності у констракті стають оперативно з'єднаними з кодуючою послідовністю ендегенного ліганду *zalpha11*. На цьому шляху, ендегенний про-мотер ліганду *zalpha11* може бути заміненим або доповненим іншою регуляторною послідовністю для забезпечення посиленої, тканино-специфічної, або інакше регульованої експресії.

Згідно з винаходом запропоновано також аналогові поліпептиди та полінуклеотиди від іншого виду (ортологи). Ці види включають, але без обмеження, ссавців, птахів, амфібій, рептилій, риб, комах та інших членистоногих і нечленистоногих видів. Особливо цікавими є поліпептиди ліганду *zalpha11* від інших видів ссавців, включаючи поліпептиди мишей, свиней, овець, корів, собак, кішок, коней та інших приматів. Ортологи ліганду *zalpha11* людини можна клонувати, використовуючи інформацію та композиції згідно з представленим винаходом у комбінації зі звичайними способами клонування. Наприклад, кДНК можна клонувати, використовуючи мРНК, що отримано з типів тканин або клітин, які експресують ліганд *zalpha11*, як тут розкрито. Придатні джерела мРНК можна ідентифікувати зондуванням норзерн-блотів створеними з розкритих тут послідовностей зондами. Бібліотеку далі виготовляють з мРНК позитивної лінії тканин або клітин. кДНК, що кодує ліганд *zalpha11*, можна далі виділити багатьма способами, як-то зондуванням повною чи частковою кДНК людини або одним чи більше комплектами вироджених зондів на основі розкритих послідовностей. кДНК можна також клонувати, використовуючи по-лімеразну ланцюгову реакцію, або PCR [Mullis, Патент США №4683202], використовуючи праймери, створені з розкритої тут послідовності, що репрезентує ліганд *zalpha11* людини. За додатковим способом, бібліотеку кДНК можна використовувати для трансформації або трансфекції клітини хазяїна, а експресію потрібної кДНК можна детектувати антитілом до поліпептиду ліганду *zalpha11* дослідженням приєднання, або дослідженням активності. Подібні способи можна також застосовувати для виділення геномних клонів.

Полінуклеотидна послідовність мишачого ортологу ліганду *zalpha11* ідентифіковано та показано як SEQ ID NO: 55, а відповідну амінокислотну послідовність показано як SEQ ID NO: 56. Виявлено 62% ідентичності між послідовностями миші та людини у регіоні зі 124 амінокислот, що відповідає залишкам 30-153 у SEQ ID NO: 2 та залишкам 23-146 у SEQ ID NO: 56 ліганду *zalpha11*. Розвинена послідовність для ліганду *zalpha11* миші прогнозовано починається на His₁₈ (як показано послідовністю SEQ ID NO: 56), що відповідає His₂₃ (як показано послідовністю SEQ ID NO: 2) у послідовності людини. Оскільки усічена форма поліпептиду людини є активною, ймовірно, що еквівалентний по-

ліпептид ліганду *zalpha11* миші (тобто без залишків His₁₈-Pro₂₂ послідовності SEQ ID NO: 56) є активним також. Аналіз тканин виявив, що експресію ліганду *zalpha11* миші знаходять у яєчках, селезінці та тимусі.

Фахівці здогадаються, що розкрити як SEQ ID NO: 1 послідовність репрезентує одиничний алель гена людини, та що очікуються алельні варіації та альтернативний сплайсинг. Алельні варіації цієї послідовності можна клонувати зондуванням кДНК чи геномних бібліотек від різних осіб чи тканин стандартними відомими в рівні техніки способами. Алельні варіанти показаної SEQ ID NO: 1 послідовності, включаючи ті, що мають мовчазні мутації, та ті, в яких мутації призводять до змін в амінокислотній послідовності, включено до рамок винаходу, як і білки, що є алельними варіантами SEQ ID NO: 2. Створені з альтернативно сплайсованих мРНК кДНК, які зберігають властивості поліпептиду ліганду *zalpha11*, включено в рамки представленого винаходу, як і поліпептиди, що кодовані такими кДНК та мРНК. Алельні варіанти та сплайс-варіанти цих послідовностей можна клонувати зондуванням кДНК чи геномних бібліотек від різних осіб чи тканин стандартними відомими в рівні техніки способами.

Ген ліганду *zalpha11* картовано до структурного маркеру IL-2 SHGC-12342, позиціонує ліганд *zalpha11* приблизно на 180 ко від маркеру EL-2. Використання оточуючих маркери позицій гена ліганду *zalpha11* у регіоні маркеру 4q27 на інтегрованій карті LDB хромосоми 4 (The Genetic Location Database (База даних розташування генів)), University of Southampton,). Згідно з винаходом запропоновано також реагенти, що знайдуть використання при діагностиці. Наприклад, ген ліганду *zalpha11*, зонд, що містить ДНК або РНК ліганду *zalpha11* або їх субпослідовність, можна використовувати для визначення, чи присутній ген ліганду *zalpha11* у хромосомі людини, як-то хромосомі 4, або чи відбувається мутація гена. На базі анотації фрагменту геномної ДНК людини, що містить частину геномної ДНК ліганду *zalpha11* (Genbank Accession №AC007458), ліганд *zalpha11* локалізують у регіоні 4q27 хромосоми 4. Виявлені хромосомні аберації на локусі гена ліганду *zalpha11* включають, але без обмеження, анеуплоїдію, зміни числа копій гена, втрату гетерогенності (LOH), транслокації, вставки, делеції, зміни рестрикційних сайтів та перегрупування. Такі аберації можна детектувати, використовуючи полінуклеотиди представленого винаходу, застосуванням техніки молекулярної генетики, як-то аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (RFLP), аналіз коротких tandemних повторів (STR), застосовуючи техніку PCR та інших аналізів зчеплення, що відомі в рівні техніки [Sambrook et al., вище; Ausubel et al., вище; Marian, Chest 108: 255-65, 1995].

Точні відомості про позицію гена можуть бути корисними для багатьох цілей, включаючи: 1) визначення, чи є послідовність частиною існуючого контигу, та отримання додаткових оточуючих генетичних послідовностей у різних формах, як-то клонів YAC, BAC або кДНК; 2) забезпечення можливо-го кандидатного гена спадкового захворювання, який виявляє зв'язок з тим же хромосомним регіо-

ном; та 3) перехресно орієнтовану модель організмів, як-то мишей, що може допомагати при визначенні, яку функцію може мати певний ген.

Як попередньо встановлено, генні залишки ліганду *zalpha11* людини поблизу гена IL-2, що знаходиться у регіоні хромосоми 4q, яку було виявлено як маючу зв'язок зі схильністю до запальних внутрішніх захворювань (IBD) (включаючи хворобу Крона (CD) та виразковий коліт) у деяких родинах [Hampe et al. Am. J. Hum. Genet. 64: 808-816, 1999; Cho et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 7502-7507, 1998]. На додаток, ген рецептору *zalpha11* картовано до 16p11, іншого геномного регіону, що асоційований зі схильністю до CD [Hugot et al. Nature 379: 821-823, 1996; Ohmen et al., Hum. Mol. Genet.: 5: 1679-1683, 1996]. CD є хронічним запаленням кишки, з частим системним залученням; при цьому точна етіологія невідома, імунорегуляторна дисфункція, що включає нестачу толерантності до звичайних кишкових антигенів, є головним компонентом [для огляду, дивися (Braegger et al. Annals Allergy 72: 135-141, 1994; Sartor. Am. J. Gastroenterol. 92: 5S-11S, 1997)]. Кількома дослідженнями виявлено ненормальну активність NK у пацієнтів з CD [дивися, наприклад, (Egawa et al., J. Clin. Lab. Immunol. 20: 187-192, 1986; Aparicio-Pages et al. J. Clin. Lab. Immunol. 29: 119-124, 1989; van Tol et al., Scand. J. Gastroenterol. 27: 999-1005, 1992)], а також було показано дефектне утворення В-клітин пам'яті [Brogan et al., J. Clin. Lab. Immunol. 24: 69-74, 1987]. Оскільки ліганд *zalpha11* грає роль в імунній регуляції, та оскільки гени рецептору та ліганду лежать у регіонах схильності до CD, рецептор та ліганд є кандидатними генами генетичної схильності до хвороби Крона.

Визначення залучення рецептору *zalpha11* та/або ліганду *zalpha11* у патології IBD можна виконати кількома способами. Секвенсуванням екзонів з геномної ДНК можна виявити мутації кодування (включаючи мутації хибно-сенсові, несенсові та зміщення рамок), як-то секвенсуванням кДНК. Додатковою перевагою секвенсування з геномної ДНК є те, що сплайс-з'єднання також є наявними у секвенсованих фрагментах, і можна виявити аномалії сплайсингу, які можна було б не виявити у зразках кДНК, якщо наприклад, хибно сплайсовані РНК швидко вироджувалися. Визначено геномну структуру ліганду *zalpha11*. Інші способи аналізу ліганду та рецептору *zalpha11* у пацієнтів з IBD включають: (1) оцінку продукування ліганду з активованих Т-клітини від пацієнтів у порівнянні з нормальними контрольними особами (тобто біодослідженням); (2) гібридизацію *in situ* РНК рецептору *zalpha11* або ліганду *zalpha11* з сегментами запаленого кишечника від пацієнтів з IBD у порівнянні з подібними сегментами від нормальних контрольних осіб; (3) імуногістохімію на сегментах запаленого кишечника від пацієнтів з IBD у порівнянні з подібними сегментами від нормальних контрольних осіб; та (4) оцінку швидкості реагування периферійних В-клітини пацієнтів з лігандом *zalpha11*, як вимірювали дослідженням мітогенезу.

Діагностика могла би допомогти лікарям при визначенні типу захворювання та прийнятної терапії, або могла би допомогти у генетичних висно-

вах. Як такі, антитіла проти ліганду *zalpha11*, полінуклеотиди, та поліпептиди згідно з винаходом можна використовувати для визначення поліпептиду, мРНК ліганду *zalpha11*, або антитіл проти ліганду *zalpha11*, отже вони можуть слугувати маркерами та безпосередньо використовуватися для визначення генетичних захворювань або раку, як тут описано, використовуючи відомі в рівні техніки та описані тут способи. Далі, полінуклеотидні зонди ліганду *zalpha11* можна використовувати для визначення аномалії, що включає хромосому 4q27, як тут описано. Ці аномалії можна пов'язувати з захворюваннями людини, або генезисом пухлин, спонтанними абортами або іншими генетичними розладами. Отже, полінуклеотидні зонди ліганду *zalpha11* можна використовувати для визначення аномалій або генотипів, що пов'язані з цими дефектами.

Як обговорено вище, дефекти у гені ліганду *zalpha11* самі можуть бути результатом спадкового захворювання людини. Молекули представленого винаходу, як-то поліпептиди, антагоністи, агоністи, полінуклеотиди та антитіла представленого винаходу могли б допомогти при визначенні, діагностичному попередженні та лікуванні захворювань, пов'язаних з дефектом гена ліганду *zalpha11*. На додаток, полінуклеотидні зонди ліганду *zalpha11* можна використовувати для визначення алельних відмінностей між хворими або здоровими особами на хромосомному локусі ліганду *zalpha11*. Як таку, послідовності ліганду *zalpha11* можна використовувати як діагностичні у судово-діагностичному профілюванні ДНК.

Загалом способи діагностики, використовувані у аналізі генетичного зчеплювання, для визначення генної аномалії або аберації у пацієнта, відомі в рівні техніки. Більшість способів діагностики включає етапи (i) отримання генетичного зразку від потенційно хворого пацієнта, хворого пацієнта або потенційно здорового носія рецесивної алелі захворювання; (ii) продукування першого продукту реакції інкубуванням генетичного зразку з полінуклеотидним зондом ліганду *zalpha11*, причому полінуклеотид гібридуватиметься з комплементарною полінуклеотидною послідовністю, як-то у RFLP-аналізі, або інкубуванням генетичного зразку з сенсовими та антисенсовими праймерами у реакції PCR у прийнятних умовах реакції PCR; (iii) візуалізацію першого продукту реакції гелелектрофорезом та/або іншим відомим способом, як-то візуалізація першого продукту реакції полінуклеотидним зондом ліганду *zalpha11*, причому полінуклеотид гібридуватиметься з комплементарною полінуклеотидною послідовністю з першої реакції; та (iv) порівняння візуалізованого першого продукту реакції з другим продуктом контрольної реакції генетичного зразку від нормальної або контрольної особи. Відмінність між першим продуктом реакції та продуктом контрольної реакції є показником генної аномалії у потенційно хворого чи хворого пацієнта, або наявності фенотипу гетерозиготного рецесивного носія для здорового пацієнта, або наявності генетичного дефекту у пухлині від хворого пацієнта, або наявності генної аномалії в утробному плоді чи ембріоні для імплантації. Наприклад, відмінність у структурі рестрикційного

фрагменту, довжині продуктів PCR, довжині повторюваних послідовностей на генному локусі ліганду *zalpha11*, тощо, є показником генної аномалії, генетичної аберації, або алельної відмінності у порівнянні з нормальним контролем. Контролі можуть бути від неуражених членів родини, або неспоріднених осіб, залежно від тесту та придатності зразків. Генетичні зразки для використання в рамках представленого винаходу включають геномну ДНК, мРНК, та кДНК, виділені з будь-якої тканини або іншого біологічного зразку від пацієнту, як-то, але без обмеження, крові, слини, сперми, ембріональних клітин, амніотичної рідини тощо. Полінуклеотидний зонд або праймер може бути РНК або ДНК, та включатиме частину послідовності SEQ ID NO: 1, комплемент послідовності SEQ ID NO: 1, або їх РНК-еквіваленти. Такі способи аналізу виявлення генетичного зчеплювання стосовно фенотипів захворювань людини добре відомі в рівні техніки. Для посилання на способи на основі PCR у діагностиці [дивися, загалом, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), White (ed.), *PCR Protocols: Current Methods and Applications* (Humana Press, Inc. 1993), Cotter (ed.), *Molecular Diagnosis of Cancer* (Humana Press, Inc. 1996), Hanausek та Walaszek (eds.), *Tumor Marker Protocols* (Humana Press, Inc. 1998), Lo (ed.), *Clinical Applications of PCR* (Humana Press, Inc. 1998), та Meltzer (ed.), *PCR in Bioanalysis* (Humana Press, Inc. 1998)].

Мутації, пов'язані з локусом ліганду *zalpha11*, можна детектувати, використовуючи молекули нуклеїнової кислоти представленого винаходу застосуванням стандартних способів безпосереднього аналізу мутацій, як-то аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів, аналіз коротких tandemних повторень із застосуванням способів PCR, аналіз непокірливих стосовно ампліфікації мутаційних систем, визначення одноланцюгового конформаційного поліморфізму, способи розщеплення РНазою, гелелектрофорез з виродженим градієнтом, аналіз невідповідності за допомогою флуоресценції та інші відомі в рівні техніки способи генетичного аналізу [дивися, наприклад, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), Marian, Chest 108: 255 (1995), Coleman та Tsongalis. *Molecular Diagnostics* (Humana Press, Inc. 1996), Elles (ed.) *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases* (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), *Laboratory Protocols for Mutation Detection* (Oxford University Press 1996). Birren et al. (eds.), *Genome Analysis, Vol. 2: Detecting Genes* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998). Dracopoli et al. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics* (John Wiley & Sons 1998), та Richards та Ward, "Molecular Diagnostics Testing" in *Principles of Molecular Medicine*, pages 83-88 (Humana Press, Inc. 1998)]. Прямий аналіз гена ліганду *zalpha11* на мутації можна провести, використовуючи геномну ДНК осіб. Способи ампліфікації геномної ДНК, отриманої наприклад з периферичної лімфоцитів крові, добре відомі фахівцям, [дивися, наприклад, Dracopoli et al. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, сторінки 7.1.6-7.1.7 (John Wiley & Sons 1998)].

Позиції інтронів у гені ліганду *alpha11* визначали ідентифікацією геномних клонів, з наступним секвенсуванням стиків інтрон/екзон. Перший інтрон знаходиться між амінокислотними залишками 56 (Leu) та 57 (Val) у послідовності SEQ ID NO: 2, та має 115 пар основ у довжину. Другий інтрон є найбільшим, маючи 4,4 кілооснов, та знаходиться між амінокислотними залишками 68 (Glu) та 69 (Thr) у послідовності SEQ ID NO: 2. Третій інтрон має 2,6 кілооснов, та знаходиться між амінокислотними залишками 120 (Leu) та 121 (Thr) у послідовності SEQ ID NO: 2. Кінцевий інтрон, розміром 89 пар основ, знаходиться між амінокислотними залишками 146 (Lys) та 147 (Met) у послідовності SEQ ID NO: 2. Повна протяжність гена складає приблизно 8 ко.

Структура гена ліганду *alpha11* є подібною до гена IL-2 [Fujita et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 7437-7441, 1983], хоча ген ліганду *alpha11* містить один додатковий інтрон (інтрон-4). Структура короткого першого інтрону та довгого другого та третього інтронів є збереженою для обох генів, хоча ген IL-2 є, взагалі, трохи меншим (приблизно на 6 ко). Ген IL-15, з іншого боку, складається з 8 екзонів та простягається щонайменше на 34 ко [Anderson et al. *Genomics* 25: 701-706, 1995]. Отже ген ліганду *alpha11* є подібнішим за структурою до гена IL-2, ніж до гена IL-15.

За втіленнями згідно з винаходом виділені кодуєчі ліганд *alpha11* молекули нуклеїнової кислоти можуть гібридизуватися у суворих умовах з молекулами нуклеїнової кислоти, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1, з молекулами нуклеїнової кислоти, що мають нуклеотидну послідовність з нуклеотидів 47-532 послідовності SEQ ID NO: 1, або з молекулами нуклеїнової кислоти, що мають нуклеотидну послідовність, комплементарну SEQ ID NO: 1. Загалом суворі умови вибирають приблизно на 5°C нижче температури плавлення (T_m) певної послідовності при визначених іонній силі та pH.

T_m є температурою (при визначених іонній силі та pH), при якій 50% цільової послідовності гібридує з цілковито підігнаним зондом.

Спарені молекули нуклеїнової кислоти, як-то ДНК-ДНК, РНК-РНК та ДНК-РНК, можуть гібридизуватися, якщо нуклеотидні послідовності мають деякий ступінь комплементарності. Гібриди можуть допускати невідповідність пари основ у подвійній спіралі, але стабільність гібриду залежить від ступеню невідповідності. T_m невідповідного гібриду зменшується на 1°C для кожних 1-1,5% невідповідності пар основ. Варіювання суворості умов гібридизації дозволяє регулювати ступінь невідповідності, що буде наявною у гібриді. Ступінь суворості збільшується при збільшенні температури гібридизації та зменшенні іонної сили гібридизаційного буферу.

В рамках компетенції фахівців добре адаптувати ці умови для використання з певним поліпептидним гібридом. T_m для певної цільової послідовності є температурою (при визначених умовах), при якій 50% цієї послідовності гібридизується з цілковито підігнаною послідовністю зонду. Ці умови, які впливають на T_m , включають, величину та склад пар основ поліпептидного

зонду, іонну силу гібридизаційних розчинів, та наявність дестабілізуючих засобів у гібридизаційних розчинах. Для розрахунку T_m в рівні техніки відомі різні рівняння, що є специфічними для гібридів ДНК, РНК та ДНК-РНК і послідовностей поліпептидних зондів змінної довжини [дивися, наприклад, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel et al, (eds.). *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger та Kimmel (eds.), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, (Academic Press, Inc. 1987); та Wetmur, Crie. *Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 111 (1990)]. Програмне забезпечення секвенсування як-то OLIGO 6,0 (LSR; Long Lake, MN) та Primer Premier 4,0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), а також сайти в Інтернеті, є придатними інструментами для аналізу певної послідовності та розрахунку T_m на основі визначених критеріїв користувача. Такі програми можуть також аналізувати певну послідовність у визначених умовах та ідентифікувати придатні послідовності зонду. Звичайно гібридизацію довгих поліпептидних послідовностей, більше 50 пар основ, проводять при температурах приблизно на 20-25°C нижче розрахованої T_m . Для менших зондів, менше 50 пар основ, гібридизацію звичайно проводять при T_m або на 5-10°C нижче розрахованої T_m . Це дає максимальну швидкість гібридизації для гібридів ДНК-ДНК та ДНК-РНК.

Після гібридизації, молекули нуклеїнової кислоти можна промити для видалення негібризованих молекул нуклеїнової кислоти у суворих умовах, або у дуже суворих умовах. Типові суворі умови промивки включають промивку у розчині 0,5-2xSSC (розчин хлориду та цитрату натрію) з 0,1% додецилсульфатом натрію (SDS) при 55-65°C. Іншою мовою, молекули нуклеїнової кислоти, що кодують варіацію поліпептидів ліганду *alpha11*, гібридизуються з молекулою нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 (або її комплемент) у суворих умовах промивки, при яких суворість промивки є еквівалентною 0,5-2xSSC з 0,1% SDS при 55-65°C, включаючи 0,5xSSC 0,1% SDS при 55°C, або 2xSSC з 0,1% SDS при 65°C. Передічний фахівець може легко визначити еквівалентні умови, наприклад, заміщенням SSC на SSPE у розчині для промивки.

Типові дуже суворі умови промивки включають промивку у розчині 0,1-0,2xSSC з 0,1% додецилсульфатом натрію (SDS) при 50-65°C. Іншою мовою, молекули нуклеїнової кислоти, що кодують варіацію поліпептидів ліганду *alpha11*, гібридизуються з молекулою нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 (або її комплемент) у дуже суворих умовах промивки, в яких суворість промивки є еквівалентною 0,1-0,2xSSC з 0,1% SDS при 50-65°C, включаючи 0,1xSSC з 0,1% SDS при 50°C, або 0,2xSSC 0,1% SDS при 65°C.

Згідно з винаходом запропоновано також виділені поліпептиди ліганду *alpha11*, що мають по суті подібну природу послідовності поліпептидів стосовно послідовності SEQ ID NO: 2, або їх ортологи. Термін "по суті подібну природу послідовності" використано тут для позначення поліпептидів,

що мають щонайменше 70%, щонайменше 80%, щонайменше 90%, щонайменше 95%, або більше 95% ідентичності послідовності стосовно послідовностей, показаних у SEQ ID NO: 2, або їх ортологів. Представлений винахід також включає поліпептиди, що включають амінокислотну послідовність, що має щонайменше 70%, щонайменше 80%, щонайменше 90%, щонайменше 95% або більше 95% ідентичності послідовності стосовно послідовності амінокислотних залишків 1-162 або 33-162 послідовності SEQ ID NO: 2. Представлений винахід крім того включає молекули нуклеїнової кислоти, що кодують такі поліпептиди. Способи визначення проценту ідентичності описано нижче.

Представлений винахід також охоплює різні молекули нуклеїнової кислоти ліганду α 11, що можна ідентифікувати, використовуючи два критерії: визначення подібності між кодованим поліпептидом та амінокислотою послідовності SEQ ID NO: 2, та/або гібридизаційним дослідженням, як описано вище. Такі варіації ліганду α 11 включають молекули нуклеїнової кислоти: (1) що гібридизуються з молекулою нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність послідовності SEQ ID NO: 1 (або її комплемент) у суворих умовах промивки, де суворість промивки є еквівалентною 0,5-2xSSC з 0,1% SDS при 55-65°C; або (2), що кодують поліпептид, що має щонайменше 70%, щонайменше 80%, щонайменше 90%, щонайменше 95% або більше 95% ідентичності послідовності стосовно амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2. Альтернативно, варіації ліганду α 11 можна характеризувати як молекули нуклеїнової кислоти: (1), що гібридизуються з молекулою нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 (або її комплемент) у дуже суворих умовах промивки, де суворість промивки є еквівалентною 0,1-0,2xSSC з 0,1% SDS при 50-65°C; та (2), що кодують поліпептид, який має щонайменше 70%, щонайменше 80%, щонайменше 90%, щонайменше 95% або більше 95% ідентичності послідовності стосовно амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2.

Таблиця 4

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-1	6																	
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6							
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	-1	-0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5				
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

Фахівці здогадуються, що є багато встановлених, придатних для суміщення двох амінокислотних послідовностей алгоритмів. Алгоритм "FASTA" дослідження подібності Пірсона та Ліпмана (Pearson та Lipman) є придатним способом суміщення білків для виявлення кількості ідентичних ділянок, спільно використовуваних розкритою тут

амінокислотою послідовністю та амінокислотою послідовністю передбачуваної варіації ліганду α 11. Алгоритм FASTA описано [Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), та Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990)].

Коротше, FASTA, по-перше, характеризує подібність послідовності ідентичними регіонами, спільно використовуваними з'ясованою послідовністю (наприклад, SEQ ID NO: 2) та досліджуваною послідовністю, що мають або найвищу густину ідентичних ділянок (якщо величина $k_{\text{tup}} \leq 1$) або пари ідентичних ділянок (якщо $k_{\text{tup}} = 2$), без огляду на заміни, вставки, або делеції консервативних амінокислот. Десять регіонів з найвищою густиною ідентичних ділянок реєструють далі порівнянням подібності усіх спарених амінокислот, використовуючи матрицю амінокислотних заміни, а кінці регіонів "підрізають" для включення тільки тих залишків, що сприяють найвищій оцінці. Якщо є кілька регіонів з оцінкою більше "граничної" величини (розрахованої за попередньо визначеною формулою на основі довжини послідовності та величини k_{tup}), далі підрізані початкові регіони оцінюють для визначення, чи можуть регіони поєднуватися для утворення приблизного суміщення з гепами. Під кінець, найвище оцінені регіони двох амінокислотних послідовностей суміщують, використовуючи модифікацію алгоритму Needleman-Wunsch-Sellers [Needleman та Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787 (1974)], який дозволяє амінокислотні вставки та делеції. Кращими параметрами для аналізу FASTA є: $k_{\text{tup}}=1$, пенальті початку гепу 10, пенальті подовження гепу 1 та матрицю заміни=BLOSUM62. Ці параметри можна вводити у програму FASTA модифікацією файлу матриці підрахунку ("SMATRIX"), як пояснено у [додатку 2 у Pearson. Meth. Enzymol. 183: 63 (1990)].

FASTA можна також використовувати для визначення ідентичності послідовності молекул нуклеїнової кислоти, використовуючи розкриті вище співвідношення. Для порівнянь нуклеотидних послідовностей, величина k_{tup} може бути від 1 до 6, краще 3-6, найкраще 3, з установкою інших параметрів за умовчанням.

Різні поліпептиди ліганду α 11 або поліпептиди з подібною по суті природою послідовності характеризуються як такі, що мають одну чи більше заміни, делецій або вставок амінокислот. Ці зміни мають переважно другорядну природу, що є консервативними замінами амінокислот (дивися Таблицю 5) та іншими замінами, що помітно не впливають на укладку або активність поліпептидів; невеликими делеціями, звичайно 1-30 амінокислот; та аміно- або карбокси-кінцевими подовженнями, як-то аміно-кінцевим залишком метіоніну, невеликим лінкерним пептидом з приблизно 20-25 залишків, або афінною міткою. Представлений винахід, отже, включає поліпептиди з приблизно 108-216 амінокислотних залишків, що включають послідовність, що є щонайменше на 70%, краще щонайменше на 90%, ще краще на 95% або більше ідентична відповідному регіону послідовності SEQ ID NO: 2. Поліпептиди, що містять афінні мітки, можуть також включати сайт протеолітичного розщеплення між поліпептидом ліганду α 11

та афінною міткою. Кращі такі сайти включають сайти розщеплення тромбіну та сайти розщеплення фактору Ха.

Таблиця 5

Заміщення консервативних амінокислот

Основні	Аргінін Лізин Гістидин
Кислі	Глутамінова кислота Аспаргінова кислота
Полярні	Глутамін Аспаргін
Гідрофобні	Лейцин Ізолейцин Валін
Ароматичні	Фенілаланін Триптофан Тирозин
Малі	Гліцин Аланін Серин Треонін Метіонін

Можна визначити амінокислотні залишки, що включають регіони або домени, які є критичними для підтримання структурної цілісності. У цих регіонах можна визначити специфічні залишки, що будуть більш чи менш толерантними до зміни та підтримуватимуть загальну третинну структуру молекули. Способи аналізу структури послідовностей включають, але без обмеження, суміщення багатьох послідовностей з високою амінокислотою або нуклеотидною ідентичністю, схильність вторинних структур, бінарні структури, комплементарну упаковку та внутрішні полярні взаємодії [Barton, *Current Opin. Struct. Biol.* 5: 372-376, 1995 та Cordes et al., *Current Opin. Struct. Biol.* 6: 3-10, 1996]. Взагалі, при проектуванні модифікації молекул або ідентифікуванні специфічних фрагментів визначення структури супроводжуватиметься оцінюванням активності модифікованих молекул.

Зміни амінокислотної послідовності здійснюють у поліпептидах ліганду $\alpha 11$ так, щоб мінімізувати порушення структур вищого порядку, що є суттєвими для біологічної активності. Наприклад, там, де поліпептид ліганду $\alpha 11$ включає одну чи більше спіралей, зміни у амінокислотних залишках будуть зроблені так, щоб не порушити спіральну геометрію та інші компоненти молекули, де зміни у конформації послаблюють деякі критичні функції, наприклад, приєднання молекули до її партнерів по зв'язуванню, наприклад, спіралей A та D, залишків 44, 47 та 135 послідовності SEQ ID NO: 2. Вплив зміни амінокислотної послідовності можна прогнозувати, наприклад, комп'ютерним моделюванням, як розкрито вище, або визначити аналізом кристалічної структури [дивися, наприклад, Lapmorn et al., *Nat. Struct. Biol.* 2: 266-268, 1995]. Інші способи, що добре відомі в рівні техніки, порівнюють укладку варіантного білку зі стандартною молекулою (наприклад, нативного білку).

Наприклад, можна зробити порівняння цистеїнової структури у варіантних та стандартних молекулах. Мас-спектрометрія та хімічна модифікація, використовуючи відновлення та алкілування, забезпечує способи визначення цистеїнових залишків, що пов'язані дисульфідними зв'язками або є вільними від такого поєднання [Bean et al. *Anal. Biochem.* 201: 216-226, 1992; Gray, *Protein Sci.* 2: 1732-1748, 1993; та Patterson et al., *Anal. Chem.* 66: 3727-3732, 1994]. Взагалі можна вважати, що якщо модифікована молекула не має такої цистеїнової структури, як стандартна молекула, упаковка може бути ураженою. Іншим добре відомим та доступним способом виміру укладки є циркулярний дихроїзм (CD). Вимір та порівняння спектрів CD, генерованих модифікованою молекулою та стандартною молекулою є звичайними [Johnson, *Proteins* 7: 205-214, 1990]. Кристалографія є іншим добре відомим способом аналізу укладки та структури. Ядерний магнітний резонанс (NMR), картування пептидним розщепленням та епітопне картування є також добре відомими способами аналізу укладки та структурної подібності між білками та поліпептидами [Schaanan et al. *Science* 257: 961-964, 1992].

Можна створювати профіль гідрофільності за Хоплом/Вудсом послідовності білку ліганду $\alpha 11$, яку показано послідовністю SEQ ID NO: 2 [Hopp et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3824-3828, 1981; Hopp, J. *Immun. Meth.* 88: 1-18, 1986 та Triquier et al., *Protein Engineering* 11: 153-169, 1998]. Профіль оснований на ковзному шести-залишковому вікні. Внутрішні залишки G, S, та T та відкриті залишки H, Y, та W ігнорували. Наприклад, у ліганді $\alpha 11$ гідрофільні регіони включають амінокислотні залишки 114-119 послідовності SEQ ID NO: 2, амінокислотні залишки 101-105 послідовності SEQ ID NO: 2, амінокислотні залишки 126-131 послідовності SEQ ID NO: 2, амінокислотні залишки 113-118 послідовності SEQ ID NO: 2, та амінокислотні залишки 158-162 послідовності SEQ ID NO: 2.

Фахівці здогадаються, що гідрофільність або гідрофобність треба брати до уваги при конструюванні модифікацій у амінокислотній послідовності поліпептиду ліганду $\alpha 11$, щоб не порушити загальний структурний та біологічний профіль. Особливо цікавими для заміни є гідрофобні залишки, вибрані з групи, що складається з Val, Leu та Ile або з групи, що складається з Met, Gly, Ser, Ala, Tyr та Trp. Наприклад, залишки толерантні до замін можливо включають залишки 100 та 103, як показано послідовністю SEQ ID NO: 2. Цистеїнові залишки у позиціях 71, 78, 122 та 125 послідовності SEQ ID NO: 2, будуть відносно нетолерантними до замін.

Ідентичність за незамінними амінокислотами також можна визначити з аналізу подібності послідовностей IL-15, IL-2, IL-4 та GM-CSF стосовно ліганду $\alpha 11$, використовуючи способи, як-то аналіз "FASTA", що описано попередньо, регіони високої подібності ідентифікують у родині білків та використовують для аналізу амінокислотної послідовності збережених регіонів. Альтернативний підхід для ідентифікації варіації поліпептиду ліганду $\alpha 11$ на основі структури призначений для визначення, чи може молекула нуклеїнової кисло-

ти, що кодує потенційну варіацію гена ліганду *zalpha11*, гібридизуватися з молекулою нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1, яку обговорено вище.

Інші способи ідентифікування незамінних амінокислоти у поліпептидах представленого винаходу відомі в рівні техніки, як-то сайт-спрямований мутагенез або аланін-сканувальний мутагенез [Cunningham та Wells. *Science* 244: 1081 (1989), Bass et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4498 (1991), Coombs та Corey, "Site-Directed Mutagenesis та Protein Engineering," у *Protein: Analysis та Design*. Angeletti (ed.), стор.259-311 (Academic Press, Inc. 1998)]. За останнім способом, одиничні аланінові мутації вводять на кожному залишку у молекулі, а утворені мутантні молекули досліджують на біологічну або біохімічну активність, як розкрито нижче для ідентифікації амінокислотних залишків, що є критичними стосовно активності молекули. [Дивися також, Hilton et al., *J. Biol. Chem.* 277: 4699 (1996)].

Представлений винахід також включає функціональні фрагменти поліпептиду ліганду *zalpha11* та молекули нуклеїнової кислоти, що кодують такі функціональні фрагменти. "Функціональний" ліганд *zalpha11* або його фрагмент, що визначено тут, характеризуються їх проліферативною або диференціювальною активністю, їх здатністю індукувати або інгібувати спеціалізовані функції клітин, або їх здатністю приєднуватися специфічно до антитіл проти ліганду *zalpha11*, або рецептору *zalpha11* (розчинного або іммобілізованого). Як попередньо описано, ліганд *zalpha11* характеризується структурою з чотирьох-спіральною жмутом, що містить спіраль A (амінокислотні залишки 41-56), спіраль B (амінокислотні залишки 69-84), спіраль C (амінокислотні залишки 92-105) та спіраль D (амінокислотні залишки 135-148), як показано послідовністю SEQ ID NO: 2. Отже, згідно з винаходом запропоновано також конденсовані білки, що включають: (а) поліпептидні молекули, що містять одну чи більше описаних вище спіралей; та (b) функціональні фрагменти, що містять одну чи більше з цих спіралей. Іншій частині поліпептиду конденсованого білку може сприяти інший цитокін з чотирьох-спіральною жмутом, як-то IL-15, EL-2, IL-4 та GM-CSF, або штучний та/або неспоріднений секреторний сигнальний пептид, що полегшує секрецію конденсованого білку.

Отже, згідно з винаходом запропоновано конденсовані білки, що містять щонайменше чотири поліпептиди, причому порядок поліпептидів від N-закінчення до C-закінчення такий: перший поліпептид включає амінокислоти, вибрані з групи, що складається з: (а) спіралі A IL-2 - амінокислотні залишки 36-46 послідовності SEQ ID NO: 111; (b) спіралі A IL-15 - амінокислотні залишки 29-43 послідовності SEQ ID NO: 112; (c) спіралі A IL-4 - амінокислотні залишки 45-68 послідовності SEQ ID NO: 113; (d) спіралі A GM-CSF - амінокислотні залишки 30-44 послідовності SEQ ID NO: 114; та (e) амінокислотні залишки 41-56 послідовності SEQ ID NO: 2; перший спейсер - амінокислоти 6-27; та другий поліпептид, що включає амінокислотні залишки, вибрані з групи, що складається з: (а) спіралі B IL-2 - амінокислотні залишки 53-75 послідо-

вності SEQ ID NO: 111; (b) спіралі B IL-4 - амінокислотні залишки 65-83 послідовності SEQ ID NO: 112; (c) спіралі B IL-15 - амінокислотні залишки 84-101 послідовності SEQ ID NO: 113; (d) спіралі B GM-CSF - амінокислотні залишки 72-81 послідовності SEQ ID NO: 114; та (e) - амінокислотні залишки 69-84 послідовності SEQ ID NO: 2; другий спейсер - амінокислотні залишки 5-11; третій поліпептид, що включає послідовність амінокислотних залишків, що вибрана з групи, яка складається з: (а) спіралі C IL-2 - залишки 87-99 послідовності SEQ ID NO: 111; (b) спіралі C IL-4 - залишки 95-118 послідовності SEQ ID NO: 112; (c) спіралі C IL-15 - залишки 107-119 послідовності SEQ ID NO: 113; (d) спіралі C GM-CSF - залишки 91-102 послідовності SEQ ID NO: 114; та (e) - амінокислотні залишки 92-105 послідовності SEQ ID NO: 2; третій спейсер - амінокислотні залишки 3-29; та четвертий поліпептид, що включає амінокислотні залишки, вибрані з групи, що складається з: (а) спіралі D EL-2 - амінокислотні залишки 103-121 послідовності SEQ ID NO: 111; (b) спіралі D IL-15 - амінокислотні залишки 134-157 послідовності SEQ ID NO: 112; (c) спіралі D IL-4 - амінокислотні залишки 134-160 послідовності SEQ ID NO: 113; (d) спіралі D GM-CSF - амінокислотні залишки 120-131 послідовності SEQ ID NO: 114; та (e) амінокислотні залишки 135-148 послідовності SEQ ID NO: 2, причому щонайменше один з 4-х поліпептидів є похідним від ліганду *zalpha11*. Згідно з іншим втіленням винаходу спейсерні пептиди вибиратимуть з петель ліганду *zalpha11*, IL-2, EL-4, EL-15 або GM-CSF A/B, B/C та CfD, як показано у таблиці 1.

Стандартні делеційні аналізи молекули нуклеїнової кислоти можна провести для отримання функціональних фрагментів молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид ліганду *zalpha11*. В якості ілюстрації, молекули ДНК, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 або її фрагменти, можна розщепити нуклеазою Bal31 для отримання серії згрупованих делецій. Ці фрагменти ДНК далі вставляють в експресійні вектори у належній рамці зчитування та виділяють і досліджують експресовані поліпептиди на активність ліганду *zalpha11*, або на здатність приєднувати антитіла проти ліганду *zalpha11* або рецептору *zalpha11*. Одною альтернативою розщепленню екзонуклеазою є використання олігонуклеотид-спрямованого мутагенезу для введення делецій або стоп-кодонів для специфічного продукування потрібного фрагменту ліганду *zalpha11*. Альтернативно, певні фрагменти гена ліганду *zalpha11* можна синтезувати, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію.

Стандартні способи ідентифікування функціональних доменів добре відомі фахівцям. Наприклад, вивчення на усиченому одному з двох чи обох закінченнях інтерферонів підсумовано [Horisberger and Di Marco, *Pharmac. Ther.* 66: 507 (1995)]. Більш того, стандартні способи функціонального аналізу білків описано, наприклад, [Treuter et al., *Molec. Gen-Genet.* 240: 113 (1993); Content et al., "Expression та preliminary deletion analysis of the 42kDa 2-5A synthetase induced by human interferon," (Експресія та попередній делеційний аналіз індукованої інтерфероном людини

синтези 2-5A у 42 кДа) у Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (ed.), стор.65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, "The EGF Рецептор," у Control of Animal Cell Proliferation L, Boynton et al., (eds.) стор.169-199 (Academic Press 1985); Coumailleau et al., J. Biol. Chem. 270: 29270 (1995); Fukunaga et al., J. Biol. Chem. 270: 25291 (1995); Yamaguchi et al., Bi-ochem. Pharmacol. 50: 1295 (1995); та Meisel et al., Plant Molec. Biol. 30: 1 (1996)].

Багато амінокислотних заміни можна здійснити та дослідити, використовуючи відомі способи мутагенезу та скринінгу, як-то розкриті Reidhaar-Olson та Sauer [Science 241: 53 (1988)] або Bowie та Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152 (1989)]. Коротше, ці автори описують способи одночасної рандомізації двох чи більше позицій у поліпептиді, селекції на функціональні поліпептиди, а потім секвенсування мутагенозованих поліпептидів для визначення спектру дозволених заміни в кожній позиції. Інші способи, що можна використовувати, включають фагове виявлення [наприклад, Lowman et al, Biochem. 30: 10832 (1991), Ladner et al., Патент США №5223409, Huse, міжнародна публікація № WO 92/06204], та регіон-спрямований мутагенез [Derbyshire et al. Gene 46: 145 (1986), та Ner et al., DNA 7: 127, (1988)].

Варіації розглянутих послідовностей нуклеотиду та поліпептиду ліганду α 11 можна також створювати перемішуванням ДНК, як розкрито [Stemmer, Nature 370: 389 (1994), Stemmer, Proc. Natl Acad. Sci. USA 91: 10747 (1994) та у міжнародній публікації № WO 97/20078]. Коротше, варіації молекули ДНК створюють гомологічною рекомбінацією *in vitro* випадковою фрагментацією вихідної ДНК з наступним реконструюванням, використовуючи PCR, результатом чого є випадково введені місцеві мутації. Ці способи можна модифікувати, використовуючи родину вихідної молекули ДНК, як-то альтернативні варіанти або молекули ДНК від різних видів, для введення додаткової варіабельності у процес. Селекція або скринінг на потрібну активність з наступними додатковими повтореннями мутагенезу та дослідження забезпечує швидку "еволюцію" послідовностей селекцією на потрібні мутації, одночасно селектуючи проти шкідливих змін.

Способи мутагенезу, які тут розкрито, можна комбінувати з високопродуктивними автоматизованими способами скринінгу для визначення активності клонуваних, мутагенозованих поліпептидів у клітинах хазяїна. Мутагенозовані молекули ДНК, що кодують біологічно активні поліпептиди, або поліпептиди, що приєднуються до антитіл проти ліганду α 11 або розчинного рецептору α 11, можна вилучити з клітин хазяїна та швидко секвенсувати, використовуючи сучасне обладнання. Ці способи дозволяють швидко визначення важливості окремих амінокислотних залишків у потрібному поліпептиді і можуть застосовуватися до поліпептидів невідомої структури.

На додаток, білки представленого винаходу (або фрагменти їх поліпептидів) можна поєднувати з іншими біоактивними молекулами, зокрема іншими цитокінами, для забезпечення багатфункціональних молекул. Наприклад, одну чи більше

спіралей з ліганду α 11 можна поєднувати з іншими цитокінами для посилення їх біологічних властивостей чи ефективності продукування.

Згідно з винаходом запропоновано тому серію нових гібридних молекул, в яких сегмент, що містить одну чи більше спіралей з ліганду α 11, конденсований з іншим поліпептидом. Конденсацію краще здійснювати сплайсингом на рівні ДНК для дозволу експресії химерних молекул у системах продукування рекомбінантів. Утворені молекули далі досліджують на такі властивості як поліпшена розчинність, поліпшена стабільність, подовжений період напіввидалення, поліпшені рівні експресії та секреції, та фармакодинаміку. Такі гібридні молекули можуть крім того включати додаткові амінокислотні залишки (наприклад, поліпептидний лінкер) між компонентними білками або поліпептидами.

Неіснуючі в природі амінокислоти включають, без обмеження, транс-3-метилпролін, 2,4-метанпролін, цис-4-гідроксипролін, транс-4-гідроксипролін, N-метилглутамін, алло-треонін, метилтреонін, гідроксіетилцистеїн, гідроксіетилгомоцистеїн, нітроглутамін, гомоглутамін, піпекілінову кислоту, тіазолідинкарбонову кислоту, дегідропролін, 3- та 4-метилпролін, 3,3-диметилпролін, третлейцин, норвалін, 2-азафенілаланін, 3-азафенілаланін, 4-азафенілаланін, та 4-флуорфенілаланін. В рівні техніки відомі кілька способів вставки неіснуючих в природі амінокислотних залишків у білки. Наприклад, можна застосовувати систему *in vitro*, причому несенсові мутації пригнічують, використовуючи хімічно аміноацильовані супресорні tРНК. Способи синтезу амінокислот та аміноацильованих tРНК відомі в рівні техніки. Транскрипцію та трансляцію плазмід, що містять несенсові мутації, звичайно проводять у позбавленій клітин системі, що містить екстракт *E. coli* S30 та комерційно доступні ферменти та інші реагенти. Білки очищають хроматографією. [Дивися, наприклад, Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113: 2722 (1991), Ellman et al., Methods Enzymol. 202: 301 (1991), Chung et al., Science 259: 806 (1993), та Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10145 (1993)].

За другим способом, трансляцію проводять в ооцитах *Xenopus* мікроін'єкцією мутованої мРНК та хімічно аміноацильованих супресорних tРНК [Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271: 19991 (1996)]. За третім способом, клітини *E. coli* культивують при відсутності природної амінокислоти, яку треба замінити (наприклад, фенілаланіну), та у присутності потрібних неіснуючих в природі амінокислот (наприклад, 2-азафенілаланіну, 3-азафенілаланіну, 4-азафенілаланіну, або 4-флуорфенілаланіну). Неіснуючу в природі амінокислоту вставляють у білок на місце її природного еквівалента. [Дивися, Koide et al., Biochem. 33: 7470 (1994)]. Існуючі в природі амінокислотні залишки можна перетворити у неіснуючі в природі види хімічною модифікацією *in vitro*. Хімічну модифікацію можна комбінувати з сайт-спрямованим мутагенезом для подальшого вирощування ступеню заміни [Wynn and Richards, Protein Sci. 2: 395 (1993)]. Може бути кращим стабілізувати ліганд α 11 для збільшення періоду напіввидалення молекул, зокрема для збільшення

тривалості метаболічної дії у активному стані. Для досягнення збільшеного періоду напіввидалення молекули ліганду $\alpha 11$ можна хімічно модифікувати, використовуючи способи, що описано тут. Обробка PEG є одним звичайно використовуваним способом, що продемонстровано збільшенням періоду напіввидалення у плазмі, збільшенням розчинності, та зменшенням антигенності та імуногенності [Nucci et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 6: 133-155, 1991 та Lu et al., *Int. J. Peptide Protein Res*, 43: 127-138, 1994].

Амінокислотні залишки ліганду $\alpha 11$ можна замінити обмеженим числом неконсервативних амінокислот, амінокислот, що не кодовані генетичним кодом, неіснуючих в природі амінокислоти, та протиприродних амінокислот.

Згідно з винаходом запропоновано також фрагменти поліпептидів або пептиди, що містять частину описаного тут поліпептиду ліганду $\alpha 11$, що несе епітоп. Такі фрагменти або пептиди можуть включати "імуногенний епітоп," який є частиною білку, що викликає реакцію антитіл, коли як імуноген використовують суцільний білок. Імуногенні пептиди, що несуть епітоп, можна ідентифікувати, використовуючи стандартні способи [дивися, наприклад, Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8J: 3998 (1983)].

За контрастом, поліпептидні фрагменти або пептиди можуть включати "антигенний епітоп," що є регіоном молекули білку, до якого може специфічно приєднуватися антитіло. Деякі епітопи складаються з лінійної або суміжної ділянки амінокислоти, і антигенність такого епітопу не знижується денатуруючими засобами. В рівні техніки відомі відносно короткі синтетичні пептиди, що можуть імітувати епітопи білку, які можна використовувати для стимулювання продукування антитіл проти білку [дивися, наприклад, Sutcliffe et al., *Science* 219: 660 (1983)]. Відповідно, антигенні пептиди та поліпептиди представленого винаходу, що несуть епітоп, є корисними для генерування антитіл, що приєднуються до описаних тут поліпептидів. Для визначення регіонів, що мають найвищий антигенний потенціал, можна використовувати профіль гідрофільності за Хоппом/Вудсом [Hopp et al., 1981, вище, та Hopp, 1986, вище]. У ліганді $\alpha 11$ ці регіони включають: амінокислотні залишки 114-119, 101-105, 126-131, 113-118, та 158-162 послідовності SEQ ID NO: 2.

Антигенні пептиди та поліпептиди, що несуть епітоп, містять переважно щонайменше 4-10 амінокислот, щонайменше 10-14 амінокислот, або приблизно 14-30 амінокислот послідовностей SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 56. Такі пептиди та поліпептиди, що несуть епітоп, можна продукувати фрагментуванням поліпептиду ліганду $\alpha 11$, або хімічним пептидним синтезом, як тут описано. Більш того, епітопи можна селектувати фаговим виявленням випадкових пептидних бібліотек [дивися, наприклад, Lane та Stephen, *Curr. Opin. Immunol.* 5: 268 (1993); та Cortese et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 616 (1996)]. Стандартні способи ідентифікування епітопів та продукування антитіл з малих пептидів, що включають епітоп, описано, наприклад, [Mole, "Epitope Mapping," у *Methods in Molecular Biology*. T. 10, Manson (ed.), стор.105-116

(The Humana Press, Inc. 1992); Price, "Production та Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," у *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering та Clinical Application*, Ritter та Ladyman (eds.), стор.60-84 Cambridge University Press 1995), та Coligan et al. (eds.). *Current Protocols in Immunology*, стор.9-3,1 - 9,3,5 та стор.9,4,1 - 9,4,11 (John Wiley & Sons 1997)].

Незалежно від окремої нуклеотидної послідовності варіації поліпептиду ліганду $\alpha 11$, поліпептид кодує поліпептид, що характеризується його проліферативною або диференціальною активністю, здатністю індукувати або інгібувати спеціалізовані клітинні функції, або здатністю специфічно приєднуватися до антитіла проти ліганду $\alpha 11$ та рецептору $\alpha 11$. Точніше, варіації поліпептидів ліганду $\alpha 11$, кодуватимуть поліпептиди, які виявляють щонайменше 50%, а краще, більше 70%, 80% або 90%, активності поліпептиду, який показано послідовністю SEQ ID NO: 2.

Для будь-якого поліпептиду ліганду $\alpha 11$, включаючи варіації та конденсовані білки, пересічний фахівець може легко створити повністю вирождену поліпептидну послідовність, що кодує цю варіацію, використовуючи інформацію з вищеведених таблиць 1 та 2.

Згідно з винаходом запропоновано також ряд інших поліпептидних конденсатів (та споріднених мультимерних білків, що містять один чи більше поліпептидних конденсатів). Наприклад, поліпептиди ліганду $\alpha 11$ можна виготовити конденсованими у димеризований білок, як розкрито у [патентах США №5155027 та 5567584]. Кращі димеризовані білки в цьому відношенні включають домени постійного регіону імуноглобуліну. Конденсати імуноглобулін-поліпептид ліганду $\alpha 11$ можна експресувати у генетично сконструйованих клітинах (для продукування ряду мультимерних аналогів ліганду $\alpha 11$). З поліпептидами ліганду $\alpha 11$ для спрямування їх до специфічних клітин, тканин, або макромолекул можна конденсувати допоміжні домени. Наприклад, поліпептид або білок ліганду $\alpha 11$ можна спрямувати до попередньо визначеного типу клітин конденсуванням поліпептиду ліганду $\alpha 11$ з лігандом, що специфічно приєднується до рецептору таких цільових клітин. Таким чином поліпептиди та білки можна спрямовувати на терапевтичні або діагностичні призначення. Поліпептид ліганду $\alpha 11$ можна конденсувати з двома чи більше частинами, як-то афінною мішкою для очистки та спрямовуваним доменом. Поліпептидні конденсати можуть також включати один чи більше сайтів розщеплення, зокрема між доменами. [Дивися, Tuan et al. *Connective Tissue Research* 34: 1-9, 1996].

Використовуючи обговорені тут способи, пересічний фахівець може ідентифікувати та/або виготовити ряд поліпептидів, що мають по суті подібну природу послідовності стосовно залишків 1-162 або 33-162 послідовності SEQ ID NO: 2, або їх функціональні фрагменти та конденсати, причому такі поліпептиди або фрагменти чи конденсати залишають властивості нативного білку, як-то здатність стимулювати проліферацію, диференціацію, індукувати спеціалізовану клітинну функцію або

приєднуватися до рецептору $\alpha 11$ або антитіл до ліганду $\alpha 11$.

Поліпептиди ліганду $\alpha 11$ представленого винаходу, включаючи поліпептиди повної довжини, функціональні фрагменти та конденсовані поліпептиди, можна продукувати у генетично сконструйованих клітинах хазяїна звичайними способами. Придатними клітинами хазяїна є клітини такого типу, що можна трансформувати або трансфектувати з екзогенною ДНК та вирощувати у культурі, та включають клітини бактерій, грибів, та культивовані клітини вищих еукаріотів. Клітини еукаріотів, зокрема культивовані клітини багатоклітинних організмів, є кращими. Способи обробки клонуваних молекул ДНК та введення екзогенної ДНК у ряд клітин хазяїна розкрито [Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, та Ausubel et al., eds. *Current Protocols in Methods in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, 1987].

Загалом послідовність ДНК, що кодує поліпептид ліганду $\alpha 11$ оперативно зв'язана з іншими генетичними елементами, що потрібні для її експресії, включаючи у експресійному векторі, звичайно, промотор та термінатор транскрипції. Вектор також звичайно містить один чи більше придатних для селекції маркерів та один чи більше ініціаторів реплікації, хоча фахівці здогадаються, що у деяких системах придатні для селекції маркери можна запровадити на окремих векторах, а реплікацію екзогенної ДНК можна запровадити інтегруванням у геном клітини хазяїна. Селекція промоторів, термінаторів, придатних для селекції маркерів, векторів та інших елементів є предметом стандартного конструювання, знаного передчими фахівцями. Багато таких елементів описано в літературі та доступно від комерційних постачальників.

Для спрямування поліпептиду ліганду $\alpha 11$ у секреторний шлях обміну клітин хазяїна у експресійний вектор запроваджують секреторну сигнальну послідовність, (також відому як лідерну послідовність, препослідовність або препослідовність). Секреторна сигнальна послідовність може бути від ліганду $\alpha 11$ або похідною з іншого секретованого білку (наприклад, t-PA) або синтезованою de novo. Секреторна сигнальна послідовність оперативно зв'язана з послідовністю ДНК ліганду $\alpha 11$, тобто, дві послідовності об'єднують у коректній рамці зчитування та позиціюють для спрямування наново синтезованого поліпептиду у секреторний шлях обміну клітин хазяїна. Секреторні сигнальні послідовності звичайно 5'-позиціюють стосовно послідовності ДНК, що кодує потрібні поліпептиди, хоча деякі секреторні сигнальні послідовності можна позиціонувати в іншому місці потрібної послідовності ДНК [дивися, наприклад, Welch et al., патент США №5037743; Holland et al., патент США №5143830].

Альтернативно, секреторну сигнальну послідовність, що міститься у поліпептидах представленого винаходу, використовують для спрямування інших поліпептидів у секреторний шлях обміну. Згідно з винаходом запропоновано такі конденсовані поліпептиди. Сигнальні конденсовані поліпеп-

тиди можна зробити такими, що секреторна сигнальна послідовність, похідна від амінокислотних залишків 1-31 послідовності SEQ ID NO: 2, буде оперативно зв'язаною з послідовністю ДНК, що кодує інший поліпептид, використовуючи способи, що відомі в рівні техніки та розкриті тут. Секреторна сигнальна послідовність, що міститься у конденсованих поліпептидах представленого винаходу, переважно конденсована з додатковим пептидом для спрямування додаткового пептиду у секреторний шлях обміну амінотермінально. Такі констракти мають ряд застосувань, що відомі в рівні техніки. Наприклад, ці конденсовані констракти нової секреторної сигнальної послідовності можуть викликати секрецію активного компоненту звичайно несекретованого білку. Такі конденсати можна використовувати in vivo або in vitro для спрямування пептидів через секреторний шлях обміну.

Культивовані клітини ссавців є придатними хазяїнами в рамках представленого винаходу. Способи введення екзогенної ДНК у клітини ссавця-хазяїна включають опосередковану фосфатом кальцію трансфекцію [Wigler et al., *Cell* 14:725, 1978; Corsaro та Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603, 1981; Graham and Van der Eb, *Virology* 52:456, 1973], електропорацію [Neumann et al., *EMBO J.* 1:841-45, 1982], опосередковану DEAE-декстраном [Ausubel et al., вище] та опосередковану ліпосомами трансфекцію [Hawley-Nelson et al., *Focus* 15:73, 1993; Ciccarone et al., *Focus* 15:80, 1993] та вектори вірусів [Miller та Rosman, *BioTechniques* 7: 980-90, 1989; Wang та Finer, *Nature Med.* 2: 714-6, 1996]. Продукування рекомбінантного поліпептиду у культивованих клітинах ссавців розкрито, наприклад, [Levinson et al., Патент США №4713339; Hagen et al., Патент США №4784950; Palmiter et al., Патент США №4579821; та Ringold, Патент США №4656134]. Придатні культивовані клітини ссавців включають COS 1 (ATCC №. CRL 1650), COS-7 (ATCC №. CRL 1651), BHK (ATCC №. CRL 1632), BHK 570 (ATCC №. CRL 10314), 293 (ATCC №. CRL 1573; [Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977]), Jurkat (ATCC №. CRL-8129), BaF3 (лінія похідних з кісткового мозку миші залежних від інтерлейкіну-3 прелімфоїдних клітин. [Дивися, Palacios та Steinmetz, *Cell* 41: 727-34, 1985; Mathey-Prevot et al., *Mol. Cell. Biol.* 6: 4133-5, 1986] та лінії клітин яєчника китайського хом'яка (наприклад, CHO-K1; ATCC №. CCL 61). Додаткові придатні лінії клітин відомі в рівні техніки та доступні з загальнодоступних депозитаріїв, як-то American Type Culture Collection (Американська колекція типів культур), Rockville, Maryland. Взагалі, кращими є такі сильні промотери транскрипції, як промотери від SV-40 або цитомегаловірусу. [Дивися, наприклад, Патент США №4956288]. Інші придатні промотери включають промотери з металотіонеїнових генів [Патенти США №№. 4579821 та 4601978] та головний пізній промотор аденовірусу.

Селекцію ліками звичайно використовують для вибору культивованих клітин ссавців в які уведено чужинну ДНК. Такі клітини звичайно позначають як "трансфектанти". Клітини, що культивовані у присутності засобу селекції та здатні передавати по-

трібний ген своєму потомству, позначають як "стабільні трансфектанти". Кращим придатним до селекції маркером є ген, що кодує резистентність до антибіотику неоміцину. Селекцію проводять у присутності ліків типу неоміцину, як-то G-418 або подібних. Селекційні системи можна також використовувати для збільшення рівня експресії потрібного гена, процес позначають як "ампліфікацію." Ампліфікацію проводять культивуванням трансфектантів у присутності низької кількості засобу, а потім підвищують кількість засобу селекції для вибору клітин, що продукують високі рівні продукту уведеного гена. Кращим придатним для ампліфікації та селекції маркером є дигідрофолатредуктаза, яка надає резистентності до метатрексату. Інші гени резистентності до ліків (наприклад, резистентності до піроміцину, резистентності до багатьох ліків, пуроміцин-ацетилтрансферазу) можна використовувати також. Альтернативні маркери, що представляють змінений фенотип, білок зеленої флуоресценції, або білки поверхні клітин, як-то CD4, CD8, класу I MHC, плацентарну лужну фосфатазу, можна використовувати для сортування трансфектованих клітин від нетрансфектованих клітин такими засобами, як FACS-сортування або спосіб сепарації магнітними кульками.

Можна використовувати як хазяїв також клітини інших вищих еукаріотів, включаючи клітини рослин, клітини комах та клітини птахів. Використання *Agrobacterium rhizogenes* як вектору для експресії гена в клітинах рослин обговорено [Sinkar et al., J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987]. Трансформація клітин комах та продукування ними чужинного поліпептиду розкрито [Guarino et al., Патент США №5162222 та публікація WIPO WO 94/06463]. Клітини комах можна інфікувати рекомбінантним бакуловірусом, похідним, звичайно, від *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV). [Дивися, King L.A. & Possee R.D., *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, London, Chapman & Hall; O'Reilly et al., *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. New York, Oxford University Press., 1994; та Richardson, Ed., *Baculovirus Expression Protocols*. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ, Humana Press, 1995]. Другий спосіб створення рекомбінантного бакуловірусу використовує систему на базі транспозону, що описана Луковом [Luckow, et al., J. Virol., 67:4566-79, 1993]. Ця система, що застосовує вектори переносу, продається в комплекті *Vac-to-Bac™* [Life Technologies, Rockville, MD]. Ця система застосовує вектор переносу, *pFastBad™* [Life Technologies], що містить транспозон Tn7, для переносу ДНК, що кодує поліпептид ліганду *zalpha11*, у геном бакуловірусу, що міститься в *E. coli*, як велика плазміда під назвою "басміда". Вектор переносу, *pFastBad™* використовує поліедриновий промотор AcNPV для запуску експресії потрібного гена, в цьому випадку ліганду *zalpha11*. Однак, *pFastBad™* можна значною мірою модифікувати. Поліедриновий промотор можна видалити та замінити основним промотором білку бакуловірусу (також відомий як промотор Pco, р6,9 або MP), що експресований раніше у бакуловірусній інфекції, та має, як було показано, переваги при

експресії секретованих білків. [Дивися, Hill-Perkins та Possee, J. Gen. Virol. 71:971-6, 1990; Bonning, et al., L. Gen. Virol. 75:1551-6, 1994; та Chazenbalk and Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543-9, 1995]. У таких констрактах вектору переносу можна використовувати короткі або довгі варіанти основного промотору білку. Більш того, вектори переносу можна сконструювати так, щоб замінити нативну секреторну сигнальну послідовність ліганду *zalpha11* секреторною сигнальною послідовністю, що походить від білку комах. Наприклад, секреторну сигнальну послідовність з екдистероїд-глюкозилтрансферази (EGT), мелітин з бджолиного меду (Melittin, Invitrogen, Carlsbad, CA), або бакуловірус gp67 (PharMingen, San Diego, CA) можна використовувати у констрактах для заміни нативної секреторної сигнальної послідовності ліганду *zalpha11*. На додаток, вектори переносу можуть включати в рамці генетичного коду конденсат з ДНК, що кодує епітопну мітку на C- або N- закінченні поліпептиду ліганду *zalpha11*, наприклад, епітопну мітку Glu-Glu [Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82:7952-4, 1985]. Використовуючи відомі в рівні техніки способи, вектор переносу, що містить ліганд *zalpha11* трансформують в *E. coli*, та скринують на басміди, що містять переривчастий ген *lacZ* як свідок рекомбінантного бакуловірусу. Басмідну ДНК, що міститься в рекомбінантному бакуловірусному геномі, виділяють, використовуючи звичайні способи, та використовують для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*, наприклад, клітин Sf9. Далі продукується рекомбінантний вірус, що експресує ліганд *zalpha11*. Рекомбінантні вірусні штами виробляють звичайно використовуваними в рівні техніки способами.

Рекомбінантний вірус використовують для інфікування клітин хазяїна, звичайно похідних від осінніх маршових хробаків, *Spodoptera frugiperda*, лінії клітин. [Дивися, взагалі, Click та Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington, D.C., 1994. Іншими придатними лініями клітин є лінія клітин High Five[™] (Invitrogen), що походить від *Trichoplusia ni* (Патент США №5300435)].

Клітини грибів, включаючи клітини дріжджів, можна також використовувати згідно з винаходом. Особливо цікаві, в цьому плані види дріжджів включають *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, та *Pichia methanolica*. Способи трансформації клітин *S. cerevisiae* екзогенною ДНК та продукування з неї рекомбінантного поліпептиду розкрито, наприклад, [Kawasaki, Патент США №4599311; Kawasaki et al., Патент США №4931373; Brake, Патент США №4870008; Welch et al., Патент США №5037743; та Murray et al., Патент США №4845075]. Трансформовані клітини селектують за визначеним придатним для селекції маркером фенотипом, звичайно резистентності до ліків або здатності до вирощування за відсутності певної живильної речовини (наприклад, лейцину). Переважною векторною системою для використання у *Saccharomyces cerevisiae* є розкрита [Kawasaki et al. (Патент США №4931373)] векторна система POT1, яка дозволяє селектувати трансформовані клітини вирощуванням у середовищі з вмістом глюкози. Придатні промотори та терміна-

тори для використання у дріжджах включають промотери та термінатори генів гліколітичних ферментів [дивися, наприклад, Kawasaki, Патент США №4599311; Kingsman et al., Патент США №4615974; та Bitter, Патент США №4977092] та генів алкоголь-дегідрогенази. [Дивися також Патенти США №№. 4990446; 5063154; 5139936 та 4661454]. Відомими в рівні техніки є трансформаційні системи для інших дріжджів, включаючи *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia gnallerinondii* та *Candida maltosa*. [Дивися, наприклад, Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132:3459-65, 1986 та Cregg, Патент США №4882279]. Згідно зі способом [McKnight et al., Патент США №4935349, можна використовувати клітини *Aspergillus*]. Способи трансформації *Acremonium chrysogenum* розкрито [Sumino et al., Патент США №5162228]. Способи трансформації *Neurospora* розкрито [Lambowitz, Патент США №4486533].

Використання *Pichia methanolica* як хазяїна для продукування рекомбінантного білку розкрито в [інтернаціональних публікаціях №№. WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 та WO 98/02565]. Молекули ДНК для використання у трансформації *P. methanolica* виготовляють звичайно як дволанцюгові циклічні плазмиди, які переважно перед трансформацією лінеаризують. Для продукування поліпептиду у *P. methanolica*, краще, щоб промотер та термінатор були промотером та термінатором з гена *P. methanolica*, як-то гена *P. methanolica* утилізації спирту {AUG1 або AUG2}. Інші корисні промотери включають про-мотери генів дегідроксіацетон-синтази (DHAS), форміат-дегідрогенази (FMD), та каталази (CAT). Для покращення інтеграції ДНК у хромосому хазяїна краще мати суцільний фланкований з обох кінців послідовностями ДНК хазяїна експресійний сегмент плазмиди. Кращим придатним для селекції маркером для використання у *Pichia methanolica* є ген *P. methanolica*, ADE2, що кодує фосфорибозил-5-аміноімідазол-карбоксилазу (AIRC; EC 4.1.1.21), що дозволяє клітинам хазяїна *ade2* рости при відсутності аденіну. Для великомасштабного промислового процесу, де бажано мінімізувати використання метанолу, краще використовувати клітини хазяїна, в яких обидва гени утилізації метанолу (AUG1 та AUG2) є видаленими. Для продукування секреторного білку кращими є позбавлені генів вакуольної протеази клітини хазяїна (PEP4 та PRB1). Для покращення введення плазмиди з вмістом ДНК, що кодує потрібний поліпептид, у клітини *P. methanolica* використовують електропорацію. Краще трансформувати клітини *P. methanolica* електропорацією, використовуючи експоненціально згасаюче, пульсуюче електричне поле, що має напруженість поля 2,5-4,5кВ/см, переважно приблизно 3,75кВ/см, константу часу (t) 1-40 мілісекунд, найкраще приблизно 20 мілісекунд.

Прокаріотні клітини хазяїна, включаючи штами бактерій *Escherichia coli*, *Bacillus* та інших видів, в рамках винаходу також є корисними клітинами хазяїна. Способи трансформації цих хазяїв та експресування клонованих в них чужинних послідов-

ностей ДНК добре відомі в рівні техніки [дивися, наприклад, Sambrook et al., вище]. При експресії поліпептиду ліганду α 11 у таких бактеріях, як *E. coli*, поліпептид може залишатися у цитоплазмі, звичайно як нерозчинні гранули, або може бути спрямованим у периплазматичні проміжки послідовністю бактеріальної секреції. В попередньому випадку, клітини лізують, а гранули відбирають і денатують, використовуючи, наприклад, ізоціанат гуанідину або сечовину. Денатурований поліпептид можна далі переукласти та димеризувати розбавленням денатуруючого засобу, як-то діалізом проти розчину сечовини та комбінації відновленого та окисненого глутатіону, з наступним діалізом проти буферованого сольового розчину. В останньому випадку поліпептид можна виділити з периплазматичного проміжку у розчинній та функціональній формі розщепленням клітин (наприклад, обробкою ультразвуком або осмотичним шоком) для вивільнення вмісту периплазматичного проміжку та витягу білку, таким чином уникаючи необхідності денатурації та переукладки.

Трансформовані та трансфектовані клітини культивують звичайними способами в культивативному середовищі, що містить живильні речовини та інші потрібні для вирощування вибраних клітин хазяїна компоненти. В рівні техніки відомо багато придатних середовищ, включаючи стандартні та комплексні середовища, вони звичайно включають джерело карбону, джерело нітрогену, незамінні амінокислоти, вітаміни та мінерали. Середовища можуть також містити такі компоненти як фактори росту або сироватки, за потребою. Середовища для вирощування звичайно вибирають для клітин, що містять екзогенно додану ДНК, наприклад, селекцією за допомогою ліків або нестачі необхідних живильних речовин, які доповнені придатним для селекції маркером, який входить в експресійний вектор або є співтрансфектованим у клітину хазяїна. Клітини *P. methanolica* культивують у середовищі, що містить, адекватні джерела карбону, нітрогену та слідових живильних речовин, при температурі приблизно 25-35°C. Рідкі культури забезпечують достатньою аерацією звичайними засобами, як-то збовтування невеликих флаконів або барботаж ферментаторів. Кращим культивативним середовищем для *P. methanolica* є YEPD (2% D-глюкози, 2% Пептону Bacto™ (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1% дріжджового екстракту Bacto™ (Difco Laboratories), 0,004% аденіну та 0,006% L-лейцину).

Краще очищати поліпептиди згідно з винаходом до чистоти більше 80%, краще до чистоти більше 90%, ще краще до чистоти більше 95%, а найкраще у фармацевтично чистому стані, тобто з чистотою більше 99,9%, з огляду на забруднюючі макромолекули, зокрема інші білки та нуклеїнові кислоти, та позбавляти від інфекційних та пірогенних агентів. Переважно, очищений поліпептид є по суті позбавленим інших поліпептидів, особливо інших поліпептидів тваринного походження.

Експресовані рекомбінантні поліпептиди ліганду α 11 (чи химерні поліпептиди ліганду α 11) можна очищати, використовуючи фракціонування та/або звичайні способи та середовища для очистки. Для фракціонування зразків мож-

на використовувати осадження сульфатом амонію та кислотну або хаотропну екстракцію. Приклади стадій очистки можуть включати гідроксіапатитну, витіснення за розміром, FPLC (рідинну експрес-хроматографію білків) та високоефективну рідинну хроматографію з оберненою фазою. Придатні аніонообмінні середовища включають дериватизовані декстрини, агарозу, целюлозу, поліакриламід, спеціалізовані види діоксиду силіцію тощо. Кращими є похідні PEI, DEAE, QAE та Q, а краще усього DEAE Fast-Flow Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). Приклади хроматографічних середовищ включають дериватизовані фенілом, бутилом, або октилом середовища, як-то Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) тощо; або такі поліакрилові смоли, як Amberchrom CG 71 (Toso Haas) тощо. Придатні тверді підкладки включають скляні кульки, смоли на базі діоксиду силіцію, целюлозні смоли, агарозні кульки, кульки з перехресно зшитої агарози, полістирольні кульки, перехресно зшиті поліакриламідні смоли тощо, які є нерозчинними в умовах використання. Ці підкладки можна модифікувати реакційними групами, що дозволяють приєднувати білки через аміногрупи, карбоксигрупи, сульфгідрильні групи, гідроксигрупи та/або вуглеводні угруповання. Приклади хімічних способів конденсації включають ціаногенбромідну активацію, N-гідроксисукцинамідну активацію, епоксидну активацію, сульфгідрильну активацію, гідразидну активацію, та карбокси- та амінопохідні для хімічних способів карбодіімідної конденсації. Ці та інші тверді середовища добре відомі і широко використовуються в рівні техніки та доступні від комерційних постачальників. Способи приєднання рецепторного поліпептиду до середовища підкладки добре відомі в рівні техніки. Вибір конкретних способів є предметом рутинного розрахунку та частково визначається властивостями вибраної підкладки. [Дивися, наприклад, *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988].

Поліпептиди згідно з винаходом можна виділити на базі їх фізичних чи біохімічних властивостей. Наприклад, для очистки збагачених гістидином білків включаючи ті, що містять полігістидинову мітку, можна використовувати хроматографію на базі адсорбції на іммобілізованих іонах металу (IMAC). Коротше, гель спочатку насичують іонами двовалентного металу з утворенням хелату [Sulkowski, *Trends in Biochem.*, 3:1-7, 1985]. Збагачені гістидином білки адсорбують на цих матрицях з різною спорідненістю залежно від використовованого іону металу та елюють конкурентним елюванням, зниженням рН, або використанням сильних хелатуючих засобів. Інші способи очистки включають очистку глікозилованих білків хроматографією на базі спорідненості до лецитину та іонообмінною хроматографією [Methods in Enzymol., Vol.182, "Guide to Protein Purification" (Посібник з очистки білків), M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp.529-39]. Згідно з додатковим втіленням винаходу для полегшення очистки можна створити конденсати потрібного

поліпептиду та афінної мітки (наприклад, зв'язуючого мальтозу білку, імуноглобулінового домену).

Більш того, використовуючи способи що описано в області техніки, поліпептидні конденсати, або гібридні білки ліганду $\alpha 11$, конструюють, використовуючи регіони або домени ліганду $\alpha 11$ згідно з винаходом у комбінації з регіонами або доменами білків іншої родини цитокінів людини (наприклад, інтерлейкінів або GM-CSF), або гетерологічних білків [Sambrook et al., вище, Altschul et al., вище, Picard, *Cur. Opin. Biology*, 5: 511-5, 1994, та посилання у них]. Ці способи дозволяють визначення біологічної важливості більших доменів або регіонів у потрібному поліпептиді. Такі гібриди можуть змінювати кінетику реакцій, зв'язування, звуження чи розширення специфічності субстрату, або змінювататканинну та клітинну локалізацію поліпептиду, та можуть бути застосованими до поліпептидів невідомої структури.

Конденсовані білки можна виготовити відомими фахівцям способами виготовлення кожного компоненту конденсованого білку та їх хімічним сполученням. Альтернативно, поліпептиди, що кодує обидва компоненти конденсованого білку у підходящій рамці зчитування можна створювати, використовуючи відомі способи та експресувати способами, що тут описано. Наприклад, частину або усі зі спіралей, що надають біологічну функцію, можна обмінювати між лігандом $\alpha 11$ представленого винаходу з функціонально еквівалентними спіралями від іншого члену родини, як-то IL-15, DL-2, IL-4 або GM-CSF. Такі компоненти включають, але без обмеження, секреторну сигнальну послідовність; спіралі A, B, C, D; петлі A/B, B/C, C/D цитокінів з чотирьох-спіральним жмутом.

Такі конденсовані білки, можна чекати, матимуть біологічний функціональний профіль, що є таким же або подібним до поліпептидів представленого винаходу або інших відомих білків родини цитокінів з чотирьох-спіральним жмутом, залежно від сконструйованого конденсату. Більш того, як тут розкрито, такі конденсовані білки можуть виявляти інші властивості.

Стандартні молекулярно-біологічні способи та способи клонування можна використовувати для обміну еквівалентних доменів між поліпептидом ліганду $\alpha 11$ та тими поліпептидами з якими вони конденсовані. Загалом, сегмент ДНК, що кодує потрібний домен, наприклад, спіралі A-D ліганду $\alpha 11$, або інший описаний тут домен, оперативно зв'язаний у рамці зчитування щонайменше з одним іншим сегментом ДНК, що кодує додатковий поліпептид (наприклад домен або регіон з іншого цитокіну, як-то EL-2, або подібного), та вставлений у прийнятний експресійний вектор, як описано тут. Загалом констракти ДНК роблять такими, щоб кілька сегментів ДНК, що кодують відповідні регіони поліпептиду, що оперативно зв'язані у рамці зчитування, утворювали одиничний констракт, що кодує суцільний конденсований білок, або його функціональну частину. Наприклад, констракт ДНК міг би кодувати від N-закінчення до C-закінчення конденсований білок, що містить сигнальні поліпептиди з наступним розвиненим конденсованим білком цитокіну з чотирьох-спіральним жмутом, що містить спіраль A,

далі спіраль В, далі спіраль С і далі спіраль D. Такі конденсовані білки можна експресувати, виділяти, та досліджувати на активність як тут описано.

Поліпептиди ліганду $\alpha 11$ або їх фрагменти можна також виготовити хімічним синтезом, поліпептиди ліганду $\alpha 11$ можуть бути мономерами або мультимерами; глікозилованими або неглікозилованими; обробленими PEG або необробленими PEG; та можуть включати чи не включати початковий метіоніновий амінокислотний залишок. Наприклад, поліпептиди можна виготовити твердофазним пептидним синтезом, наприклад, як описано [Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963].

Активність молекул представленого винаходу можна вимірювати, використовуючи ряд досліджень, що вимірюють проліферацію клітин та/або зв'язування з клітинами, що експресують рецептор $\alpha 11$. Особливо цікавими є заміни у залежних від ліганду $\alpha 11$ клітинах. Придатні лінії клітин, що сконструйовані як залежні від ліганду включають залежну від IL-3 лінію клітин BaF3 [Palacios та Steinmetz, Cell 4J.: 727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986], FDC-P1 [Hapel et al., Blood 64: 786-790, 1984], та MO7e [Kiss et al., Leukemia 7: 235-240, 1993]. Залежні від фактору росту лінії клітин можна встановити згідно з опублікованими способами [наприклад, Greenberger et al., Leukemia Res. 8: 363-375, 1984; Dexter et al., у Baum et al. Eds., Experimental Hematology Today, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980].

Білки представленого винаходу є корисними для стимулювання проліферації, активації, диференціації та/або індукції або інгібування спеціалізованої клітинної функції клітини, задіяної у гомеостазі кровотворення та імунної функції. Зокрема, поліпептиди ліганду $\alpha 11$ є корисними для стимулювання проліферації, активації, диференціації, індукції або інгібування спеціалізованої клітинної функції клітин кровотворних ліній диференціювання, включаючи, але без обмеження, Т-клітини, В-клітини, NK-клітини, дендритні клітини, моноцити, та макрофаги, а також епітеліальні клітини. Проліферацію та/або диференціацію кровотворних клітин можна вимірювати *in vitro*, використовуючи культивовані клітини, або застосуванням *in vivo* молекул згідно з винаходом до прийнятної тваринної моделі. Дослідження з виміру проліферації або диференціації клітин добре відомі в рівні техніки. Наприклад, дослідження з виміру проліферації включають такий аналіз, як хемочувливість до барвника нейтральний червоний [Cavanaugh et al., Investigational New Drugs 8: 347-354, 1990, представлено тут як посилання], включення радіоактивно мічених нуклеотидів [Cook et al. Analytical Biochem. 179: 1-7, 1989, представлено тут як посилання], включення 5-бром-2'-дезоксіуридину (BrdU) у ДНК проліферуючих клітин [Porstmann et al., J. Immunol. Methods 82: 169-179, 1985, представлено тут як посилання], та використання солі тетразоліуму [Mosmann, J. Immunol. Methods 65: 55-63, 1983; Alley et al. Pak Res. 48: 589-601, 1988; Marshall et al., Growth Reg. 5: 69-84, 1995; та Scudiero et al. Pak Res. 48: 4827-4833, 1988; усі представлені тут як посилання].

Дослідження з виміру диференціації включають, наприклад, визначення маркерів поверхні клітин, пов'язаних з фазо-специфічною експресією тканини, ферментною активністю, функціональною активністю або морфологічними змінами [Watt, FASEB, 5: 281-284, 1991; Francis, Differentiation 57: 63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989; усі представлені тут як посилання].

Молекули представленого винаходу можна досліджувати *in vivo*, використовуючи вірусні системи доставки. Приклади вірусів для цієї мети включають аденовірус, вірус герпесу, ретровіруси, вірус коров'ячої віспи, та адено-асоційований вірус (AAV). Аденовірус, вірус з дволанцюговою ДНК, є зараз найкраще дослідженим вектором переносу гену для доставки гетерологічних нуклеїнових кислот [для огляду, дивися T.C. Becker et al., Meth. Cell Biol. 43: 161-89, 1994; та J.T. Douglas & D.T. C.Uriel, Science & Medicine 4: 44-53, 1997].

Як ліганду, активність поліпептиду ліганду $\alpha 11$ можна вимірювати біосенсорним мікрофізіометром на базі силіцію, який вимірює асоційовані зі зв'язуванням рецептору та наступною фізіологічною реакцією клітини величини екстрацелюлярної ацидифікації або виділення протонів. Прикладом пристрою є мікрофізіометр Cytosensor™, що виготовлений Molecular devices, Sunnyvale, CA. Багато клітинних реакцій, як-то проліферація клітин, транспорт іонів, продукування енергії, реакція запалення, регуляторна та рецепторна активація тощо, можна виміряти цим способом. [Дивися, наприклад, McConnell et al., Science 257:1906-12, 1992; Pitchford et al., Meth. Enzymol. 228:84-108, 1997; Arimilli et al., J. Immunol. Meth. 212:49-59, 1998; Van Liefde et al., Eur. J. Pharmacol. 346:87-95, 1998].

Більш того, ліганд $\alpha 11$ можна використовувати для ідентифікації клітин, тканин чи ліній клітин, що відповідають стимульованому лігандом $\alpha 11$ шляху обміну. Вищеописаний мікрофізіометр можна використовувати для швидкої ідентифікації чутливих до ліганду клітин, як-то клітин, чутливих до ліганду $\alpha 11$ представленого винаходу. Клітини можна культивувати у присутності або відсутності поліпептидів ліганду $\alpha 11$. Ті клітини, що викликають вимірну зміну у екстрацелюлярній ацидифікації у присутності ліганду $\alpha 11$, є чутливими до ліганду $\alpha 11$. Такі клітини або лінії клітин можна використовувати для ідентифікації антагоністів та агоністів описаного вище поліпептиду ліганду $\alpha 11$.

З точки зору розподілу лігандів по тканинам, що спостерігають для рецептору $\alpha 11$ агоністи (включаючи нативний ліганд $\alpha 11$ /субстрат/кофактор/тощо) та/або антагоністи мають величезний потенціал при застосуваннях *in vitro* та *in vivo*. Сполуки, що ідентифіковані як агоністи ліганду $\alpha 11$, є корисними для вирощування, проліферації, активації, диференціації, та/або індукції або інгібування спеціалізованих клітинних функцій клітини, задіяної у гомеостазі кровотворення та імунної функції. Наприклад, ліганд $\alpha 11$ та сполуки агоністів є корисними як компоненти визначених клітинних культивативних середовищ, і їх можна використовувати по-

одинці або у комбінації з іншими цитокінами та гормонами для заміни сироватки, що є звичайно використовуваною у культурі клітин. Агоністи є тому корисними при специфічному стимулюванні росту та/або розвитку Т-клітин, В-клітин, НК-клітин, цитотоксичних лімфоцитів, та інших клітин лімфоїдних та мієлоїдних ліній диференціювання у культурі.

Антагоністи також є корисними як реагенти при дослідженнях для характеризування сайтів взаємодії ліганд-рецептор. Антагоністи є корисними для інгібування вирощування, проліферації, активації, диференціації та/або диференціації клітин, що залучено у регулюванні кровотворення. Інгібітори активності ліганду $\alpha 11$ (антагоністи ліганду $\alpha 11$) включають антитіла проти ліганду $\alpha 11$ та розчинні рецептори ліганду $\alpha 11$, а також інші пептидні та непептидні агенти (включаючи рибосоми), ліганд $\alpha 11$ можна також використовувати для ідентифікації інгібіторів (антагоністів) їх активності. Тест-сполуки додають до досліджених розкритих тут для ідентифікації сполук, що інгібують активність ліганду $\alpha 11$. На додаток до цих досліджень, розкритих тут, зразки можна досліджувати на інгібування активності ліганду $\alpha 11$ у ряді досліджень, призначених для виміру приєднання рецептору, стимуляції/інгібування залежних від ліганду $\alpha 11$ клітинних реакцій або проліферації експресуючих розчинний рецептор $\alpha 11$ клітин.

Поліпептид ліганду $\alpha 11$ можна експресувати як конденсат з постійним регіоном важкого ланцюга імуноглобуліну, звичайно фрагменту Fc, що має два домени постійного регіону та втрачений змінний регіон. Способи виготовлення таких конденсатів розкрито у [патентах США №№ 5155027 та 5567584]. Такі конденсати звичайно секретуються як мультимерні молекули причому частини Fc зв'язані одна з одною дисульфідними зв'язками, а два поліпептиди не-Ig є розташовані поблизу один від одного. Конденсати цього типу можна використовувати, наприклад, для димеризації, збільшуючи стабільність та період напіввидалення *in vivo*, для афінної очистки ліганду, як інструмент дослідження *in vitro*, або антагоніст. Для використання у дослідженнях, химери приєднують до підкладки регіоном Fc та використовують у форматі ELISA.

Поліпептиди, що зв'язують ліганд $\alpha 11$, можна також використовувати для очистки ліганду. Поліпептиди іммобілізують на твердій підкладці, як-то кульках агарози, перекресно-зв'язаній агарозі, склі, целюлозних смолах, смолах на базі силіцію, полістиролі, перехресно-зв'язаному поліакриламіді, або подібних матеріалах, що є стійкими в умовах використання. Способи приєднання поліпептидів до твердих підкладок відомі в рівні техніки та включають хімію амінів, ціанобромідну активацію, N-гідроксисукцинімідну активацію, епоксидну активацію, сульфгідрильну активацію, та гідразидну активацію. Утворене середовище взагалі оформлюють у формі колонки, а рідини, що містять ліганд пропускають через колонку один чи більше разів, щоб дозволити ліганду приєднатися до рецепторного поліпептиду. Ліганд далі елюють, використовуючи зміни концентрації солі, хаот-

ропні засоби (гуанідин-HCl), або зміни pH, щоб порушити приєднання ліганду до рецептору.

Переважно можна застосовувати систему дослідження, що використовує рецептор (або антитіло, один член пари комплемент-антикомплемента), що зв'язує ліганд, або його зв'язуючий фрагмент, та комерційно доступний біосенсорний прилад (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Такий рецептор, антитіло, член пари комплемент-антикомплемента або фрагмент іммобілізують на поверхні рецепторного чіпа. Використання цього приладу розкрито [Karlsson, J. Immunol. Methods 145: 229-40, 1991 та Cunningham та Wells, J. Mol. Biol. 234: 554-63, 1993]. Рецептор, антитіло, член або фрагмент є приєднують ковалентно, використовуючи хімію амінів або сульфгідрильну хімію, на декстранові волокна, які нанесено на плівку золота в проточній комірці. Тест-зразок пропускають через комірку. Якщо у зразку наявні ліганд, епітоп, або протилежний член пари комплемент-антикомплемента, він зв'язується з іммобілізованим рецептором, антитілом або членом, викликаючи, відповідно, зміну коефіцієнту рефракції середовища, яке детектується як зміна резонансу поверхневого плазмону золотої плівки. Ця система дозволяє визначення верхньої та нижньої меж величини, за якою можна розрахувати спорідненість до зв'язування, та оцінити стехіометрію зв'язування. Альтернативно, зв'язування ліганду з рецептором можна аналізувати, використовуючи спосіб SELDI(TM) (Ciphergen, Inc., Palo Alto, CA).

Ліганд-зв'язуючий рецепторний поліпептид можна також використовувати в інших відомих в рівні техніки досліджуваних системах. Такі системи включають аналіз за Скат-чардом (Scatchard) на визначення спорідненості до зв'язування [дивися, Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-72, 1949] та калориметричний аналіз [Cunningham et al., Science 253:545-48, 1991; Cunningham et al., Science 245:821-25, 1991].

Поліпептиди ліганду $\alpha 11$ можна також використовувати для виготовлення антитіл, що приєднуються до епітопів, пептидів або поліпептидів ліганду $\alpha 11$. Поліпептид ліганду $\alpha 11$ або його фрагмент слугує антигеном (імуногеном) для щеплення тварин та виклику імунної реакції. Перспективний фахівець зрозуміє, що антигенні поліпептиди, що несуть епітоп, мають послідовність щонайменше з 6, краще щонайменше з 9, та ще краще приблизно з 15-30 суміжних амінокислотних залишків поліпептиду ліганду $\alpha 11$ (наприклад, SEQ ID NO: 2). Включеними є поліпептиди, що містять більшу частину поліпептиду ліганду $\alpha 11$, тобто, від 30-100 залишків до амінокислотної послідовності повної довжини. Антигени або імуногенні епітопи можуть також включати приєднані мітки, ад'юванти та носії, як тут описано. Придатні антигени включають поліпептид ліганду $\alpha 11$, що зашифрований послідовністю SEQ ID NO: 2 від амінокислоти №32 до амінокислоти №162, або їх суміжних амінокислотних фрагментів 9-131. Інші придатні антигени включають, ліганд повної довжини та розвинений ліганд $\alpha 11$, спіралі A-D, та окремі чи багато спіралей A, B, C, та D структури ліганду $\alpha 11$ з чотирьох-спіральним жмутом, як тут описано. Кращими пеп-

тидами для використання в якості антигенів є гідрофільні пептиди, як-то ті, що спрогнозує пересічний фахівець за графіком гідрофобності, як тут описано, наприклад, амінокислотні залишки 114-119, 101-105, 126-131, 113-118, та 158-162 послідовності SEQ ID NO: 2.

Антитіла від імунної реакції, створені щепленням тварини цими антигенами можна виділити та очистити як тут описано. Способи для виготовлення та виділення поліклональних та моноклональних антитіл добре відомі в рівні техніки. [Дивися, наприклад, Current Protocols in Immunology, Cooligan, et al. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley та Sons, Inc., 1995; Sambrook et al., Methods in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor, NY, 1989; та Hurrell, J. G. R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques та Applications. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982].

Як повинен розуміти пересічний фахівець, поліклональні антитіла можна створювати щепленням ряду теплокровних тварин як-то коней, корів, кіз, овець, собак, курей, кролів, мишей та щурів поліпептидом ліганду α 11 або його фрагментом. Імуногенний поліпептид ліганду α 11 можна посилювати використанням ад'юванту, як-то алюм (гідроксид алюмінію) або повний або неповний ад'ювант Фрейнда. Поліпептиди, що корисні для імунізації також включають конденсовані поліпептиди, як-то конденсати ліганду α 11 або його частини з імуноглобуліновим поліпептидом або зі зв'язуючим мальтозу білком. Поліпептидний імуноген може бути молекулою повної довжини або її частиною. Якщо частина поліпептиду є "гаптеноподібною," таку частину можна переважно об'єднувати чи зв'язувати з макромолекулярним носієм (як-то гемоціанін ключового блюдечка (KLH), альбумін коров'ячої сироватки (BSA) або токсод тетануса) для імунізації.

Використаний тут термін "антитіла" включає поліклональні антитіла, афінно очищені поліклональні антитіла, моноклональні антитіла, та антиген-зв'язуючі фрагменти, як-то протеолітичні фрагменти F(ab')₂ та Fab. Також є включеними генетично сконструйовані суцільні антитіла або фрагменти, як-то химерні антитіла, Fv-фрагменти, антитіла з одиничним ланцюгом тощо, а також синтетичні антиген-зв'язуючі пептиди та поліпептиди. Антитіла не від людини можна пристосувати до людини прищепленням тільки CDR не від людини до рамки читування та незмінених регіонів людини, або вставкою суцільних змінних доменів не від людини (як варіант, "покриваючи" їх людиноподібною поверхнею заміщенням оголених залишків, результатом чого є "фанеровані" антитіла). В деяких випадках, пристосовані до людини антитіла можуть зберігати залишки не від людини у доменах рамок змінних регіонів людини для посилення належних характеристик зв'язування. Пристосуванням антитіл до людини можна збільшити період їх біологічного напіввидалення, а можливість шкідливих імунних реакцій при застосуванні до людей зменшується. Більш того, антитіла людини можна продукувати у трансгенній, нелюдській тварині, що сконструйована з вмістом генів імуноглобуліну людини, як розкрито у [публікації

WIPO WO 98/24893]. Краще, коли ендogenous гени імуноглобуліну у цій тварині є інактивованими або видаленими, як-то гомологічною рекомбінацією.

Антитіла позначають як специфічно зв'язуючі, якщо: 1) вони виявляють пороговий рівень активності до зв'язування, та/або 2) вони не виявляють помітних перехресних реакцій з молекулами спорідненого поліпептиду. Пороговий рівень зв'язування визначають, якщо антитіла проти ліганду α 11 специфічно приєднуються до поліпептиду, пептиду або епітопу ліганду α 11 зі спорідненістю щонайменше у 10 разів більшою спорідненості до приєднання контрольних поліпептидів (не з ліганду α 11).

Краще, щоб антитіла виявляли спорідненість до приєднання (K_a) 10^6 моль⁻¹ або більше, переважно 10^7 моль⁻¹ або більше, краще 10^8 моль⁻¹ або більше, а найкраще 10^9 моль⁻¹ або більше. Спорідненість до приєднання антитіла може легко визначити пересічний фахівець, наприклад, аналізом Скотчарда [Scatchard, Ann, NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949].

Чи не виявляють антитіла проти ліганду α 11 помітних перехресних реакцій з молекулами спорідненого поліпептиду, показано, наприклад, детектуванням антитілами поліпептиду ліганду α 11 але не відомих споріднених поліпептидів, використовуючи стандартний аналіз Вестерн-блотингом [Ausubel et al., вище]. Приклади відомих споріднених поліпептидів розкриті в попередньому рівні техніки, як-то відомі ортологи, паралоги, та подібні відомі члени білку родин. Скринінг можна також здійснити, використовуючи ліганд α 11 не від людини, та мутантні поліпептиди ліганду α 11. Більш того, антитіла можна "скринувати проти" відомих споріднених поліпептидів для ізоляції популяції, що специфічно приєднується до ліганду α 11 людини. Наприклад, антитіла, що створені на ліганд α 11, адсорбуються на споріднених поліпептидах, які прикріплені до нерозчинної матриці, антитіла, що специфічні до поліпептидів ліганду α 11 людини, протікатимуть через матрицю в належних умовах буферування. Такий скринінг дозволяє ізоляцію поліклональних та моноклональних антитіл, що не виявляють перехресних реакцій з близько спорідненими поліпептидами [Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Coohgan, et al. (eds.), National Institutes of Health, Fohn Wiley and Sons, Inc., 1995]. Скринінг та виділення специфічних антитіл є добре відомими в рівні техніки [дивися, Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff et al., Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Goding, J.W. (eds.). Academic Press Ltd. 1996; Benjamin et al., Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984]. Специфічне зв'язування антитіла проти ліганду α 11 можна детектувати рядом розкритих в рівні техніки та показаних нижче способів.

Ряд досліджень, що відомі фахівцям, можна використовувати, для визначення антитіл, що приєднуються до білків або поліпептидів ліганду α 11. Типові дослідження детально описано у [довіднику Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow

та Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988]. Репрезентативні приклади таких аналізів включають: паралельний імуоелектрофорез, радіоімуноаналіз, радіоімунопреципітацію, імуносорбентний аналіз на зв'язаних ферментах (ELISA), аналіз дот-блотингом або Вестерн-блотингом, інгібування або конкурентний аналіз, та сендвіч-аналіз. На додаток, антитіла можна скринувати на приєднання білків або поліпептидів ліганду α 11-нативного типу проти мутантних білків або поліпептидів.

Антитіла до ліганду α 11 можна використовувати для мічених клітин, що експресують ліганд α 11; для виділення ліганду α 11 афінною очисткою; для діагностичних досліджень при визначенні рівнів поліпептиду ліганду α 11, що знаходиться в обігу; для виявлення або кількісного визначення розчинного ліганду α 11 як маркеру - патології або захворювання, що лежить в основі; у аналітичних способах із застосуванням FACS; для скринінгу експресійних бібліотек; для створення анти-ідіотипових антитіл; та як нейтралізуючі антитіла або як антагоністи для блокування активності ліганду α 11 *in vitro* та *in vivo*. Придатні безпосередні мітки або мічені атоми включають радіонукліди, ферменти, субстрати, кофактори, інгібітори, флуоресцентні маркери, хемілюмінесцентні маркери, магнітні частинки тощо; непрямі мітки або мічені атоми можуть грати головну роль при використанні біотин-авідину або іншої пари комплемент-антикомплемента як інтермедіатів. Антитіла тут можна також безпосередньо або не безпосередньо сполучати з ліками, токсинами, радіонуклідами тощо, і ці сполучення використовувати для діагностичного або терапевтичного застосування *in vivo*. Більш того, антитіла до ліганду α 11 або його фрагментів можна використовувати *in vitro* для визначення виродженого ліганду α 11 або його фрагментів у дослідженнях, наприклад, Вестерн-блотингом або іншими відомими в рівні техніки способами.

Придатні виявлювані молекули можуть бути безпосередньо або не безпосередньо приєднаними до поліпептидів або антитіл, та включають радіонукліди, ферменти, субстрати, кофактори, інгібітори, флуоресцентні маркери, хемілюмінесцентні маркери, магнітні частинки тощо. Придатні цитотоксичні молекули можуть бути безпосередньо або не безпосередньо приєднаними до поліпептидів або антитіл, і включають бактеріальні або рослинні токсини (наприклад, токсин дифтерії, сапорин, екзотоксин *Pseudomonas*, ризин, абрин тощо), а також терапевтичні радіонукліди, як-то йод-131, реній-188 або ітрій-90 (приєднані до поліпептидів чи антитіл безпосередньо або приєднані не безпосередньо, наприклад, через хелатні групи). Поліпептиди або антитіла можуть також бути сполученими з цитотоксичними ліками, як-то адриаміцин. Для не безпосереднього приєднання виявлюваної або цитотоксичної молекули, виявлювана або цитотоксична молекула може бути сполученою з членом пари комплемент-антикомплемента, де інший член приєднаний до частин поліпептидів або антитіл. Прикладом цієї

пари комплемент-антикомплемента є пара біотин/стрептавідин.

Зв'язуючі поліпептиди можуть також діяти як "антагоністи" ліганду α 11 для блокування приєднання ліганду α 11 та передачі сигналу *in vitro* та *in vivo*. Ці поліпептиди проти приєднання ліганду α 11 могли б бути корисними для інгібування активності ліганду α 11 або зв'язування білку.

Конденсовані білки поліпептид-токсин або конденсовані білки антитіло-токсин можна використовувати для інгібування або видалення намічених клітин або тканин (наприклад, для обробки ракових клітин або тканин). Альтернативно, якщо поліпептид має багато функціональних доменів (тобто, домен активації або домен приєднання, рецептору, плюс цільовий домен), конденсований білок, що включає тільки цільовий домен, може бути придатним для спрямування виявлюваної молекули, цитотоксичної молекули або комплементарної молекули до клітин або тканин потрібного типу. У випадках, коли домен конденсованого білку включає тільки комплементарну молекулу, антикомплементарна молекула може бути сполученою з виявлюваною або цитотоксичною молекулою. Такі конденсовані білки з доменом комплементарної молекули, отже, репрезентують спільний цільовий переносник для клітинно/тканино-специфічної доставки спільних антикомплементарно-виявлюваних/цитотоксичних сполучень молекул.

Конденсовані білки ліганду α 11 цитокіну або конденсовані білки антитіло-цитокіну можна використовувати для посилення знищення *in vivo* цільових тканин (наприклад, раку крові та кісткового мозку), якщо поліпептид ліганду α 11 або антитіло проти ліганду α 11 націлене на гіперпроліферативну клітину крові чи кісткового мозку [Дивися, загалом, Homick et al. Blood 89: 4437-47, 1997]. Описані конденсовані білки здатні націлювати цитокін на потрібну ділянку дії, забезпечуючи тим збільшену місцеву концентрацію цитокіну. Придатні поліпептиди ліганду α 11 або антитіла проти ліганду α 11 націлені на небажану клітину або тканину (тобто, пухлини або лейкемії), і конденсований цитокін опосередковує посилений лізис цільових клітин ефекторними клітинами. Придатні для цього цитокіни включають, наприклад, інтерлейкін 2 та фактор стимулювання колоній гранулоцитів-макрофагів (GM-CSF).

Диференціація є поступовим та динамічним процесом, що починається плюрипотентними стовбурними клітинами та закінчується у кінці диференціюваними клітинами. Плюрипотентні стовбурні клітини, що можуть регенерувати клітинування до лінії диференціювання, експресують ряд маркерів диференціювання, що втрачається, коли відбувається клітинування до лінії диференціювання клітин. Вихідні клітини експресують ряд маркерів диференціювання, що можуть або ні продовжувати експресуватися при тому, що клітини просунулися по шляху обміну клітин лінії диференціювання протягом повного розвитку. Маркери диференціювання, що експресуються виключно розвиненими клітинами, мають звичайно функціональні властивості, як-то клітинних продуктів, фе-

рментів для продукування клітинних продуктів та рецепторів. Етап диференціації популяції клітин відслідковують ідентифікацією присутніх у клітинній популяції маркерів.

Виявлені свідчення означають, що фактори, які стимулюють специфічні типи клітин на шляху обміну при кінцевій диференціації або дедиференціації впливають на чисті популяції клітин, що походять зі звичайних попередників чи стовбурних клітин. Отже, згідно з винаходом запропоновано стимулювання або інгібування проліферації лімфоїдних клітин, кровотворних клітин та епітеліальних клітин.

Ліганд $\alpha 11$ виділяли з тканини, відомої як маючу важливу імунологічну функцію, яка містить клітини, що грають роль у імунній системі. Ліганд $\alpha 11$ експресується у CD3+-відібраних, активованих клітинах периферійної крові, і показано, що експресія ліганду $\alpha 11$ збільшується після активації Т-клітин. Більш того, результати експериментів, що описано у розділі Приклади, демонструють, що поліпептиди представленого винаходу впливають на зростання/виращування та/або стан диференціації NK-клітин або NK-попередників. Додаткове свідчення демонструє, що ліганд $\alpha 11$ впливає на проліферацію та/або диференціацію Т-клітин та В-клітин *in vivo*. Фактори, що стимулюють проліферацію кровотворних попередників та активують розвинені клітини загалом відомі. NK-клітини є чутливими до IL-2 самого по собі, але проліферація та активація загалом потребують додаткових факторів росту. Наприклад, показано, що IL-7 та фактор Steel (ліганд c-kit) потребували для утворення колоній NK-попередників. IL-15+IL-2 у комбінації з IL-7 та фактором Steel були ефективнішими [Mrozek et al. Blood 87: 2632-2640, 1996]. Однак, для проліферації специфічних підкласів NK-клітин та/або NK-попередників можуть бути необхідними неідентифіковані цитокіни [Robertson et al. Blood 76: 2451-2438, 1990]. Композиція, що містить ліганд $\alpha 11$ та IL-15, стимулює NK-попередники та NK-клітини з очевидністю, що ця композиція є потужнішою за попередньо описані фактори та комбінації факторів.

Виміри диференціації включають, наприклад, вимір клітинних маркерів, пов'язаних зі специфічною стосовно етапу експресією тканини, ферментною активністю, функціональною активністю або морфологічними змінами [Watt, FASEB, 5: 281-284, 1991; Francis, Differentiation 57: 63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989; всі які надані тут як посилання]. Альтернативно, поліпептид ліганду $\alpha 11$ сам може слугувати додатковим маркером поверхні клітини або секретованим маркером, пов'язаним зі специфічною стосовно етапу експресією тканини. Як так, безпосередній вимір поліпептиду ліганду $\alpha 11$, або втрати його експресії у тканині як його диференціатів, може слугувати маркером для диференціації тканин.

Подібно, безпосередній вимір поліпептиду ліганду $\alpha 11$, або втрати його експресії у тканині можна визначити у тканині або у клітинах як свідчення їх піддавання прогресуванню пухлини. Збільшення інвазивності та рухливості клітини, або

збільшення, чи втрати експресії ліганду $\alpha 11$ у передракових або ракових умовах у порівнянні з нормальною тканиною, можуть слугувати як діагностика для трансформації, інвазії та метастазів при прогресуванні пухлин. Як так, знання стадії прогресування пухлини або її метастазів допоможе лікарю при виборі найпридатнішої терапії, або суворості лікування для індивідуального ракового пацієнта. Способи виміру збільшення чи втрати експресії (мРНК або білку) добре відомі в рівні техніки та описано тут, і їх можна застосовувати до експресії ліганду $\alpha 11$. Наприклад, виявлення або зникнення поліпептидів, що регулюють рухомість клітин можна використовувати для допомоги лікарю діагностувати та прогнозувати рак простати [Banyard, J. та Zetter, B.R., Pak та Metast. Rev. j_7: 449-458, 1999]. Як ефектор рухомості клітин, ліганд $\alpha 11$ збільшення чи втрати експресії можуть слугувати як діагностика для лімфоїдного, В-клітинного, епітеліального, гематопое-тичного та іншого раку.

Більш того, активність та вплив ліганду $\alpha 11$ на прогресування пухлини або її метастази можна вимірювати *in vivo*. Розроблено кілька сингенних мишачих моделей для дослідження впливу поліпептидів, сполук або інших видів лікування на прогресування пухлини. У цих моделях, клітини пухлини з культури імплантують у мишей тієї ж породи, що і донор пухлини. Клітини розвиватимуться у пухлини, що мають подібні характеристики у мишах-реципієнтах, а у деяких моделях з'являтимуться також метастази. Прийнятні моделі пухлин для нашого вивчення включають, серед іншого, карциному легенів Льюїса (ATCC №CRL-1642) та меланому B-16 (ATCC №CRL-323). Звичайно використовують лінії сингенних стосовно мишей C57BL6/J пухлин, які легко культивувати та маніпулювати з ними *in vitro*. Утворені від імплантації кожної з цих ліній клітин пухлини здатні до метастазів у легені у мишей C57BL6/J. Модель карциноми легенів Льюїса нещодавно використано на мишах для ідентифікації інгібітору ангіогенезу [O'Reilly MS, et al. Cell 79: 315-328, 1994]. Мишей C57BL6/J обробляли експериментальним агентом через кожну добу ін'єкцією рекомбінантного білку, агоністу чи антагоністу, або одноразовою ін'єкцією рекомбінантного аденовірусу. Через 3 доби після обробки 10^5 - 10^6 клітин імплантують під шкіру спини. Альтернативно, самі клітини можна інфікувати рекомбінантним аденовірусом, як-то тим, що експресує ліганд $\alpha 11$, перед імплантацією, так щоб білок синтезувався скоріше на ділянці пухлини або інтрацелюлярно, ніж у всьому організмі. У мишей звичайно протягом 5 діб розвиваються видимі пухлини. Пухлинам дозволяють рости протягом до 3 діб, протягом цього періоду вони можуть досягти розміру 1500 - 1800 мм³ - у контрольній обробленій групі. Величину пухлини та масу тіла уважно відслідковують протягом експерименту. Під час умертвіння пухлину видаляють та зважують разом з легенями та печінкою. Маса легенів виявляє гарну кореляцію з масою метастатичної пухлини. Як додатковий вимір, підраховують метастази поверхні легенів. Вирізані пухлину, легені та печінку готують для гістопатологічного дослідження, імуногістохімії та гібридизації *in situ*, викорис-

товуючи відомі в рівні техніки та описані тут способи. Отже, можна визначати вплив розглянутих експресованих поліпептидів, наприклад, ліганду $\alpha 11$, на здатність пухлини створювати судинну сітку та утворювати метастази. На додаток, за винятком використання аденовірусу, імплантовані клітини можна тимчасово трансфектувати лігандом $\alpha 11$. Використання стабільних трансфектантів ліганду $\alpha 11$, а також використання здатних до індукції промотерів для активації експресії ліганду $\alpha 11$ *in vivo* є відомим в рівні техніки, і це можна використовувати в такій системі для дослідження індукції метастазів лігандом $\alpha 11$. Більш того, очищені ліганд $\alpha 11$ або кондиційовані середовища ліганду $\alpha 11$ можна безпосередньо ін'єктувати в таких мишачій моделі, а відтак використовувати в цій системі. Для загального посилення [дивися, O'Reilly MS, et al. *Cell* 79: 315-328, 1994; та Rusciano D, et al. *Murine Models of Liver Metastasis* (Мишачі моделі метастазів у печінці), *Invasion Metastasis* 14: 349-361, 1995].

Ліганд $\alpha 11$ буде корисним при лікуванні онкогенезу, а відтак міг би бути корисним при лікуванні раку. Ліганд $\alpha 11$ інгібує стимульовану EL-4 проліферацію стимульованих анти-IgM нормальних В-клітин, і подібний вплив спостерігають у лініях В-клітин пухлин, означаючи, що може бути терапевтично корисно лікувати пацієнтів лігандом $\alpha 11$ для індукування меншої проліферації клітин В-клітинної пухлини. Ліганд можна було б застосовувати у комбінації з іншими засобами вже при використанні, включаючи звичайні хіміотерапевтичні засоби, а також імунні модулятори, як-то альфа-інтерферон. Показано, що альфа-інтерферон є ефективним при лікуванні деяких лейкемій та тваринних моделей захворювань, а зростання інгібіторного впливу альфа-інтерферону та ліганду $\alpha 11$ є адитивним для щонайменше одної похідної від В-клітин пухлини лінії клітин.

Згідно з винаходом запропоновано спосіб зменшення проліферації В- або Т-клітин, що стосуються пухлин, що включає застосування до ссавця з В- або Т-клітинним новоутворенням кількості композиції ліганду $\alpha 11$, що достатня для зменшення проліферації В- або Т-клітин, що стосуються пухлин. У інших втіленнях, композиція може включати щонайменше один інший цитокін, вибраний з групи, що складається з IL-2, IL-15, IL-4, GM-CSF, ліганду Flt3 або фактору стовбурних клітин.

Згідно з ще одним аспектом винаходу запропоновано спосіб зменшення проліферації В- або Т-клітин, що стосуються пухлин, що включає застосування до ссавця з В- або Т-клітинним новоутворенням кількості композиції антагоністу ліганду $\alpha 11$, що достатня для зменшення проліферації В- або Т-клітин, що стосуються пухлин. У інших втіленнях, композиція може включати щонайменше один інший цитокін, вибраний з групи, що складається з IL-2, IL-15, IL-4, GM-CSF, ліганду Flt3 або фактору проліферації стовбурних клітин, що стосуються В- або Т-клітинних пухлин. Крім того, антагоніст ліганду $\alpha 11$ може бути конденсованим білком ліганд/токсин.

Конденсат токсину ліганд $\alpha 11$ -сапорин можна застосовувати проти подібного кола лейкемій та лімфом, розширюючи кількість лейкемій, які

можна лікувати лігандом $\alpha 11$. Опосередкована конденсованим токсином активація рецептору $\alpha 11$ забезпечує два незалежні засоби для інгібування росту цільових клітин, перший є ідентичний розглянутій дії ліганду поодиноці, а другий обумовлений доставкою токсину через засвоєння рецептору. Обмежений характер лімфоїдної експресії рецептору $\alpha 11$ означає, що сполучення ліганд-сапорин може бути толерантним для пацієнтів.

Коли лікування злоякісних включає трансплантацію алогенного кісткового мозку або стовбурних клітин, ліганд $\alpha 11$ може бути корисним для посилення дії трансплантату на пухлину. Ліганд $\alpha 11$ стимулює створення літчних НК-клітин з обмежених попередників та стимулює проліферацію Т-клітин після активації рецепторів антигену. Відтак, коли пацієнти сприймають алогенні трансплантати кісткового мозку, ліганд $\alpha 11$ посилюватиме генерацію анти-пухлинної реакції, з інфузією донорних лімфоцитів або без неї.

Тканинний розподіл рецептору даного цитокіну дає змогу чітко виявити можливі ділянки дії цього цитокіну. Норзерн-аналіз рецептору $\alpha 11$ виявив транскрипти у селезінці, тимусі, лімфатичному вузлі, кістковому мозку, та лейкоцитах периферійної крові людини. Специфічні типи клітин ідентифікували як експресуючі рецептор $\alpha 11$, і спостерігали сильні сигнали у реакції змішаних лімфоцитів (MLR) та у лімфомі Буркітта Раджі. Дві лінії моноцитів, THP-1 [Tsuchiya et al. *Int. J. Cancer* 26: 171-176, 1980] та U937 [Sundstrom et al. *Int. J. Cancer* 17: 565-577, 1976], були негативними.

Рецептор $\alpha 11$ експресується у відносно високих рівнях у MLR, в яких периферійні мононуклеарні клітини крові (PBMNC) від двох осіб змішують, що призводить до двобічної активації. Визначення високих рівнів транскрипту у MLR, але не на відпочиваючих Т- або В-клітинних популяціях, означає, що експресію рецептору $\alpha 11$ можна індукувати у одному чи більше типах клітин протягом активації. Активації виділених популяцій Т- та В-клітин можна досягти штучно стимулюванням клітин PMA та іономіцином. Коли класифіковані клітини піддавали таким умовам активації, рівні транскрипту рецептору $\alpha 11$ зростали в обох типах клітин, підтверджуючи роль цього рецептору та ліганду $\alpha 11$ в імунній реакції, особливо у експансії аутокринних та паракринних Т- та В-клітин протягом активації. Ліганд $\alpha 11$ може також грати роль у експансії примітивніших попередників, що залучено у лімфоцитоутворення. Присутність низького рівня рецептору $\alpha 11$ знайшли у спочиваючих Т- та В-клітинах, і він був вище регульованим при активації в обох типах клітин. Цікаво, що В-клітини також регулюють інформацію до кінця швидше, ніж Т-клітини, вказуючи, що амплітуда сигналу та час гасіння сигналу є важливими для прийнятної регуляції реакцій В-клітин.

На додаток, велика частина власних клітин кишкової пластини виявляє позитивні сигнали гібридизації з рецептором $\alpha 11$. Ця тканина складається зі змішаної популяції лімфоїдних клітин, включаючи активовані CD4⁺-Т-клітини та активовані В-клітини. Імунна дисфункція, зокрема,

хронічна активація імунної реакції у слизовій оболонці, грає важливу роль у етіології хвороби Крона; аномальна реакція на прозапальні цитокіни та/або продукування прозапальних цитокінів є також підозрілим фактором [Braegger et al., *Annals Allergy* 72: 135-141, 1994; Sartor RB *Am. J. Gastroenterol.* 92: 5S-11S, 1997]. Ліганд *zalpha11* у взаємодії з IL-15 розвиває NK-клітини з попередників з кісткового мозку та збагачує NK-клітинну ефекторну функцію, ліганд *zalpha11* також співстимулює розвинені В-клітини, що стимульовані антитілами проти CD40, але інгібує проліферацію В-клітин на сигнали через IgM. Ліганд *zalpha11* посилює проліферацію Т-клітин у взаємодії з сигналом через рецептор Т-клітин, а надекспресія у трансгенних мишей призводить до лімфопенії та вирощування моноцитів та гранулоцитів. Ця плейотропна дія ліганду *zalpha11* означає, що вона може забезпечити терапевтичну корисність для широкого кола захворювань, що виникають від дефектів імунної системи, включаючи (але без обмеження) системний червоний вовчак (SLE), ревматоїдний артрит (RA), розсіяний склероз (MS), важку міастенію, та діабет. Важливо відмітити, що ці захворювання є результатом комплексного ланцюга імунної дисфункції (SLE, наприклад, є виявленням дефектів у Т- та В-клітинах), та що імунні клітини є залежними від взаємодії одна з одною для виклику можливої імунної реакції. Відтак, ліганд *zalpha11* (або антагоніст ліганду), що можна використовувати для впливу на більше ніж один тип імунних клітин, є притягальним терапевтичним кандидатом для впровадження на багатьох етапах захворювання.

Поліпептиди та білки представленого винаходу можна також використовувати *ex vivo*, як-то у аутологічній культурі кісткового мозку. Коротше, кістковий мозок видаляють з пацієнта до хіміотерапії або трансплантації органу і обробляють лігандом *zalpha11*, як варіант, у комбінації з одним чи більше іншими цитокінами. Оброблений кістковий мозок далі повертають пацієнту після хіміотерапії для прискорення відновлення кісткового мозку або після трансплантації для пригнічення хвороби у проти хазяїна. На додаток, білки представленого винаходу можна також використовувати для вирощування *ex vivo* кісткового мозку або клітин-попередників периферійної крові (PBPC). До обробки кістковий мозок можна стимулювати фактором стовбурних клітин (SCF) для вивільнення ранніх клітин-попередників у периферійний кровообіг. Ці попередники можна зібрати з периферійної крові та концентрувати, а потім обробити у культурі лігандом *zalpha11*, як варіант, у комбінації з одним чи більше іншими цитокінами, включаючи але без обмеження SCF, IL-2, IL-4, IL-7 або IL-15, для диференціації та проліферації у лімфоїдних культурах, які далі можна повернути пацієнту після хіміотерапії або трансплантації.

Згідно з винаходом запропоновано спосіб вирощування кровотворних клітин та попередників кровотворних клітин, що включає культивування кісткового мозку або клітин периферійної крові з композицією, що містить кількість ліганду *zalpha11*, що достатня для продукування збільшеного числа лімфоїдних клітин у клітинах кісткового мозку або

периферійної крові у порівнянні з клітинами кісткового мозку або периферійної крові, культивованими при відсутності ліганду *zalpha11*. Згідно з іншими втіленнями кровотворні клітини та попередники кровотворних клітин є лімфоїдними клітинами. Згідно з іншим втіленням лімфоїдні клітини є NK-клітинами або цитотоксичними Т-клітинами. Крім того, композиція може також включати щонайменше один інший цитокін, вибраний з групи, що складається з IL-2, IL-15, IL-4, GM-CSF, ліганду Flt3 та факторів стовбурних клітин.

Альтернативно, ліганд *zalpha11* може активувати імунну систему, що могло би бути важливим у підтримці імунітету щодо інфекційних захворювань, лікуванні імунокомпромісних пацієнтів, як-то ВІЛ+ пацієнтів, або у посиленні вакцин. Зокрема, стимуляція ліганду *zalpha11* або вирощування NK-клітин, або їх попередників, могли б забезпечити терапевтичну корисність при лікуванні вірусної інфекції та як анти-пухлинного фактору. NK-клітини, можна думати, грають головну роль у знищенні метастатичних клітин пухлини, а пацієнти з метастазами та твердими пухлинами мають зменшені рівні активності NK-клітин [Whiteside et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 230: 221-244, 1998]. Подібно, стимуляція лігандом *zalpha11* імунної реакції проти вірусних та невірусних патогенних агентів (включаючи бактерії, найпростіших та гриби) забезпечуватимуть терапевтичну корисність при лікуванні такої інфекції інгібуванням росту таких інфекційних агентів. Визначення безпосередньо або безпосередньо рівнів патогену або антигену, як то клітини пухлини, присутніх у тілі, можна досягти рядом відомих в рівні техніки та описаних тут способів.

Представлений винахід включає спосіб стимуляції імунної реакції у підданого дії патогену або антигену ссавця, який включає етапи: (1) визначення безпосередньо або безпосередньо рівнів патогену або антигену, присутніх у вказаному ссавці, (2) застосування композиції, яка включає поліпептид ліганду *zalpha11* у фармацевтично прийнятному наповнювачі, (3) визначення безпосередньо або безпосередньо рівнів патогену або антигену у вказаному ссавці, (4) порівняння рівнів патогену або антигену на етапі 1 з рівнем патогену або антигену на етапі 3, при цьому зміна цього рівня є показовою стосовно стимуляції імунної реакції. Згідно з іншим втіленням винаходу композицію ліганду *zalpha11* застосовують повторно. Згідно з іншими втіленнями винаходу антиген є В-клітинною пухлиною, вірусом, паразитом чи бактерією.

Згідно з ще одним аспектом винаходу запропоновано спосіб стимуляції імунної реакції у підданого дії патогену або антигену ссавця, який включає етапи: (1) визначення рівня специфічного стосовно патогену або антигену антитіла, (2) застосування композиції, яка включає поліпептид ліганду *zalpha11* у фармацевтично прийнятному наповнювачі, (3) визначення після застосування рівня специфічного стосовно патогену або антигену антитіла, (4) порівняння рівнів антитіла на етапі 1 з рівнем антитіла на етапі 3, при цьому збільшення цього рівня є показовим стосовно стимуляції імунної реакції.

Полінуклеотиди, що кодують поліпептиди ліганду *zalpha11*, корисні при застосуванні в рамках генної терапії, де потрібно посилити інгібування активності ліганду *zalpha11*. Якщо ссавець має мутований чи відсутній ген ліганду *zalpha11*, ген ліганду *zalpha11* можна ввести у клітини ссавця. Згідно з одним втіленням винаходу ген, що кодує поліпептид ліганду *zalpha11*, вводять *in vivo* у вірусному векторі. Такі вектори включають послаблений чи дефективний ДНК-вірус, як-то, але без обмеження, вірус герпесу (HSV), вірус папіломи, вірус Епштейна-Барра (EBV), аденовірус, аденоасоційований вірус (AAV), тощо. Дефективні віруси, що повністю чи частково втратили вірусні гени, є кращими. Дефективні віруси, після введення у клітину не є інфекційними. Використання векторів дефективних вірусів дозволяє застосування до клітин у специфічних локалізованих ділянках без турботи, що вектор може інфікувати інші клітини. Приклади окремих векторів включають, але без обмеження вектор дефективного вірусу герпесу 1 (HSV1) [Kaplitt et al., *Molec. Cell. Neurosci.* 2: 320-30, 1991]; вектор послабленого аденовірусу, як-то вектор, що описано [Stratford-Perricaudet et al., *J. Clin. Invest.* 90: 626-30, 1992]; та вектор дефективного аденоасоційованого вірусу [Samulski et al., *J. Virol.* 61: 3096-101, 1987; Samulski et al., *J. Virol.* 63: 3 822-8, 1989].

Ген ліганду *zalpha11* можна вводити у ретровірусний вектор, наприклад, як описано [Anderson et al., патент США №5399346; Mann et al. *Cell* 33: 153, 1983; Temin et al., патент США №4650764; Temin et al., патент США №4980289; Markowitz et al., *J. Virol.* 62: 1120, 1988; Temin et al., патент США №5124263; Міжнародна патентна публікація № WO 95/07358, опублікована 16 березня 1995р., Dougherty et al.; and Kuo et al. *Blood* 82: 845, 1993]. Альтернативно, вектор можна вводити ліпофекцією *in vivo*, використовуючи ліпосоми. Синтетичні катіонгенні ліпіди можна використовувати для виготовлення ліпосом для трансфекції *in vivo* гена, що кодує маркер [Feigner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7, 1987; Mackey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8027-31, 1988]. Використання ліпофекції для введення екзогенних генів у специфічні органи *in vivo* має деякі практичні переваги. Молекулярне спрямування ліпосом до специфічних клітин репрезентує одну область корисності. Конкретніше, одну область корисності репрезентує спрямування трансфекції до певних клітин. Наприклад, спрямування трансфекції до певних типів клітин буде зокрема переважним у тканині з клітинною гетерогенністю, як-то імунній системі, підшлунковій залозі, печінці, нирках, та мозку. Ліпіди для спрямування можна хімічно сполучати з іншими молекулами. Спрямовані пептиди (наприклад, гормони або нейротрансмітери), білки, як-то антитіла, або непептидні молекули можна сполучати з ліпосомами хімічно.

Для видалення клітин-мішеней з тіла можливо: вводити вектор як оголену ДНК-плазмиду, а потім реімплантувати трансформовані клітини у тіло. Оголені ДНК-вектори для генної терапії можна вводити у потрібні клітини хазяїна відомими в рівні техніки способами, наприклад, трансфекцією, електропорацією, мікроін'єкцією, трансдукцією, клітин-

ною конденсацією, DEAE-декстраном, осадженням фосфатом кальцію, використанням генного "пострілу з дробовика" або використання транспортеру ДНК-вектору. [Дивися, наприклад, Wu et al. *J. Biol. Chem.* 207: 963-7, 1992; Wu et al., *J. Biol. Chem.* 263: 14621-4, 1988].

Антисенсову методологію можна використовувати для інгібування транскрипції гену ліганду *zalpha11*, як-то інгібування проліферації клітин *in vivo*. Полінуклеотиди, що є комплементарними до сегменту кодуючого ліганду *zalpha11* полінуклеотиду (наприклад, полінуклеотиду, представленого послідовністю SEQ ID NO: 1) призначені для приєднання до кодуючої ліганду *zalpha11* мРНК та інгібування трансляції такої мРНК. Такі антисенсові полінуклеотиди використовують для інгібування експресії кодуючих поліпептид ліганду *zalpha11* генів у культурі клітин або у суб'єкті.

Можна створювати також мишей, що сконструйовані для експресії гена ліганду *zalpha11* і визначені як "трансгенні миші", та мишей, що виявляють повну відсутність функції гена ліганду *zalpha11* та визначені як "нокаутні миші" [Snouwaert et al., *Science* 257: 1083, 1992; Lowell et al. *Nature* 366: 740-42, 1993; Capecchi, M.R., *Science* 244: 1288-1292, 1989; Palmiter, R.D. et al. *Annu Rev Genet.* 20: 465-499, 1986]. Наприклад, трансгенні миші, що надекспресують ліганд *zalpha11*, повсюдно або під впливом тканино-специфічного або тканино-обмежувального промотору, можна використовувати для запиту, чи впливає надекспресія на фенотип. Наприклад, надекспресія поліпептиду ліганду *zalpha11* нативного типу, фрагменту поліпептиду або його мутанту може змінювати нормальні клітинні процеси, приводячи до фенотипу, що ідентифікує тканини, в яких експресія ліганду *zalpha11* є функціонально релевантною і може вказувати терапевтичні мішені для ліганду *zalpha11*, його агоністів або антагоністів. Наприклад, кращою трансгенною мишею для створення є така, що надекспресує ліганд *zalpha11* (амінокислотні залишки 32-162 послідовності SEQ ID NO: 2). Більш того, така надекспресія може призвести до фенотипу, що виявляє подібність із захворюваннями людини. Подібно, нокаутних стосовно ліганду *zalpha11* мишей можна використовувати для визначення, де ліганд *zalpha11* є абсолютно потрібним *in vivo*. Можна мати фенотип нокаутних мишей, що передбачає дію *in vivo* такого антагоністу ліганду *zalpha11*, як той, що тут описано. Для створення нокаутної миші можна використовувати кДНК ліганду *zalpha11* людини або миші. Цих мишей можна застосовувати для дослідження гена ліганду *zalpha11* та кодованого у зв'язку з цим білку у системі *in vivo* і використовувати як моделі *in vivo* для відповідних захворювань людини.

Більш того, експресію трансгенними мишами антисенсових полінуклеотидів або спрямованих проти ліганду *zalpha11* рибосом ліганду *zalpha11*, що тут описано, можна застосовувати аналогічно до описаних вище трансгенних мишей. Вивчення також можна проводити застосуванням очищеного білку ліганду *zalpha11*.

Для фармацевтичного використання, білки представленого винаходу формують для паренте-

ральної, зокрема внутрішньовенної чи підшкірної доставки звичайними способами. Біоактивні сполучення поліпептидів або антитіл, що тут описано, можна доставляти внутрішньовенно, внутрішньо-артеріально або внутрішньопроточно, або можна вводити локально у призначеній ділянці дії. Внутрішньовенне застосування здійснюють звичайно болюсною ін'єкцією або інфузією протягом звичайного періоду у одну чи кілька годин. Загалом фармацевтичні композиції звичайно включають білок ліганду *alpha11* у комбінації з фармацевтично прийнятним наповнювачем, як-то фізіологічний розчин, буферований фізіологічний розчин, 5% декстроза у воді тощо. Композиції можуть включати один чи більше ексципієнтів, консервантів, солюбілізаторів, буферних засобів, альбумін для попередження втрати білку на стінках склянки тощо. Способи формування добре відомі в рівні техніки та розкриті, наприклад, у [Remington: The Science та Practice of Pharmacy, Gennaro, ed. Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th ed., 1995]. Терапевтичні дози знаходяться загалом в межах 0,1-100мкг/кг маси пацієнта на добу, краще 0,5-20мкг/кг на добу, з визначенням точної дози лікарем згідно з загальноприйнятими стандартами, беручи до уваги природу та суворість лікуемого стану, характерні особливості пацієнта тощо. Визначення дози є у компетенції пересічних фахівців. Білки можна застосовувати при гострому лікуванні, протягом тижня чи менше, часто протягом однієї-трьох діб, або можна використовувати при хронічному лікуванні, протягом кількох місяців чи років. Загалом, терапевтично ефективна кількість ліганду *alpha11* є кількістю, що достатня для продукування клінічно помітних змін у кровотворній або імунній функції.

Винахід далі ілюстровано наступними необмежувальними прикладами.

Приклади

Приклад 1 Конструювання поліпептидної химери MPL-*alpha11*: екстрацелюлярний MPL та домен TM конденсували з інтрацелюлярним сигналізаційним доменом *alpha11*

Екстрацелюлярний та трансмембранний домен рецептору MPL миші виділяли з плазмід, що містять рецептор MPL миші (плазіда PHZ1/MPL), використовуючи PCR з праймерами ZC17,212 (SEQ ID NO: 5) та ZC19,914 (SEQ ID NO: 6). Реакційні умови були такими: 95°C протягом 1 хвилини, 35 циклів при 95°C протягом 1 хвилини, 45°C протягом 1 хвилини, 72°C протягом 2 хвилин, а потім 72°C протягом 10 хвилин, і далі просочування при 10°C. Продукт PCR проганяли на 1% агарозі з низкою температурою плавлення (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) та виділяли фрагмент рецептору MPL розміром приблизно 1,5 ко, використовуючи гель-екстракційний комплект Qiaquick™ (Qiagen) за інструкціями виробника.

Інтрацелюлярні домени *alpha11* людини виділяли з плазмиди, що містить кДНК рецептору *alpha11*, використовуючи PCR з праймерами ZC19,913 (SEQ ID NO: 8) та ZC20,097 (SEQ ID NO: 9). Полінуклеотидна послідовність, що відповідає до кодуєчій рецептору *alpha11* послідовності, показана як SEQ ID NO: 7, а відповідна амінокислотна послідовність показана як SEQ ID NO: 115. Реак-

ційні умови аналогічні вищезазначеним. Продукт PCR проганяли на 1% агарозі з низкою температурою плавлення (Boehringer Mannheim) та фрагмент *alpha11* розміром приблизно 900 по виділяли, використовуючи гель-екстракційний комплект Qiaquick за інструкціями виробника.

Кожний з описаних вище виділених фрагментів змішували при об'ємному співвідношенні 1:1 та використовували у реакції PCR, використовуючи ZC17,212 (SEQ ID NO: 5) та ZC20,097 (SEQ ID NO: 9) для створення химери MPL-*alpha11*. Реакційні умови були такими: 95°C протягом 1 хвилини, 35 циклів при 95°C протягом 1 хвилини, 55°C протягом 1 хвилини, 72°C протягом 2 хвилин, а потім 72°C протягом 10 хвилин, і далі просочування при 10°C. Чистий продукт PCR проганяли на 1% агарозі з низкою температурою плавлення (Boehringer Mannheim) та виділяли фрагмент химери MPL-*alpha11* розміром приблизно 2,4 ко, використовуючи гель-екстракційний комплект Qiaquick™ (Qiagen) за інструкціями виробника. Фрагмент химери MPL-*alpha11* розщеплювали за допомогою EcoRI (BRL) та XbaI (Boehringer Mannheim) за інструкціями виробника. Весь продукт розщеплення проганяли на 1% агарозі з низкою температурою плавлення (Boehringer Mannheim) та розщеплену химеру MPL-*alpha11* виділяли, використовуючи гель-екстракційний комплект Qiaquick™ (Qiagen) за інструкціями виробника. Одержану розщеплену химеру MPL-*alpha11* вставляли у експресійний вектор як описано нижче.

Реципієнтний експресійний вектор pZP-5N розщеплювали за допомогою EcoRI (BRL) та HindIII (BRL) за інструкціями виробника, а гель очищали як описано вище. Цей фрагмент вектору комбінували з виділеною вище розщепленою EcoRI та XbaI химерою MPL-*alpha11* та XbaI/HindIII лінкерним фрагментом у реакції лігування. Лігування здійснювали, використовуючи лігазу ФАГУ T4 (BRL), при 15°C протягом ночі. Зразок після лігування електропорували у електрокомпетентні клітини E. coli DHIOB ElectroMAX™ i (25мкФ, 200Ом, 2,3В). Трансформанти засівали на планшети LB+ампіцилін та скринували одиничні колонії за допомогою PCR для перевірки химери MPL-*alpha11*, використовуючи ZC17,212 (SEQ ID NO: 5) та ZC20,097 (SEQ ID NO: 9), використовуючи описані вище умови PCR.

Підтвердження послідовності химери MPL-*alpha11* провели секвенсуванням, використовуючи такі праймери: ZC12,700 (SEQ ID NO: 10), ZC5,020 (SEQ ID NO: 11), ZC6,675 (SEQ ID NO: 12), ZC7,727 (SEQ ID NO: 13), ZC8,290 (SEQ ID NO: 14), ZC19,572 (SEQ ID NO: 15), ZC6,622 (SEQ ID NO: 16), ZC7,736 (SEQ ID NO: 17) та ZC9,273 (SEQ ID NO: 18). Інсерція мала розмір приблизно 2,4 ко, та була повної довжини.

Приклад 2 Проліферація на основі химери MPL-*alpha11* у дослідженні BAF3 з використанням аламар-блакитного

А. Конструювання експресуючих химери MPL-*alpha11* клітин BaF3

Залежну від інтерлейкіну-3 (IL-3) лінію предлімфоїдних клітин BaF3, похідну від кісткового мозку миші [Palacios та Steinmetz, Cell 41: 727-734. 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135,

1986], витримували у повному середовищі (середовище RPMI (JRH Bioscience Inc. Lenexa, KS) доповненому 10% інактивованої нагріванням сироватки зародка теляти, 2нг/мл IL-3 миші (mIL-3) (R & D, Minneapolis, MN), 2мМ L-glutaMax-1™ (Gibco BRL), 1мМ пірувату натрію (Gibco BRL), та PSN-антибіотики (GIBCO BRL)). До електропорації виготовляли та очищали ДНК плазмиди pZP-5N/MPL-zalpha11 (приклад 1), використовуючи комплект Qiagen Maxi Prep (Qiagen) за інструкціями виробника. Клітини BaF3 для електропорації промивали однократно у середовищах RPMI, а потім ресуспендували у середовищах RPMI при густині клітин 10⁶ клітин/мл. Один мл ресуспендованих клітин BaF3 змішували з 30мкг ДНК плазмиди pZP-SN/MPL-zalpha11 та переносили у окремі одноразові електропораційні камери (GIBCO BRL). Через 15 хвилин інкубації при кімнатній температурі клітини піддавали двом серійним шокам (800 IFad/300 В, 1180 IFad/300 В) за допомогою електропораційного приладу (CELL-PORATOR™; GIBCO BRL). Через 5 хвилин відновлення, електропоровані клітини переносили у 50мл повного середовища та витримували в інкубаторі протягом 15-24 годин (37°C, 5% CO₂). Клітини далі перемішували та ресуспендували у 50мл повного середовища, що включає Genetec™ (Gibco) селекцію (500мкг/мл G418) у колбі T-162 для виділення стійкого до G418 об'єднання. Об'єднання трансфектованих клітин BaF3, позначених далі як клітини BaF3/MPL-zalpha11, досліджували на сигналізаційну здатність, як описано нижче.

В. Тестування сигналізаційної здатності клітин BaF3/MPL-zalpha11, використовуючи дослідження проліферації з аламар-блакитним

Клітини BaF3/MPL-zalpha11 перемішували та промивали повним середовищем, описаним вище, але без mIL-3 (позначено далі як "позбавлене mEL-3 середовище"). Клітини перемішували та промивали тричі для гарантування видалення mIL-3. Клітини підраховували далі у гематиметрі. Клітини засівали у 96-коміркову форму при кількості клітин 5000 на комірку у об'ємі 100мкл на комірку, використовуючи позбавлене mIL-3 середовище.

Проліферацію клітин BaF3/MPL-zalpha11 досліджували, використовуючи м-тромбопоетин миші (mTPO), розбавлений позбавленим mIL-3 середовищем до концентрацій 500нг/мл, 250нг/мл, 125нг/мл, 62нг/мл, 30нг/мл, 15нг/мл, 7,5нг/мл, 3,75нг/мл, 1,8нг/мл, 0,9нг/мл, 0,5нг/мл та 0,25нг/мл. 100мкл розбавленого mTPO додавали до клітин BaF3/MPL-zalpha11. Загальний об'єм при дослідженні - 200мкл. Негативні контролю проводили паралельно, використовуючи тільки позбавлене mIL-3 середовище RPMI, без добавки mTPO. Досліджувані планшети інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 3 діб, в цей час додавали аламар-блакитний (Accumed, Chicago, IL) при 20мкл/комірku. Аламар-блакитний дає флуориметричні показання приладу на основі метаболічної активності клітин, і дає тому безпосередній вимір проліферації клітин у порівнянні з негативним контролем. Планшети знов інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 24 годин. Планшети зчитували на планшетному зчитувачі Fmax™ (Molecular Devices

Sumiyvale, CA), використовуючи програму SoftMax™ Pro, при довжині хвилі 544 (збудження) та 590 (емісія).

Результати підтверджують сигналізаційну здатність інтрацелюлярної частини рецептору zalpha11, як індуковану тромбопоетином проліферацію приблизно у 10 разів більше фону при концентраціях mTPO 62нг/мл та більше.

Приклад 3 Конструювання вектору експресії zalpha11 повної довжини

Суцільний рецептор zalpha11 виділяли з плазмиди, що містить кДНК рецептору zalpha11 (SEQ ID NO: 7), використовуючи PCR з праймерами ZC 19,905 (SEQ ID NO: 19) та ZC 19,906 (SEQ ID NO: 20). Реакційні умови були такими: 95°C протягом 1 хвилини; 35 циклів при 95°C протягом 1 хвилини, 55°C протягом 1 хвилини, 72°C протягом 2 хвилин; а потім 72°C протягом 10 хвилин; і далі просочування при 10°C. Продукт PCR проганяли на 1% гелі агарози з низкою температурою плавлення (Boehringer Mannheim) та виділяли кДНК zalpha11 розміром приблизно 1,5 ко, використовуючи гель-екстракційний комплект Qiaquick™ (Qiagen) за інструкціями виробника.

Очищену кДНК zalpha11 розщеплювали за допомогою BamHI (Boehringer Mannheim) та EcoRI (BRL) за інструкціями виробника. Весь продукт розщеплення проганяли на 1% гелі агарози з низкою температурою плавлення (Boehringer Mannheim) та розщеплений фрагмент zalpha11 очищали, використовуючи гель-екстракційний комплект Qiaquick™ за інструкціями виробника. Утворений розщеплений фрагмент zalpha11 вставляли у експресійний вектор як описано нижче.

Реципієнтний експресійний вектор pZP-5N розщеплювали за допомогою BamHI (Boehringer Mannheim) та EcoRI (BRL) за інструкціями виробника, та очищали на гелі, як описано вище. Цей фрагмент вектору комбінували з виділеним вище розщепленим BamHI та EcoRI фрагментом zalpha11 у реакції лігування, використовуючи лігazu фалу T4 (BRL). Лігувальну суміш інкубували при 15°C протягом ночі. Зразок після лігування електропорували у електрокомпетентні клітини E. coli DHIOB electroMAX™ (25мкФ, 200Ом, 2,3В). Трансформанти засівали на планшети з LB+ампіцилін та скринували одиничні колонії за допомогою PCR для перевірки послідовності zalpha11, використовуючи ZC 19,905 (SEQ ID NO: 19) та ZC 19,906 (SEQ ID NO: 20) і умови PCR, що описано вище.

Підтвердження послідовності zalpha11 робили секвенсуванням, використовуючи такі праймери: ZC12/700 (SEQ ID NO: 10), ZC5,020 (SEQ ID NO: 11), ZC20,114 (SEQ ID NO: 21), ZC 19,459 (SEQ ID NO: 22), ZC 19,954 (SEQ ID NO: 23), та ZC20,116 (SEQ ID NO: 24). Вставка мала розмір приблизно 1,6 ко та повну довжину.

Приклад 4 Дослідження на базі проліферації zalpha11 у BAF3, використовуючи аламар-блакитний

А. Конструювання експресуючих рецептор zalpha11 клітин BaF3

Клітини BaF3, що експресують рецептор zalpha11 повної довжини конструювали як у прикладі 2А вище, використовуючи 30мкг описаного вище у прикладі 3 експресійного вектору zalpha11.

Клітини BaF3, що експресують mPHK рецептору $\alpha 11$, позначали як BaF3/ $\alpha 11$. Ці клітини використовували для екранування ліганду $\alpha 11$, як описано нижче у прикладах 5 та 6.

Приклад 5 Дослідження проліферації скринінгом стосовно ліганду $\alpha 11$. використовуючи клітини BaF3/ $\alpha 11$ та аламар-блакитний

А. Активація первинних спленоцитів мавпи для тестування наявності ліганду $\alpha 11$

Спленоцити мавпи стимулювали *in vitro* для продукування кондиційованих середовищ для тестування на наявність активності ліганду $\alpha 11$, як описано нижче. Селезінки мавп отримували від самиць мавп *M. nesestrian* віком 8 років. Селезінки частково лізували для продукування суспензії одиничних клітин. Мононуклеарні клітини виділяли за допомогою градієнта густини Ficoll-Paque® PLUS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Мононуклеарні клітини засівали при 2×10^6 клітин/мл у середовищі RPMI-1640, доповненому 10% FBS та активованому 5нг/мл форбол-12-міристан-13-ацетату (PMA) (Calbiochem, San Diego, CA), та 0,5мг/мл іономіцину (Calbiochem) протягом 48 годин. Супернатант від стимульованих клітин селезінки мавпи використовували для дослідження проліферації клітин BaF3/ $\alpha 11$, як описано нижче.

В. Дослідження проліферації скринінгом стосовно ліганду $\alpha 11$. використовуючи клітини BaF3/ $\alpha 11$ та аламар-блакитний

Клітини BaF3/ $\alpha 11$ перемішували та промивали у позбавленому mIL-3 середовищі. Клітини перемішували та промивали тричі для гарантування видалення mIL-3. Клітини підраховували далі у гемоцитометрі. Клітини засівали у 96-коміркову форму при 5000 клітини на комірку у об'ємі 100мкл на комірку, використовуючи позбавлене mIL-3 середовище.

Проліферацію клітин BaF3/ $\alpha 11$ досліджували, використовуючи кондиційовані середовища з активованої селезінки мавп (дивися приклад 5A). Кондиційовані середовища розбавляли позбавленим mIL-3 середовищем до концентрацій 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% та 0,375%. До клітин BaF3/ $\alpha 11$ додавали 100мкл розбавленого кондиційованого середовища. Загальний досліджуваний об'єм складав 200мкл. Досліджувані планшети інкубували при 37°C, 5% CO₂, протягом 3 діб, після чого додавали 20мкл/комірку аламар-блакитного (Accumed, Chicago, IL). Планшети знов інкубували при 37°C, 5% CO₂, протягом 24 годин. Планшети зчитували на планшетному зчитувачі Fmax™ (Molecular Devices) як описано вище (приклад 2).

Результати підтверджували проліферативну реакцію клітин BaF3/ $\alpha 11$ на фактор, присутній у активованому кондиційованому середовищі селезінки мавпи. Реакція, як виміряно, була приблизно у 4 рази вище фонові при 50% концентрації. Нетрансфектовані клітини BaF3 не проліферують у реакції на цей фактор, виявляючи, що цей фактор є специфічним для рецептору $\alpha 11$.

С. Первинне джерело з людини, використане для виділення ліганду $\alpha 11$

Від кожного з 6 донорів брали по 100 мл крові. Кров відбирали, використовуючи вакутайнерні

(vacutainer) туби 10X10мл, що містять гепарин. Кров від 6 донорів об'єднували (600мл), розбавляли 1:1 у PBS, та розділяли, використовуючи Ficoll-Paque® PLUS (Pharmacia Biotech). Вихід виділених первинних клітин людини після розділення на фікол-градієнті складав $1,2 \times 10^9$ клітин.

Клітини суспендували у 9,6мл буферу MACS (PBS, 0,5% EDTA, 2мМ EDTA). 1,6мл суспензії клітин видаляли та додавали 0,4мл мікрокульок CDS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Суміш інкубували протягом 15 хвилин, при 4°C. Ці клітини мітили кульками CDS промивали 30мл буферу MACS, а потім ресуспендували у 2мл буферу MACS.

VS+-колонку (Miltenyi) виготовляли за інструкціями виробника. VS+-колонку розміщали далі у магнітному полі VarioMACS™ (Miltenyi). Колонку урівноважували 5мл буферу MACS. Виділені первинні клітини людини далі вносили у колонку. Негативним клітинам CD3 дозволяли пройти наскрізь. Колонку промивали 9мл (3x3мл) буферу MACS. Колонку далі видаляли від магніту та розміщали над 15-мл тубою Фалькона. CD3+-клітини елюювали додаванням 5мл буферу MACS до колонки та вимивали зв'язані клітини, використовуючи забезпечений виробником шток. Інкубацію клітин з магнітними кульками CD3, промивки, та вищезазначені етапи на VS+-колонці (інкубації - елюювання) повторювали приблизно п'ять разів. Утворені CD3+-фракції з шести розділень на колонках об'єднували. Вихід CD3+-відібраних людини клітини складав загалом 3×10^6 клітини.

Зразок об'єднаних CD3+-відібраних людини клітини видаляли для виявлення та сортування на флуоресцентному сортувальному пристрої клітин антитіл (FACS) для оцінки їх чистоти.

CD3+-відібрані клітини людини складали 91% CD3+ клітин.

CD3+-відібрані клітини людини активували інкубуванням у RPMI+5% FBS+PMA 10нг/мл та іономіцину 0,5мг/мл (Calbiochem) протягом 13 годин при 37°C. Супернатант від цих активованих CD3+-відібраних клітин людини тестували на активність ліганду $\alpha 11$, як описано нижче. Більш того, активовані CD3+-відібрані клітини людини використовували для виготовлення бібліотек кДНК, як описано у прикладі 6, нижче.

Д. Тестування супернатанту з активованих CD3+-відібраних клітин людини на ліганд $\alpha 11$, використовуючи клітини BaF3/ $\alpha 11$, та дослідження проліферації з аламар-блакитним

Клітини BaF3/ $\alpha 11$ перемішували та промивали у позбавленому mIL-3 середовищі. Клітини перемішували та промивали тричі для гарантування видалення mIL-3. Клітини підраховували далі у гемоцитометрі. Клітини засівали у 96-коміркову форму при 5000 клітини на комірку у об'ємі 100мкл на комірку, використовуючи позбавлене mIL-3 середовище.

Проліферацію клітин BaF3/ $\alpha 11$ досліджували, використовуючи кондиційоване середовище від активованих CD3+-відібраних клітин людини (дивися приклад 5C), розбавлене позбавленим mIL-3 середовищем до 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% та 0,375% концентрацій. 100мкл розбавленого кондиційованого середовища додавали до клітин BaF3/ $\alpha 11$. Загальний

об'єм у дослідженні 200мкл. Досліджувані планшети інкубували та досліджували як описано у прикладі 5В.

Результати підтверджували проліферативну реакцію клітин BaF3/zalpa11 на наявний у активованих CD3+-відібраних клітинах людини кондиційованому середовищі фактор. Реакція, як виміряно, була приблизно у 10 разів вище фоновій при 50% концентрації. Нетрансфектовані клітини BaF3 не проліферували у реакції на цей фактор, виявляючи, що цей фактор є специфічним для рецептору zalpa11. Більш того розчинний рецептор zalpa11 блокував цю проліферативну активність у клітинах BaF3/zalpa11 (дивися приклад 11).

Приклад 6 Клонування ліганду zalpa11 людини з бібліотеки CD3+-відібраних клітин людини

Скринінгом бібліотеки кДНК первинних активованих CD3+-відібраних клітин людини виявили виділену кДНК, що є новим членом родини цитокінів з чотирьох-спіральною жмутом. Ця кДНК кодувала ліганд zalpa11. кДНК ідентифікували скринінгом на активність ліганду zalpa11, використовуючи рецептор zalpa11.

Вектор для конструювання CD3+-відібраних бібліотек

Вектором для конструювання CD3+-відібраних бібліотек був рP7NX. Вектор рP7NX конструювали таким чином: Кодуючий регіон селективного маркера DHFR у векторі рP7 видаляли розщепленням ДНК рестрикційними ферментами NcoI та PstI (Boehringer Mannheim). Розщеплену ДНК проганяли на 1% гелі агарози, вирізали її та очищали на гелі, використовуючи гель-екстракційний комплект Qiagen (Qiagen) за інструкціями виробника. Фрагмент ДНК, репрезентуючий кодуючий регіон зеосин-селективного маркера ампліфікували способом PCR з праймерами ZC 13,946 (SEQ ID NO: 25) та 13,945 (SEQ ID NO: 26), та pZeoSV2(+) як темплатом. Наявними у праймері ZC 13,946 (SEQ ID NO: 25) є додаткові рестрикційні сайти PstI та BclI, а у праймері ZC13,945 (SEQ ID NO: 26) додаткові сайти NcoI та SfuI. Фрагмент PCR розрізали рестрикційними ферментами PstI та NcoI і клонували у вектор рP7 виготовлений розщепленням тими ж двома ферментами та подальшою очисткою на гелі. Цей вектор позначали як рP7Z. Далі кодуючий зеосин регіон видаляли розщепленням ДНК вектору рP7Z рестрикційними ферментами BclI та SfuI. Розщеплену ДНК проганяли на 1% гелі агарози, вирізали та очищали на гелі, а потім зшивали з фрагментом ДНК кодуючого неоміцин регіону, вирізаного з вектору рZem228 (зберігається у American Type Culture Collection (Американська колекція типів культур - ATCC), Manassas, VA; ATCC №69446) з тими ж самими рестрикційними ферментами (Bell та SfuI).

Цей новий вектор позначили як рP7TN, у ньому кодуючий селективний маркер DHFR регіон замінювали кодуючим регіоном для селективного маркера для неоміцину з вектору рZem228. Фрагмент наповнювачу, включаючи сайт XhoI, додавали до рP7TN для створення вектору, придатного для високої ефективності спрямованого клонування кДНК; цей вектор позначили як рP7NX. Для виготовлення вектору для кДНК 20мкг рP7NX розщеплювали за допомогою 20 одиниць EcrRI

(Life Technologies Gaithersburg,MD) та 20 одиниць XhoI (Boehringer Mannheim Indianapolis,IN) протягом 5 годин при 37°C, далі при 68°C протягом 15 хвилин. Продукт розщеплення далі проганяли на 0,8% гелі агарози з низькою температурою плавлення IXAE для відокремлення наповнювачу від вектору. Векторну смугу вирізали та розщеплювали за допомогою "β-агарази" (New England Biolabs, Beverly, MA) за інструкціями виробника. Після осадження етанолом розщеплений вектор ресуспендували у воді до 45нг/мл у препараті для лігування описаній нижче CD3+-відібраної бібліотеки кДНК.

В. Виготовлення бібліотеки кДНК первинних активованих CD3+-відібраних клітин людини

Приблизно $1,5 \times 10^5$ первинних CD3+-відібраних клітин людини, стимульованих у іономіцині/РМА виділяли центрифугуванням після культивування при 37°C протягом 13 годин (приклад 5С). Загальну РНК виділяли з пелети клітин, використовуючи комплект РНazi "RNeasy Midi" від Qiagen, Inc. (Valencia, CA). мРНК виділяли з 225 мікрограм загальної РНК, використовуючи комплект для очистки мРНК "MPG" від CPG Inc. (Lincoln Park, NJ). 3,4 мікрограм мРНК виділяли та перетворювали у дволанцюгову кДНК, використовуючи такий спосіб.

Перший ланцюг кДНК зі стимульованих CD3+-відібраних клітин людини синтезували так. Дев'ять мкл оліго d(T)-вибраної полі(А) CD3+ РНК у концентрації 0,34мкг/мкл та 1,0мкл розчину з концентрацією праймеру першого ланцюга ZC 18,698 (SEQ ID NO: 27) 1мкг/мкл, що містить рестрикційний сайт XhoI, змішували та гріли при 65°C протягом 4 хвилин і охолоджували охолодженням на льоді. Синтез першого ланцюга кДНК ініціювали додаванням 9мкл буферу для першого ланцюга (5x SUPERScript® буфер; (Life Technologies), 4мкл розчину з концентрацією дитіотреїтолу 100мМ та 2мкл розчину трифосфату дезоксинуклеотиду, що містять 10мМ кожного з dATP, dGTP, dTTP та 5-метил-dCTP (Pharmacia Biotech Inc.) до суміші РНК-праймерів. Реакційну суміш інкубували при 45°C протягом 4 хвилин з наступним додаванням 8мкл розчину з концентрацією SuperscriptII®, зворотної транскриптази RNase H (Life technologies) 200одмкл. Реакційну суміш інкубували при 45°C протягом 45 хвилин з наступним підвищенням температури інкубації на 1°C кожні 2 хвилин до 50°C, коли реакційну суміш витримували протягом 10 хвилин. Для денатурації будь-якої вторинної структури та дозволу додаткового подовження кДНК реакційну суміш далі гріли при 70°C протягом 2 хвилин, далі температуру знижували до 55°C протягом 4 хвилин, після чого додавали 2 мкл SuperscriptII® RT та інкубували додаткові 15 хвилин з наступним підвищенням температури до 70°C на 1°C за хвилину. Невбудовані нуклеотиди видаляли від кДНК двічі осадженням у присутності 2мкг глікогенового носія, 2,0М ацетату амонію та 2,5 об'ємів етанолу, з наступною промивкою 100мкл 70% етанолу. кДНК ресуспендували у 98мкл води для використання у синтезі другого ланцюга.

Синтез другого ланцюга проводили на першому ланцюгу кДНК в умовах, що стимульовані праймуванням першим ланцюгом синтезу другого ланцюга, призводячи до утворення шпильки ДНК.

Реакційна суміш для другого ланцюга, що містить 98мкл кДНК першого ланцюга, 30мкл 5х буферу полімерази I (100мМ Трис: HCl, pH 7,5, 500мМ KCl, 25мМ MgCl₂, 50мМ (NH₄)₂SO₄), 2мкл розчину з концентрацією дитіотреїтолу 100мМ, 6 мкл розчину, що містить 10мМ кожного з трифосфатів дезоксинуклеотиду, 5мкл розчину з концентрацією b-NAD 5мМ, 1мкл розчину з концентрацією ДНК-лігази E. coli (New England Biolabs Inc.) 30д/мкл та 4 мкл розчину з концентрацією ДНК-полімерази E. coli I (New England Biolabs Inc.) 100д/мкл. Реакційну суміш складали при кімнатній температурі та інкубували при кімнатній температурі протягом 2 хвилин з наступним додаванням 4мкл рибонуклеази H у концентрації 3,80д/мкл (Life Technologies). Реакційну суміш інкубували при 15°C протягом двох годин з наступною інкубацією протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. До реакційної суміші додавали 10мкл 1М TRIS з pH 7,4 та екстрагували двічі фенолом/хлороформом та один раз хлороформом, органічні фази далі знов екстрагували 50мкл TE (10мМ TRIS з pH 7,4, 1мМ EDTA), об'єднували іншим водним розчином та осаджували етанолом у присутності 0,3М ацетату натрію. Гранулу промивали 100мкл 70% етанолу, сушили на повітрі та ресуспендували у 40мкл води.

Одноланцюгову ДНК структури шпильки розщеплювали, використовуючи нуклеазу золотавої квасолі. Реакційну суміш, що містить 40мкл другого ланцюга кДНК, 5мкл 10х буферу нуклеази золотавої квасолі (Life technologies), 5мкл нуклеази золотавої квасолі (Pharmacia Biotech Corp.), розбавленої до 10д/мкл у 1х буфері нуклеази золотавої квасолі. Реакційну суміш інкубували при 37°C протягом 45 хвилин. Реакцію зупиняли додаванням 10 ІІ 1М Трис:HCl з pH 7,4 з наступними послідовними екстракціями фенолом/хлороформом та хлороформом, як описано вище. Після екстракцій, кДНК осаджували етанолом у присутності 0,3М ацетату натрію. Пелету промивали 100мкл 70% етанолу, сушили на повітрі та ресуспендували у 38мкл води.

Ресуспендовану кДНК притуплювали ДНК-полімеразою ФАГУ Т4. кДНК, яку ресуспендували у 38мкл води, змішували з 12мкл 5х буферу ДНК-полімерази ФАГУ Т4 (250мМ Трис:HCl з pH 8,0, 250мМ KCl, 25мМ MgCl₂), 2мкл 0,1М дитіотреїтолу, по 6мкл розчину, що містить 10мМ трифосфати кожного з дезоксинуклеотидів та 2мкл розчину з концентрацією ДНК-полімерази ФАГУ Т4 (Boehringer Mannheim Соф.) 10д/мкл. Після інкубації протягом 45 хвилин при 15° С, реакцію зупиняли додаванням 30мкл TE з наступними послідовними екстракціями фенолом/хлороформом та хлороформом та знов екстрагували 20мкл TE як описано вище. ДНК осаджували етанолом у присутності 2мкл носія Pellet Paint™ (Novagen) та 0,3М ацетату натрію та ресуспендували у 11мкл води.

Адаптери Eco RI зшивали з 5' закінченнями описаної вище кДНК для полегшення клонування у експресійний вектор. 11мкл кДНК та 4 мкл розчину з концентрацією гемі-фосфорилізованого адаптеру Eco RI (Pharmacia Biotech Corp) 65пмоль/мкл змішували з 5мкл 5х буферу лігази (Life Technologies), 2мкл розчину з концентрацією ATP 10мМ та 3мкл розчину з концентрацією ДНК-лігази

ФАГУ Т4 (Life Technologies) 10д/мкл, 1мкл 10х лігаційного буферу (Promega Corp), 9мкл води. Додаткове розбавлення 1х буфером було зроблено для попередження забарвлення пелети при осадженні. Реакційну суміш інкубували 9 годин на водяній бані з підйомом температури з 10°C до 22°C протягом 9 годин, з наступними 45 хвилинами при 25°C. Реакцію зупиняли інкубацією при 68°C протягом 15 хвилин.

Для полегшення спрямованого клонування кДНК у експресійний вектор, кДНК розщеплювали за допомогою XhoI, одержуючи кДНК, що має 5' зв'язуюче закінчення Eco RI та 3' зв'язуюче закінчення XhoI. Рестрикційний сайт XhoI на 3' закінченні кДНК введено попередньо, використовуючи праймер ZC 18698 (SEQ ID NO: 27). Рестрикційне ферментне розщеплення проводили у реакційній суміші, що містить 35мкл суміші для лігування описаної вище, 6мкл 10х буферу H (Boehringer Mannheim Corp.), 3мкл розчину з концентрацією 2мг/мл BSA (Biolabs Corp.), 17мкл води та 1,0мкл розчину з концентрацією 400д/мкл XhoI (Boehringer Mannheim). Розщеплення проводили при 37°C протягом 1 години. Реакцію зупиняли інкубацією при 68°C протягом 15 хвилин з наступним осадженням етанолом, промивкою сушкою як описано вище та ресуспендуванням у 30мкл води.

Ресуспендовану кДНК гріли при 65°C протягом 5 хвилин та охолоджували на льоді, додавали 4мкл 5х гелю, завантаженого барвником (Research Genetics Corp.), кДНК завантажували на 0,8% гель агарози з низькою температурою плавлення IX TAE (агароза з низькою температурою плавлення SEA PLAQUE GTG™; FMC Corp.) та піддавали електрофорезу. Забруднювальні адаптери та кДНК розміром менше 0,6 ко у довжину вирізали з гелю. Електроди реверсували, розплавлену агарозу додавали у комірки до заповнення, буфер замінювали та кДНК піддавали електрофорезу, поки концентрація не досягала початкової. Зону гелю, що містить концентровану кДНК вирізали та розміщали у туби мікроцентрифуги, та плавили агарозу нагріванням до 65°C протягом 15 хвилин. Після урівноважування зразку при 45°C додавали 2мкл розчину β-агарози з концентрацією 10д/мкл 1 (Biolabs, Inc.) та суміш інкубували протягом 90 хвилин, при 45°C для розщеплення агарози. Після інкубації, десятку частину об'єму 3М ацетату Na додавали до зразку та суміш інкубували на льоді протягом 15 хвилин. Зразок центрифугували при 14,000хг протягом 15 хвилин при кімнатній температурі для видалення нерозщепленої агарози, кДНК осаджували етанолом, промивали 70% етанолом, сушили на повітрі та ресуспендували у 40мкл води.

Для визначення оптимального співвідношення кДНК/вектор кілька лігувань складали та електропорували. Коротше, 2мкл 5х буферу лігази ФАГУ Т4 (Life Technologies), 1мкл 10мМ ATP, 1мкл розщепленого за допомогою EcoRI-XhoI pZP7NX, 1 ДНК-лігази ІІ ФАГУ Т4 розбавляли до 0,250д/мкл (Life Technologies) водою до 10мкл, та змішували у 4 окремих лігуваннях 0,5, 1,2 або 3 мкл кДНК, інкубували при 22°C протягом 4 годин, 68°C протягом 20 хвилин, осаджували етанолом-ацетатом натрію, промивали, сушили та ресуспендували у 10

II. Одиничний мікролітр кожного лігування електропорували у 40мкл електрокомпетентних бактерій DH10b ElectroMax™ (Life Technologies), використовуючи кювету на 0,1см (Biorad) та регулятор імпульсів Genepulser, pulse controller™ (Biorad) встановлений на 2,5кВ, 251Ф, 200Ом. These клітини негайно ресуспендували у 1 мл. відвару SOC (Manniat, et al. вище.) з наступними 500 II 50% гліцерину-SOC як консервантом. Ці "гліцеринові вихідні розчини" заморожували у кількох аліквотах при -70°C. Аліквоту кожного розтоплювали та серійно помішали на LB-агарові планшети, доповнені ампіциліном при концентрації 100мкг/мл. Число колоній засвідчило, що оптимальне співвідношення CD3+-кДНК до вектору pZPTNX складало 1мкл до 45нг; таке лігування дало 4,5 мільйони первинних клонів.

Для скринінгу цієї бібліотеки, використовуючи аналіз на основі дослідження проліферації BaF3-zalpha11 (приклад 5), отримані вище гліцеринові вихідні розчини розбавляли у рідких культурах 100 або 250 клонів на об'єднання у мікротитрувальних планшетах з глибокими комірками, вирощували 24 години при 37°C зі збовтуванням та виділяли плазмиду, використовуючи комплект Qiagen за інструкціями виробника. Таку ДНК потім трансфектували у клітини BHK, середовища кондиціювали 72 години, збирали та розміщали на клітинах 5K BaF3-zalpha11 протягом 72 годин, після чого досліджували проліферацію, використовуючи дослідження флуоресценції аламар-блакитного (приклад 5B та приклад 2B).

Для скринінгу бібліотеки клонуванням на уловлювання секреції, комплекс, ампліфікована форма бібліотеки, необхідний для трансфекції клітин COS-7. Приблизно 4,8 мільйонів клонів засівали на LB-агарові планшети 110 розміром 15см, доповнені 100мкг/мл ампіциліну, 10мкг/мл метициліну. Після вирощування планшетів протягом ночі при 37°C бактерії збирали вискоблюванням та пелетували. Плазмідну ДНК екстрагували з пелетованих бактерій, використовуючи Nucleobond-giga™ (Clontech) за інструкціями виробника. Цю плазмиду використовували далі для трансфекції COS-7 клітин (ATCC № CRL 1651) на предметних стеклах та скринували, використовуючи спосіб з уловлювачем секреції, описаний нижче (приклад 12).

Приклад 7 Експресійне клонування ліганду zalpha11 людини

Гліцеринові вихідні розчини з бібліотеки активованих CD3+-відібраних клітин людини (приклад 6) додавали до відвару Super Broth II™ (Becton Dickinson, Cockeysville, MD)+0,1мг/мл ампіциліну (amp) у концентрації 250 клітини на 800 мікролітрів. E. coli дозволяли урівноважитися протягом 24 годин при кімнатній температурі. Під час інокуляції, 400 мікролітрів засівали на планшети LB+amp для визначення фактичного титру інокуляції. Після 24 годин планшети підраховували, а потім кінцеву концентрацію відвару SuperBrothII™+E. coli відрегульовували так, щоб кінцева концентрація складала 250 клітини на 1,2мл. Тричі по 2 літрів інокульованого до загального об'єму 6 літрів, середовища засівали далі у 96-коміркові блоки з заглибленими комірками (Qiagen). Засів виконали на 8-канальному розподільнику Q-Fill2™ (Genetix,

Christchurch, Dorset, UK). E. coli вирощували протягом ночі при 37°C, центрифугуючи при 250 обертах/хвилину на багаторушному перемішувачі середовища New Brunswick Scientific Innova 4900. E. coli відцентрифугували від розчинів при 3000 обертах/хвилину, використовуючи центрифугу Beckman GS-6KR. Ці пелети E. coli заморожували при -20°C або використовували свіжими перед міні-виготовленням (miniprep) плазмиди ДНК. Кожна пелета містить приблизно 250 кДНК клонів бібліотек CD3+-відібраних клітин людини.

Ці об'єднання 250 кДНК клонів далі міні-підтримували, використовуючи комплект, QIAprep™ 96 Turbo Miniprep (Qiagen). Плазмідну ДНК елювали, використовуючи 125мкл TE (10мМ Трис з рН 8, 1мМ EDTA). Цю плазмідну ДНК використовували далі для трансфектування BHK клітин.

Трансфектування BHK

BHK клітини засівали у 96-коміркові планшети культур тканин при щільності 12,000 клітини на комірку у об'ємі 100мкл. на комірку. Культурним середовищем було DMEM (GibcoBRL), 5% інактивованої нагріванням сироватки зародка теляти, 2мМ L-глутаміну (GibcoBRL), DC PSN (GibcoBRL), 1мМ пірувату натрію (GibcoBRL).

Наступного дня, клітини BHK промивали один раз 100мкл SFA. SPA є позбавленим сироватки середовищем, яким є DMEM/F12 (GibcoBRL), 2мМ GlutaMax™ (GibcoBRL), 1мМ пірувату натрію, 10мкг/мл трансферину, 5мкг/мл інсуліну, 10мкг/мл фетюїну, 2мкг/мл селену, 25мМ HEPES (GibcoBRL), 100мМ замінних амінокислот (GibcoBRL).

Суміш ДНК/Lipofectamine™ виготовлено так: 2,2мкл реагенту Lipofectamine™ (GibcoBRL) комбінують з 102,8мкл SFA при кімнатній температурі; приблизно 5мкл плазмідної ДНК (200нг/мкл) додають далі до Lipofectamine™/SFA з утворенням суміші ДНК/Lipofectamine™, яку інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. SFA видаляли з BHK клітин та клітини інкубували з 50мкл суміші ДНК/Lipofectamine™ протягом 5 годин при 37°C з 5% CO₂, 50мкл суміші ДНК/Lipofectamine™ додавали до кожної з двох комірок з клітинами BHK так, щоб трансфекції було зроблено дубльованими.

Далі клітини BHK інкубували з суміші ДНК/Lipofectamine™ протягом 5 годин, суміш ДНК/Lipofectamine™ видаляли та додавали 100мкл культивативного середовища. Клітини інкубували протягом ночі, середовище видаляли та замінювали 100мкл. культивативного середовища. Після культивування клітин протягом 72 годин, кондиційоване середовище видаляли, заморожували при -80°C протягом мінімум 20 хвилин, розтоплювали, а потім 50мкл досліджували у дослідженні проліферації zalpha11/BaF3, що описано у прикладах 2B та 5, для ідентифікації об'єднань 250 клонів за активністю ліганду.

У одному дослідженні скринували 35 96-коміркових планшетів. Це репрезентувало приблизно 250 кДНК/комірку або загалом 840000 кДНК. З них кондиційовані середовища з 54 комірок (репрезентуючих 250 кДНК на комірку) тестували як

позитивні у дослідженні проліферації. Кондиційовані середовища з цих позитивних об'єднань повторно тестували у другому дослідженні (уловлювання секреції) з розчинним рецептором (дивися приклад 12) та без нього. Розчинний рецептор *zalpha11CEE* (приклад 10А) використовували при кінцевій концентрації приблизно 1мкг/мл. Для усіх 54 позитивних об'єднань, по суті усі активності нейтралізували додаванням розчинного рецептору *zalpha11*, виявляючи, що ці об'єднання містять кДНК ліганду *zalpha11*. 4 з цих позитивних об'єднань вибрали для розщеплення та виділення одичної кДНК, що кодуватиме ліганд *zalpha11*. Ними були 45C5, 46G11, 40H12 та 60A1.

Для кожного з цих 4 об'єднань для трансформації клітин DH10B ElectroMax™ (Gibco/BRL) використовували електропорацію 1мкл ДНК. Трансформанти засівали на планшети LB+amp (100мкг/мл)+метицилін (10мкг/мл) для отримання одиничних колоній.

Для кожного електропорованого об'єднання, 960 окремих колоній відбирали зубочисткою (toothpicked) у десять 96-коміркових планшетів, що містять 1,2мл відвару SuperBrothII™ на комірку. Цим планшетам давали номери 1-10 для кожного з розщеплених об'єднань (45C5, 46G11, 40H12 та 60A1), які культивували протягом ночі та міні-виготовляли (mini-prepped), як вищезазначено, плазмідну ДНК. Для 46G11, 40H12 та 60A1 плазмідну ДНК з планшетів для розщеплення трансфектували у клітини BHK як вищезазначено.

Для 45C5, протокол "фіксований слід" використовували для прискорення ідентифікації ліганду кДНК *zalpha11*. Клітини BHK трансфектували плазмідною ДНК з вищезазначених планшетів для розщеплення, суміш ДНК/Lipofectamine™ видаляли після 5 годин інкубації та додавали культиватійне середовище. Оскільки трансфекції дублювали, культиватійне середовище збирали наступного дня через 24 години з одного з планшетів трансфектованих BHK, а з другого планшета для трансфектування збирали наступного дня через 48 годин. Кондиційовані середовища, зібрані через 24 години досліджували, як вищезазначено, на активність ліганду *zalpha11*, використовуючи дослідження проліферації, що тут описано.

Плазмідну ДНК об'єднували з планшетів для розщеплених 45C5 під №№1-4 та досліджували на приєднання розчинного рецептору *zalpha11* до його ліганду за протоколом "уловлювання секреції" (дивися приклад 12, нижче). Вісім позитивних клонів ідентифікували з загалу з 384 послідовностей. Результати з дослідження проліферації підтверджували активність ліганду *zalpha11* та корелювали з результатами дослідження уловлювання секреції (дивися приклад 12). Паралельно, плазмідну ДНК, міні-виготовлену (mini-prepped) з планшетів під №№1-4 для розщепленого об'єднання 45C5, секвенсували для визначення ДНК послідовності кожного з 384 клонів.

Кілька клонів, що позитивно ідентифікували у дослідженнях проліферації та уловлювання секреції, також секвенсували, використовуючи такі праймери: ZC14,063 (SEQ ID NO: 28), ZC7,764a (SEQ ID NO: 38), ZC7,764b (SEQ ID NO: 39), ZC22,034 (SEQ ID NO: 40), та ZC22,035 (SEQ ID

NO: 41). Полінуклеотидна послідовність ліганду *zalpha11* мала повну довжину (SEQ ID NO: 1), відповідна їй амінокислотна послідовність показана як (SEQ ID NO: 2).

Приклад 8 Конструювання експресійних векторів ссавця, що експресують розчинні рецептори *zalpha11*: *zalpha11CEE*, *zalpha11CFLG*, *zalpha11CHIS* та *zalpha11-Fc4*

А. Конструювання експресійного вектору ссавця *zalpha11*, що містять *zalpha11CEE*, *zalpha11CFLG* та *zalpha11CHIS*

Експресійний вектор виготовляли для експресії розчинного, екстрацелюлярного домену поліпептиду *zalpha11*, pC4*zalpha11CEE*, причому контракт призначений для експресії поліпептиду *zalpha11*, включав передбачуваний ініціюючий метіонін та усічений суміжний з передбачуваним трансмембранним доменом, а також з С-кінцевою міткою Glu-Glu (SEQ ID NO: 29).

Генерований PCR фрагмент ДНК *zalpha11* розміром 700 по створювали, використовуючи як праймери PCR ZC19,931 (SEQ ID NO: 30) та ZC19,932 (SEQ ID NO: 31) для додавання рестрикційних сайтів Asp718 та BamHI. Плазмиду, що містить кДНК рецептору *zalpha11* (SEQ ID NO: 7) використовували як темплат. PCR-ампліфікацію фрагменту *zalpha11* проводили так: двадцять п'ять циклів при 94°C протягом 0,5 хвилин; п'ять циклів при 94°C протягом 10 с, при 50°C протягом 30с, при 68°C протягом 45с, з наступним витримуванням при 4°C. Реакційну суміш очищали екстракцією хлороформом/фенолом та осадженням ізопропанолом, і розщеплювали за допомогою Asp718 та BamHI (Gibco BRL) за протоколом виробника. Смугу передбачуваного розміру, 700 по, візуалізували гел-електрофорезом на 1% агарозі, вирізали та очищали ДНК, використовуючи комплект QiaexH™ для очистки систем (Qiagen) за інструкціями виробника.

Вирізану ДНК субклонували у плазмиду pC4EE, яку вирізали за допомогою BamHI та Asp718. Експресійний вектор pC4*zalpha11CEE* використовує нативний сигнальний пептид *zalpha11* та приєднує мітку Glu-Glu (SEQ ID NO: 29) до С-закінчення екстрацелюлярної частини кодуючої поліпептид *zalpha11* полінуклеотидної послідовності. Плазмідна pC4EE є експресійним вектором ссавця, що містить експресійну касету, що має промотор металотіонеїн-1 миші, багато рестрикційних сайтів для вставки кодуючої послідовності, стоп-кодон та термінатор гормону росту людини. Плазмідна також має початок реплікації E. coli, елемент придатного для селекції маркеру експресії ссавця, що має промотор SV40, енхансер та початок реплікації, ген DHFR та термінатор SV40.

Приблизно 30нг рестрикційно розщепленої вставки *zalpha11* та приблизно 12нг розщепленого вектору зшивали протягом ночі при 16°C. Один мікролітр з кожної реакційної суміші для лігування незалежно електропорували у компетентні клітини DH10B (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) за протоколом виробника та засівали на планшети LB, що містять 50мг/мл ампіциліну, і інкубували протягом ночі. Колонії скринували рестрикційним аналізом виготовленої з 2мл рідкої культури окремих колоній ДНК. Послідовність вставки позитивних клонів

підтверджували секвенсуванням. Високопродуктивне виготовлення плазмід здійснювали, використовуючи комплект QIAGEN® Maxi Prep (Qiagen) за інструкціями виробника.

Такий же спосіб використовували для виготовлення розчинних рецепторів *zalpha11* з С-кінцевою гістидиновою міткою, що містить 6 залишків His підряд; та С-кінцеву флагову мітку (SEQ ID NO: 37), *zalpha11CFLAG*. Для виготовлення цих конструктив, вищезазначений вектор має мітку HIS або FLAG® замість мітки *glu-glu* (SEQ ID NO: 29).

В. Експресійний конструкт ссавця розчинного рецептору *zalpha11 zalpha11-Fc4*

Експресійну плазмиду, що містить весь або частину полінуклеотиду, що кодує *zalpha11*, конструювали гомологічною рекомбінацією. Екстрацелюлярний домен рецептору *zalpha11* конденсували похідним від IgG людини регіоном з Fc, під назвою "Fc4" (SEQ ID NO: 33), що містить мутацію що, що він більше не приєднується до рецептору Fc. Фрагмент кДНК *zalpha11* виділяли, використовуючи PCR, що включає полінуклеотидну послідовність з екстрацелюлярного домену рецептору *zalpha11*. Двома використовуваними у продукування фрагменту *zalpha11* праймерами були: (1) праймери для PCR включають кожний від 5'- до 3'-закінчення: 40 по векторної фланкуючої послідовності (5'-вставки) та 17 по відповідного 5'-закінчення *zalpha11* (SEQ ID NO: 32); та (2) 40 по 5'-закінчення по-лінуклеотидної послідовності Fc4 (SEQ ID NO: 33) та 17 по відповідного 3'-закінчення екстрацелюлярного домену *zalpha11* (SEQ ID NO: 34). Фрагмент Fc-4 для конденсату з *zalpha11* створювали за допомогою PCR у подібним чином. Двома використовуваними у продукування фрагменту Fc4 праймерами були: (1) 5'-праймер, що складається з 40 по послідовності з 3'-закінчення екстрацелюлярного домену *zalpha11* та 17 по 5'-закінчення Fc4 (SEQ ID NO: 35); та (2) 3'-праймер, що складається з 40 по послідовності вектору (3'-вставки) та 17 по 3'-закінчення Fc4 (SEQ ID NO: 36).

PCR-ампліфікацію кожної з описаних вище реакцій проводили так: один цикл при 94°C протягом 2 хвилин; двадцять п'ять циклів при 94°C протягом 30с, 60°C протягом 30с, 72°C протягом 1 хвилини; один цикл при 72°C протягом 5 хвилин; з наступним витримуванням при 4°C. Десять мкл зі 100мкл реакційної суміші PCR проганяли на 0,8% гелі агарози (Seaplaque GTG) з буфері 1x TBE для аналізу. Залишкові 90мкл реакційної суміші PCR осаджують додаванням 5мкл 1M NaCl та 250мкл абсолютного етанолу. Використаний експресійний вектор походив з плазмиди pCZR199, похідної від pZP9 (ATCC Deposit №98668), та був вирізаним за допомогою Smal (BRL). Експресійний вектор походив від плазмиди pCZR199 та є експресійним вектором ссавця, що містить експресійну касету, що має негайний ранній промотор CMV, узгоджений інтрон з непостійного регіону локусу важкого ланцюга імуноглобуліну миші, багато рестрикційних сайтів для вставки кодуючої послідовності, стоп-кодон та термінатор гормону росту людини. Експресійний вектор також має початок реплікації *E. coli*, елемент придатного для селекції маркеру експресії ссавця, що має промотор SV40, енхан-

сер та початок реплікації, ген DHFR та термінатор SV40. Використаний експресійний вектор конструювали з pCZR199 заміною мета-лотіонейнового промотеру негайним раннім промотером CMV.

Сто мікролітрів компетентних клітин дріжджів (*S. cerevisiae*) комбінували з 10мкл, що містять приблизно 1мкг кожної з *zalpha11* та Fc4 вставок, та 100нг розщепленого експресійного вектору Smal (BRL) та переносили у кювету на 0,2см для електропорації. Суміші дріжджі/ДНК піддавали електроімпульсам при 0,75кВ (5кВ/см), "невизначено великому" числу Ом, 25мкФ. До кожної кювети додають 600мкл 1,2М сорбіту та засівали дріжджі у дві аліквоти по 300мкл на два планшети URA-D та шкубували при 30°C.

Через приблизно 48 годин, Ura⁺-трансформанти дріжджів з одного планшету ресуспендували у 1мл води та швидко центрифугували до пелети клітин дріжджів. Пелету клітин ресуспендували у 1мл лізисного буферу (2% Тритон X-100, 1% SDS, 100мМ NaCl, 10мМ Трис, pH 8,0, 1мМ EDTA). П'ятсот мікролітрів лізисної суміші додавали до туб Еппендорфа, що містять 300мкл кислоти, промиті скляні кульки та 200мкл фенолу-хлороформу, перемішували з інтервалами у 1 хвилину двічі чи тричі, з наступним 5-хвилинним центрифугуванням у центрифугу Еппендорфа при максимальній швидкості. Триста мікролітрів водної фази переносили у нові туби та осаджували ДНК 600мкл етанолу (EtOH), з наступним центрифугуванням протягом 10 хвилин при 4°C. Пелету ДНК ресуспендували у 100мкл води.

Трансформацію електрокомпетентних *E. coli* (DH10B, GibcoBRL) зроблено з 0,5-2мл препарату ДНК дріжджів та 40мкл клітин DH10B. Клітини піддавали електроімпульсам при 2,0кВ, 25мФ та 400Ом. Після електропорації 1мл SOC (2% триптон Bacto™ (Difco, Detroit, MI), 0,5% екстракт дріжджів (Difco), 10мМ NaCl, 2,5мМ KCl, 10мМ MgCl₂, 10мМ MgSO₄, 20мМ глюкози) засівали аліквотами по 250мкл на чотири планшети LB AMP (відвар LB (Lennox), 1,8% агар Bacto Agar (Difco), 100мг/л ампіциліну).

Окремі клони, що включають коректний експресійний конструкт для *zalpha11-Fc4* ідентифікували рестрикційним розщепленням для підтвердження наявності вставки *zalpha11-Fc4* та підтвердження, що різні послідовності ДНК об'єднані правильно одна з одною. Вставку позитивних клонів піддавали секвенсуванню. З високою продуктивністю плазмідну ДНК виділяють, використовуючи комплект Qiagen Maxi (Qiagen) за інструкціями виробника.

Приклад 9 Трансфекція та експресія розчинних поліпептидів рецепторів *zalpha11*

А. Експресія розчинних рецепторів ссавців *zalpha11 zalpha11CEE*, *zalpha11CFLG* та *zalpha11CHIS*

Клітини BHK 570 (ATCC №CRL-10314), місце 27, засівали при $1,2 \times 10^6$ клітин/комірку (6-комірковий планшет) у 800мкл позбавленого сироватки (SF) DMEM середовища (DMEM, Gibco/BRL з високим вмістом глюкози) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Клітини трансфектували експресійними плазмідами, що містять описані вище *zalpha11CEE*, *zalpha11CFLG* або *zalpha11CHIS*

(дивися приклад 8), використовуючи Lipofectin™ (Gibco BRL), у позбавленому сироватки (SF) DMEM. Три мікрограми zalpha11CEE, zalpha11CFLG або zalpha11CHIS, кожний окремо розбавляли у тубах на 1,5мл до загального кінцевого об'єму 100мкл SF DMEM. У окремих тубах, 15мкл Lipofectin™ (Gibco BRL) змішували з 100мкл SF DMEM. Суміш Lipofectin™ інкубували при кімнатній температурі протягом 30-45 хвилин, потім додавали суміш ДНК та інкубували приблизно 10-15 хвилин при кімнатній температурі.

Суцільну суміш ДНК: Lipofectin™ додавали до розміщених клітин та рівномірно розподіляли поверх них. Клітини інкубували при 37°C протягом приблизно п'яти годин, потім переносили у окремі 150-мм планшети MAXI у кінцевому об'ємі 30мл DMEM/5% сироватки зародка теляти (FBS) (Hyclone, Logan, UT). Планшети інкубували при 37°C, 5% CO₂, протягом ночі та суміш ДНК: Lipofectin™ наступної доби замінювали селекційним середовищем (5% FBS/DMEM з 1мкМ метотрексату (MTX)).

Приблизно 10-12 діб після трансфекції, планшети промивали 10мл SF DMEM. Середовище для промивки відсмоктували та замінювали 7,25мл позбавленого сироватки DMEM. Стерильні тефлонові сітки (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA), попередньо просочені SF DMEM, розміщали далі поверх колоній клональних клітин. Стерильний нітроцелюлозний фільтр, попередньо просочений SF DMEM, розміщали далі поверх сітки. Орієнтаційні мітки на нітроцелюлозі переносили у чашку для культури. Планшети далі інкубували протягом 5-6 годин при 37°C, 5% CO₂ в інкубаторі.

Після інкубації, фільтри/сітки видаляли, та середовища відсмоктували та замінювали 5% FBS/DMEM з 1мкМ MTX. Фільтри далі блокували у 10% сухому обезжиреному молоці/буфері Western A (Western A: 50мМ Трис pH 7,4, 5мМ ЕДТА, 0,05% NP-40, 150мМ NaCl та 0,25% желатин) протягом 15 хвилин при кімнатній температурі на обертовому перемішувачі. Фільтри далі інкубували зі сполученнями HRP-(анти-Glu-Glu, анти-FLAG®, або анти-HIS)-антитіло, відповідно, у 2,5% сухому обезжиреному молоці/буфері Western A протягом одної години при кімнатній температурі на обертовому перемішувачі. Фільтри далі промивали тричі при кімнатній температурі Western A при 5-10 хвилин на промивку. Фільтри виявляли реагентом ultra ECL (Amersham Corp, Arlington Heights, IL) згідно з інструкціями виробника та візуалізували на візуалізаторі Lumi-Imager (Roche Corp.)

Позитивно експресуючі клональні колонії механічно відбирали у 12-коміркові планшети у одному мл 5%FCS/DMEM з 5мкМ MTX, далі вирощували до конфлюентності. Зразки кондиційованих середовищ далі тестували на рівні експресії, використовуючи SDS-PAGE та Вестерн-аналіз. Найкраще експресуючі клони для кожного констракту відбирали; два з трьох заморожували для подальшого використання, а один вирощували для тестування мікоплазми та засіву високопродуктивної колонії.

В. Експресія розчинного рецептору zalpha11 ссавця zalpha11-Fc4

Клітини ВНК 570 (ATCC NO: CRL-10314) засівали у 10-см чашки для культур тканин та дозволяли рости до приблизно 50-70% конфлюентності протягом ночі при 37°C, 5% CO₂, у середовищі DMEM/FBS (DMEM, Gibco/BRL з високим вмістом глюкози, (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 5% сироватки зародка теляти (Hyclone, Logan, UT), 1мМ L-глутамін (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 1мМ піруват натрію (Gibco BRL)). Клітини далі трансфектували плазмідом, що містить zalpha11-Fc4 (дивися приклад 8), використовуючи Lipofectamine™ (Gibco BRL), у позбавленому сироватки (SF) композиції середовища (DMEM, 10мг/мл трансферину, 5мг/мл інсуліну, 2мг/мл фетуїну, 1% L-глутаміну та 1% пірувату натрію). Плазмід, що містить zalpha11-Fc4, розбавляли у 15мл тубах до загального кінцевого об'єму 640мл SF-середовищем. 35мл Lipofectamine™ (Gibco BRL) змішували з 605мл SF-середовища. Суміш Lipofectamine™ додавали до суміші ДНК та інкубували приблизно 30 хвилин при кімнатній температурі. П'ять мілілітрів SF-середовища додавали до суміші ДНК: Lipofectamine™. Клітини промивали одноразово 5мл SF-середовища, відсмоктували та додавали суміш ДНК: Lipofectamine™. Клітини інкубували при 37°C протягом п'яти годин, далі до кожного планшету додавали 6,4мл середовища DMEM/10% FBS, 1% PSN. Планшети інкубували при 37°C протягом ночі та наступної доби суміш ДНК: Lipofectamine™ замінювали свіжим 5% середовищем FBS/DMEM. На добу 2 після трансфекції клітини розподіляли у селекційні середовища (отримані вище середовища DMEM/FBS з додаванням 1мкМ метотрексату (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo.)) на 150мм планшети при 1:10, 1:20 та 1:50. Середовища на клітинах замінювали свіжими селекційними середовищами у добу 5 після трансфекції. Приблизно 10 діб після трансфекції, дві 150-мм-чашки для культур резистентних до метотрексату колоній з кожної трансфекції обробляли трипсином і клітини об'єднували та засівали у колби T-162 та переносили у високопродуктивну культуру.

Приклад 10 Очистка розчинних рецепторів zalpha11 з ВНК 570 клітин

А. Очистка поліпептидів zalpha11CEE з ВНК 570

Поки не сказано інше, усі операції проводили при 4°C. Нижченаведені способи використовували для очистки поліпептидів zalpha11, що містять С-кінцеві мітки GluGlu (EE). Тридцять літрів кондиційованих середовищ колоній клітин концентрували до 1,6 літрів за допомогою спірального патрона Amicon S10Y3 на ProFlux A30. Розчини інгібіторів протеази додавали до концентрованих 1,6 літрів кондиційованих середовищ колоній клітин з трансфектованих клітин ВНК 570 (дивися приклад 9) до кінцевої концентрації етилендіамінтетраоцтової кислоти 2,5мМ (ЕДТА, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), 0,003мМ лейпептину (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), 0,001мМ пепстатину (Boehringer-Mannheim) та 0,4мМ Pefabloc (Boehringer-Mannheim). Зразки видаляли для аналізу та більшу частину об'єму заморожували при -80°C до початку очистки. Загальні концентрації цільового білку з концентрованих кондиційованих

середовищ колоній клітин визначали за допомогою SDS-PAGE та Вестерн-блотингу з анти-EE HRP сполученими антитілом.

Колонку на 100мл з анти-EE G-сефарозою (виготовлено як описано нижче) виливали у скляну колонку Waters AP-5, 5см×10см. Колонку ущільнювали потоком та урівнювали на BioCad Sprint (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) буферованим фосфатом фізіологічним розчином (PBS) з pH 7,4. Концентровані кондиційовані середовища колоній клітин розтоплювали, фільтрували через 0,2-мікронний фільтр в стерильних умовах, pH доводили до 7,4, далі заправляли колонку протягом ночі з швидкістю потоку 1мл/хвилин. Колонку промивали 10 об'ємами колонки (CV) буферованого фосфатом фізіологічного розчину (PBS, pH 7,4), далі вміст елюювали 200мл PBS (pH 6,0), що містять 0,5мг/мл пептиду EE (Anasps, San Jose, CA) при швидкості 5мл/хвилин. Використаний пептид EE має послідовність EYMPME (SEQ ID NO: 29). Колонку промивали 10 CV PBS, далі елюювали 5 CV 0,2М гліцину з pH 3,0. pH елююваної гліцином колонки доводили до 7,0 2 CV 5X PBS, далі урівнювали у PBS (pH 7,4). Фракції по 5мл накопичували протягом усього хроматографічного елюювання та відслідковували оптичне поглинання при 280 та 215нм; пропущені та об'єднані промивки також залишали та аналізували. Фракції пікового елюювання поліпептиду EE аналізували на цільовий білок за допомогою виявлення сріблом SDS-PAGE та Вестерн-блотингу зі сполученим антитілом анти-EE HRP. Потрібні фракції поліпептидної елюції об'єднували та концентрували з 60мл до 5,0мл, використовуючи мембранний обертовий концентратор з обмеженням молекулярної маси 10000 Да (Milipore, Bedford, MA) за інструкціями виробника.

Для відділення zalpha11CEE від інших співочищених білків, об'єднані концентровані фракції поліпептидної елюції піддавали дії POROS HQ-50 (сильна аніонообмінна смола від PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) при pH 8,0. Колонку 1,0×6,0см виливали та ущільнювали потоком на BioCad Sprint. Колонку заряджали протіонами, далі урівнювали у 20мМ Трис з pH 8,0 (Трис(гідроксиметиламінометан)). Зразок розбавляли 1:13 (для зменшення іонної сили PBS), далі завантажували на колонку Poros HQ при швидкості 5мл/хвилину. Колонку промивали 10 CV 20мМ Трис з pH 8,0 далі елюювали з 40 CV з градієнтом 20мМ Трис/1М хлорид натрію (NaCl) при швидкості 10мл/хвилин. 1,5мл фракції накопичували протягом всієї хроматографії та відслідковували оптичне поглинання при 280 та 215нм. Фракції пікового елюювання поліпептиду EE аналізували на цільовий білок за допомогою виявлення сріблом SDS-PAGE. Потрібні фракції об'єднували та концентрували до 1,5-2мл, використовуючи мембранний обертовий концентратор з обмеженням молекулярної маси 10000 Да (Milipore, Bedford, MA) за інструкціями виробника.

Для відділення поліпептиду zalpha11CEE від вільного пептиду EE та будь-яких інших співочищених забруднювальних білків, об'єднані концентровані фракції піддавали хроматографії на колонці 1,5×90см Sephadex S200 (Pharmacia, Piscataway,

NJ) колонку урівнювали та завантажували у PBS при швидкості потоку 1,0мл/хвилину, використовуючи BioCad Sprint. 1,5мл фракції збирали протягом всієї хроматографії та відслідковували оптичне поглинання при 280 та 215нм. Фракції з піковим поглинанням характеризували за допомогою виявлення сріблом SDS-PAGE, і об'єднували тільки найчистіші фракції. Цей матеріал репрезентував очищений поліпептид zalpha11CEE. Зразок пропускали через урівноважену силою тяжіння колонку з PBS чотири рази, далі колонку промивали одиничним об'ємом PBS 3мл, який об'єднували з "очищеним" зразком. Матеріал далі фільтрували через 0,2-мікронний фільтр в стерильних умовах та зберігали при -80°C до аліквотування.

На підданих Вестерн-блотингу, виявлених кумасі блакитним та сріблом гелях SDS-PAGE поліпептид zalpha11CEE мав одну головну смугу підхожої молекулярної маси приблизно 50000 Да. Рухомість цієї смуги була однаковою на редукованому та нередукованому гелях.

Концентрацію білку в очищеному матеріалі визначали аналізом BCA (Pierce, Rockford, IL), білки аліквотували, та зберігали при -80°C згідно з нашими стандартними способами. На гелях IEF (ізоелектрично фокусованих) білок рухається при PI (ізоелектрична точка) менше 4,5. Концентрація поліпептиду zalpha11CEE складала 1,0мг/мл.

Для виготовлення анти-EE-сефарози підкладку білку G-Sepharose об'ємом 100мл (Pharmacia, Piscataway, NJ) промивали тричі 100мл PBS, що містять 0,02% азиду натрію, використовуючи 500мл фільтрувальний елемент на 0,45 мікрон Nalgene. Гель промивали 6,0 об'ємами 200мМ триетаноламіну, pH 8,2 (TEA, Sigma, St. Louis, MO), та додавали такий же об'єм розчину антитіла EE, що містить 900мг антитіла. Після інкубації протягом ночі при 4°C, незв'язане антитіло видаляли промивкою смоли 5 об'ємами 200мМ TEA, як описано вище. Смоли ресуспендували у 2 об'ємах TEA, переносили у придатний контейнер, та додавали розчин диметилпіпімідату-2HCl (Pierce, Rockford, IL) у TEA, до кінцевої концентрації білку у гелі G-Sepharose 36 мг/мл. Гель збовтували при кімнатній температурі протягом 45 хвилин та видаляли рідину, використовуючи описаний вище фільтрувальний елемент. Неспецифічні ділянки на гелі далі блокували інкубуванням протягом 10 хвилин, при кімнатній температурі з 5 об'ємів 20мМ етаноламіну у 200 мМ TEA. Гель далі промивали 5 об'ємами PBS, що містять 0,02% азиду натрію та зберігали у цьому розчині при...

В. Очистка поліпептиду zalpha11CFLAG від BHK 570

Поки не сказано інше, усі операції проводили при 4°C. Використовували такі способи очистки поліпептидів zalpha11, що містять С-кінцеві мітки FLAG® (FLG) (Sigma-Aldrich Co.). Тридцять літрів кондиційованих середовищ колоній клітин концентрували до 1,7 літрів спіральним патроном Amicon S10Y3 на ProFlux A30. До 1,7 літрів концентрованих кондиційованих середовищ колоній клітин з трансфектованих клітин BHK 570 додавали розчин інгібітору протеази (дивися приклад 9) до кінцевих концентрацій етилендіа-мінтетраоцтової кислоти (EDTA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) 2,5мМ,

лейпептину 0,003мМ (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), пепстатину 0,001мМ (Boehringer-Mannheim) та Pefabloc 0,4мМ (Boehringer-Mannheim). Зразки видаляли для аналізу та більшу частину об'єму заморожували при -80°C до початку очистки. Загальні концентрації цільового білку у кондиційованих середовищах колоній клітин визначали за допомогою SDS-PAGE та Вестерн-блотингу зі сполученням антитілом анти-FLAG® (Kodak) HRP. Колонку на 125мл анти-FLAG® афінного гелю агарози M2 (Sigma-Aldrich Co.) виливали у скляну колонку Waters AP-5, 5см×10см. Колонку ущільнювали потоком та урівнювали буферованим фосфатом фізіологічним розчином (PBS) з рН 7,4 на BioCad Sprint (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). Концентровані кондиційовані середовища колоній клітин розтоплювали, фільтрували на фільтрі на 0,2 мікрон в стерильних умовах, доводили рН до 7,4, далі завантажували на колонку протягом ночі з 1мл/хвилини швидкістю потоку. Колонку промивали 10 об'ємами колонки (CV) буферованого фосфатом фізіологічного розчину (PBS, рН 7,4), далі вставку елюювали 250мл PBS (рН 6,0), що містить 0,5мг/мл пептиду FLAG® (Sigma-Aldrich Co.) при 5мл/хвилини. Використаний пептид FLAG® має послідовність DYKDDDDK (SEQ ID NO: 37). Колонку промивали 10 CV PBS, далі елюювали 5 CV 0,2М гліцину з рН 3,0. рН елююваної гліцином колонки доводили до 7,0 2 CV 5х PBS, далі урівнювали у PBS (рН 7,4). П'ять мл фракції збирали протягом усього хроматографічного елюювання та відстежували оптичне поглинання при 280 та 215нМ; пропущені та об'єднані промивки також залишали та аналізували. Фракції пікового елюювання поліпептиду FLAG® аналізували на цільовий білок за допомогою виявлення сріблом SDS-PAGE та Вестерн-блотингу зі сполученням антитілом анти-FLAG HRP. Потрібні фракції поліпептиди ої елюції об'єднували та концентрували з 80мл до 12мл, використовуючи мембранний обертовий концентратор з обмеженням молекулярної маси 10000 Да (Milipore, Bedford, MA) за інструкціями виробника.

Для відділення zalpha11CFLG від інших співочищених білків, об'єднані концентровані фракції поліпептидної елюції піддавали дії POROS HQ-50 (сильна аніонообмінна смола від PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) при рН 8,0. Колонку 1,0×6,0см виливали та ущільнювали потоком на BioCad Sprint. Колонку заряджали протиіонами, далі урівнювали у 20мМ ТРИС з рН 8,0 (Трис гідроксиметил Амінометан)). Зразок розбавляли 1:13 (для зменшення іонної сили PBS) далі завантажували на колонку Poros HQ-50 при 5мл/хвилини. Колонку промивали 10 об'ємами колонки (CV) з 20мМ Трис рН 8,0 далі елюювали 40 CV з градієнтом 20мМ Трис/1М хлорид натрію (NaCl) при 10мл/хвилини. 1,5мл фракції збирали протягом усієї хроматографії та відстежували оптичне поглинання при 280 та 215нМ. Фракції пікового елюювання аналізували за допомогою виявлення сріблом SDS-PAGE. Потрібні фракції об'єднували та концентрували до 1,5-2мл, використовуючи мембранний обертовий концентратор з обмеженням моле-

кулярної маси 10000 Да (Milipore, Bedford, MA) за інструкціями виробника.

Для відділення поліпептиду zalpha11CFLG поліпептиди від вільного пептиду FLAG® та будь-яких інших співочищених забруднювальних білків, об'єднані концентровані фракції піддавали хроматографії на колонці 1,5×90см Sephacryl S200 (Pharmacia, Piscataway, NJ), колонку урівнювали та завантажували у PBS при швидкості потоку 1,0мл/хвилину, використовуючи BioCad Sprint. 1,5мл фракції збирали протягом всієї хроматографії та відслідковували оптичне поглинання при 280 та 215нМ. Фракції з піковим поглинанням характеризували за допомогою виявлення сріблом SDS-PAGE, і об'єднували тільки найчистіші фракції. Цей матеріал репрезентував очищений поліпептид zalpha11CFLG.

Цей очищений матеріал обробляли наприкінці на 4мл колонці ActiClean Etox (Sterogene) для видалення будь-яких залишків ендотоксинів. Зразок пропускали через урівноважену силою тяжіння колонку з PBS чотири рази, далі колонку промивали одноразово 3мл PBS, які об'єднували з "очищеним" зразком. Матеріал далі фільтрували на фільтрі 0,2 мікрон в стерильних умовах та зберігали при -80°C до його аліквотування.

На підданих Вестерн-блотингу, виявлених ку-масі блакитним та сріблом гелях SDS-PAGE поліпептид zalpha11CFLG мав одну головну смугу підхожої молекулярної маси приблизно 50000 Да. Рухомість цієї смуги була однаковою на редукованому та нередукованому гелях.

Концентрацію білку в очищеному матеріалі визначали аналізом BCA (Pierce, Rockford, IL), білки аліквотували, та зберігали при -80°C згідно з нашими стандартними способами. На гелях EEF (ізоелектрично фокусованих) білок рухається при PI (ізоелектрична точка) менше 4,5. Концентрація поліпептиду zalpha11CFLG складала 1,2мг/мл.

С. Очистка поліпептиду zalpha11-Fc4 з трансфектованих клітин BHK 570

Поки не сказано інше, усі операції проводили при 4°C. Використовували такі способи очистки поліпептидів zalpha11, що містять С-кінцеві конденсати з IgG/Fc людини (zalpha11-Fc4; приклади 8 та 9). 12,000мл кондиційованих середовищ з клітин BHK 570 трансфектованих з zalpha11-Fc4 (приклад 9) фільтрували через 0,2мл стерилізований фільтр, а потім доповнювали розчином інгібіторів протеази, до кінцевої концентрації лейпептину 0,001мМ (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), 0,001мМ пепстатину (Boehringer-Mannheim) та 0,4мМ Pefabloc (Boehringer-Mannheim). Білкову сефарозу G (6мл вихідний об'єм, Pharmacia Biotech) розміщали та промивали 500мл PBS (Gibco/BRL) Доповнені кондиційовані середовища пропускали через колонку зі швидкістю потоку 10мл/хвилини, супроводжуючи промивкою 1000мл PBS (BRL/Gibco). Zalpha11-Fc4 елюювали з колонки 0,1М гліцином з рН 3,5 та 2мл фракції збирали безпосередньо у 0,2мл 2М Трис рН 8,0, для доведення кінцевого рН у фракції до 7,0.

Елюйовані фракції характеризували SDS-PAGE та Вестерн-блотингом з антитілами проти Fc людини (Amersham). Аналіз Вестерн-блотингом відновлених SDS-PAGE гелів виявив імунореакти-

вий білок розміром приблизно 80000кДа у фракціях 2-10. Виявлені сріблом гелі SDS-PAGE також виявили поліпептиди α 11:Fc розміром 80000кДа у фракціях 2-10. Фракції 2-10 об'єднували.

Концентрацію білку об'єднаних фракції демонстрували аналізом BCA (Pierce, Rockford, IL), матеріал аліквотували, та зберігали при -80°C згідно з нашими стандартними способами. Концентрація в об'єднаних фракціях складала 0,26мг/мл.

Приклад 11 Дослідження з використанням розчинних рецепторів α 11CEE, α 11CFLG та α 11-Fc4 (мутант) розчинного рецептору α 11 у дослідженні конкурентного інгібування

Клітини BaFS/ α 11 перемішували та промивали у позбавленому mIL-3 середовищі. Клітини перемішували та промивали тричі для гарантування видалення mIL-3. Клітини підраховували далі у гемоцитометрі. Клітини засівали у 96-коміркову форму по 5000 клітин на комірку у об'ємі 100мкл на комірку, використовуючи позбавлене mEL-3 середовище.

Обидва кондиційованих середовища, з активації клітин селезінки мавп та CD3+-відібраних клітини людини, що описано у прикладі 5, додавали у окремих 3 експериментах при концентраціях 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% та 0,375%, з розчинними рецепторами α 11 (констракти CEE, C-flag, та Fc4; дивися приклад 9 та 10) при 10мкг/мл або без них. Загальний об'єм у дослідженні був 200мкл

Досліджувані планшети інкубували при 37°C , 5% CO_2 протягом 3 діб, додаючи в цей час аламар-блакитний (Accumed) по 20мкл на комірку. Планшети знов інкубували при 37°C , 5% CO_2 протягом 24 годин. Планшети зчитували на планшетному зчитувачі FmaxTM (Molecular Devices) як описано у прикладі 2. Результати продемонстрували повне інгібування росту клітин кожним з різних констрактів розчинних рецепторів α 11 при 10мкг/мл, підтверджуючи, що фактор у кожному зразку був специфічним стосовно рецептору α 11.

Криві титрування, розбавляючи розчинні рецептори, проводили, також використовуючи вищезазначені дослідження. Розчинні рецептори α 11, α 11CEE та α 11CFLG, були здатні повністю інгібувати ріст при концентраціях нижче 20нг/мл. Мутантний α 11-Fc4 розчинний рецептор α 11 був ефективним тільки при 1,5мкг/мл.

Приклад 12 Дослідження уловлювання секретії

Дослідження уловлювання секретії використовували для ідентифікації кДНК ліганду α 11. Позитивні об'єднання ДНК отримано з виконання експресії клонування, що описано у прикладі 7.

Об'єднання ДНК 250 клонів трансфектували у клітини BHK у 96-комірковому форматі, а умови середовища наведено у дослідженні проліферації клітини BaF3/ α 11, що описано у прикладах 4 та 5. Кілька об'єднань ДНК виявило позитивну активність що повторювали та нейтралізували розчинними рецепторами α 11 (дивися приклад 11).

Одне з позитивних об'єднань ДНК, 45C5, трансфектували у клітини COS у 12-комірковому

форматі, використовуючи спосіб з використанням LipofectamineTM, описаний нижче. Дослідження уловлювання секретії далі проводили, використовуючи розчинні рецептори α 11 (конденсати, мічені на C-кінці Glu-Glu з біотинілуванням або без нього; мічені на C-кінці Flag; або розчинний рецептор Fc4- α 11) (приклад 9) дослідження безпосереднього зв'язку між потенційним лігандом рецептору α 11 у об'єднанні 45C5 та розчинним рецептором α 11 (дивися нижче). Результат був позитивним. Тому ДНК об'єднання 45C5 електropорували у E. coli, та одиничні колонії відбирали на десять 96-коміркових планшетів. Планшети збовтували при 37°C протягом 24 годин, а потім у 96-комірковій формі виготовляли мініпреп ДНК (QiaPrepTM 96 Turbo Miniprep Kit; Qiagen), використовуючи TomTech Quadra 9600. Плазмідну ДНК об'єднували далі у форматі рядів та колонок, трансфектували у клітини COS, а потім позитивні об'єднання визначали уловлювачем секретії як описано нижче.

Трансфекція клітин COS

Трансфекцію клітин COS проводили так: Суміш 3мкл об'єднаної ДНК та 5мкл LipofectamineTM у 92мкл позбавленого сироватки DMEM середовища (55мг пірувату натрію, 146мг L-глутаміну, 5мг трансферину, 2,5мг інсуліну, 1мкг селену та 5мг фетюїну у 500мл DMEM), інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, а потім додають 400мкл позбавленого сироватки DMEM середовища. Ці 500мкл суміші додають до $1,5 \times 10^5$ клітин COS/комірку, розміщених на 12-комірковому планшеті для культур тканин та інкубують протягом 5 годин при 37°C . Додають 500мкл середовища 20% FBS DMEM (100мл FBS, 55мг пірувату натрію та 146мг L-глутаміну у 500мл DMEM) та інкубують протягом ночі.

Дослідження уловлювання секретії

Уловлювання секретії проводили так: середовища вимивали з клітин з PBS, а потім фіксували протягом 15 хвилин у 1,8% формальдегіді у PBS. Клітини далі промивали TNT (0,1M Трис-HCl, 0,15M NaCl та 0,05% Tween-20 у I-b0) та просочували 0,1% Тритон-Х у PBS протягом 15 хвилин, та знов промивали TNT.

Клітини блокували протягом 1 години за допомогою TNB (0,1M Трис-HCl, 0,15M NaCl та 0,5% блокуючим реагентом (NEN Renaissance TSA-Direct Kit) у H_2O), та промивали знов з TNT. При використанні біотинілованого білку клітини блокували інкубаціями протягом 15 хвилин з авидином, а потім біотином (Vector Labs) з промивкою між ними TNT. Залежно від використовуваного розчинного рецептору клітини інкубували протягом 1 години з: (A) 1-3мкг/мл α 11 конденсованого білку α 11-Fc4 розчинного рецептору (приклад 10); (B) 3мкг/мл міченого на C-кінці FLAG розчинного рецептору α 11, α 11CFLG (приклад 10); (C) 3мкг/мл міченого на C-кінці GluGlu розчинного рецептору α 11, α 11CEE (приклад 10); або (D) 3мкг/мл біотинілованого розчинного рецептору α 11, α 11CEE у TNB. Клітини далі промивали TNT. Залежно від використовуваного розчинного рецептору, клітини інкубували протягом ще години з: (A) 1:200 розбавленим козячим Ig-HRP проти людини (Fc специфічним); (B) 1:1000

розбавленим M2-HRP; (C) 1:1000 розбавленим анти-GluGlu антитілом-HRP; або (D) 1:300 розбавленим стрептавідин-HRP (комплект NEN) у TNB. Знов клітини промивали TNT.

Позитивне зв'язування детектували з флуоресцеїновим тирамідним реагентом, розбавленим 1:50 у буфері для розбавлення (комплект NEN) та інкубували протягом 4-6 хвилин і промивали TNT. Клітини зберігали з середовищем Vectashield Mounting Media (Vector Labs Burlingame, CA) розбавленим 1:5 у TNT. Клітини візуалізували, використовуючи фільтр FITC на флуоресцентному мікроскопі.

Приклад 13 Хромосомний розподіл та розміщення гена ліганду *zalpha11*.

Ген ліганду *zalpha11* картували до хромосоми 4, використовуючи комерційно доступний різновид панелі "Stanford G3 Radiation Hybrid Mapping Panel" (Research Genetics, Inc, Huntsville, МЛ). Панель "Stanford G3 RH Panel" має ДНК з кожних 83 радіаційних гібридних клонів суцільного геному людини, плюс дві контрольних ДНК (RM-донор та A3-реципієнт). Загальнодоступний сервер WWW server <http://shgc-www.stanford.edu> дозволяє хромосомну локалізацію маркерів.

Для картування гена ліганду *zalpha11* за допомогою панелі "Stanford G3 RH Panel", 20мкл реакційної суміші засівали на 96-комірковий мікротитрувальний планшет (Stratagene, La Jolla, A) та використовували у термоциклері "RoboCycler Gradient 96" (Stratagene). Кожна з 85 реакційних сумішей PCR складалася з 2мкл буферу 10X KlenTaq для реакції PCR (CLONTECH Laboratories, Inc, Palo Alto, CA), 1,6мкл суміші dNTP (2,5мМ кожного, PERKIN-ELMER, Foster City, CA), 1мкл сенсового праймеру, ZC 22,050 (SEQ ID NO: 42), 1мкл антисенсового праймеру, ZC 22,051 (SEQ ID NO: 43), 2мкл "RediLoad" (Research Genetics, Inc, Huntsville, МЛ), 0,4мкл суміші полімераз 50X Advantage KlenTaq (Clontech Laboratories, Inc.), 25нг ДНК з окремих гібридних клонів або контролю та бідицилює до загального об'єму 20мкл Реакційні суміші покривали рівною кількістю мінерального масла та закривали. Умови циклера PCR були такими: спочатку 1 цикл 5 хвилин денатурації при 94°C, 35 циклів 45с денатурації при 94°C, 45с гібридизації при 60°C та 1 хвилину ТА 15с розвитку при 72°C, з наступним кінцевим 1 циклом розвитку протягом 7 хвилин при 72°C. Реакційні суміші розділяли електрофорезом на 2% гелі агарози (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Результати показали зчеплювання ген ліганду *zalpha11* зі структурним маркером IL2 SHGC-12342 з оцінкою LOD більше 12 та на відстані 6 cR_10000 (приблизно 180 ко) від маркеру. Використання оточуючих маркери позицій гена ліганду *zalpha11* у регіоні 4q27 на карті інтегрованої LDB хромосоми 4 (Genetic Location Database (База даних розташування генів), University of Southampton. WWW server: http://cedar.genetics-soton.ac.uk/public_html/).

Приклад 14 Ідентифікація та клонування ліганду *zalpha11* миші, використовуючи послідовність EST для отримання ліганду *zalpha11* миші ловчої довжини

Послідовність EST ліганду *zalpha11* миші

Пошуки бази даних з послідовністю кДНК лігандом *zalpha11* людини (послідовність SEQ ID NO: 1) як запитом EST миші (EST1483966) ідентифікували як можливу часткову послідовність ліганду *zalpha11* миші. EST1483966 репрезентує геномний фрагмент миші, у якому послідовність пептиду походить з двох можливих екзонів, що мають високу ідентичність послідовності з пептидним сегментом ліганду *zalpha11* людини (амінокислота 13 (Ile) - амінокислота 80 (Gln) послідовності SEQ ID NO: 2).

B. PCR-скринінг марафонної панелі кДНК миші

Зразки 11 мишачих марафонних кДНК (Clontech) скринували за допомогою описаної нижче PCR. Зразки мишачих марафонних кДНК виготовили з тканин мозку, підшлункової залози, нирок, плаценти, слинної залози, шкіри, яєчок, матки, ембріону та селезінки. Їх робили у лабораторії, використовуючи комплект для ампліфікації кДНК Marathon™ (Clontech) за інструкціями виробника. На базі послідовності EST два праймери PCR, ZC22,056 (SEQ ID NO: 44) та ZC22,057 (SEQ ID NO: 45), використовували для ідентифікації джерела ліганду *zalpha11* миші засобом PCR. Умови реакції PCR були такими: 94°C протягом 2 хвилин, 35 циклів при 94°C протягом 30с, 68°C протягом 2 хвилин, а потім 68°C протягом 4 хвилин, а далі просочування при 10°C. Продукти PCR проганяли на 1% гелі агарози. Сильну смугу, відповідну 150 по, репрезентуючу ампліфікований фрагмент кДНК, візуалізували. Ця визначена марафонна кДНК селезінки миші є джерелом для клонування кДНК ліганду *zalpha11* миші. Марафонна кДНК селезінки миші, що містить позитивну кДНК, яку далі ідентифікували секвенсуванням як часткову кДНК ліганду *zalpha11* миші.

C. Складну послідовність кДНК миші повної довжини створювали засобом 5'- та 3'-RACE

5'- та 3'-фланкуючі послідовності часткової послідовності кДНК ліганду *zalpha11* миші отримували засобом 5'- та 3'-RACE-ампліфікації. Два цикли гніздових PCR-ампліфікацій проводили з додатковими ген-специфічними олігопраймерами ZC22,205 (SEQ ID NO: 46) та ZC22,206 (SEQ ID NO: 47), ZC22,056 (SEQ ID NO: 44) та ZC22,057 (SEQ ID NO: 45), та двома адаптерними олігопраймерами ZC9J39 (SEQ ID NO: 48) та ZC9,719 (SEQ ID NO: 49). Реакції PCR проводили так: 94°C протягом 2 хвилин; 35 циклів при 94°C протягом 30с, 68°C протягом 2 хвилин; а потім 68°C протягом 4 хвилин; і далі просочування при 10°C. Продукти PCR проганяли на 1% гелі агарози, та ідентифікували продукт розміром приблизно 300 по 5'-RACE та продукт розміром приблизно 800 по 3'-RACE. Ці фрагменти виділяли, використовуючи гель-екстракційний комплект Qiaquick™ (Qiagen).

Очищені продукти PCR секвенсували, використовуючи такі праймери: ZC9,719 (SEQ ID NO: 49), ZC22,205 (SEQ ID NO: 46) та ZC22,206 (SEQ ID NO: 47). Попередня величина повної довжини складної послідовності ліганду *zalpha11* миші ідентифікували комбінуванням 5'- та 3'-RACE-фрагментів. Повної довжини клон миші виділяли як описано у прикладі 15 нижче.

Приклад 15 Виділення клону кДНК *zalpha11* миші з бібліотеки активованої селезінки миші

А. Первинне мишаче джерело, використане для виділення ліганду $\alpha 11$ миші

Мишачі селезінки з мишей Balb/C, збирали та роздавлювали між замороженими на закінчення скляними пластинками для створення суспензії клітин. Вихід виділених первинних клітин миші складав $6,4 \times 10^5$ клітини до описаної нижче селекції.

Клітини селезінки суспендували у 9,6 мл буферу MACS (PBS, 0,5% EDTA, 2 мМ EDTA). 1,6 мл суспензії клітин видаляли та додавали 0,4 мл мікрокульок CD90 (Miltenyi Biotec). Суміш інкубували протягом 15 хвилин, при 4°C. Ці клітини мітили CD90, кульки промивали 30 мл буферу MACS, і далі ресуспендували у 2 мл буферу MACS.

VS+-колонку (Miltenyi) виготовляли згідно з інструкціями виробника. VS+-колонку розміщали далі VarioMACS™ у магнітному полі (Miltenyi). Колонку урівноважували у 5 мл буферу MACS. Виділені первинні мишачі клітини were далі перенесли на колонку. Негативним клітинам CD3 пройти через колонку. Колонку промивали 9 мл (3x3 мл) буферу MACS. Колонку далі видаляли від магніту та розміщали зверху 15 мл туби Фалько-на. CD90+ міїТННН елюювали додаванням 5 мл буферу MACS до колонки та зв'язані клітини витягали за допомогою забезпеченого виробником штоку. Інкубацію клітин з магнітними кульками CD90, промивки, та етапи на VS+-колонці (інкубація елювання) повторювали ще один раз. Утворені CD90+ фракції з 2 розділень на колонці об'єднували. Загальний вихід CD90+-відібраних клітин селезінки миші складав 1×10^5 клітин.

Зразок об'єднаних CD90+-відібраних клітин миші видаляли для виявлення та сортування на флуоресцентному сортувальнику клітин антитіл (FACS) для оцінки їх чистоти. PE-сполучені антимишачі CD3 антитіла хом'яка (PharMingen) використовували для виявлення та сортування CD90+-відібраних клітин. CD90+-відібраними клітинами миші були 93% CD3+клітин, означаючи, що клітин були на 93% Т-клітинами.

CD90+-відібрані клітини миші активували інкубуванням 3×10^6 клітин/мл у RPMI+5% FBS+PMA 10 нг/мл та іономіцині 0,5 мкг/мл (Calbiochem) протягом ночі при 37°C. Супернатант від цих активованих CD90+-відібраних клітин миші тестували на активність ліганду $\alpha 11$ як описано нижче. Більш того, активовані CD90+-відібрані клітини миші використовували для виготовлення бібліотек кДНК, як описано у прикладі 16, нижче.

Приклад 16 Клонування ліганду $\alpha 11$ миші з бібліотеки CD90+-відібраних клітин миші

Скринінгом первинної бібліотеки кДНК активованих CD90+-відібраних клітин миші виявили виділену кДНК, що є новим членом родини цитокінів з чотирьох-спіральною жмутом. Ця кДНК кодувала мишачий ортолог ліганду $\alpha 11$ людини. кДНК ідентифікували скринінгом гібридизацією.

А. Вектор для конструювання CD90+-відібраної бібліотеки

Для конструювання CD3+-відібраної бібліотеки використовували вектор pZPTN (Дивися приклад 6А)

В. Виготовлення первинної бібліотеки кДНК активованих CD90+-відібраних клітин миші кДНК

Приблизно $1,5 \times 10^5$ первинних CD90+-відібраних клітин миші, стимульованих у іономіцині/PMA (приклад 15) виділяли центрифугуванням. Загальну РНК виділяли з пелети клітин, та перетворювали у дволанцюгову кДНК як описано у прикладі 6В. Цю ДНК далі трансфектували у клітини ВНК, як описано у 5 прикладі 6В, та досліджували проліферацію, використовуючи флуоресценцію аламар-блакитного (приклад 2В).

Для скринінгу бібліотеки клонуванням уловлювачу секреції ампліфікований з бібліотеки комплекс був необхідним для трансфекції клітин COS-7. 4,8 мільйонів клонів засівали на 110 LB-агарові планшети по 15 см, доповнених 100 мкг/мл ампіциліну, 10 мкг/мл метициліну. Після вирощування планшетів протягом ночі при 37°C бактерій збирали вискоблюванням та пелетували. Плазмідну ДНК екстрагували з пелетованих бактерій, використовуючи Nucleobond-giga™ (Clontech) за інструкціями виробника. Цю плазмідну використовували далі для трансфекції клітин COS-7 на предметних стеклах та скринували, використовуючи спосіб уловлювання секреції описаний нижче (приклад 17).

С. Скринінг активованої бібліотеки кДНК миші

Приблизно 5×10^5 клонів засівали на 10 планшетів LB/Amp Maxі. Колонії знімали, денатурували, нейтралізували, та перехресно зв'язували, використовуючи стандартні способи [Sambrook, J. et al. вище]. П'ятдесят нанограм фрагменту 5' RACE PCR розміром 300 по (приклад 14) мітили ^{32}P , використовуючи комплект випадкового мічення праймерів Prime-Itr RmT (Stratagene). 10 фільтрів гібридизували з цим міченим зондом при 65°C протягом ночі, використовуючи гібридизаційний розчин ExpressHyb™ (Clontech). Фільтри далі промивали при 60°C протягом 1 години послідовно трічі 0,2xSSC (30 мМ NaCl, 3 мМ цитрату натрію з рН 7,0), 0,1% SDS; а потім при 65°C протягом 1 години. Фільтри експонували при -80°C протягом ночі, та проявляли рентгеноплівку. Агарові пробки, що містять позитивні колонії виймали, та засівали клони на 10-см планшети LB/Amp. Колонії далі знімали з фільтрів та гібридизували знов після такої ж описаної вище процедури.

Один клон ДНК під назвою M11L/pZP7, виділяли та секвенсували, використовуючи такі праймери: ZC14,063 (SEQ ID NO: 50), ZC5,020 (SEQ ID NO: 51), ZC22,421 (SEQ ID NO: 52), ZC22,604 (SEQ ID NO: 53) та ZC22,641 (SEQ ID NO: 54). Полінуклеотидна послідовність цього клону є лігандом $\alpha 11$ миші повної довжини (SEQ ID NO: 55) та складається зі складної послідовності, отриманої з 5'- та 3'-RACE-продуктів. Відповідну амінокислотну послідовність для ліганду $\alpha 11$ миші показано послідовністю SEQ ID NO: 56.

Приклад 17 Ліганд $\alpha 11$ миші приєднується до розчинного рецептору $\alpha 11$ людини у дослідженні уловлювання секреції

ДНК для клону миші M11L/pZP7 трансфектували у клітини COS, а приєднання розчинного рецептору $\alpha 11$ -Fc4 $\alpha 11$ людини (приклад 10С) до трансфектованих клітин COS тестували дослідженням уловлювання секреції (приклад 12). Дослідження підтверджувало, що ліганд $\alpha 11$

миші приєднується до розчинного рецептору $\alpha 11$ людини.

Трансфекцію клітин COS проводили як у прикладі 12, використовуючи 0,7мкг M11L/pZP7 ДНК (приклад 16) у 3мкл.

Уловлювання секретії проводили як у прикладі 12, використовуючи 1мкг/мл конденсованого білку розчинного рецептору $\alpha 11$ -Fc4 (приклад 10C) у TNB, та 1:200 розбавленого козячого Ig-HRP проти людини (Fc специфічного) у TNB для виявлення антитіла. Позитивне з'єднання розчинного рецептору $\alpha 11$ людини з виготовленими фіксованими клітинами детектували з флуоресцентним тирамідним реагентом як у прикладі 12. Клітини зберігали та візуалізували згідно з прикладом 12.

Позитивний результат свідчить, що ліганд $\alpha 11$ миші приєднується до розчинного рецептору $\alpha 11$ людини.

Приклад 18 Експресія ліганду $\alpha 11$ миші у клітини ссавців

А. Конструювання експресійного вектору M11L/pZP7

Експресійний вектор виготовляли для експресії ліганду $\alpha 11$ миші у клітини ссавців. Генерований PCR фрагмент ДНК ліганду $\alpha 11$ 500 по створювали, використовуючи як PCR праймери ZC22,283 (SEQ ID NO: 57) та ZC22,284 (SEQ ID NO: 58) для ампліфікації кодуючого регіону ліганду $\alpha 11$ миші та приєднаних рестрикційних сайтів XhoI та XbaI. Клон ліганду $\alpha 11$ миші M11L/pZP7 (приклад 16) використовували як темплат. Умови реакції PCR були такими: 94°C протягом 2 хвилин, 25 циклів при 94°C протягом 30с, 68°C протягом 2 хвилин, а потім 68°C протягом 4 хвилин, і далі просочування при 10°C. Смугу передбачуваного розміру, приблизно 500 по, візуалізували гель-електрофорезом на 1% агарозі, вирізали та очищали ДНК, використовуючи систему для очистки QiaexII™ (Qiagen) за інструкціями виробника. Очищену ДНК розщеплювали за допомогою XhoI та XbaI (Boehringer Mannheim) при 37°C протягом 2 годин. Далі ДНК виділяли з гелю та очищали вищезазначеним способом.

Вирізаних ДНК субклонували у плазмиду pZP9, яку розрізали XhoI та XbaI (Boehringer Mannheim). Плазміда pZP9 є експресійним вектором ссавця, що містить експресійну касету, яка має промотор миші металотіонеїн-1 (MT-1)миші, багато рестрикційних сайтів для вставки кодуючої послідовності та термінатор гормону росту людини. Плазміда також має початок реплікації E. coli, експресійний елемент селективного маркера ссавця, що має промотор SV40, енхансер та початок реплікації, ген DHFR, та термінатор SV40.

Приблизно 30нг рестрикційно розщепленого фрагменту ліганду $\alpha 11$ миші та приблизно 10нг розщепленого вектору pZP9 зшивали при кімнатній температурі протягом 2 годин. Два мкг суміші для реакції лігування трансформували у компетентні клітини INVaF' (bavtrogen) за протоколом виробника і засівали на планшети LB, що містять 50мкг/мл ампіциліну, та інкубували при 37°C протягом ночі Колонії скринували рестрикційним аналізом, використовуючи XhoI та XbaI (Boehringer Mannheim), виготовленої з рідких куль-

тур окремих колоній ДНК. Послідовність вставки позитивних клонів підтверджували аналізом послідовності на те, що вона є послідовністю ліганду $\alpha 11$ миші. Велику кількість препарату плазмиди виготовляли, використовуючи комплект QIAGEN® Maxi Prep (Qiagen) за інструкціями виробника. Експресійний вектор, що містить ліганд $\alpha 11$ миші, позначали як M11L/pZP7.

В. Експресія ліганду $\alpha 11$ миші стосовно ссавців

Клітини BHK 570 (ATCC No: CRL-19-314) засівали у 10см-чашки для культур тканин та давали рости до приблизно 20% конфлюентності протягом ночі при 37°C, 5% CO₂ у середовищі DMEM/FBS (середовище DMEM, Gibco/BRL з високим вмістом глюкози; Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 5% сироватки зародка теляти (Hyclone, Logan, UT), 1мМ L-глутаміну (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 1мМ пірвату натрію (Gibco BRL)). Клітини далі трансфектували з плазмідною M11L/pZP9 (приклад 18A), використовуючи комплект для стабільної трансфекції засобом CaPO₄ ссавців (Stratagene) за інструкціями виробника.

Через добу після трансфекції, клітини розподіляли у розбавленні 1:10 та 1:20 у селекційне середовище (середовище DMEM/FBS з додаванням 1мМ метотрексату (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO)) на 150мм-планшетах. Середовище на клітинах замінювали свіжими селекційними середовищами на добу 5 після трансфекції. Приблизно 10 діб після трансфекції, резистентні до метотрексату колонії обробляли трипсином та клітини об'єднували і засівали у колби для високопродуктивної культури. Один раз клітини вирощували до приблизно 90% конфлюентності, їх тричі промивали PBS, та культивували у позбавленому сироватки кондиційованому середовищі ESTE2 (DMEM (Gibco BRL), 0,11г/л пірвату натрію, 3,7г/л NaHCO₃, 2,5мг/л інсуліну, 5мг/л трансферину, pH 7,0). Кондиційоване середовище збирали трьома добами пізніше, та піддавали дослідженню проліферації у BaF3, використовуючи аламар-блакитний, що описано у прикладі 19 нижче.

Приклад 19 Ліганд $\alpha 11$ миші активує рецептор $\alpha 11$ людини у дослідженні з BaF3 з використанням аламар-блакитного

Проліферацію клітин BaF3/ $\alpha 11$ (прикладі 4, та 5B) досліджували, використовуючи позбавлене сироватки кондиційоване середовище з клітин BHK, що експресують ліганд $\alpha 11$ миші (приклад 18).

Клітини BaF3/ $\alpha 11$ перемішували, промивали та засівали у позбавлене mIL-3 середовище як описано у прикладі 5B.

Проліферацію клітин BaF3/ $\alpha 11$ досліджували, використовуючи позбавлене сироватки кондиційоване середовище з клітин BHK, що експресують ліганд $\alpha 11$ миші (приклад 18). Кондиційоване середовище розбавляли позбавленим mIL-3 середовищем до концентрацій: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% та 0,375%. Дослідження проліферації проводили як у прикладі 5B.

Результати підтвердили проліферативну реакцію клітин BaF3/ $\alpha 11$ на ліганд $\alpha 11$ миші.

Реакція, як виміряно, була приблизно у 5 разів вище фонові при 50% концентрації.

Приклад 20 Ліганд α 11 активує рецептор α 11 людини у дослідженні з люциферазою

A. Конструювання лінії клітин BaF3/KZ134/ α 11

Плазмиду KZ134 конструювали з комплементарними олігонуклеотидами ZC 12,749 (SEQ ID NO: 59) та ZC 12,748 (SEQ ID NO: 60), що містять фактор STAT транскрипції зв'язуючих елементів з 4 генів. Модифікований придатний до індукції елемент c-fos Sis (m67SIE. або hSIE) [Sadowski, H. et al. Science 261: 1739-1744, 1993], p21 SIE1 з гена p21 WAF1 [Chin, Y. et al. Science 272: 719-722, 1996], реакційний елемент гена β -казеїну молочної залози [Schmitt-Ney, M. et al., Mol. Cell. Biol. 11: 3745-3755, 1991], та елемент STAT гена Fcg R1, [Seidel, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3041-3045, 1995]. Ці олігонуклеотиди містять Asp718-XhoI сумісне закінчення, і їх зшивали, використовуючи стандартні способи, у реципієнтному репортерному векторі люцифери світляка з промотором C-fos [Poulsen, L.K. et al., J. Biol. Chem. 273: 6229-6232, 1998], розщепленим за допомогою тих же ферментів, і що містять неоміциновий придатний для селекції маркер. Плазмиду KZ134 використовували до стабільно трансфектованих клітин BaF3, використовуючи стандартні способи трансфекції та селекції, для створення лінії клітин BaF3/KZ134.

Стабільний індикатор лінії клітин BaF3/KZ134, що експресують рецептор α 11 повної довжини, конструювали як у прикладі 2A, використовуючи приблизно 30 мкг експресійного вектору α 11, що описано у прикладі 3. Клон розбавляли, засівали та селектували, використовуючи стандартні способи. Клон скринували дослідженням люцифери (дивися приклад 20B, нижче), використовуючи кондиційоване середовище ліганду α 11 людини як індуктор. Вибірало клони з найвищою реакцією люцифери (за допомогою люцифери STAT) та найнижчим фоном. Вибірало стабільну трансфектантну лінію клітин. Лінію клітин назвали BaF3/KZ134/ α 11.

B. α 11 людини та миші. Ліганд активує рецептор α 11 людини у BaF3/KZ134/ α 11 дослідженні люцифери

Клітини BaF3/KZ134/ α 11 перемішували та промивали у позбавленому mIL-3 середовищі. Клітини перемішували та промивали тричі для гарантування видалення mIL-3. Клітини підраховували далі у гемоцитометрі. Клітини засівали у 96-коміркову форму при приблизно 30,000 клітини на комірку у об'ємі 100мкл на комірку, використовуючи позбавлене mIL-3 середовище. Таку ж процедуру використовували для нетрансфектованих BaF3/KZ134 клітин для використання як контролю у наступному дослідженні.

STAT-активацію клітини BaF3/KZ134/ α 11 досліджували, використовуючи кондиційоване середовище з (1) клітин BHK570, трансфектованих лігандом α 11 людини (приклад 7) або (2) клітин BHK570, трансфектованих лігандом α 11 миші (приклад 18), або (4) позбавлене mIL-3 середовище для виміру контрольної реакції тільки в середовищі. Кондиційоване середовище розбав-

ляли позбавленим mIL-3 середовищем RPMI до концентрацій 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% та 0,375%. 100мкл розбавленого кондиційованого середовища додавали до клітин BaF3/KZ134/ α 11. Дослідження з використанням кондиційованого середовища проводили паралельно на нетрансфектованих клітинах BaF3/KZ134 як контрольних. Загальний досліджуваний об'єм складав 200мкл. Досліджувані планшети інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 24 годин, потім клітини пелетували центрифугуванням при 2000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин, середовища відсмоктували та додавали 25мкл лізисного буферу (Promega). Через 10 хвилин при кімнатній температурі, планшети вимірювали на активацію STAT-репортерного конструкту зчитуванням їх на люмінометрі (Labsystem Luminoskan, модель RS), до яких додавали 40мкл субстрату для дослідження люцифери (Promega) при інтегруванні протягом 5с.

Результати підтверджували реакцію STAT-репортеру клітин BaF3/KZ134/ α 11 на ліганд α 11 людини. Реакція, як виміряно, була приблизно у 50 разів вище контролю тільки у середовищі при 50% концентрації. STAT-активація у реакції на ліганд α 11 людини була відсутньою у нетрансфектованих BaF3/KZ134 контрольних клітин, показуючи, що реакція є опосередкованою рецептором α 11.

Результати також підтверджували реакцію STAT-репортеру клітин BaF3/KZ134/ α 11 на ліганд α 11 миші. Реакція, як виміряно, була приблизно у 40 разів вище контролю тільки у середовищі при 50% концентрації. Більш того, STAT-активація у реакції на ліганд α 11 миші помітною (приблизно у 5 разів) на нетрансфектованих контрольних клітинах BaF/KZ134, означаючи, що клітини BaF3 миші можуть мати ендогенний рецептор миші.

Приклад 21 Ліганд α 11 миші є активним у дослідженні кісткового мозку миші

A. Виділення неліпких клітин кісткового мозку низької густини:

Свіжу витяжку мишачого стегна (кістковий мозок) отримували від самців мишей Balb/C або C57BL/6 віком 6-10 тижнів. Кістковий мозок далі промивали RPMI+10% FBS (JRH, Lenexa KS; Hyclone, Logan UT) та суспендували у RPMI+10% FBS як суспензію цілих клітин кісткового мозку. Суспензію цілих клітин кісткового мозку далі піддавали дії градієнту густини (Nycorger, 1,077, Animal: Gibco BRL) для збагачення переважно моно-нуклеарними клітинами низької густини таким чином: Суспензію цілих клітин кісткового мозку (приблизно 8мл) обережно наносили піпеткою на поверхню приблизно 5мл розчину Nycorger gradient у 15мл конічних тубах, а потім центрифугували при 600xg протягом 20 хвилин. Міжфазний шар, що містить мононуклеарні клітини низької густини, далі видаляли, промивали надлишком RPMI+10% FBS, та пелетували центрифугуванням при 400xg протягом 5-10 хвилин. Цю пелету ресуспендували у RPMI+0% FBS та засівали у колбу T-75 при приблизно 10⁶клітин/мл, та інкубували при 37°C 5% CO₂ протягом приблизно 2 годин.

Одержані з суспензії клітини були неліпкими клітинами низької густини (NA LD) кісткового мозку.

В. 96-коміркове дослідження

Клітини NALD кісткового мозку миші засівали при кількості 25,000-45,000 клітин/комірку на 96 коміркові планшети для культур тканин у RPMI+10% FBS+1нг/мл фактору стовбурних клітин миші (mSCF) (R&D Systems, Minneapolis, MN), плюс 5% кондиційованого середовища з одного з наступного: (1) клітин BHK 570, що експресують ліганд α 11 миші (приклад 18), (2) клітин BHK 570, що експресують ліганд α 11 людини (приклад 7), або (3) контрольних клітин BHK 570, що містять вектор та не експресують ліганд. Ці клітини далі піддавали обробці рядом цитокінів для тестування вирощування або диференціації кровотворних клітин з кісткового мозку. Для тестування, розміщені клітини кісткового мозку миші NALD піддавали дії інтерлейкіну-15 людини (hIL-15) (R&D Systems), а одну з панелей інших цитокінів (R&D Systems). Серійні розбавлення hIL-15, або інших цитокінів тестували з 2-разовим серійним розбавленням приблизно 50нг/мл до концентрації приблизно 6025нг/мл. Через 8-12 діб 96-коміркові дослідження оцінювали стосовно проліферації клітин дослідженням з аламар-блакитним як описано у прикладі 5B.

С. Результати 96-коміркового дослідження NALD кісткового мозку миші

Кондиційоване середовище з клітин BHK, що експресують ліганд α 11 миші та людини виявляв синергічну дію з hIL-15 стосовно підтримки вирощування популяції кровотворних клітин у кістковому мозку мишей NALD. Цього вирощування кровотворних клітин не виявлено з контрольному кондиційованому середовищі BHK плюс IL-15. Клітини кровотворної популяції, що вирощені лігандом α 11 миші з hIL-15, та ті кровотворні клітини, що вирощені лігандом α 11 людини з hIL-15, були далі вирощувані у культурі клітин. Ці кровотворні клітини виявляли міченим фікоеритрином антитілом проти клітин Pan NK (Pharmingen) та аналізували цитометрією в потоці, це продемонструвало, що вирощувані клітини виявлялися позитивними стосовно цього маркера природних кілерних (NK) клітин.

Таке ж 96-коміркове дослідження провели, використовуючи свіжі клітини кісткового мозку людини, закуплені в Poietic Technologies, Gaithersburg, MD. Знов-таки, у сполученні з IL-15, ліганд α 11 миші та людини поширює популяцію кровотворних клітин, що виявляється позитивною стосовно маркеру NK-клітин при використанні розкритих вище антитіл.

Приклад 22

Констракти для створення ліганду α 11 людини трансгенних мишей

А. Констракт для експресії ліганду α 11 людини зі специфічного стосовно печінки промотеру MT-1

Олігонуклеотиди були сконструйовані для створення PCR-фрагменту, що містить узгоджену послідовність Kozak та кодуєчий ліганд α 11 людини регіон. Ці олігонуклеотиди були сконструйовані з сайту FseI на 5'-закінченні та сайту AscI на 3'-закінченні для полегшення клонування у (а)

pMT12-8, наш стандартний трансгенний вектор, або (b) pKF051, лімфоїдно-специфічний трансгенний вектор (приклад 22B).

Реакції PCR проводили з 200нг темплату ліганду α 11 людини (приклад 7) та олігонуклеотидами ZC22J43 (SEQ ID NO: 61) та ZC22,144 (SEQ ID NO: 62). Умови реакції PCR були такими: 95°C протягом 5 хвилин, причому додавали кДНК полімерази Advantage™ (Clontech); 15 циклів при 95°C протягом 60с, 60°C протягом 60с, та 72°C протягом 90с; і 72°C протягом 7 хвилин. Продукти PCR розділяли на агарозі гель-електрофорезом та очищали, використовуючи гель-екстракційний комплект QiaQuick™ (Qiagen). Виділений фрагмент ДНК розміром 488 по розщеплювали за допомогою FseI та AscI (Boehringer-Mannheim), осаджували етанолом та вшивали у pMT12-8, попередньо розщеплений за допомогою FseI та AscI. Плазміда pMT12-8, що сконструйована для експресії потрібного гена у печінці та інших тканинах трансгенних мишей, містить експресійну касету фланковану 10 ко 5'-ДНК MT-1 та 7 ко 3'-ДНК MT-1. Експресійна касета включає промотер MT-1, інтрон інсуліну II щура, полілінкер для вставки потрібного клону, та полі А послідовність гормону росту людини (hGI).

Приблизно один мікролітр кожної реакційної суміші лігування електропорували у компетентні клітини DHIOB ElectroMax™ (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) за протоколом виробника та засівали на планшети LB, що містять 100мкг/мл ампіциліну, та інкубували протягом ночі. Колонії відбирали та вирощували у середовищі LB, що містить 100мкг/мл ампіциліну. Мініпреп ДНК готували з відібраних клонів та скринували на вставку ліганду α 11 людини рестрикційним розщепленням EcoRI поодиночі, або комбінованими FseI та AscI, а далі гель-електрофорезом на агарозі. Створювали максипреп правильного pMT-ліганду α 11 людини. Фрагмент Sail, що містить з 5'- та 3'-фланкуючими послідовностями промотер MT-1, інтрон інсуліну II щурів, кДНК ліганду α 11 людини та полі А послідовність hGH, виготовляли для використання мікроін'єкціями у запліднені ооцити миші. Мікроін'єкції та отримання трансгенних мишей виконували як описано у [Hogan, B. et al. Manipulating Mice Embryo, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; NY, 1994].

В. Констракт для експресії ліганду α 11 людини з лімфоїдно-специфічним промотером E μ LCK

Олігонуклеотиди були сконструйовані для створення PCR-фрагменту, що містить узгоджену послідовність Kozak та кодуєчий ліганд α 11 людини регіон. Ці олігонуклеотиди були сконструйовані з сайту FseI на 5'-закінченні та сайту AscI на 3'-закінченні для полегшення клонування у pKF051, лімфоїдно-специфічний трансгенний вектор.

Реакції PCR проводили з 200 нг темплату ліганду α 11 людини(приклад 7) та олігонуклеотидами ZC22,143 (SEQ ID NO: 61) та ZC22,144 (SEQ ID NO: 62). Реакцію PCR проводили, використовуючи кДНК полімерази Advantage™ (Clontech) у таких умовах: 95°C протягом 5 хвилин; 15 циклів при 95°C протягом 60с, 60°C протягом 60с, та 72°C

протягом 90с; і 72°C протягом 7 хвилин. Продукти PCR очищали як описано вище. Виділений фрагмент ДНК розміром 488 по розщеплювали за допомогою FseI та AseI (Boehringer-Mannheim), осаджували етанолом та вшивали у рKF051, попередньо розщеплений за допомогою FseI та AseI. Трансгенний вектор рKF051 є похідним від р1026X [Iritani, B.M, et al, EMBQJ J. 6; 7019-31, 1997] та містить Т-клітино-специфічний проксимальний промотор Ick, В/Т-клітино-специфічний енхансер важкого ланцюга імуноглобуліну μ , полілінкер для вставки потрібного клону, та мутований ген hGH, що кодує білок неактивного гормону росту (що забезпечує 3'-інтрони та поліаденіляційний сигнал).

Приблизно один мікролітр кожної реакційної суміші лігування електропорували, висівали на чашки, клони відбирали та скринували на вставку ліганду α 11 людини рестрикційним розщепленням як описано вище. Правильний клон ліганду рKF051- α 11 підтверджували секвенсуванням, та створювали максипреп цього клону. Фрагмент NotI, що містить проксимальний промотор Ick, та енхансер імуноглобуліну μ (E μ LCK), кДНК ліганду α 11, та мутований ген hGH, виготовляли для використання мікроін'єкціями у запліднені ооцити миші.

Приклад 23 Тканинний розподіл ліганду α 11 миші

Норзерн-блоти ряду тканин мишей (Mouse, Mouse Embryo, Clontech; MBIOIO, MB 1012 Origene) зондували для визначення тканинного розподілу експресії ліганду α 11 миші. PCR-похідний зонд розміром приблизно 484 по ампліфікували, використовуючи плазмиду M11L/pZP7 (приклад 16) як темплат, та олігонуклеотиди ZC22283 (SEQ ID NO: 57) та ZC22284 (SEQ ID NO: 58) як праймери. PCR-ампліфікацію проводили так: 1 цикл при 94°C протягом 1,0 хвилин; 35 циклів 94°C протягом 30с, 50°C протягом 30с, та 72°C протягом 30с; з наступним 1 циклом при 72°C протягом 10 хвилин. Продукти PCR візуалізували гель-електрофорезом на агарозі, вони мали розмір приблизно 484 по Продукт PCR очищали, використовуючи гель-екстракційний комплект (Qiagen) за інструкціями виробника. Зонд радіоактивно мітили, використовуючи комплект для мічення REDIPRIME™ (Amersham) за інструкціями виробника. Зонд очищали, використовуючи витісняльну колонку NUCTRAP™ (Stratagene). Розчин EXPRESSHYB™ (Clontech) використовували для попередньої гібридизації та як гібридизаційні розчини для норзерн-блотів. Гібридизацію проводили протягом ночі при 65°C, використовуючи мічений зонд з активністю 10⁶ імп/хвил/мл. Блоти далі промивали тричі у 2 x SSC та 0,1% SDS при кімнатній температурі, з наступними 2 промивками у 0,1X SSC та 0,1% SDS при 55°C. Два транскрипти розміром приблизно 1,2 та 3,5 ко спостерігали у яєчках. Більший транскрипт спостерігали тільки у тимуці.

Мишачій RNA Master Dot Blot (Clontech), що містить РНК з різних тканин, що були нормалізовані до 8 допоміжних генів, також зондували та гібридизували як описано вище. Експресію спостерігали у яєчках.

Приклад 24 Очищення неміченого ліганду α 11 людини та миші від BHK 570

Якщо не сказано інше, усі операції проводили при 4°C. Використовували такі способи очистки ліганду α 11 людини та миші з кондиційованого середовища з клітин BHK 570 трансфектованих з констракту, що експресує ліганд α 11 людини (приклад 25) або ліганд α 11 миші (M11L/pZP7) (приклад 18). Кондиційоване середовище концентрували стандартними способами. Концентроване кондиційоване середовище (CM) фільтрували в стерильних умовах через фільтри на 0,45 та 0,22 мікрон. Середовище далі розбавляли для зменшення іонної сили (щонайбільше 2 mS) у 0,01M Гепес (JRH Biosciences, Lenexa, KS) при pH 7,0. Зменшеної іонної сили розбавлений CM далі завантажували на колонку 10x66мм (6мл) Poros HS 50 (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) протягом ночі при 4мл/хвилину, використовуючи BioCad SPRINT (PerSeptive BioSystems). Колонку промивали 10-20 об'ємами колонки (CV) з 0,01M Гепес pH 7,0. Зв'язані білки далі елюювали 1M NaCl (Mallinckrodt, Paris, KY) у 0,01M Гепес з pH 7,0 при 5мл/хвилину; фракції по 2мл збирали протягом усієї хроматографії та контролювали оптичне поглинання при 280 та 215нм. Фракції з піковим поглинанням аналізували біодослідженням та із засобами виявлення SDS-PAGE Silver (Geno Technology, St. Louis, MO) та кумасі (Sigma, St. Louis, MO). Фракції з піковим поглинанням об'єднували, фільтрували в стерильних умовах та розбавляли до менше 19 mS буферованим фосфатом фізіологічним розчином (PBS, Gibco BRL) при pH 7,2.

Розбавлений зразок далі завантажували при 2 мл/хвилину, використовуючи колонку BioCad SPRINT, Poros AL на 0,8мл, що мала розчинний рецептор α 11CFLAG (приклад 10B) або конденсований розчинний рецептор α 11-Fc4 (приклад 10C), іммобілізованими на смоли (дивися, нижче). Колонку далі промивали щонайменше 20 CV PBS при 10мл/хвилину. Колонку далі швидко елюювали 600мкл уведенням 0,1M гліцину (амінооцтова кислота; Glycocol, Spectrum, Gardena, CA) pH 2,5 при швидкості потоку 10мл/хвилину з PBS на BioCad 700E. Фракції по 1мл збирали протягом 6 с кожна та негайно нейтралізували pH 55мкл 2M Трис (трис(гідроксиметил)амінометан, EM Science, Gibbstown, NJ) pH 8,8. Поглинання при 280 та 215нм контролювали протягом усієї хроматографії.

Фракції з піковим поглинанням аналізували біодослідженням та із засобами виявлення сріблом SDS-PAGE (Silver) (Geno Technology, St. Louis, MO) та кумасі (Coomassie) (Sigma, St. Louis, MO). Дві смуги, розміром приблизно 24кДа та 18кДа, спостерігали як на виявлених Silver, так і виявлених Coomassie гелях, для ліганду α 11 миші. Одну смугу, приблизно при 18кДа, спостерігали на обох гелях Silver та Coomassie для ліганду α 11 людини.

Іммобілізація α 11 поліпептидів розчинного рецептору людини на середовищі POROS AL

Колонки Poros AL, що мають іммобілізований розчинний рецептор α 11CFLAG (приклад 10B) або конденсований розчинний рецептор

zalpha11-Fc4 (приклад 10C) виготовляли і використовували приблизно 3мг розчинного рецептору zalpha11CFLAG та приблизно 10мг конденсованого розчинного рецептору zalpha11-Fc4. Усі операції проводили при кімнатній температурі на BioCad 700E. Колонку розміром 4,5×50мм з середовищем POROS AL ущільнювали потоком у 2М NaCl згідно з інструкціями виробника. Колонку далі урівнювали у 1,1М Na₂SO₄/50мМ фосфаті натрію з pH 7,2. Рецептор концентрували до 4мг/мл, використовуючи Milipore 30 MWKO обертовий концентратор, далі розбавляли 1:1 у 1,1М Na₂SO₄/50мМ фосфаті натрію з pH 7,2. Колонку промивали при швидкості 2мл/хвил у 1,1М Na₂SO₄/50мМ фосфаті натрію з pH 7,2 та ін'єкціями по 100мкл розбавленого ліганду було зроблено 9 CV, доки не було досягнуто стану насичення. Далі пропустили 62 CV з градієнтом від 1,1М Na₂SO₄/50мМ фосфату натрію pH 7,2, до 550мМ Na₂SO₄/50мМ фосфату натрію з pH 7,2/5мг/мл ціаноборогідриду натрію. Колонку далі витримували приблизно 2 години до завершення хімічного процесу іммобілізації. Колонку далі урівнювали у 0,2М Трис з pH 7,2/5мг/мл ціаноборогідриду натрію та витримували протягом приблизно 1 години заповненою до її верху. Під кінець колонку урівнювали у PBS/0,02% азиду натрію та зберігали при 4°C до використання. До використання, колонку попередньо елювали 0,1М гліцином для гарантування виділення неспецифічних білків та, що колонка не втратила іммобілізований розчинний рецептор zalpha11 людини.

Приклад 25 Експресія ліганду zalpha11 людини у клітинах ссавців А. Конструювання експресійного вектору PZMP11/zalpha11 Lig

Експресійну плазмиду, що містить суцільний полінуклеотид, що кодує ліганд zalpha11 людини, або його частину, конструювали гомологічною рекомбінацією. Фрагмент кДНК ліганду zalpha11 людини (SEQ ID NO: 63) виділяли, використовуючи PCR. У продукуванні фрагменту ліганду zalpha11 людини у реакції використовували два праймери PCR: (1) Праймер ZC22,052 (SEQ ID NO: 64), що містить 40 по векторної фланкуючої послідовності та 17 по, відповідних аміно-закінченню ліганду zalpha11 людини, та (2) праймер ZC22,053 (SEQ ID NO: 65), що містить 40 по 3'-закінченню, відповідних фланкуючій послідовності вектору та 17 по, відповідних карбокси-закінченню ліганду zalpha11 людини. Умови реакції PCR були такими: 1 цикл при 94°C протягом 2,0 хвилин; 25 циклів 94°C протягом 30с, 60°C протягом 30с, та 72°C протягом 30с; з наступним 1 циклом при 72°C протягом 5 хвилин; просочування при 4°C. Десять мкл зі 100мкл реакційної суміші PCR проганяли на 0,8% гелі агарози LMP (Seaplaque GTG) з аналізаційним буфером 1 x TBE, та спостерігали очікуваний фрагмент розміром приблизно 560 по. Залишок у 90мкл реакційної суміші RT-PCR осаджували додаванням 5мкл 1М NaCl та 250мкл абсолютного етанолу для використання при рекомбінації з реципієнтним вектором pZMP11, як описано нижче. Реципієнтну плазмиду pZMP11 попередньо розрізали засобом SmaI.

Плазмida pZMP11 походила з плазмиди pCZR199 (що тут описано, наприклад, у прикладі

8). Плазмida pCZR199 є експресійним вектором ссавця, що містить експресійну касету, яка має негайний ранній промотор CMV, узгоджений інтрон з непостійного регіону локусу важкого ланцюга імуноглобуліну миші, багато рестрикційних сайтів для вставки кодуючої послідовності, стоп-кодон та термінатор гормону росту людини. Плазмida також має початок реплікації E. coli, елемент придатного для селекції маркеру експресії ссавця, що має промотор SV40, енхансер та початок реплікації, ген DHFR та термінатор SV40. Вектор pZMP11, сконструйований з pCZR199 і включає заміну металотіонеїнового промотору негайним раннім промотором CMV, та послідовністю Kozac на 5'-закінченні відкритої рамки читування.

Сто мікролітрів компетентних клітин дріжджів (*S. cerevisiae*) комбінували з 10мкл суміші, що містить приблизно 1мкг вставки ліганду zalpha11 людини, та 100нг розщепленого експресійного вектору SmaI, та переносили у кювету на 0,2см для електропорації. Суміші дріжджі/ДНК піддавали електроімпульсам при 0,75кВ (5кВ/см), невизначеному опорі, 25мкФ. До кожної кювети додавали 600мкл 1,2М сорбіту та дріжджі засівали далі у дві аліквоти по 300мкл на два планшети URA-D та інкубували при 30°C.

Через приблизно 48 годин, трансформанти дріжджів Ura+ з одиничного планшету ресуспендували у 1мл води та швидко центрифугували до пелети клітин дріжджів. Пелету клітин ресуспендували у 1мл лізисного буферу (2% Тритон X-100, 1% SDS, 100мМ NaCl, 10мМ Трис, pH 8,0, 1мМ EDTA). П'ятсот мікролітрів лізисної суміші додавали до туб Еппендорфа, що містять 300мкл промитих кислотою скляних кульок та 200мкл фенолу-хлороформу, двічі або тричі перемішували протягом 1 хвилини з інтервалами, з наступним 5-хвилинним центрифугуванням у центрифугу Еппендорфа при максимальній швидкості. Триста мікролітрів водної фази переносили у нові туби, та осаджували ДНК з 600мкл етанолу (EtOH), з наступним центрифугуванням протягом 10 хвилин при 4°C. Пелету ДНК ресуспендували у 100мкл води.

Трансформація електрокомпетентних клітин E. coli (DH10B, GibcoBRL) виконували з 0,5-2мл препарату ДНК дріжджів та 40мкл клітин DH10B. Клітини піддавали електроімпульсам при 2,0кВ, 25мФ та 400Ом. Після електропорації, 1мл SOC (2% триптон у Bacto™ (Difco, Detroit, MI). 0,5% екстракту дріжджів (Difco), 10мМ NaCl 2,5мМ KCl, 10мМ MgCl₂, 10мМ MgSO₄, 20мМ глюкози) засівали у аліквотах по 250мкл на 4 планшети LB AMP (відвар LB (Lennox), 1,8% агар Bacto™ (Difco), 100мг/л ампіциліну).

Окремі клони, що включають коректний експресійний конструкт для ліганду zalpha11 людини, ідентифікували рестрикційним розщепленням для підтвердження наявності вставки та для підтвердження, що різні ДНК послідовності правильно об'єднані одна з одною. Вставку позитивних клонів піддавали секвенсуванню. З високою продуктивністю плазмидну ДНК виділяли, використовуючи комплект Qiagen Maxi (Qiagen) за інструкціями виробника

В. Експресія ліганду α 11 людини для ссавців

Клітини BHK 570 (ATCC NO: CRL-10314) засівали у 10см-чашки для культур тканин та дозволяли рости до конфлюентності приблизно 50-70% протягом ночі при 37°C, 5% CO₂, у середовищі DMEM/FBS (DMEM, Gibco/BRL з високим вмістом глюкози, (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 5% сироватки зародка теляти (Hyclone, Logan, UT), 1мМ L-глутаміну (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 1мМ пірватату натрію (Gibco BRL). Клітини далі трансфектували з плазмиди PZMPI 1/ α 11Lig (приклад 25A), використовуючи Lipofectamine™ (Gibco BRL), у композиції позбавленого сироватки (SF) середовища (DMEM, 10мг/мл трансферину, 5мг/мл інсуліну, 2мг/мл фетюїну, 1% L-глутаміну та 1% пірватату натрію). α 11-Fc4/pZMP6 (приклад 8B) розбавляли у 15мл тубах до загального кінцевого об'єму 640мкл SF-середовищем. 35мкл Lipofectamine™ (Gibco BRL) змішували з 605мкл SF-середовища. Суміш Lipofectamine™ додавали до суміші ДНК та інкубували приблизно 30 хвилин при кімнатній температурі. П'ять мілілітрів SF-середовища додавали до суміші ДНК:Lipofectamine™. Клітини промивали одноразово 5мл SF-середовища, відсмоктували, та додавали суміш ДНК:Lipofectamine™. Клітини інкубували при 37°C протягом п'яти годин, далі до кожного планшету додавали 6,4мл середовища DMEM/10% FBS, 1% PSN. Планшети інкубували при 37°C протягом ночі та суміш ДНК:Lipofectamine™ наступної доби замінювали свіжим 5% середовищем FBS/DMEM. На добу 5 після трансфекції, клітини розподіляли у колбу T-162 у селекційному середовищі (DMEM/ 5% FBS, 1% L-GLU, 1% NaPy). Приблизно 10 діб після трансфекції, дві 150-мм-чашки для культур резистентних стосовно метотрексату колоній з кожної трансфекції обробляли трипсином і клітини об'єднували та засівали у колби T-162 і переносили у високопродуктивну культуру. Кондиційоване середовище з високопродуктивної культури використовували для очистки поліпептиду ліганду α 11 людини як описано у прикладі 24.

Приклад 26 Констракт для створення ліганду α 11 миші для трансгенних мишей

А. Констракт для експресії ліганду α 11 миші з лімфоїдно-специфічним промо-тером E α 2CSK

Олігонуклеотиди конструювали для створення PCR-фрагменту, що містить узгоджену послідовність Kozak та кодуєчий ліганд α 11 миші регіон. Ці олігонуклеотиди конструювали з сайтом FseI на 5'-закінченні та сайтом AscI на 3'-закінченні для полегшення клонування у: (а) рKF051, лімфоїдно-специфічний трансгенний вектор, або (b) рTG12-8, наш стандартний трансгенний вектор.

Реакції PCR проводили з 200нг темплату ліганду α 11 миші (SEQ ID NO: 55; приклад 16) та олігонуклеотидами ZC23,115 (SEQ ID NO: 66) та ZC23,116 (SEQ ID NO: 67). Реакцію PCR проводили, використовуючи полімеразу кДНК Advantage™ (Clontech) в умовах PCR що описано у прикладі 22В. Продукт PCR виділяли як описано у прикладі 22В. Виділений фрагмент ДНК розміром 440 по розщеплювали та вшивали у рKF051, попередньо

розщеплений за допомогою FseI та AscI, як описано у прикладі 22В.

Приблизно один мікролітр кожної суміші реакцій лігування електропорували, висівали на чашки, відбирали клони та скринували на вставку ліганду α 11 людини рест-рикційним розщепленням як описано у прикладі 22. Коректність клону ліганду рKF051- α 11 підтверджували секвенсуванням та створювали максипреп цього клону. Фрагмент NotI, що містить проксимальний промотор Iск, енхансер імуноглобуліну μ , кДНК ліганду α 11, та мутований ген hGH, виготовляли для використання мікроін'єкцією у запліднені ооцити миші.

В. Констракт для експресії ліганду α 11 миші з печінко-специфічного промотору MT-1

Вставку ліганду α 11 миші з прикладу 26А субклонували у вектор рTG12-8, як описано у прикладі 22А. Для цього констракту приблизно 10мг максипрепу ДНК рKF051-ліганду α 11 розщеплювали за допомогою комбінації FseI та AscI, осаджували етанолом, та фрагмент ліганду α 11 миші очищали як описано у прикладі 22. Цей фрагмент зшивали далі у рTG12-8, що попередньо розщеплений за допомогою FseI та AscI, як описано у прикладі 22А. Електропорацію, скринінг клонів та максипреп проводили як описано у прикладі 22. Фрагмент Sail, що містить 5'- та 3'-фланкуючі послідовності, промотор MT-1, інтрон інсуліну II щурів, кДНК ліганду α 11 миші та полі-А-послідовність hGH виготовляли для використання мікроін'єкцією у запліднені ооцити миші.

Приклад 27 Поліклональні антитіла ліганду α 11 миші

Поліклональні антитіла виготовляли імунізацією 2 самиць білих кролів New Zealand очищеним рекомбінантним білком muzalpha11L/MBP-61-I (приклад 32). Кожний з кролів спочатку одержував інтраперитонально (ip) ін'єкцію 200мг очищеного білку у повному ад'юванті Фрейнда з наступними інтраперитональними допоміжними ін'єкціями 100мг пептиду у неповному ад'юванті Фрейнда кожні три тижні. Через сім-десять діб після застосування другої допоміжної ін'єкції (усього 3 ін'єкції), у тварин відбирали кров та збирали сироватку. Тварин далі допоміжно ін'єктували та відбирали у них кров кожні три тижні.

Специфічну стосовно muzalpha11L/MBP-6H кролячу сироватку попередньо адсорбували від анти-MBP антитіл, використовуючи колонку для білку CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), яку виготовляли, використовуючи 10мг очищеного рекомбінантного зв'язуючого мальтозу білку (MBP) на грам CNBr-сефарози. Рекомбінантний MBP виробляли та очищали на колонці з амілозою в лабораторії, використовуючи добре відомі в рівні техніки способи. Специфічні стосовно muzalpha11-ліганду поліклональні антитіла афінно очищали від кролячої сироватки, використовуючи колонку для білку CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), яку виготовляли, використовуючи 10мг очищеного специфічним антигеном рекомбінантного білку muzalpha11L/MBP-6H (приклад 32) з наступним 20 х діалізом у PBS протягом ночі. Специфічні стосовно Muzalpha11-ліганд антитіла характеризували засобом ELISA, використовуючи 1мкг/мл очищених рекомбінант-них білків muzalpha11L/MBP-6H (при-

клад 32) або huzalpha11L-MBP/6H (приклад 32) як мішені антитіл. Нижча межа визначення (LLD) кролячого афінно очищеного антитіла проти muzalpha11L-MBP-6H є 100пг/мл на його специфічно очищений рекомбінантний антигенний muzalpha11L-MBP-6H та 500пг/мл на очищений рекомбінантний huzalpha11L-MBP/6H.

Приклад 28 Конструювання експресійного вектору ссавця та високопродуктивна експресія ліганду zalpha11 людини у клітинах CHO DG44

Експресійний вектор ссавця для ліганду zalpha11 людини (SEQ ID NO: 1), сконструйований для додавання сайту Sail на 5'-закінчення та сайту PmeI на 3'-закінчення кДНК, конструювали PCR-ампліфікацією з плазміди, що містить ліганд zalpha11 людини (приклад 7) з олігонуклеотидними праймерами, ZC22,054 (SEQ ID NO: 70) та ZC22,055 (SEQ ID NO: 71). Умови реакції PCR були такими: 94°C протягом 4 хвилин, 25 циклів при 94°C протягом 45с, 50°C протягом 45с, та 72°C протягом 3 хвилин, і 72°C протягом 10 хвилин. Продукт PCR виділяли як тут описано, та розрізали засобом Sail та PmeI, далі вшивали до плазміди pDC312, попередньо розрізаною на прийнятних рестрикцисних сайтах у полілінкері, використовуючи стандартні способи що тут описано. Плазмідною pDC312 є описана у [Morris, A. et al., "Expyrsson Augmenting Sequence Element (EASE) isolated from Chinese Hamster Ovary Cell", у Animal Cell Technology, Carrondo, MJT et al. (eds.) (1997) KJuwier Academic Publiscrs, The Netherlands, p.529-534].

Зшитий вектор трансфектували у адаптовані до суспензії клітини CHO DG44 (Novo Nordisk, Denmark) ліпофекцією, використовуючи реагент LipofectaminePlus™ (Gibco/BRL) за інструкціями виробника. Трансфектанти селекували на середовищі PFCHO (JRH, Lenexa, Kansas), позбавленому тимідину, та гіпоксантину, з наступною селекцією 200нМ метотрексатом (Sigma, St. Louis, MO). Резистентні до метотрексату клітини клонували розбавленням та досліджували на продукування ліганду zalpha11 дослідженням активності BaF3 (приклад 5B).

Продуктивний клон зважували та вирощували у біореакторі на 7-20 літрів (Applikon Bioreactors, Schiedam, The Netherlands) у середовищі PFCHO для продукування матеріалу для очистки (приклад 29).

Приклад 29 Високопродуктивна очистка неміченого ліганду zalpha11 людини та миші з експресованих ліній клітин ссавців BHK та CHO.

А. Експресований у CHO ліганд zalpha11 людини

Якщо не сказано інше, усі операції проводили при 4°C. Використовували такі способи очистки ліганду zalpha11 людини з щонайменше 30 літрів кондиційованих середовищ CHO (дивися приклад 28). Концентроване або неконцентроване кондиційоване середовище (CM) фільтрували в стерильних умовах через фільтри на 0,45 та 0,22 мікрон. Кондиційоване середовище далі буферували 0,01M MES (Fluka BioChemika, Switzerland) та доводили pH до 6,0, а потім завантажували на колонку розміром 50×100мм (196мл) Poros 50 HS (сильний катионообмінник від PerSeptive BioSystems,

Frammgham, MA) протягом ночі при швидкості 4-10мл/хвилину, використовуючи BioCad SPRINT (Perceptive BioSystems). Колонку промивали 10-20 об'ємами колонки (CV) з 0,01 M MES/0,130 M NaCl (Mallinckrodt, Paris, KY) pH 6,0. Зв'язані білки далі елюювали 10 CV з градієнтом 0,130-1M NaCl у 0,01M MES з pH 6,0 при 30мл/хвилину, 25мл фракції збирали протягом усієї хроматографії та контролювали поглинання при 280 та 215нМ. Фракції з піковим поглинанням аналізували виявленням засобами SDS-PAGE Silver (Geno Technology, St. Louis, MO), Coomassie (Sigma, St. Louis, MO) та Вестерн-імунологічним блотингом, використовуючи антитіла проти ліганду zalpha11 людини (приклад 33 та приклад 34).

Фракції з піковим поглинанням об'єднували, далі концентрували у концентраторі клітин на мембрані YM10 (Milipore/Amicon, Bedford, MA) при перемішуванні до номінального об'єму (1-10мл). Зразок далі завантажували на прийнятну колонку Sephacryl S-200 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) з високим розділенням з відбором за розміром (52-600мл), урівноважували у PBS (Gibco BRL) при швидкостях потоку 1-2мл/мл; 1-2мл фракції збирали протягом усієї хроматографії та відстежували поглинання при 280 та 215нМ. Фракції з піковим поглинанням аналізували виявленням засобами SDS-PAGE Silver (Geno Technology, St. Louis, MO), та Coomassie (Sigma, St. Louis, MO).

Потрібні фракції об'єднували та концентрували на центрифужних обертових концентраторах з обмеженням молекулярної маси 5кДа Milipore MWKO до мінімального об'єму. Кінцевий продукт далі аналізували виявленням засобами SDS PAGE Coomassie (Sigma, St. Louis, MO), Вестерн-імунологічним блотингом, N-кінцевим секвенсуванням, аналізом амінокислот та BCA (Pierce, Rockford, Illinois) на чистоту та концентрацію білку.

В. Експресований у BHK 570 ліганд zalpha11 миші

Якщо не сказано інше, усі операції проводили при 4°C. Використовували такі способи очистки ліганду zalpha11 миші з кондиційованого середовища BHK (приклад 18). Концентроване або неконцентроване кондиційоване середовище (CM) фільтрували в стерильних умовах через фільтри на 0,45 та 0,22 мікрон. Середовище далі буферували 0,01M MES (Fluka BioChemika, Switzerland) та доводили pH до 6,0. CM аналізували, завантажували та елюювали на колонці AS як описано у прикладі 29A.

Потрібні фракції об'єднували, далі концентрували у концентраторі клітин при перемішуванні як у прикладі 29A, до об'єму 20-30мл. pH доводили до 7,0 далі зразок завантажували на колонку на 0,8мл Poros AL, що мали приблизно 3мг міченого розчинного рецептору zalpha11CFLAG (приклад 10B) або приблизно 10мг його конденсованого розчинного рецептору zalpha11-Fc4 (приклад 10C), іммобілізованих на смолі (дивися спосіб нижче), при швидкості 1мл/хвилину на BioCad SPRINT. Колонку далі промивали щонайменше 20 CV 0,3M NaCl/PBS (Gibco BRL)/0,01M MES при 10мл/хвилину. Колонку далі швидко елюювали уведенням 600мкл 0,1M гліцину (амінооцтова кислота; Glycocol, Spectrum, Gardena, CA) pH 2,5 при

швидкості потоку 10мл/хвилину з PBS на BioCad SPRINT. Фракції по 1мл збирали протягом 6с кож-на та негайно робили рН нейтральним за допомо-гою 55мкл 2М Трис з рН 8,8 (Трис(гідроксиметил)амінометан, EM Science, Gibbstown, NJ). Поглинання при 280 та 215нм кон-тролювали протягом усієї хроматографії. Фракції з піковим поглинанням аналізували виявленням засобами SDS-PAGE Silver (Geno Technology, St. Louis, MO), Coomassie (Sigma, St. Louis, MO) та Вестерн-імунологічним блотингом як вище.

Фракції з піковим поглинанням об'єднували, далі концентрували у концентраторі клітин при перемішуванні як у прикладі 29А до мінімального об'єму (1-10мл). Зразок далі завантажували, урів-новажували та аналізували як у прикладі 29А, на прийнятній колонці Sephacryl S-200 (Pharmacia) з високим розділенням з відбором за розміром. Фракції з піковим поглинанням аналізували вияв-ленням засобами SDS-PAGE Silver (Geno Technology, St. Louis, MO), та Coomassie (Sigma, St. Louis, MO). Потрібні фракції об'єднували та концентрували і аналізували як у прикладі 29А.

С. Імобілізація білку на середовищі POROS AL

Усі операції проводили при кімнатній темпера-турі на BioCad 700E. Колонку 4,5х50мм з середо-вищем POROS AL у 2М NaCl ущільнювали пото-ком згідно з інструкціями виробника. Колонку далі урівноважували у 1,1М Na₂SO₄ та 50мМ фосфаті натрію з рН 7,2. Рецептор концентрували до 4мг/мл, використовуючи центрифужний обертовий концентратор з обмеженням молекулярної маси 30кДа Milipore MWKO, далі розбавляли 1:1 1,1М Na₂SO₄ та 50мМ фосфатом натрію з рН 7,2. Коло-нку промивали при 2мл/хвилину 1,1М Na₂SO₄ та 50мМ фосфатом натрію з рН 7,2 та вводили 100мкл розбавленого ліганду у 9 CV стійкого стану рівноваги або проходження крізь тверду фазу. Далі пропускали 62 CV з градієнтом 1,1М Na₂SO₄ та 50мМ фосфат натрію з рН 7,2-550мМ Na₂SO₄ та 50мМ фосфаті натрію з рН 7,2 з 5мг/мл триацеток-сидоборогідридом натрію. Колонку витримували про-тягом 2 годин, до завершення процесу імобіліза-ції. Колонку далі урівноважували у 0,2М Трис з рН 7,2 з 5мг/мл ціаноборогідриду натрію та витриму-вали протягом 1 години. Під кінець колонку урівно-важували у PBS з 0,02% азиду натрію, далі збері-гали при 4°C до використання. Перед використанням колонку попередньо елюювали 0,1М гліцином для гарантування видалення не-специфічних білків, а колонка не втратила імобі-лізованого рецептору.

Приклад 30 Конструювання експресійного век-тору, експресія та очистка неміченого ліганду α 11 людини та миші з бакуловірусу.

А. Констракт для експресії ліганду α 11 людини у бакуловірусі

Експресійний вектор, p α 11L, виготовляли для експресії поліпептидів ліганду α 11 люди-ни у клітини комах. Фрагмент розміром 517 по, що має послідовність ліганду α 11 людини та ко-довані BamHI та XhoI рестрикційні сайти на 5'- та 3'-закінченнях відповідно, створювали PCR-ампліфікацією з плазмиди, що містить кДНК ліганду α 11 людини (приклад 7), використовуючи

праймери ZC23,444 (SEQ ID NO: 74) та ZC23,445 (SEQ ID NO: 75). Умови реакції PCR були такими: 1 цикл при 94°C протягом 4 хвилин, з наступними 25 циклами при 94°C протягом 45с, 50°C протягом 45с, та 72°C протягом 2 хвилин; 1 цикл при 72°C протягом 10 хвилин; з наступним просочуванням при 4°C. Фрагмент візуалізували гел-електрофорезом (1% SeaPlaque/1% NuSieve). Смугу вирізали, розбавляли до 0,5% агарози 2мМ MgCl₂, розтоплювали при 65°C, розщеплювали за допомогою BamHI та XhoI (Boehringer Mannheim), та зшивали у розщеплений BamHI/XhoI експресій-ний вектор бакуловірусу, pZBV3L. Вектор pZBV3L є модифікацією експресійного вектору pFastBad™ (Life Technologies), де полідроновий промотор видалено та замінено нещодавно активованим основним промотором білку. Приблизно 14 наног-рам вставки ре-стрикційно розщепленого ліганду α 11 та приблизно 40нг відповідного вектору зшивали протягом ночі при 16°C.

Суміш для лігування розбавляли у три рази у TE (10мМ Трис-HCl, рН 7,5 та 1мМ EDTA) і при-близно 4 μ mol розбавленої суміші для лігування трансформували до компетентних клітин DH5a Library Efficiency (Life Technologies) тепловим шо-ком протягом 45с у водяній бані при 42°C за про-токолом виробника. Трансформовану ДНК та клі-тини розбавляли 450мкл середовища SOC (2% триптоні Bacto™, 0,5% екстракту дріжджів Bacto, 10мл 1М NaCl, 1,5мМ KCl, 10мМ MgCl₂ 10мМ MgSO₄ та 20мМ глюкози) та засівали на LB-планшети, що містять 100мкг/мл ампіциліну. Клоні аналізували рестрикційним розщепленням, та 1мкл позитивного клону трансформували у 20мкл компетентних клітин DH10Bac Max Efficiency (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) за інструкціями виробника, тепловим шоком, як описано вище. Трансформовані клітини далі розбавляли у 980мкл SOC середовищ (2% триптоні Bacto™, 0,5% екст-ракту дріжджів Bacto™, 10мл 1М NaCl, 1,5мМ KCl, 10мМ MgCl₂, 10мМ MgSO₄, та 20мМ глюкози) ви-рощували при збовтуванні в інкубаторі при 37°C протягом чотирьох годин та засівали на планшети Luria Agar, що містять 50мкг/мл канаміцину, 7мкг/мл гентаміцину (Life Technologies), 10мкг/мл тетрацикліну, IPTG (Pharmacia Biotech) та Blu-Gal (Life Technologies). Розміщені клітини інку-бували протягом 48 годин при 37°C. Для ідентифікації клітин, що мають донорну вставку, що кодує ліганд α 11 людини, яка вставлено у плазмиду (по-значену як "басміда"), використовували селекцію за кольором. Ті колонії, що мали білий колір, від-бирали для аналізу. Басмідну ДНК ліганду α 11 людини виділяли з позитивних колоній, використовуючи систему QiaVac Miniprep8 (Qiagen) згідно з інструкціями виробника. Клоні скринували на правильну вставку ампліфікацією ДНК, використовуючи праймери для здатного до перенесення елементу у басміді за допомогою PCR, використовуючи праймери ZC447 (SEQ ID NO: 76) та ZC976 (SEQ ID NO: 77). Умови реакції PCR були такими: 35 циклів при 94°C протягом 45с, 50°C протягом 45с, та 72°C протягом 5 хви-лин; 1 цикл при 72°C протягом 10 хвилин, з насту-пним просочуванням при 4°C. Продукт PCR прога-няли на 1% гелі агарози для перевірки розміру

вставки. Ті клони, що мали правильну вставку, використовували для трансфекції у клітини *Spodoptera frugiperda* (Sf9).

В. Експресія та створення матеріалу для очистки ліганду α 11 людини від бакуловірусу

Клітини Sf9 засівали у кількості 5×10^5 клітини на 35мм-планшет та дозволяли приєднуватися протягом 1 години при 27°C. П'ять мікролітрів басмідної ДНК ліганду α 11 людини (вище) розбавляли середовища 100мкл Sf-900 II SFM (Life Technologies). Шість мкл реагенту CellFECTIN (Life Technologies) розбавляли 100мкл середовища Sf-900 II SFM. Басмідну ДНК та ліпідні розчини обережно змішували та інкубували 30-45 хвилин при кімнатній температурі. Середовище з одного планшету клітин відсмоктували, клітини промивали 1x2мл свіжого середовища Sf-900 II SFM. Бісімсот мікролітрів середовища Sf-900 II SFM додавали до суміші ліпід-ДНК. Середовище для промивки відсмоктували та додавали до клітин суміш ліпід-ДНК. Клітини інкубували при 27°C протягом 4-5 годин. Суміш, ліпід-ДНК відсмоктували та до кожного планшету додавали 2мл середовища Sf-900 II. Планшети інкубували при 27°C, вологості 90%, протягом 96 годин, після чого вірус збирали.

Для первинної ампліфікації клітини Sf9 вирощували у 50мл середовища Sf-900 II SFM у колбі на 125мл при збовтуванні до густини приблизно $0,41-0,52 \times 10^5$ клітин/мл. Їх інфікували 150мкл отриманого вище вихідного розчину вірусу та інкубували при 27°C протягом 3 діб, після чого вірус збирали стандартними способами, що відомі в рівні техніки. Зразок об'ємом 500мкл перевіряли на активність у дослідженні BaF3 (приклад 5) для виявлення, що він був біологічно активним.

Для вторинної ампліфікації клітини Sf9 вирощували при збовтуванні у 1л середовища Sf-900 II SFM у колбі на 2800мл до густини приблизно $0,5 \times 10^5$ клітин/мл. Їх інфікували 500мкл первинного отриманого вище вихідного розчину вірусу та інкубували при 27°C протягом 4 діб, після чого вірус збирали стандартними способами, що відомі в рівні техніки. Вірус титрували та вирощували у великій кількості для очистки продукowanego бакуловірусом ліганду α 11 людини (h α 11L-Bv), як описано у прикладах 30C та 30D, нижче.

С. Високопродуктивна очистка експресованого бакуловірусом ліганду α 11 людини/миші

Якщо не сказано інше, усі операції проводили при 4°C. Використовували такі способи очистки ліганду α 11 людини (h α 11L-Bv) від кондіційованого середовища BV (приклад 30B). Кондіційоване середовище (CM) фільтрували в стерильних умовах через фільтри на 0,45 та 0,22 мікрон, далі буферували 0,01M MES (Fluka BioChemika, Switzerland)) та доводили pH до 6,0. CM далі завантажували на колонку POROS 50 HS та промивали, фракції збирали і аналізували, як описано у прикладі 29A.

Вищезазначені фракції з піковим поглинанням об'єднували, концентрували, проганяли на колонці з високим розділенням з відбором за розміром, та аналізували як описано у прикладі 29A.

Потрібні фракції з колонки відбору за розміром об'єднували та концентрували центрифужними обертовими концентраторами MWCO Milipore з

обмеженням молекулярної маси 5 кДа до мінімального об'єму. Кінцевий продукт далі аналізували засобом SDS-PAGE Coomassie (Sigma, St. Louis, MO), Вестерн-імунологічним блотингом, N-кінцевим секвенсуванням, амінокислотним аналізом, та CB (Pierce, Rockford, Illinois) на чистоту та концентрацію білку, як описано у прикладі 29A. Партію білку зберігали при -80°C.

Д. Низькопродуктивна (менше 2мг) очистка експресованого бакуловірусом ліганду α 11 людини/миші

Якщо не сказано інше, усі операції проводили при 4°C. Використовували такі способи очистки 2мг ліганду α 11 людини або миші з BV кондіційованих середовищ (CM). CM фільтрували, буферували та доводили pH як у прикладі 30C. CM далі завантажували, елюювали та аналізували хроматографією POROS 50 HS як у прикладі 30C.

Фракції об'єднували, далі концентрували при перемішуванні за допомогою діалізування у концентраторі клітин на мембрані YMO (10кДа MWCO) (Milipore/Amicon, Bedford, MA) до номінального об'єму (20-30мл). pH доводили до 7,0, далі зразок завантажували на колонку на 0,8мл Poros AL, що мала приблизно 3мг розчинного рецептору α 11CFLAG (приклад 10B) або його з приблизно 10мг конденсованого розчинного рецептору α 11-Fc4 (приклад 10C), іммобілізованих на смолі (дивися спосіб у прикладі 29C), при швидкості 1мл/хвилину на BioCad SPRrNT. Колонку далі промивали щонайменше 20 CV 0,3M NaCl/PBS (Gibco BRL)/0,01M MES при швидкості 10мл/хвилину. Колонку далі швидко елюювали уведенням 600мкл 0,1M гліцину (амінооцтова кислота; Glycocol, Spectrum, Gardena, CA) pH 2,5 при швидкості потоку 10мл/хвилину з PBS на BioCad SPRINT. Фракції по 1мл збирали протягом 6с кожна та негайно нейтралізували pH 55мкл 2M ТРИС (Трис(гідроксиметил)амінометан, EM Science, Gibbstown, NJ) з pH 8,8. Поглинання при 280 та 215нм контролювали протягом усієї хроматографії. Фракції аналізували як вищезазначено.

Фракції з піковим поглинанням об'єднували, далі концентрували при перемішуванні за допомогою діалізування у концентраторі клітин на мембрані YM10 (10кДа MWCO) (Milipore/Amicon, Bedford, MA) до 1-2мл. Зразок далі завантажували на прийнятну колонку Sephacryl S-200 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) з високим розділенням з відбором за розміром, колонку урівноважували у PBS (Gibco BRL) при оптимальній швидкості потоку; фракції збирали протягом усієї хроматографії та контролювали поглинання при 280 та 215нм. Фракції аналізували як вищезазначено.

Потрібні фракції об'єднували та концентрували на центрифужних обертових концентраторах MWCO Milipore з обмеженням молекулярної маси 5кДа до номінального об'єму. Кінцевий продукт далі аналізували засобом SDS-PAGE Coomassie (Sigma, St. Louis, MO), Вестерн-імунологічним блотингом, N-кінцевим секвенсуванням, амінокислотним аналізом, та BCA (Pierce, Rockford, Illinois) на чистоту та концентрацію білку. Партію білку зберігали як описано вище.

Е. Констракт для експресії ліганду α 11 миші у бакуловіруси: p α 11HgM

Експресійний вектор, p α 11LM, виготовляли для експресії поліпептидів ліганду α 11 миші у клітини комах. Фрагмент розміром 413 по, що має послідовність ліганду α 11 миші та кодовані BspEI та XbaI рестрикційні сайти на 5'- та 3'-закінченнях, відповідно, створювали PCR-ампліфікацією з плазмиди, що містить кДНК ліганду α 11 миші (приклад 16), використовуючи праймери ZC25,970 (SEQ ID NO: 109) та ZC25,969 (SEQ ID NO: 110) використовуючи систему високоточного вирощування Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim) за інструкціями виробника. Умови PCR були такими: 1 цикл при 94°C протягом 2 хвилин, з наступними 35 циклів при 94°C протягом 15с, 50°C протягом 30с, та 72°C протягом 2 хвилин; 1 цикл при 72°C протягом 10 хвилин; з наступним просочуванням при 4°C. Невелику порцію продукту PCR візуалізували гелем електрофорезом (1% агароза NuSieve). Залишок фрагменту очищали, використовуючи комплект для очистки Qiagen PCR за інструкціями виробника, та елюювали 30мкл води. Фрагмент далі розщеплювали за допомогою рестрикційних ферментів BspEI та XbaI (Boehringer Mannheim) при 37°C протягом приблизно 2 годин, далі проганяли на гелі агарози як описано вище. Смугою вирізали, очищали та елюювали, використовуючи гелекстракційний комплект Qiagen за інструкціями виробника. Очищений фрагмент вшивали у експресійний вектор розщепленого бакуловірусу BspEI/XbaI, pZBV37L. Вектор pZBV37L є модифікацією експресійного вектору pFastBad™ (Life Technologies), де поліедричний промотор видаляли та замінювали нещодавно активованим основним промотором білку з наступною секреторною сигнальною послідовністю від екдистероїд-UDP-глюкозилтрансферази (EGT). Приблизно 5мкл вставки рестрикційно розщепленого ліганду α 11 миші та приблизно 100нг відповідного розрізаного вектору зшивали протягом ночі при 16°C у об'ємі приблизно 20мкл. П'ять мкл суміші для літування електропорували у 50мкл електрокомпетентних бактеріальних клітин Life Technologies DH12S використовуючи кювету на 2мм при 2кВ, 25мкФ та 400Ом. Електропоровані клітини вивільняли у 1мл середовища SOC (2% триптон у Bacto™, 0,5% екстракту дріжджів Bacto, 10мл 1M NaCl, 1,5мМ KCl, 10мМ MgCl₂, 10мМ MgSO₄ та 20мМ глюкози (Gibco BRL)) вирощували при 37°C протягом приблизно 1 години та засівали на LB-планшети, що містять 100мкг/мл ампіциліну. ДНК з клонів виділяли та аналізували рестрикційним розщепленням для ідентифікації позитивних клонів. Приблизно 5нг ДНК з позитивного клону трансформували у 20мкл компетентних клітин DH10Bac Max Efficiency (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) тепловим шоком протягом 45с при 42°C на водяній бані за інструкціями виробника. Трансформовані клітини далі розбавляли та вирощували як описано у прикладі 30А. Басміди, що містять вставку ліганду α 11 миші, ідентифікували та виділяли як описано у прикладі 30А. Клони скринували на правильну вставку ампліфікацією ДНК, використовуючи праймери для здатного до перенесення елемента у басміді за допомогою PCR, використовуючи праймери ZC447 (SEQ ID NO: 76) та ZC976

(SEQ ID NO: 77). Умови реакції PCR були такими: 35 циклів при 94°C протягом 45с, при 50°C протягом 45с, та 72°C протягом 5 хвилин; 1 цикл при 72°C протягом 10 хвилин, з наступним просочуванням при 4°C. Продукт PCR проганяли на 1% гелі агарози для перевірки розміру вставки. Ті, що мали правильну вставку, використовували для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda* (Sf9).

Експресія та створення матеріалу для очистки α 11 миші від бакуловірусу

Клітини Sf9 засівали в кількості 1 мільйон клітин на 35мм-планшет та дозволяли приєднуватися протягом 1 години при 27°C. Басмідну ДНК ліганду α 11 миші транс-фектували як описано у прикладі 30В та збирали вірус.

Для первинної ампліфікації, клітини SfP засівали як вищезазначено та додавали 500мкл супернатанту після 72 годин трансфекції і культурам дозволяли розвиватися протягом 96 годин., після чого вірус збирали стандартними способами.

Для вторинної ампліфікації, клітини Sf9 засівали як вище та додавали 200мкл первинного вірусного вихідного розчину. Культури інкубували при 27°C протягом 72 годин, після чого вірус збирали стандартними способами.

Для третинної ампліфікації, 10мкл вторинного ампліфікованого вірусного вихідного розчину висівали на чашки з SF9s у кількості 500,000 клітин на комірку у 50мл середовища SF900H у колбі об'ємом 250мл при збовтуванні протягом 6 дб, та вірус збирали як вище. Вірус титрували та вирощували у великій кількості для очистки від продуктового бакуловірусом ліганду α 11 миші (mu α 11L-Bv), як описано у прикладах 30С та 30D.

Присутність білку прогнозованої молекулярної маси у супернатанті визначали вес-терн-аналізом, використовуючи поліклональне антитіло анти-mu α 11L/MBP-611 (приклад 27). Аналіз дослідженням проліферації на базі BaF3 (приклад 5) також показав, що секретований ліганд був активним.

Приклад 31 Експресія ліганду α 11 людини та миші у *E. coli*

А. Конструювання експресійного вектору РТАР98/ліганд α 11 для конденсату MBP-ліганду α 11 людини

Експресійну плазмиду, що містить полінуклеотид, який кодує частину ліганду α 11 людини і конденсований N-термінально стосовно зв'язуючого мальтозу білку (MBP), конструювали гомологічною рекомбінацією. Фрагмент кДНК ліганду α 11 людини (SEQ ID NO: 1) виділяли, використовуючи PCR. Два праймери використовували при продукуванні фрагменту ліганду α 11 людини у реакції PCR: (1) праймер ZC22,128 (SEQ ID NO: 78), що містить 40 по векторної фланкуючої послідовності та 26 по стосовно аміно-закінчення ліганду α 11 людини, та (2) праймер ZC22,127 (SEQ ID NO: 79), що містить 40 по 3'-закінчення, відповідних фланкуючій послідовності вектору та 28 по відповідних карбокси-закінченню ліганду α 11 людини. Умови реакції PCR були такими: 25 циклів при 94°C протягом 30с, 50°C протягом 30с, та 72°C протягом 1 хвилини; з наступним просочуванням при 4°C, проведеним з подвоєнням.

Два мкл зі 100мкл реакційної суміші PCR проганяли на 1,0% гелі агарози з аналізаційним буфером 1 x TBE, з виявленням очікуваної смуги розміром приблизно 472 по. Залишок 90мкл реакційної суміші PCR комбінували з другою PCR-тубою, осадженою 400мкл абсолютного етанолу для використання при рекомбінації у розрізаний *Sma*I реципієнтний вектор pTAP98 для продукування констракту, що кодує ліганд MBP-zalpa11, конденсований як описано нижче.

Плазміда pTAP98 походила з плазміди pRS316 та pMAL-c2. Плазміда pRS316 є човниковим вектором *Saccharomyces cerevisiae* [Hieter P. and Sikorski, R, Genetics 122: 19-27, 1989]. pMAL-C2 (NEB) і є експресійною плазмідною *E. coli*. Вона несе промотор *tac*, що керує *MalE* (ген, що кодує MBP) з наступною *His*-міткою, сайтом розщеплення тромбіну, сайтом клонування, та термінатором *grrB*. Вектор pTAP98 конструювали, використовуючи гомологічну рекомбінацію дріжджів. 100нг розрізаного *Eco*RI pMAL-c2 рекомбінували з 1мкг розрізаного *Pvu*I pRS316, 1мкг лінкеру, та 1мкг розрізаного *Sca*I/*Eco*RI pRS316. Лінкер складався з оліго ZC19,372 (SEQ ID NO: 80). (100пмоль), ZC19,351 (SEQ ID NO, 81) (1пмоль): ZC19,352 (SEQ ID NO: 82) (1пмоль), та ZC19,371 (SEQ ID NO: 83) (100пмоль), комбінованих у реакції PCR. Умови були такими: 10 циклів при 94°C протягом 30с, 50°C протягом 30с, та 72°C протягом 30с; з наступним просочуванням при 4°C. Продукти PCR концентрували за допомогою осадження 100% етанолом.

Сто мікролітрів компетентних клітин дріжджів *{S. cerevisiae}* комбінували з 10мкл суміші, що містить приблизно 1мкг продукту PCR, ліганду zalpa11 людини, та 100нг розщепленого вектору *Sma*I pTAP98 та переносили у кювету на 0,2см для електропорації. Суміш дріжджі/ДНК піддавали електроімпульсам при 0,75кВ (5кВ/см), при невизначеному опорі, 25мкФ. До кожної кювети додавали 600мкл 1,2М сорбіту. Дріжджі засівали далі у двох аліквотах по 300мкл на два планшети URA D та інкубували при 30°C.

Через приблизно 48 годин, Ura⁺-трансформанти дріжджів з одиничного планшету ресуспендували у 1мл води та швидко центрифугували до пелети клітин дріжджів. Пелету клітин ресуспендували у 1мл лізисного буферу (2%Тритон-X-100, 1% SDS, 100мМ NaCl 10мМ Трис, рН 8,0, 1мМ ЕДТА). П'ятсот мікролітрів лізисної суміші додавали до туб Еппендорфа, що містять по 300мкл промитих кислотою скляних кульок та 200мкл фенолу-хлороформу, перемішували з інтервалами протягом 1 хвилини двічі або тричі, з наступним 5-хвилинним центрифугуванням у центрифугу Еппендорфа при максимальній швидкості. Триста мікролітрів водної фази переносили у нові туби, та осаджували ДНК 600мкл етанолу (EtOH), з наступним центрифугуванням протягом 10 хвилин при 4°C. Пелету ДНК ресуспендували у 100мкл води.

Трансформацію електрокомпетентних клітин *E. coli* [MC 1061, Casadaban et. al. J. Mol Biol. 138. 179-207] проводили з 1мкл препарату ДНК дріжджів та 40мкл клітин MC1061. Клітини піддавали електроімпульсам при 2,0кВ. 25мкФ та 400Ом. Після

електропорації, 0,6мл SOC (2% триптоні Bacto™ (Difco, Detroit, MI), 0,5% екстракту дріжджів (Difco), 10мМ NaCl, 2,5мМ KCl, 10мМ MgCl₂, 10мМ MgSO₄, 20мМ глюкози) засівали у одному аліквоті на планшети LB AMP (відвар LB (Lennox), 1,8% агару Bacto™ (Difco), 100мг/л ампіциліну).

Окремі клони, що включають коректний експресійний констракт ліганду zalpa11 людини, ідентифікували експресією. Клітини вирощували у відварі Superbroth II (Becton Dickinson) з 100мкг/мл ампіциліну протягом ночі. 50мкл культури, вирощеної протягом ночі використовували для прищеплення 2мл свіжого відвару Superbroth II+100мкг/мл ампіциліну. Культури вирощували при 37°C, збовтуючи протягом 2 годин. 1мл культури індукували 1мМ IPTG. Через 2-4 годин 250мкл кожного культур змішували з 250мкл промитих кислотою скляних кульок та 250мкл буферу Thomer з 5% βМЕ та барвником (8М сечовина, 100мМ Трис з рН 7,0, 10% гліцерину, 2мМ ЕДТА, 5% SDS). Зразки перемішували протягом однієї хвилини та гріли при 65°C протягом 5-10 хвилин. 20мкл на ряд завантажували на 4%-12% гель PAGE (NOVEX). Гелі просочили у буфері 1 x MES. Позитивні клони позначали як pTAP126 та піддавали секвенсуванню. Полінуклеотидна послідовність ліганду MBP-zalpa11 людини, конденсована в межах pTAP126, показано у послідовності SEQ ID NO: 84, а відповідного поліпептиду у SEQ ID NO: 85.

В. Бактеріальна експресія ліганду zalpa11 людини.

Один мкл секвенсованої ДНК використовували для трансформації штаму W3110 (ATCC). Клітини піддавали електроімпульсам при 2,0кВ, 25мкФ та 400Ом. Після електропорації, 0,6мл SOC (2% триптоні Bacto™ (Difco, Detroit, MI), 0,5% екстракту дріжджів (Difco), 10мМ NaCl, 2,5мМ KCl, 10мМ MgCl₂, 10мМ MgSO₄, 20мМ глюкози) засівали у одному аліквоті на планшети LB AMP (LB відвар (Lennox), 1,8% агару Bacto™ (Difco), 100мг/л ампіциліну).

Індивідуальні об'єкти експресували. Клітини вирощували у відварі Superbroth II (Becton Dickinson) з 100мкг/мл ампіциліну протягом ночі. 50мкл нічних культур використовували для прищеплення 2мл свіжого відвару Superbroth II+100мкг/мл ампіциліну. Культури вирощували при 37°C, збовтуючи протягом 2 годин. 1мл культури індукували 1мМ IPTG. Через 2-4 години 250мкл кожної культури змішували з 250мкл промитих кислотою скляних кульок та 250мкл буферу Thomer з 5% βМЕ та барвником (8М сечовина, 100мМ Трис з рН 7,0, 10% гліцерину, 2мМ ЕДТА, 5% SDS). Зразки перемішували протягом однієї хвилини та гріли при 65°C протягом 10 хвилин. 20мкл на ряд завантажували на 4%-12% гель PAGE (NOVEX). Гелі просочили у буфері 1 x MES. Позитивні клони використовували для вирощування для очистки від білку конденсованого білку huzalpa11L/MBP-6H (приклад 32, нижче).

С. Конструювання конденсованого експресійного вектору ліганду zalpa11-MBP миші, pTAP98/zalpa11 ліганду миші

Експресійну плазмідну, яка містить полінуклеотид, що кодує частину ліганду zalpa11 миші, конденсований N-термінально стосовно зв'язуючого

мальтозу білку (MBP), конструювали гомологічною рекомбінацією, як описано у прикладі 31А. Фрагмент кДНК ліганду *zalpha11* миші (SEQ ID NO: 55) виділяли, використовуючи PCR. Два праймери використовували у продукування фрагменту ліганду *zalpha11* миші у реакції PCR: (1) праймер ZC22,849 (SEQ ID NO: 86), що містить 40 по векторної фланкуючої послідовності та 24 по відповідних аміно-закінченню ліганду *zalpha11* миші, та (2) праймер ZC22,850 (SEQ ID NO: 87), що містить 40 по 3'-закінченню відповідного фланкуючої послідовності вектору та 21 по відповідних карбокси-закінченню ліганду *zalpha11* миші. Умови реакції PCR вищезазначено. Фрагмент розміром приблизно 450 по клонували у рTAP98 як описано вище. Клони трансформували, ідентифікували та вирощували як описано вище. Позитивні клони позначали рTAP134 та піддавали секвенсуванню. Полінуклеотидна послідовність ліганду MBP-*zalpha11* миші, конденсованого в межах рTAP134, показано у послідовності SEQ ID NO: 88, а відповідну послідовність поліпептиду, показано послідовністю SEQ ID NO: 89. Позитивні клони використовували для вирощування у *E. coli* як описано вище для очистки від білку конденсованого білку *huzalpha11L*/MBP-6H (приклад 32).

Приклад 32 Очистка ліганду *zalpha11*-MBP або рецептору *zalpha11*-MBP

Якщо не сказано інше, усі операції проводили при 4°C. Використовували такі способи очистки конденсатів ліганду *zalpha11*-MBP для ліганду *zalpha11*-MBP людини (*huzalpha11L*/MBP-6H) або ліганду *zalpha11*-MBP миші (*muzalpha11L*/MBP-6H) від *E. coli*. Конденсації рецептору *zalpha11*-MBP людини або миші проводили, використовуючи такий же спосіб. Попередньо перемішану заморожену пасту *E. coli* розтоплювали та розбавляли у 2 літрах буферу В (0,02М ТРИС (EM Science); 0,2М NaCl (Mallincrodt); 0,01М 2-меркапто-етанол (EM Science); pH 8,0; з 5мг/л пепстатину А (Boehringer Mannheim); 5мг/л апротиніну (Boehringer Mannheim); та 1мг/л PMSF (Fluka)) плюс 1-2мл анти-спінювального реагенту AF289 (Sigma). Суміш обробляли у попередньо охолодженому French Press руйнівником клітин (Constant Systems LTD) з 20-30 kPSI.

Лізат далі центрифугували при 18000×g протягом 45 хвилин при 4°C; супернатант залишали. До супернатанту лізату додавали 200мл кашки амліозної смоли (New England Biolabs), попередньо урівноваженої у буфері А (0,02М ТРИС (EM Science); 0,2М NaCl (Mallincrodt); 0,01М 2-меркапто-етанолу (EM Science); pH 8,0), та інкубували протягом ночі у 21 обертових балонах для досягнення максимального поглинання в партії MBP-конденсованого білку. Смоли промивали у форматі групи колонок 5 об'ємами колонки буферу А, далі партію елюювали буфером С (Буфер А з 0,02М мальтозою L5 (Sigma)). Сирі фракції збирали та контролювали за поглинанням при 280нм.

Елюйований білок аналізували засобом SDS NuPAGE (NOVEX) виявленням Coomassie (Sigma). Зразок та основну частину білку зберігали при -80°C.

Приклад 33 Поліклональні антитіла до ліганду *zalpha11* людини

Поліклональні антитіла до ліганду *zalpha11* людини виготовляли імунізацією 2 самиць білих кролів New Zealand очищеним рекомбінантним білком *huzalpha11L*/MBP-6H (приклад 32) або очищеним рекомбінантним білком CHO *huzalpha11L*-CHO (приклад 29). Кожний з кролів спочатку одержував штраперитонально (ip) ін'єкцію 200мг очищеного білку у повному ад'юванті Фрейнда з наступними інтраперитональними допоміжними ін'єкціями 100мг білку у неповному ад'юванті Фрейнда кожні три тижні. Через сімдесят днів після застосування другої допоміжної ін'єкції (усього 3 ін'єкції), у тварин відбирали кров та збирали сироватку. Тварин далі допоміжно ін'єктували та відбирали у них кров кожні три тижні.

Кролячу сироватку, створену стосовно *huzalpha11L*/MBP-6H попередньо адсорбували від анти-MBP антитіла, використовуючи білкову колонку CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), що виготовляли, використовуючи 10мг очищеного рекомбінантного MBP на грам CNBr-SEPHAROSE (Pharmacia). Рекомбінантний MBP виробляли та очищали самостійно на амліозній колонці, використовуючи добре відомі в рівні техніки способи. Поліклональні антитіла, специфічні стосовно ліганду *huzalpha11* афінно очищали від кролячої сироватки, використовуючи білкову колонку CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), яку виготовляли, використовуючи 10мг очищеного специфічним антигеном рекомбінантного білку *huzalpha11L*/MBP-6H або 10мг очищеного рекомбінантного білку CHO *huzalpha11L*-CHO на грам CNBr-SEPHAROSE, з наступним 20 х діалізом у PBS протягом ночі. Специфічні стосовно ліганду *huzalpha11* антитіла характеризували засобом ELISA, використовуючи 1мкг/мл очищеного рекомбінантного білку *huzalpha11L*/MBP-6H (приклад 32), ліганду *zalpha11* людини (*huzalpha11L*-CHO) (приклад 29), або *muzalpha11L*-MBP/6H (приклад 32) як мішень для антитіла.

Нижча межа визначення (LLD) кролячого афінно очищеного антитіла анти-*huzalpha11L*/MBP-6H складала 10нг/мл на його специфічному очищеному рекомбінантному антигені *huzalpha11L*/MBP-6H, 500нг/мл на очищеному рекомбінантному *huzalpha11L*-CHO, та 100нг/мл на очищеному рекомбінантному *muzalpha11L*/MBP-6H (приклад 32). LLD кролячого афінно очищеного антитіла анти-*huzalpha11L*-CHO складала 20нг/мл на його специфічному очищеному рекомбінантному антигені *huzalpha11L*-CHO, 500нг/мл на очищеному рекомбінантному *huzalpha11L*/MBP-6H, та 50нг/мл на очищеному рекомбінантному *muzalpha11L*/MBP-6H.

Приклад 34 Антипептидні антитіла проти ліганду *zalpha11* людини

Поліклональні антитіла до ліганду *zalpha11* людини виготовляли імунізацією 2 самиць білих кролів New Zealand очищеним рекомбінантним пептидом, *huzalpha11L*-1 (SEQ ID NO: 72) або *huzalpha11L*-3 (SEQ ID NO: 73). Пептиди синтезували, використовуючи синтезатор пептидів Applied Biosystems, модель 431 (Applied Biosystems, Inc, Foster City, CA) за інструкціями виробника. Пептиди сполучали далі з гемоціаніном замкового блюдечка (KLH) білкового носія з активацією малеїні-

мідом. Кожний з кролів спочатку одержував інтраперитонально (ip) ін'єкцію 200мг очищеного пептиду у повному ад'юванті Фрейнда з наступними інтраперитональними допоміжними ін'єкціями 100мг пептиду у неповному ад'юванті Фрейнда кожні три тижні. Через сім-десять днів після застосування другої допоміжної ін'єкції (усього 3 ін'єкції), у тварин відбирали кров та збирали сироватку. Тварин далі допоміжно ін'єктували та відбирали у них кров кожні три тижні.

Кролячу сироватку, створену стосовно пептидів α 11 людини характеризували перевіркою титру ELISA, використовуючи 1мкг/мл відповідного пептиду, використаного для створення антитіла (SEQ ID NO: 72 або SEQ ID NO: 73) як мішень антитіла. 2 кролячих сироватки до пептиду huzalpha11L-1 мали титр стосовно специфічного до них пептиду при розбавленні 1:5,000,000 (1:5E6). 2 кролячих сироватки до пептиду huzalpha11L-3 мали титр стосовно специфічного до них пептиду при розбавленні 1:5E6.

Поліклональні антитіла, специфічні до пептиду ліганду α 11 людини афінно очищали від кролячої сироватки, використовуючи білкову колонку CNBR-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), що виготовляли, використовуючи 10мг відповідного специфічного пептиду (SEQ. ID. NO: 72 або SEQ. ID. NO: 73) на грам CNBr-SEPHAROSE, з наступним 20 х діалізом у PBS протягом ночі. Huzalpha11-ліганд-специфічні антитіла характеризували перевіркою титру ELISA, використовуючи 1мкг/мл прийнятного очищеного пептидного антигену або очищених рекомбінантних білків повної довжини як мішень антитіла.

Нижча межа визначення (LLD) кролячого анти-huzalpha11L-1 афінно очищеного антитіла складає 500пг/мл на його специфічний пептидний антиген (huzalpha11L-1; SEQ ID NO: 72), 500пг/мл на очищений рекомбінантний huzalpha11L/MBP-6H (приклад 32), та 500пг/мл на очищений CHO-рекомбінантний huzalpha11L-CHO (приклад 29). Не спостережено крос-реактивності стосовно очищеного рекомбінантного huzalpha11L/MBP-6H (приклад 32). LLD кролячого анти-huzalpha11L-3 афінно очищеного антитіла складає 50пг/мл на його специфічний пептидний антиген (huzalpha11L-1; SEQ ID NO: 73), 50пг/мл на очищений рекомбінантний huzalpha11L/MBP-6H. 500пг/мл на очищений CHO-рекомбінантний huzalpha11L-CHO (приклад 29), та 100пг/мл на очищений бакуловірус-рекомбінантний huzalpha11L-Bv (приклад 30). Спостерігали крос-реактивність стосовно очищеного рекомбінантного huzalpha11L/MBP-6H (приклад 32) з LLD 5нг/мл.

Приклад 35 Моноклональні антитіла рецептору α 11 людини

Моноклональні антитіла рецептору α 11 виготовляли імунізацією 5 самців мишей BalbC (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) очищеним рекомбінантним білком розчинного рецептору, α 11CEE (huzalpha11-CEE-BHK) (приклад 10A). Миші одержували інтраперитонально (ip) ін'єкцію 20мг очищеного пептиду у повному ад'юванті Фрейнда з наступними інтраперитональними допоміжними ін'єкціями 10мг пептиду у неповному ад'юванті Фрейнда кожні два тижні. Через сім-

десять днів після застосування третьої допоміжної ін'єкції, у тварин відбирали кров та збирали сироватку.

Зразки мишачої сироватки, специфічної стосовно huzalpha11-CEE-BHK, характеризували перевіркою титру ELISA, використовуючи очищений рекомбінантний CHO-білок huzalpha11-Fc (приклад 10C) як мішень антитіла. Один зразок мишачої сироватки мав титр стосовно специфічної мішені антитіла при розбавленні 1:1,000,000 (1:1E6). Чотири зразки мишачої сироватки мали титр стосовно специфічної мішені антитіла при розбавленні 1:100,000 (1:1E5).

Спленоцити збирали з 4 високих титрів миші та конденсували з клітинами мієломи миші SP2/0, використовуючи PEG 1500 (Boehringer Mannheim, UK) у двох окремих операціях конденсації, використовуючи співвідношення у конденсаті спленоцитів до клітин мієломи 4:1 (Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow та D. Lane, Cold Spring Harbor Press). Через 10 днів вирощування після конденсації, специфічні продуковані антитілом гібридоми ідентифікували засобом ELISA, використовуючи очищений рекомбінантний білок BHK людини α 11-Fc4 (приклад 10C) як мішень антитіла, та засобом FACS, використовуючи клітини BaF3, що експресують послідовність huzalpha11 (приклад 4, та приклад 2) як мішень антитіла. Утворені 4 гібридами, що позитивні за обома способами, клонували обмеженим розбавленням тричі. Антитіла позначали: 249.28.2.1.2.2; 247.10.2.15.4.6; 249.19.2.2.3.5; та 249.15.2.4.2.7.

Приклад 36 Ліганд α 11 трансгенних мишей

A. Створення трансгенних мишей, що експресують ліганд α 11 людини та миші Фрагменти ДНК з трансгенних векторів (приклад 22 та приклад 26), що містять 5'- та 3'-фланкуючі послідовності відповідного промотеру (MT-1 печінко-специфічний промотер (ліганду α 11 миші (приклад 26B) або лімфоїдно-специфічний промотер LCK (ліганду α 11 миші та людини (приклади 26A та 22B), інтрон інсуліну II щурів, кДНК ліганду α 11 та полі-A-послідовність гормону росту людини, виготовляли та використовували для мікроін'єкцій у запліднені ооцити миші B6C3f1 (Taconic, Germantown, NY), використовуючи стандартний протокол мікроін'єктування. [Дивися, Hogan, B. et al, Manipulating Mice Embryo. A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994].

Вісім трансгенних мишей, що експресують ліганд α 11 людини з лімфоїдно-специфічного промотеру E μ LCK ідентифікували серед 44 мишенят. Чотири з них були мишенятами, що загинули, та 4 вирости до повноліття. Рівні експресії у цих тваринах були явно низькими. Двадцять трансгенних мишей, що експресують ліганд α 11 миші з лімфоїдно-специфічним промотером E μ LCK, ідентифікували серед 77 мишенят. Усі вирости до повноліття. Рівні експресії у цих тваринах були явно низькими. Три трансгенних миші, що експресують ліганд α 11 миші з печінко-специфічного промотеру MT-1, ідентифікували серед 60 мишенят. Двоє з цих мишенят загинули та 1 виріс до повноліття. Рівні експресії у цих тваринах були явно ни-

зкими. Тканини виготовляли та гістологічно оцінювали як описано нижче.

В. Мікроскопічна оцінка тканин від трансгенних мишей

Селезінку, тимус, та мезентеричні лімфатичні вузли збирали з трансгенних тварин, що експресують ліганд $\alpha 11$ людини та миші (приклад 36А), і виготовляли для гістологічного дослідження. Інші тканини, які звичайно збирали, включали такі: печінку, серце, легені, нирки, шкіру, молочну залозу, підшлункову залозу, шлунок, тонкий та товстий кишечник, мозок, слинну залозу, трахею, стравохід, надниркову залозу, слизову, репродуктивний тракт, допоміжні статеві залози самців, скелетні м'язи, включаючи периферійні нерви, та стегно з кістковим мозком. Тканини збирали з новонародженого мишеняти, яке несподівано померло, та кількох дорослих трансгенних мишей, як описано нижче. Зразки фіксували у 10% буферованому формаліні, обробляли звичайним способом, заливали парафіном, секціонували на зрізи товщиною 5 мікрон, та фарбували гематоксиліном та еозином. Зрізи оцінювали у балах стосовно суворості змін тканини (0=нема, 1=малі, 2=середні, 3=суворі) за вказівкою ветеринарного патолога, залученого до обробки.

Мишеня та 2 дорослі самиці мишей, що експресують ліганд $\alpha 11$ людини, та 3 з 6 дорослих самців мишей, що експресують ліганд $\alpha 11$ миші виявили запальні інфільтрати у багатьох досліджених тканинах. Органи було уражено від миші до миші дещо по різному. Запальний інфільтрат складався головним чином з нейтрофілів та макрофагів у різній кількості та співвідношенні та мали загалом ступінь суворості від слабкого до середнього. Більш того, ці тварини виявили зміни у лімфоїдних органах, включаючи лімфопенію від середньої до суворі у селезінці та тимусі (трансгени ліганду $\alpha 11$ людини та миші); та сувору лімфопенію (трансгени ліганду $\alpha 11$ людини), або від слабкого до середнього нагноєння до піогрануломатозного лімфаденіту (трансгени ліганду $\alpha 11$ миші) у лімфатичних вузлах. На додаток, підвищення екстрамедулярного кровотворення спостерігали у селезінках. У підхожих за віком контрольних мишей цих змін не спостерігали.

С. Проточна цитометрія тканин від трансгенних мишей, що над експресують ліганд $\alpha 11$

Трансгенних тварин, що над експресують ліганд $\alpha 11$ людини або миші (приклад 36А) умертвляли для проточної цитометрії периферійної крові, тимусу, лімфатичного вузла, кісткового мозку, та селезінки.

Суспензію клітин робили з селезінки, тимусу та лімфатичних вузлів розщепленням органу на шматки пінцетом у охолодженому льодом культивційному середовищі (500мл середовища RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, KS); 5мл 100 x L-глутаміну (Gibco BRL, Grand Island, NY); 5мл 100 x пірувату натрію (Gibco BRL); 5мл 100 x пеніциліну, стрептоміцину, неоміцину (PSN) (Gibco BRL), а потім обережно проштовхували клітини крізь клітинне сито (Falcon, VWR Seattle, WA). Периферійну кров (200мл) збирали у гепаринізовані туби та розбавляли до 10мл HBSS, що містить 10 одиниць

гепарину на мл. Еритроцити видаляли з препаратів селезінки та периферійної крові гіпотонічним лізісом. Суспензії клітин кісткового мозку робили промивкою кісткового мозку зі стегон охолодженим льодом культивційним середовищем. Клітини підраховували та тестували на життєздатність, використовуючи трипан-блакитний (Trypan Blue) (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Клітини ресуспендували у льодяному середовищі для виявлення (HBSS, 1% сироватки зародка теляти, 0,1% азиду натрію) у концентрації десять мільйонів на мілілітр. Блокування рецептору Fc та неспецифічного приєднання антитіл до клітини досягали додаванням до суспензії клітин 10% нормальної козячої сироватки та засобом Fc Block (Pharmingen, La Jolla, CA).

Суспензію клітин змішували з рівним об'ємом мічених флуорохромом моноклональних антитіл (PharMingen), інкубували на льоді протягом 60 хвилин та далі двічі промивали холодним промивочним буфером (PBS, 1% сироватки зародка теляти, 0,1% азиду натрію) до ресуспендування у 400мл промивочного буферу, що містять 1мг/мл 7-AAD (Molecular Probes, Eugene, АБО) як маркеру життєздатності у деяких зразках. Дані в потоці отримували на проточному цитометрі FACScalibur (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Отримання та аналіз проводили, використовуючи програмне забезпечення CellQuest (BD Immunocytometry Systems).

Трансгенні тварини, що експресували ліганд $\alpha 11$ людини або миші на найвищому рівні, мали надзвичайно змінені популяції клітин у всіх аналізованих лімфоїдних органах. Видимі зміни включали повну втрату клітинності зобної залози, повну відсутність CD45R-позитивних В-клітин та збільшення розміру та клітинності селезінки. Як селезінка, так і кістковий мозок збільшили число сортованих за розміром міелоїдних клітин, які підраховували збільшенням як моноцитів, так і нейтрофілів. Пен-маркер NK-клітин (DX5) збільшувався у багатьох популяціях. Середньо експресуючі засновники мали менш різучі, але все ще значні зміни, що полягали у видимому фенотипі високих експресорів. Миші з найнижчим рівнем експресії мали незначне збільшення міелоїдних клітин без зменшення числа В-клітин. Вони виявляли значні зміни у популяції тимодитів зі зменшенням CD4+CD8+-подвійно-позитивних клітин та збільшували одинично-позитивні клітини CD4 та CD8.

Приклад 37 Очищений рекомбінантний білок ліганду $\alpha 11$ людини

Дослідження реакції на дозу у нормальних мишей

А. Резюме

Нормальних самиць мишей C57B1/6 (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN), віком шість тижнів обробляли інтраперитональними ін'єкціями один раз кожної доби протягом чотирьох чи восьми діб одним з чотирьох рівнів доз очищеного рекомбінантного ліганду $\alpha 11$ людини (приклад 24) при 0,1, 0,5, 5 або 50мкг/мишу/добу або носієм як контролем. Маса тіла та температуру тіла контролювали кожної доби. На четверту або дев'яту добу, чотирьох з восьми мишей з кожної групи обробки білком та п'ять з десяти мишей з контро-

льної групи умертвляли. Кров, кістковий мозок та тканини збирали та аналізували. Можливі розлади у лімфоїдних тканинах оцінювали, як і загальні фізіологічні та токсикологічні параметри.

Свідок токсичності білку ліганду *zalpha11* людини не було при жодній з тестованих доз. Маса тіла та температура тіла не мінялися. Відчутних змін у клінічних хімічних параметрах не було. Однак, спостерігали стійкі свідчення стосовно збільшення проценту мієлоїдної лінії диференціювання клітини у кістковому мозку, селезінці та периферійній крові у мишей, оброблених найвищою дозою ліганду *zalpha11* порівняно з контролем. Це було статистично значуще зростання у мієлоїдній лінії диференціювання заклеєних клітин, що ідентифікували проточною цитометрією гомогенату селезінки у групі з вищою дозою. Селезінки двох груп з найвищими дозами були статистично помітно більшими ніж в інших групах. На гістопатологічній оцінці, однак, тільки незначне зростання у екстрамедулярному кровотворенні спостерігали у групі з найвищою дозою. Це зростання було статистично значущим для співвідношення мієлоїдного стосовно еритроїдного кісткового мозку у групі з найвищою дозою порівняно з іншими групами. Під кінець, спостерігали збільшення у периферійній крові як у загальній кількості білих кров'яних клітин, так і у проценті моноцитів у тій же групі.

В. Виготовлення дозованих розчинів

Очищений рекомбінантний ліганд *zalpha11* людини (приклад 24) розбавляли стерильним буферованим фосфатом фізіологічним розчином (GibcoBRL, Grand Island, NY) при концентрації білку 50, 5, 0,5 або 0,1 мікрограм у 0,1мл носія PBS. Дози протягом перших чотирьох діб робили на добу 0 та заморожували у морозильнику при -20°C перед використанням. Дози протягом діб п'ять-вісім робили на добу п'ять та заморожували як вищезазначено. Аліквоти такого ж PBS подібно заморожували для обробленої носієм контрольної групи. На добу застосування прийнятні аліквоти розтоплювали та по 0,1мл розчинів ін'єктували мишам інтраперитонально кожної доби протягом чотирьох чи восьми діб.

С. Мета дослідження

На початку дослідження миші були віком шість тижнів. Кожна група обробки складалася з восьми мишей, за винятком контрольної обробленої носієм групи, що включали десять мишей. Половину мишей з кожної групи обробки умертвляли після чотирьох діб обробки, а іншу половину після восьми діб.

Перед обробкою кожної доби, кожну мишу зважували та реєстрували її температуру тіла, використовуючи систему Portable Programmable Notebook System (BMDS, Inc, Maywood, NJ), скануванням мишей для ідентифікації номеру та температури тіла з імплантованих підшкірно транспондерів (IPTT-100, BMDS, Maywood, NJ).

При умертвленні тканини, що збирали для дослідження популяції білих кров'яних клітин проточною цитометрією, включали кістковий мозок, тимус та селезінку. FACS-аналіз лімфоїдних органів та кісткового мозку проводили за допомогою FACScalibur, (Becton Dickinson, Mansfield, MA). Тканини, що збирали для гістологічного дослі-

дження на визначення токсичності білку, включали: селезінку, тимус, печінку, нирки, надниркову залозу, серце та легені. Усі тканини, фіксовані для гістології, зберігали при 4°C протягом ночі у 10% нормальному буферованому фізіологічному розчині (NBF) (Surgipath, Richmond, IL). Наступної доби NBF замінювали 70% етанолом та тканини знов охолоджували до 4°C до гістологічної обробки.

Тканини обробляли та виявляли гематоксиліном та еозином самостійно, далі відсилали до договірного патолога для гістопатологічного аналізу. Кров збирали для повного підрахунку клітин крові (CBC) та хімічного профілю сироваток. CBC аналізували самостійно аналізатором клітин Dyn 3500 Hematology (Abbott Diagnostics Division, Abbott Park, IL), а ручний підрахунок диференціальних білих клітин крові аналізували у лабораторії Phoenix Central Laboratory, (Everett, WA). Сироватку тримали замороженою при -20°C до представлення у лабораторію Phoenix Central Laboratory для повних хімічних панелей сироватки. Для аналізу співвідношення мієлоїд:еритроїд кістковий мозок з одного стегна наносили на слайди CitoSpin (CITOSPIN 3 CITOCENTRJFFUGE та CITO SLIDES, Shandon, Pittsburgh, PA) та відсилали до лабораторії Phoenix Central Laboratories для аналізу.

D. Результати дослідження

Клінічних свідоків фізіологічних впливів або токсичності ліганду *zalpha11* людини при дозах 50мкг/добу або нижче не виявлено. Маса тіла та температура залишалися нормальними протягом обробок. Хімічні параметри сироваток були у нормальних межах. Підрахунки червоних клітин крові та тромбоцитів виявилися нормальними. У мишей, що отримували 50мкг/добу протягом 8 діб, ручний підрахунок диференціальних білих клітин крові виявив підвищений процент моноцитів у периферійній крові, та безумовне збільшення у підрахунках загальних білих клітин крові. У кістковому мозку, вимитому зі стегна, співвідношення мієлоїдів стосовно еритроїдів збільшилося для групи дози 50мкг, та у меншому ступеню для груп доз 5мкг при 8-добовому застосуванні. У непараметричному багатократному порівнянні колонок, використовуючи програмне забезпечення InStat (InStat MAC; GraphPad Software, Inc, San Diego, CA), ця відмінність була статистично значущою ($p=,0049$). Відмінність між групами вищої дози та носія також була значною ($p=,0286$). Збільшення білих клітин крові у периферійній крові та значне зростання у мієлоїдних попередників у кістковому мозку, можуть, отже бути спорідненими.

Гістологічна оцінка наступних тканин не виявила явних свідоків цитологічних або структурних змін, мітотичних перетворень або некрозу: тимус, печінка, нирки, надниркова залоза, дванадцятипала кишка, підшлункова залоза, тонка кишка, сліпа кишка, товста кишка, мезентеричні лімфатичні вузли, матка, яєчник, слинні залози, серце, трахея, легені та мозок. Не було явної відмінності між обробленими групами у масі тимусу, нирок, печінки або мозку. З усіх досліджених тканин тільки маси селезінки були помітно зміненими.

Масу селезінки кожної миші нормалізували стосовно маси її мозку. У групі обробки білком у

дозі 50мкг/добу порівняно з носієм, групах обробки 0,1мкг та 0,5мкг, середні маси селезінки були приблизно на 50% більше після чотирьох діб обробки та майже на 100% більше після восьми діб, ніж середні маси селезінки інших трьох груп. У 4-добовій підгрупі групи обробки 5мкг/добу також була тенденція до збільшення селезінки, ніж у контрольній групі та групах з нижчими дозами. Відмінність мас селезінки/мозку з 4-добової та 8-добової підгруп з комбінованою обробкою була статистично значущою ($p=0,0072$) непараметричному при Kruskal-Wallis ANOVA, тесті багатократним порівнянням колонок, використовуючи програму InStat (GraphPad Software).

Незначне зростання екстрамедулярного кровотворення, особливо у червоній суспензії, спостерігали у селезінках мишей з групи вищої дози, навіть у мишей, оброблених протягом чотирьох діб. Проточна цитометрія селезінок виявила значне зростання у пропорції клітин мієлоїдного формату у групі вищої дози ($p=0,01$, тест Ст'юдента), репрезентуючи збільшення як моноцитів, так і нейтрофілів. Цей вплив може стосуватися збільшеного проценту мононуклеарних клітин периферійної крові, а також безумовного збільшення мієлоїдних попередників у кістковому мозку, що описано вище. Більш того, трансгенні миші, похідні від вставки гена *zalpha11* людини, збільшили екстрамедулярне кровотворення у своїх селезінках порівняно з нетрансгенними нащадками.

Кілька змін спостерігали у групі дози 50мкг на добу порівняно з контрольною групою, що залучає ліганд *zalpha11* у продукування або розвиток клітин мієлоїдної лінії диференціювання. Узяті разом, спостережені зміни означають, що *zalpha11* може бути корисним як терапевтичний білок у таких областях медицини як рак та імунологічні розлади, що тут описано.

Приклад 38 Дослідження попереднього відбору та тканинного розподілу очищеного рекомбінантного білку ліганду *zalpha11* людини

A. Резюме

Для пояснення тканинного розподілу та схеми відбору очищеного ліганду *rhalpha11* провели попередні фармакокінетичні дослідження. Самцям миші віком 9 тижнів C57B1/6 давали очищений рекомбінантний білок ліганду *zalpha11* людини, мічений ^{111}In дієм (^{111}In) (NEN, Boston, MA) одним з трьох шляхів. Кожна миша отримувала разову болюсну ін'єкцію внутрішньовенним (IV), інтраперитональним (IP), або підшкірним шляхом (SC). Мишей, ін'єктованих підшкірно чи інтраперитонально, умертвляли через одну або три години після ін'єкції. Мишей, ін'єктованих внутрішньовенно умертвляли через десять хвилин або одну годину після ін'єкції. Кров, плазму та вибрані тканини збирали у різні моменти часу та підраховували гамалічильником для оцінки приблизного періоду напіввиведення та тканинного розподілу екзогенного міченого білку. Тканини, що збирали для підрахунку, а також інтервали умертвлення вибирали на основі відомостей про розподіл інших цитокінів, мічених радіонуклідами.

При умертвленні тканини, що збирали для підрахунку радіоактивності включали тимус, селезінку, нирки, частину печінки, частину легенів та се-

ховий міхур. У групі, що отримували ін'єкцію інтраперитонально, також підраховували кишку для оцінки впливу ін'єкції на кишку, а у підшкірно дозованих мишей підраховували шкіру з нижчезташованими структурами в області ін'єкції. Число імпульсів на хвилину у суцільних печінці та легенях розраховували зі зрізів, що підраховували за процентом від мас суцільних органів, репрезентованих зрізами.

Після закінчення дослідження зібрані тканини, всю кров та плазму підраховували на гамалічильнику COBRA II AUTO-GAMMA (Packard Instrument Company, Meriden, CT). Аліквоту з вихідних мічених дозованих розчинів також підраховували при закінченні дослідження тканин. Це дозволяло розрахувати процент загальної ін'єктованої радіоактивності для кожної миші та одночасну корекцію всіх підрахунків радіоактивного розкладу. Апроксимація залишкового об'єму крові та мас органів свідчила, підраховували що більшість імпульсів, а відтак процент імпульсів на тканину був прийнятним для репрезентації розподілу імпульсів після застосування міченого ліганду *zalpha11* кожним шляхом.

B. Мічення ліганду *zalpha11* ^{111}In дієм

Очищений рекомбінантний ліганд *zalpha11* людини (приклад 29) сполучали з 10-кратним молярним надлишком DTPA (Peirce, Rockford, IL) інкубуванням протягом 30 хвилин при кімнатній температурі у PBS. Непроореагувавший DTPA та гідролізати видаляли заміною буферу на Biomat-5k NMWL (Ultrafree-15, Milipore, Bedford, MA). Вільний об'єм піку білку концентрували до 5мг/мл та відбирали аліквоту для тестування у біодослідженні (анти-CD40-стимуляції В-клітин миші (приклад 44)). На підтвердження, що DTPA-сполучення все ще має повну біоактивність, сполучення розбавляли до 0,5мг/мл 1М Na-ацетатом з рН 6,0. Два мкг ^{111}In дію переносили у 0,5мл 1М Na-ацетатом з рН 6,0 та змішували з лігандом DTPA-*zalpha11* людини протягом 30 хвилин, при кімнатній температурі. Непоглинений ^{111}In дію видаляли при заміні буферу на PBS на колонці PD-10 (Pharmacia, Piscataway, NJ). Мічений радіоактивним ізотопом матеріал розбавляли неміченим лігандом *zalpha11* людини для отримання специфічної активності 100мКі/мг, фільтрували в стерильних умовах та зберігали при 4°C протягом ночі. Сто процентів міченого білку залишався на мембрані Biomat-5k NMWL (Milipore). Мічений ^{111}In -ліганд *zalpha11* людини застосовували до миші у відборі та фармакокінетичному дослідженні. П'ятдесят мкг білку ліганду *zalpha11* людини, міченого 5мкКі міченого ліганду *zalpha11* людини у 0,1мл носія PBS, застосовували до кожної тварини.

C. Результати попереднього дослідження розподілу

Через одну та три години після застосування усіма трьома шляхами найвищу концентрацію ^{111}In -ліганду *zalpha11* людини знайшли у нирках, а другу найвищу у сечі та сечовому міхурі, як показано цими тканинами, що мають найвище число імпульсів на хвилину. Середні підрахунки, отримані з нирок, були у 3-8 разів вище, ніж підрахунки для всієї печінки, залежно від шляху ін'єкції та моменту умертвлення. Наприклад, середнє число

імпульсів на хвилину у нирках протягом 60 хвилин після внутрішньовенної ін'єкції було у 4,5 рази вище, ніж середні підрахунки, що розраховані для всієї печінки з тої ж групи. У групі, що була умертвлена через десять хвилини після внутрішньовенного застосування, найвище число імпульсів на хвилину було знов у нирках, а друге найвище накопичення було еквівалентним у печінці, сечовому міхурі та сечі.

D. Попереднє фармакокінетичне дослідження

Збори крові та плазми здійснили на 10, 30 та 60 хвилинах після ін'єкції усіма трьома шляхами. Після ін'єкції внутрішньовенним шляхом, у окремої

підгрупи мишей взяли зразки крові та плазми на другій, п'ятій та десятій хвилинах. У іншій підгрупі мишей, що отримувала свої ін'єкції інтраперитонально або підшкірно, зібрали зразки крові через одну, дві та три години. Для оброблених груп дивися Таблицю 6. Дужки для короткого часу збору описують період напіввидалення IL-2 після внутрішньовенної ін'єкції. Описані T_{1/2} були в межах 2,5-5,1 хвилин. Як посилення на застосування *in vivo* стосовно IL-2, дивися [Donohue JH and Rosenberg SA J Immunol, 130: 2203. 1983]. Довгі проміжки часу було вибрано для основи очікуваної фази відбору.

Таблиця 6

Шлях ін'єкції	Час збору крові (хвил.)	Час умертвлення
Внутрішньовенно, група 1	2, 5, 10	10 хвилин.
Внутрішньовенно, група 2	10, 30, 60	60 хвилин.
Інтраперитонально, група 1	10, 30, 60	60 хвилин.
Інтраперитонально, група 2	60, 120, 180	180 хвилин.
Підшкірно, група 1	10, 30, 60	60 хвилин.
Підшкірно, група 2	60, 120, 180	180 хвилин.

Немічений IL-2 мав, як виявлено елімінуванням з сироватки, період напіввидалення приблизно три хвилини у мишей після внутрішньовенної ін'єкції. Як посилення дивися Donahue, JH та Rosenberg вище. Після ін'єкції інтраперитонально та підшкірно подібної кількості IL-2, тривалість активності DL-2 у сироватці була пролонгованою з 20 хвилин/мл протягом менше 30 хвилин після внутрішньовенної ін'єкції до вище, ніж 20 хвилин/мл протягом 2 годин після інтраперитональної та 6 годин після підшкірної ін'єкції. Головний шлях елімінації IL-2 виявлено як через нирки. Ліганд α 11, як виявлено, є структурно подібним до IL-2, як обговорено тут. Попередня оцінка елімінації ліганду α 11, як виявлено, збігається з безумовною елімінацією IL-2 нирками, оснований на накопиченні числа імпульсів на хвилину переважно у нирках, а потім у сечовому міхурі та сечі у представленому дослідженні.

Оцінку фармакокінетичних параметрів робили на основі окремого аналізу даних числа імпульсів на хвилину, отриманих з плазми, використовуючи програму аналізу PK WinNonLin, Version 1,1, (Scientific Consulting Inc, Cary, NC). Періоди напіввидалення у плазмі ліганду α 11 оцінювали, використовуючи передбачувані константи швидкості кінцевої елімінації при внутрішньовенному, підшкірному та інтраперитональному застосуванні дози 50мкг. Фармакокінетичні результати були оцінками внаслідок обмеженого точок даних у регіоні залежності кінцевої елімінації концентрацій у плазмі від часу. Більш того, відповідність фази кінцевої елімінації для підшкірного та інтраперитонального дозування потребувало використання даних для моментів часу, протягом якого поглинання ліганду ^{111}In - α 11 людини очевидно все ще відбувалося. Однак, оцінки напіввидалення після внутрішньовенного, підшкірного та інтраперитонального дозування складали 13,6 хвилин, 18,8 хвилин, та 34,3 хвилин, відповідно. Оскільки межі дозування не оцінювали, було неясно, насичувальна або активна елімінація (Michaelis Menten kinetics) відбувалася. Відтак, розрахунки цього періоду напіввидалення є оцінками.

Оцінки біопридатності міченого білку робили на основі величини площі під кривою (AUC) після підшкірного або інтраперитонального дозування порівняно з внутрішньовенним дозуванням. Оцінена біопридатність після підшкірної та інтраперитональної ін'єкції складала 35,8% та 63,9% відповідно. Оскільки досліджували тільки одну дозу білку, біопридатність не оцінювали як функцію дози. Оцінений проміжок та об'єм розподілу (на основі даних від внутрішньовенної ін'єкції) складав 0,48мл/хвилину. та 6,1мл, відповідно.

Хоча дані є попередніми, доля ліганду α 11, застосованого внутрішньовенно була подібною до описаної для EL-2, іншого цитокіну з 4-спіральною жмutoю [Donahue, JH та Rosenberg, SA вище]. Аналогічно IL-2, внутрішньовенно застосований ліганд α 11 має напіввидалення у плазмі тільки хвилини з основною очисткою нирками. Через три години після ін'єкції, більшість міченого матеріалу, екстрагованого з нирок, все ще залишалася на мембрані Biomat 5K NMLW (Miiroge). Оскільки попередньо було сказано, що втрати індію пов'язані з білком навіть протягом лізосомного розкладання [Stand, F. et al, J. Pharm. Sciences 88: 577-585, 1999] ліганд α 11 накопичується та може розкладатися у нирках. Проведене дослідження також виявило, як спостережено для багатьох інших білків, включаючи IL-2 [Donahue, JH and Rosenberg, SA, вище], що інтраперитональне та підшкірне застосування помітно подовжує рівні ліганду α 11 у плазмі.

Приклад 39 Виділення та вирощування CD34⁺-фракції MNC свіжого кісткового мозку людини використовуючи ліганд α 11 для оцінки NK-активності

А. Селекція та виділення CD34⁺-клітин з кісткового мозку людини

Свіжий кістковий мозок людини мононуклеарні клітини (MNC) виготовляли для збагачення клітинами, що мають NK-клітинну активність. Свіжі MNC людини отримували засобом Poetic Technologies (Gaithersburg, MD). 10мл Alpha-MEM (JRH, Lenexa, I-CS), що містять 10% HIA FBS (Hyclone, Logan, UT) та антибіотичний 1% PSN (Gibco, BRL, Grand Island, NY) додавали до суспензії клітин та пропускали клітини через сито на 100мкм. Клітини далі підраховували, пелетували, промивали 10мл PBS, що містить 2% FBS, далі пелетували знов та ресуспендували у 1мл PBS, що містить 2% FBS. Клітини, що мають поверхневий маркер клітин CD34 (CD34⁺-клітини) розділяли у магнітному полі, використовуючи комплект Detachabead з Dynabeads M-450 CD34 ((Dynal, Oslo, Norway), за інструкціями виробника. Обидві фракції CD34⁺- та CD34⁻ клітин далі аналізували як нижче наведено.

В. Вирощування CD34⁺-клітин, використовуючи ліганд α 11

Фракцію CD34⁺-клітин засівали у 4 комірки на 24-комірковому планшеті. 50000 позитивно вибраних клітин суспендували у 1мл Alpha MEM (JRH), що містить 10% HIA FBS (Hyclone) та 1% PSN (Gibco/BRL), плюс різні описані нижче цитокіни засівали у кожну з 4 комірок (1-4). Для 5 тестів для індукованого лігандом α 11 вирощування CD34⁺-вибраних MNC кісткового мозку використовували різні реагенти: реагенти включали flt3 людини. (R&D, Minneapolis, MN); очищений ліганд α 11 людини (приклад 30C та приклад 30D); IL-15 людини (R&D). Реагенти комбінували таким чином у добу 0: у комірку №1 додавали 2нг/мл flt3 людини, у комірку №2 додавали 2нг/мл flt3 людини та 15нг/мл очищеного ліганду α 11 людини, у комірку №3 додавали 2нг/мл flt3 людини та 20нг/мл IL15 людини, у комірку №4 додавали 2нг/мл flt3 людини, 15нг/мл очищеного ліганду α 11 людини, та 20нг/мл IL15 людини. Після інкубування протягом 18 діб, суспензії клітин з кожної комірки пелетували, а потім ресуспендували у 0,5мл Alpha MEM (JRH), що містить 10% HIA FBS (Hyclone) та 1% PSN (Gibco/BRL), і підраховували для аналізу проліферації фракції CD34⁺-клітин. Низький рівень проліферації спостерігали у присутності flt3 поодинці (контрольна комірка №1), але наявність IL-15 або α 11 на додаток до flt3 не мала значного впливу на вирощування (комірки №2 та №3). Однак, вирощування flt3 вище контрольного було очевидним у комірці №4, що містить на додаток до flt3 IL-15 та ліганд α 11. Ці результати означали, що α 11 та EL-15 діють синергічно на вирощування популяції CD34⁺-клітин людини. Більш того, результати цих експериментів підтверджують результати, показані лігандом α 11 миші у дослідженні BM миші (приклад 21).

Усі популяції клітин далі тестували на NK-активність та аналізували проточною цитометрією, як показано нижче (приклад 41).

С. Вирощування CD34⁺-клітин або CD34⁻-клітин, використовуючи ліганд α 11 з уповільненим додаванням IL-15

Обидва CD34⁻ позитивні та негативні (CD34⁻) фракції засівали окремо у шість комірок 12 комір-

кового планшету (1-6). Кожна з комірок містила 100000 позитивно або негативно вибраних клітин у 2мл Alpha MEM, що містить 10% HIA FBS та PSN, що описані вище. Використані реагенти описано вище. У комірку №12 нг/мл flt3 людини додавали у добу 0, у комірку №2 2нг/мл flt3 людини додавали у добу 0, а через 5 діб інкубації додавали 20нг/мл людини JL15, у комірку №3 2нг/мл flt3 людини та 15нг/мл ліганду α 11 людини додавали у добу 0, у комірку №4 2нг/мл flt3 людини та 15нг/мл ліганду α 11 людини додавали у добу 0, а після 5 діб інкубації додавали 20нг/мл DLI 5 людини, у комірку №5 2нг/мл flt3 людини та 5нг/мл IL15 людини додавали у добу 0, у комірку №6 2нг/мл flt3 людини, 15нг/мл ліганд α 11 людини, та 20нг/мл EL15 людини додавали у добу 0. Після інкубування протягом загалом 15 діб з початку експерименту, клітини з кожної комірки збирали та підраховували.

У комірці CD34⁺-популяції низький рівень проліферації спостерігали у присутності flt3 поодинці (контрольна комірка №1), але наявність EL-15 або α 11, доданих у добу 0 на додаток до flt3, не мала значного впливу на вирощування (комірки, №3 та 5). Додавання EL-15 через 5 діб мало деякий вплив на проліферацію у порівнянні з контрольною flt3 (комірка №2 порівняно з коміркою №1) та вплив на проліферацію у присутності α 11 (комірка №4 порівняно з коміркою №3). Однак, найбільше вирощування спостерігали у комірці №6, що містила IL-15 та ліганд α 11 на додаток до flt3 у добу 0.

У комірці CD34⁻-популяції, не спостерігали проліферацію у присутності flt3 поодинці (контрольна комірка №1), а фактично спостерігали зменшення популяції клітин. Наявність α 11, доданого у добу 0 на додаток до flt3 (комірка №3), була подібною до контрольного flt3. Наявність EL-15, доданого у добу 5, збільшувала вплив на проліферацію клітин у присутності (комірка №4) або відсутності (комірка №2) ліганду α 11. Знов, найбільше вирощування спостерігали у комірці №6, що містить EL-15 та ліганд α 11 на додаток до flt3 у добу 0.

Усі популяції клітин далі тестували на NK-активність та піддавали FACS-аналізу, як показано нижче (приклад 41).

Приклад 40 Виділення та вирощування свіжих клітин миші, використовуючи ліганд α 11 людини та миші для оцінки NK-активності та маркери NK-клітин

А. Виділення та вирощування клітин свіжого кісткового мозку миші низької густини, використовуючи ліганд α 11 людини та миші

Клітини свіжого кісткового мозку миші виділяли зрізуванням обох закінчень мишачих стегон, та вимиванням двома-трьома мл середовища для вирощування (дивися нижче) через внутрішню частину кістки у туби для збирання. Середовищем для вирощування було 500мл середовища RPMI 1640 (JRH Biosciences. Lenexa, KS); 5мл 100 x L-глутаміну (Gibco BRL. Grand Island, NY); 5мл 100 x пірувату натрію (Gibco BRL); 5мл 100x пеніциліну, стрептоміцину, неоміцину (PSN) (Gibco BRL); та 50мл інактивованої нагріванням сироватки зародка теляти (FBS)-(Hyclone Laboratories. Logan, UT).

Клітини кісткового мозку далі розділяли піпетуванням середовища уверх та униз кількаразово. Клітини далі пелетували та промивали один раз середовищем для вирощування і пропускали крізь сито на 70-мікрон. Мононуклеарні клітини низької густини виділяли, далі піддавали клітини кісткового мозку градієнту густини. Клітини кісткового мозку у 5-8 мілілітрах середовища для вирощування обережно наносили піпеткою на 5-8 мілілітрів за собою NycosPrep 1,077 Animal (Nycomed, Oslo, Norway) у труби центрифуги. Це далі центрифугували з градієнтом при 600×g протягом 20 хвилин. Мононуклеарні клітини низької густини збирали з поверхневого шару між NycosPrep та середовищем. Ці клітини далі розбавляли до приблизно 20 мілілітрів у середовищі для вирощування, пелетували та промивали. Клітини засівали далі при кількості приблизно $0,5-1,5 \times 10^6$ клітин на мілілітр у середовищі для вирощування у стандартній колбі для культур тканин та інкубували при 37° C, 5% CO₂, протягом двох годин.

Незліплені, низької густини (NALD) клітини кісткового мозку далі збирали та висівали на чашки при $0,5-2,0 \times 10^5$ клітин на мілілітр у середовищі для вирощування плюс 2,5 нанограм на мілілітр flt3 миші (R та D Systems, Minneapolis, MN) плюс 25-50 нанограм на мілілітр людини інтерлейкіну 15 (IL-15) (R та D Systems) з 50-150 нанограмами на мілілітр ліганду α 11 людини або без нього; або з 0,12-10 нанограмами на мілілітр ліганду α 11 миші або без нього.

Значного вирощування без додавання ліганду α 11 людини або миші не спостерігали. Незліплені клітини вирощувалися у культурах, що містять ліганд α 11 миші в такій низькій кількості, як 0,12нг/мл та у культурах, що містять ліганд α 11 людини в такій низькій кількості, як 22нг/мл. У культурах, що містять ліганд α 11 людини та миші, вирощування незліплених клітин збільшувалося зі збільшенням дози ліганду α 11, з насиченням реакції лігандом миші при приблизно 5-10нг/мл та недосягненням насичення реакції з лігандом людини навіть при найвищій дозі 200нг/мл. Ліганд α 11 людини виявляє приблизно у 20-100 разів менший вплив на клітини миші, ніж ліганд α 11 миші. Через приблизно п'ять-десять днів вирощування з лігандом α 11 клітини миші збирали та аналізували проточною цитометрією (FACScalibur; Becton Dickinson, Mansfield, MA) для визначення, який процент з них був позитивним стосовно антигенів NK-клітин, де 46% були позитивними стосовно маркеру PanNK-клітин DX5 (Pharmingen).

В. Виділення та вирощування клітин свіжої лінії диференціювання виснаженого кісткового мозку миші

Клітини свіжої лінії диференціювання виснаженого кісткового мозку миші (lin-) виділяли з клітин свіжого кісткового мозку миші першим інкубуванням клітин з такими антитілами: TER119, Gr-1, B220, MAC-1, CD3e та I-Ab (Pharmingen, San Diego, CA). Клітини lin+ далі видаляли засобом Dynabeads M-450 з овечим анти-щурячим IgG (Dyna, Lake Success, NY) за інструкціями виробника.

Негативно вибрані лінії клітин кісткового мозку засівали далі, як вищезазначено, у середовище для вирощування плюс 2,5нг/мл flt3 (R&D Systems) та 25нг/мл IL-15 (R&D Systems); або flt3, IL-15 та ліганд α 11 миші, 2-5% кондиційованого середовища BHK ліганду α 11 миші. Через шість днів росту, культури збирали, підраховували та досліджували активність NK-клітин (приклад 41). Ріст клітин з лігандом α 11 миші був приблизно двічі чи тричі ефективнішим при лізингу цільових для NK-клітин клітин (YAC-1 клітини), ніж ріст клітин без ліганду α 11.

С. Виділення та вирощування CD4-CD8- (подвійно негативних або DN) тимоцитів

Свіжі тимоцити миші виділяли нарізанням та протиранням тимусів від мишей віком від трьох до восьми тижнів. CD4-CD8-(DN) клітини далі негативно вибирали інкубуванням тимоцитів з анти-CD4 та анти-CD8 антитілами (PharMingen), далі видаляючи CD4+CD8+клітини із засобом Dynabeads M-450 з овечим анти-щурячим IgG (Dyna) за інструкціями виробника.

DN-мишачі тимоцити вирощували далі у середовищі для вирощування плюс 2,5нг/мл flt3 (R&D Systems), 25нг/мл IL-15 (R&D Systems) та 10нг/мл EL-7 (R&D Systems) з лігандом α 11 миші, як вищезазначено, чи без нього. Через шість днів клітини збирали, підраховували, аналізували проточною цитометрією як описано вище, а також досліджували активність NK-клітин (приклад 41).

Ріст культур з лігандом α 11 миші давав вихід приблизно у 480000 клітини, в той час, як культура без ліганду α 11 давала вихід тільки приблизно 160000 клітини. Ріст культур з лігандом α 11 миші знайшли приблизно на 16,2% позитивним стосовно антигену Pan NK NK-клітин, DX5 (PharMingen). Ріст культур без ліганду α 11 був на 14,6% позитивним стосовно DX5. Ріст клітин з лігандом α 11 при лізингу цільових для NK-клітин клітин, YAC-1, приблизно у два рази був кращим, ніж ріст клітин без ліганду α 11. Вирощувані клітини не лізували помітно лінії цільових клітин негативного контролю, EL4. Ці результати підтверджували, що ліганд α 11 селективно поширює літичні NK-клітини.

Приклад 41 Активність вирощуваних з лігандом α 11 людини та миші клітин та розвинені NK-клітини миші у дослідженні цитотоксичності NK-клітин

А. Дослідження NK-клітин

Опосередкований NK-клітинами цільовий цитоліз досліджували стандартним аналізом вивільнення ⁵¹Cr. Цільові клітини (клітини K562 (ATCC №CCL-243) у дослідженні людини, та клітини YAC-1 (ATCC №TIB-160) у дослідженні миші) мають втрачену експресію молекул головного комплексу гістосумісності (MHC), роблячи їх сприйнятливими до опосередкованого NK-клітинами лізису. Лінію цільових клітин негативного контролю у дослідженні миші представлено MHC-тимомою EL4 (ATCC №TIB-39). Ми вирощували клітини K562, EL4 та YAC-1 у середовищі RPMI 1640 (Gibco/BRL, Grand Island, NY), доповненому 10% FBS (Hyclone, Logan, UT), а також 4мМ глутаміну (Gibco/BRL), 100 I.U./мл пеніциліну+100 MCG/мл стрептоміцину (Gibco/BRL), 50мкМ

β -меркаптоетанолу (Gibco/BRL) та 10мМ буферу Гепес (Gibco/BRL). На добу дослідження, $1-2 \times 10^6$ цільових клітин збирали та ресуспендували при кількості $2,5-5 \times 10^6$ клітин/мл у середовищі RP10 у. Ми додавали безпосередньо до клітин 50-100мкл 5мКи/мл ^{51}Cr -хромату натрію (NEN, Boston, MA) та інкубували їх протягом 1 години при 37°C , далі промивали двічі 12мл PBS та ресуспендували у середовища 2мл RP10. Після підрахунку клітини на гемоцитометрі, цільові клітини розбавляли до $0,5-1 \times 10^5$ клітин/мл та 100мкл ($0,5-1 \times 10^4$ клітин) змішували з ефекторними клітинами як описано нижче.

У дослідженні ефекторних клітин людини клітини виготовили з вибраних та вирощуваних $\text{CD}34^+$ -клітин людини BM (приклад 39B), які збирали, промивали, підраховували, змішували при різних концентраціях з ^{51}Cr -міченими цільовими клітинами у 96-коміркових планшетах з заокругленим дном, та інкубували протягом 4 годин при 37°C . Після співінкубації ефекторних клітин та мічених цільових клітин, половину супернатанту з кожної комірки збирали та підраховували у гамалічильнику протягом 1 хвилини на зразок. Процент специфічного вивільнення ^{51}Cr розраховували за формулою $100 \times (X-Y)/(Z-Y)$, де X - вивільнення ^{51}Cr у присутності ефекторних клітин, Y - спонтанне вивільнення при відсутності ефекторів, а Z є загальне вивільнення ^{51}Cr з цільових клітин, інкубованих з 0,5% Тритоном X-100. Дані наносили на графік як залежність % специфічного лізису від співвідношення ефектор/мішень у кожній комірці.

В. Активність вирощуваних з лігандом $\alpha\text{pha}11$ людини клітин

Виділений $\text{CD}34^+$ -HPC людини культивували з $\text{flt}3$ +/ $\alpha\text{pha}11$ -лігандом та $\text{flt}3$ +IL-15+/ $\alpha\text{pha}11$ -лігандом (приклад 39), збирали клітини на добу 15 для оцінки їх здатності лізувати клітини МНС⁺ K562 у стандартному описаному вище аналізі з вивільненням Cr , та для аналізу фенотипу їх поверхні проточною цитометрією. Як прогнозували за попередніми дослідженнями, [Mrozek, E et al. Blood 87: 2632-2640, 19%; та Yu, H et al. Blood 92: 3647-3657, 1998], одночасне додавання EL-15 та $\text{flt}3\text{L}$ індукувало продукт невеликої популяції клітин $\text{CD}56^+$. Цікаво, що хоча клітини BM, культивовані одночасно з лігандом $\alpha\text{pha}11$ та $\text{flt}3\text{L}$, не розвивалися помітно, було значне зростання загального числа клітин у культурах, що містять комбінацію $\text{flt}3\text{L}$, ліганду $\alpha\text{pha}11$ та IL-15 (дивися приклад 39).

Для оцінки фенотипу поверхні цієї культури BM людини, ми виявили невеликі аліквоти клітин протягом 3-кольорової проточної цитометрії з анти- $\text{CD}3$ -FITC, анти- $\text{CD}56$ -PE та анти- $\text{CD} 16$ -CyChrome mAbs (від PharMingen, San Diego, CA) та аналізували їх за допомогою FACScalibur, використовуючи програму CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Ця проточна цитометрія підтвердила, що переростання клітин з цих культур було диференційоване NK-клітинами, оскільки вони були великими та гранульованими та експресували $\text{CD}56$ та $\text{CD}16$, і були $\text{CD}3^+$ (Lanier, LL Annu. Rev. Immunol. 16: 359-393, 1998). Крім того, ці клітини виявляли помітно вищу ефекторну функцію, ніж ті клітини, що зростали з DL-15

та $\text{flt}3$. Точніше, ріст клітин у всіх трьох цитокинах лізував більше 40% цільових K562 при співвідношенні ефектор-мішень (E:T) 1,5, в той же час ріст клітин у IL-15+ $\text{flt}3\text{L}$ лізував менше 5% мішеней при E:T 2. Ці дані демонструють, що у комбінації з IL-15, ліганд $\alpha\text{pha}11$ стимулює диференціацію NK-клітин з $\text{CD}34^+$ -BM-клітин.

С. Активність вирощених з лігандом $\alpha\text{pha}11$ миші клітин

Для дослідження впливу ліганду $\alpha\text{pha}11$ на клітини кровотворних попередників миші, очищені клітини кісткового мозку з негативною лінією диференціювання (Lin-) з мишей C57Bl/6 вирощували у присутності $\text{flt}3$ +IL-15+/ $\alpha\text{pha}11$ -ліганду, як описано у прикладі 40B. На добу 6 культивування клітини ("ефектори") збирали та підраховували, далі ресуспендували у 0,4мл середовища RP10 (приклад 41A). Дві аліквоти (0,15мл кожна) кожного зразку вирощували з лігандом $\alpha\text{pha}11$ або без нього (приклад 41A) серійно розбавляли у три рази з дублюванням у 96-коміркові планшети з заокругленим дном, всього у 6 комітках по 100мкл кожна. Залишкові 100мкл клітин виявляли на маркери поверхні NK-клітин засобами FITC-анти-2B4 та PE-анти-DXS mAbs (PharMingen) та аналізували проточною цитометрією. Кожна група клітин, підданих дії $\text{flt}3$ +DL-15 при наявності ліганду $\alpha\text{pha}11$ або без нього, мала подібні фракції 2B4+DXS+клітин, в межах 65-75% позитивних стосовно обох NK-маркерів.

Для дослідження NK-лізису цільові клітини (YAC-1 та EL4) мітили ^{51}Cr , як описано вище. Після підрахунку цільових клітин на гемоцитометрі, цільові клітини розбавляли до $0,5-1 \times 10^5$ клітин/мл та 100мкл YAC-1 або EL4 ($0,5-1 \times 10^4$ клітин) змішували з 100мкл ефекторних клітин і інкубували протягом 4 годин при 37°C . Специфічний лізис визначали для кожної комірки, як описано вище.

Ми виявили, що ріст клітин у присутності $\text{flt}3$ +IL-15+ліганд $\alpha\text{pha}11$ виявляв посилену літичну активність (приблизно у два рази) проти мішеней YAC-1 (але не вбивав МНС⁺-контрольну лінію клітин EL4). При співвідношенні ефектор-мішень (E:T) 5, NK-клітини створені у присутності усіх 3-х цитокінів (ліганд $\alpha\text{pha}11$ + $\text{flt}3$ +IL-15) лізували 12% клітин YAC-1, при тому що ці NK-клітини вирощені з $\text{flt}3$ +IL-15 лізували 6% мішеней YAC-1. Наступні експерименти підтвердили цю тенденцію.

Згідно з другим підходом визначення біологічного активного ліганду $\alpha\text{pha}11$ на NK-клітинах миші, ми виділяли недорозвинені $\text{CD}4^+\text{D}8^-$ ("подвійно негативні", DN) тимоцити миші, як описано у прикладі 40C, та культивували їх з IL-15+ $\text{flt}3$ +IL-7 або EL-15+ $\text{flt}3$ +IL-2, з лігандом $\alpha\text{pha}11$ або без нього. На добу 6 культивування клітини збирали та досліджували стосовно NK-літичної активності на клітинах YAC-1 та EL4, як описано вище. Ми виявили, що клітини, культивовані у присутності ліганду $\alpha\text{pha}11$, мали найвищу літичну активність у цьому дослідженні, з підвищеною літичною активністю відносно клітин, культивованих у присутності інших цитокінів. Точніше, тимоцити DN, що росли з IL-15+ $\text{flt}3$ +IL-7, вбивали 18% клітин YAC-1 при E:T 24, при тому, що клітини, вирощені у присутності IL-15+ $\text{flt}3$ +IL-7 плюс ліганд $\alpha\text{pha}11$, вбивали 48% мішеней при такому ж E:T. DN-тимоцити, вирощені

у EL-15+IL-2, вбивали 15% мішеней YAC-1 при Е:Т 6, при тому, що клітини, вирощені з цими 3 цитокінами та лігандом α 11, вбивали 35% клітин YAC-1 при Е:Т 9. Проточну цитометрію проводили на культивованих клітинах за одну добу до дослідження NK-лізису. Як було встановлено для культури кісткового мозку, незважаючи на проліферативну дію ліганду α 11 (число клітин зростає приблизно у два рази, коли додають ліганд α 11), він не посилював помітно фракції $DX5^+$ -клітин (17-20% від усіх клітин у культурі з IL-7, та 35-46% від усіх клітин у культурах з IL-2). Ці дані означають, що ліганд α 11, у комбінації з IL-15 та IL-2, посилює літичну активність NK-клітин, створених з кісткового мозку або тимусу миші.

Д. Активність ліганду α 11 миші стосовно розвинених NK-клітин миші Для дослідження дії ліганду α 11 миші на розвинені NK-клітини, ми виділяли селезінки від 4-х мишей віком 5 тижнів C57Bl/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) та розминали їх скляними пластинками з замороженими кінцями для створення суспензії клітин. Червоні клітини крові видаляли гіпотонічним лізисом таким чином: клітини пелетували, а супернатант видаляли відсмоктуванням. Ми руйнували пелету обережним перемішуванням, додавали далі, збовтуючи, 900мкл стерилізованої води, а потім швидко (менше 5с) 100мкл $10\times$ HBSS (Gibco/BRL). Клітини далі ресуспендували у 10мл $1\times$ HBSS та обривки видаляли пропусканням клітин над нейлоновим меш-лінійчатим фільтром клітин (Falcon). Ці RBC-виснажені клітини селезінки далі пелетували та ресуспендували у буфері MACS (PBS+1% BSA+2мМ EDTA) та підраховували. Ми виявляли 300×10^6 клітин анти- $DX5$ -покритими магнітними кульками (Miltenyi Biotec) та позитивно відбирали $DX5^+$ -NK-клітини через сепараційну колонку MACS VS+ за інструкціями виробника, отримавши $8,4\times 10^6$ $DX5^+$ -клітини та 251×10^6 $DX5^+$ -клітин. Кожну з цих груп клітин культивували у 24-коміркових планшетах ($0,67\times 10^6$ клітин/комірку, 2 комірки на умови обробки) у середовищі RP10 (приклад 41А) поодиночі або з 1) 30нг/мл ліганду α 11 миші, 2) 30нг/мл рекомбінантного IL-2 миші (R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN), 3) 30нг/мл рекомбінантного IL-15 людини (R&D), 4) 30нг/мл кожного з ліганду α 11 миші та hIL-15, або 5) 30нг/мл кожного з mIL-2 та hIL-15. Клітини збирали через 21 годину, промивали та ресуспендували у середовищі RP10 і підраховували. Клітини далі досліджували на їх здатність лізувати ^{51}Cr -мічені цільові клітини YAC-1 або EL4, як описано у прикладі 41А.

Загалом, спостерігали низьку NK-активність від груп $DX5^+$ (HeNK-клітини), але клітини $DX5^+$, культивовані з лігандом α 11 та hIL-15 лізували 25% цільових клітин YAC-1 при Е:Т 82. Для порівняння, клітини $DX5^+$, культивовані з hIL-15 поодиночі, лізували 14% мішеней YAC-1 при Е:Т 110. Це означає, що ліганд α 11 та hIL-15 діють разом на залишкові NK-клітини NK1.1⁺ у цьому препараті клітин. Для препаратів клітин $DX5^+$, обробка лігандом α 11 миші поодиночі не збільшує помітно цю ефекторну функцію (лізис ними клітин YAC-1 був подібний до необробленої групи). Як очікували, обидва IL-2 та IL-15 помітно поліпшують NK-активність. Найвищий рівень лізису,

однак, детектували у групі, обробленій лігандом α 11 та hIL-15 (65% лізис клітин YAC-1 при Е:Т 3,3) у порівнянні з 45% лізису при Е:Т 4 для обробленої hIL-15 групи). Узяті разом, ці результати означають, що хоча ліганд α 11 поодиночі не може збільшувати лізисну активність NK-клітин, він посилює NK-лізисну активність розвинених NK-клітин при застосуванні з IL-15.

Приклад 42 Проліферація з лігандом α 11 людини та миші Т-клітин у дослідженні проліферації Т-клітин

А. Проліферація з лігандом α 11 миші Т-клітин

Т-клітини з мишей C57Bl/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) виділяли з об'єднаних спленоцитів та лімфоцитів з пахових, брахіальних, пахових, шийних та мезентеричних лімфатичних вузлів (LN). Селезінки розминали скляними пластинками з замороженими кінцями для створення суспензії клітин. LN роздирали на шматки пінцетом та пропускали через фільтр для клітин для видалення обривків. Об'єднані спленоцити та LN-клітини розділяли на підгрупи $CD8^+$ та $CD4^+$, використовуючи дві послідовні магнітні сепараційні колонки MACS за інструкціями виробника (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Непошкоджені тимоцити збирали з тих же мишей.

Клітини культивували у кількості 3×10^5 клітин/комірку (тимоцити) або 10^5 клітин/комірку (розвинені Т-клітини) зі збільшенням концентрацій очищеного ліганду α 11 миші (0-30нг/мл) (приклад 24 та приклад 29) у 96-коміркових планшетах з плоским дном, попередньо покритих протягом ночі при 4°C різними концентраціями анти- $CD3$ mAb 2C11 (PharMingen), протягом 3 діб при 37°C. Анти- $CD3$ антитіла сприяли активації Т-клітини миші через Т-клітинний рецептор. Кожну комірку пульсували з 1мкМ 3H -тимідину на добу 2 і планшети збирали та підраховували через 16 годин для оцінки проліферації.

Коли ми тестували ліганд α 11 у проліфераційному дослідженні Т-клітин, ми виявили, що він спів-стимулював анти- $CD3$ -активовані тимоцити миші, призводячи до прискореного вирощування $CD8^+CD4^-$ mTНН (більшість тимоцитів, культованих з анти- $CD3$ лігандом α 11 були $CD8^+CD4^-$ на добу 3 культивування, при тому що клітини, що культивували з анти- $CD3$ поодиночі не відхилялися помітно до цього фенотипу до доби 5). Ми не спостерігали значного рівня проліферації тимоцитів з лігандом α 11 при відсутності анти- $CD3$.

Цікаво, що коли ми досліджували розвинені периферійні Т-клітини миші на їх здатність реагувати на ліганд α 11+анти- $CD3$, ми виявили, що тільки підгрупа $CD8^+$, але не $CD4^+$, реагувала на ліганд α 11 у залежності від дози. Ми також спостерігали слабку, але відтворену проліферацію $CD8^+$ -клітин (але не $CD4^+$ -клітин) у реакції до ліганду α 11 поодиночі. Цікаво, що цього не спостерігали для Т-клітин людини (дивися приклад 42В, нижче).

В. Проліферація з лігандом α 11 людини Т-клітин

$CD4^+$ -Та $CD8^+$ -Т-клітини людини виділяли з PBMC як описано у прикладі 43 (нижче) Клітини

культивували при приблизно 10^5 клітин/комірку зі збільшенням концентрацій очищеного ліганду $\alpha 11$ людини (0-50нг/мл) (приклад 24) у 96-коміркових планшетах з плоским дном попередньо покритих протягом ночі при 4°C різними концентраціями анти-людини CD3 mAb UCHT1 (PharMingen) протягом 3 діб при 37°C . Кожну комірку пульсували $1\text{мкКі } ^3\text{H-тимідину}$ на добу 2 і планшети збирали та підраховували через 16 годин. На відміну від наших результатів з Т-клітинами миші, Наші попередні дані означають, що ліганд $\alpha 11$ людини спів-стимулює CD4^+ , але не CD8^+ , Т-клітини людини у залежності від дози.

Приклад 43 PCR в реальному часі виявляє експресію ліганду $\alpha 11$ у CD4^+ -клітинах людини

А. Очищені Т-клітини людини як первинне джерело, використане для визначення експресії $\alpha 11$ ліганду людини

Суцільну кров (150мл) збирали зі здорової людини-донору та змішували 1:1 з PBS у конічних тубах по 50мл. Тридцять мл розбавленої кров далі покривали 15мл Ficoll Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech. Uppsala, Sweden). Це центрифугували з градієнтом 30 хвилин при 500g та дозволяли зупинитися без гальмування. RBC-виснажені клітини на поверхні розділу (PBMC) збирали та промивали тричі PBS. Виділений вихід PBMC людини складав 200×10^6 до описаної нижче селекції.

PBMC суспендували у 1,5мл буферу MACS (PBS, 0,5% EDTA, 2мМ EDTA) та 3×10^6 клітин засівали окремо для контролю РНК та проточної цитометрії. Ми далі додавали 0,25мл CD8-мікрокульок проти людини (Miltenyi Biotec) та суміш інкубували протягом 15 хвилин при 4°C . Ці клітини, мічені CD8-кульками , промивали 30мл буферу MACS, а потім ресуспендували у 2мл буферу MACS.

VS+-колонку (Miltenyi) виготовляли за інструкціями виробника. VS+-колонку розміщали далі у магнітному полі VarioMACS (Miltenyi). Колонку урівноважували 5мл буферу MACS. Виділені первинні клітини миші далі переносили до колонки. Негативним клітинам CD3 давали пройти крізь колонку. Колонку промивали 9мл ($3 \times 3\text{мл}$) буферу MACS. Колонку далі видаляли з магнітного поля та засівали на 15мл туби Фалькона. CD8^+ -клітини елюювали додаванням до колонки 5мл буферу MACS та зв'язані клітини виштовхували, використовуючи забезпечений виробником шток. Вихід CD8^+ -відібраних периферійних Т-клітин людини був приблизно усього 51×10^6 клітин. CD3-негативні клітини, що пройшли крізь колонку, збирали, підраховували, виявляли покритими кульками CD4 проти людини, далі інкубували та пропускали крізь нову VS+-колонку при тих же концентраціях, як описано вище. Вихід CD4^+ -відібраних людини периферійних Т-клітин людини був усього 42×10^6 клітин.

Зразок кожних з CD8^+ - та CD4^+ -відібраних людини Т-клітини видаляли для виявлення та сортування на сортувальнику активованих флуоресценцією клітин (FACS) для оцінки їх чистоти. РЕ-сполучене антитіло проти людини CD4 , CD8-FITC

Ab проти людини, та CD19-CyChrome Ab проти людини (усі від PharMingen) використовували для виявлення CD8^+ - та CD4^+ -відібраних клітини. CD8-відібрані клітини у цьому першому експерименті були на 80% CD8^+ , а CD4-відібрані клітини - на 85% CD4^+ . У 2 наступних експериментах (приклад 43B), CD8^+ -очищені клітини мали чистоту 84% та 81%, а CD4^+ -клітини мали чистоту 85% та 97%, відповідно. У одному експерименті ми виявляли покритими кульками CD19 (Miltenyi) проти людини незв'язуючі клітини (що пройшли крізь колонку) та пропустили їх через третю колонку з магнітними кульками для виділення CD19^+ -В-клітин (які мали чистоту 92%).

CD8^+ , CD4^+ та CD19^+ -відібрані клітини людини активували інкубуванням $0,5 \times 10^6$ клітин/мл у RPMI+5% ультрасироватки людини (Gemini Byproducts, Calabasas, CA)+PMA 10нг/мл та іономіцин 0,5мкг/мл (Calbiochem) протягом приблизно 4, 16, або 24 годин при 37°C . Т-клітини ($2,5 \times 10^6$ /комірку) були альтернативно стимульовані у 24-коміркових планшетах попередньо покритих протягом ночі 0,5мкг/мл приєднаного до планшету анти- CD3 mAb LJCHT1 (PharMingen) з розчинним анти- CD28 mAb (PharMingen) при 5мкг/мл, або без нього. У кожний момент часу клітини збирали, пелетували, промивали одноразово PBS, та пелетували знов, супернатант видаляли та пелети різко-заморожували у бані з сухим льодом/етанолом, далі зберігали при -80°C для виготовлення РНК пізніше.

PCR в реальному часі проводили на цих CD8^+ , CD4^+ та CD19^+ -відібраних клітинах людини як описано у прикладах 43B та 43C нижче для визначення експресії ліганду та рецептору $\alpha 11$ людини.

В. Праймери та зонди для кількісної RT-PCR для експресії ліганду $\alpha 11$ людини

Кількісну RT-PCR в реальному часі з використанням системи детектування послідовності ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems, Inc, Foster City, CA) попередньо описано [дивися, Held, CA et al, Genome Research 6: 986-994, 1996; Gibson, UEM et al., Genome Research 6: 995-1001, 1996; та Sundaresan, S et al., Endocrinology 139: 4756-4764, 1998]. Цей спосіб включає використання ген-специфічного зонду, що містить обидва репортерні та гасильні барвники. Коли зонд є непошкодженим репортерним барвником, емісія відсутня внаслідок близькості гасильного барвнику. Протягом PCR з використанням додаткових ген-специфічних прямого та зворотного праймерів зонд розщеплюється 5'-нуклеазною активністю полімерази Taq, яка вивільняє репортерний барвник, призводячи до зростання флуоресцентної емісії.

Праймери та зонди, використані для аналізів кількісною RT-PCR в реальному часі, конструювали, використовуючи програму конструювання праймеру Primer Express™ (PE Applied Biosystems). Праймери для ліганду $\alpha 11$ людини конструювали, стягуючи стик інтрон-екзон для виключення ампліфікації геномної ДНК. Прямий праймер, ZC22,281 (SEQ ID NO: 90) та зворотний праймер, ZC22,279 (SEQ ID NO: 91) використовували обидва при концентрації 300нМ для синтезу продукту розміром 80 по. Відповідний зонд ліганду

zalpha11, TaqMan, ZG32 (SEQ ID NO: 92) синтезували засобом РН Applied Biosystems. Зонд був міченим репортерним флуоресцентним барвником (6-карбоксі-флуоресцеїн) (FAM) (PE Applied Biosystems) на 5'-закінченні та гасильним флуоресцентним барвником (6-карбоксі-тетраметил-родамін) (TAMRA) (PE Applied Biosystems) на 3'-закінченні. Для тестування цілісності чи якості усіх зразків РНК, їх скринували на рРНК, використовуючи комплект праймеру та зонду від PL Applied Biosystems (№4304483). Репортерний флуоресцентний барвник для цього зонду - це VIC (PE Applied Biosystems). Утворена рРНК дозволить нормалізацію результатів для ліганду zalpha11.

РНК виготовили з пелет, отриманих у прикладі 43A, використовуючи комплект RNeasy Miniprep™ (Qiagen, Valencia, CA) за інструкціями виробника. Контрольну РНК виготовили з приблизно 10 мільйонів клітин BHK, що експресують ліганд zalpha11 людини.

С. Праймери та зонди для кількісної RT-PCR для експресії рецептору zalpha11 zalpha11

RT-PCR в реальному часі проводили для визначення експресії рецептору zalpha11, як у прикладі 43B та прикладі 43D, використовуючи клітини, виготовлені в умовах, деталізованих у прикладі 43A, та зонди, специфічні стосовно рецепторів zalpha11. Прямий праймер, ZC22,277 (SEQ ID NO: 93) та зворотний праймер, ZC22,276 (SEQ ID NO: 94) використовували у реакції PCR (вище) при концентрації приблизно 300нМ для синтезу продукту розміром 143 по. Відповідний зонд zalpha11 TaqMan®, позначений ZG31 (SEQ ID NO: 95) синтезували та мітили засобом PE Applied Biosystems. РНК з клітин BaF3, що експресують рецептор zalpha11 людини, використовували для створення прийняттого контролю для стандартних кривих для PCR в реальному часі, що описано у прикладі 43D нижче.

Д. Кількісна RT-PCR в реальному часі

Відносні рівні ліганду zalpha11 РНК визначали аналізом зразків загальної РНК, використовуючи спосіб одностадійної RT-PCR (PE Applied Biosystems). РНК з клітин BHK, що експресують ліганд zalpha11 людини, використовували для створення стандартної кривої. Криву складали з серійних розбавлень в межах $2,5\text{--}2,5 \times 10^{-4}$ нг для випробування рРНК та $25\text{--}0,0025$ нг для випробування ліганду zalpha11 з кожної точки, аналізованої у потроєнні. Зразки загальної РНК також аналізували у потроєнні для рівнів транскрипту ліганду zalpha11 людини та для рівнів рРНК як ендогенного контролю. Кожна одностадійна реакційна суміш RT-PCR складалася з 25нг загальної РНК у буфері А (50мМ KCL, 10мМ Трис-HCl, та внутрішнього стандартного барвника, ROX (PE Applied Biosystems)), прийнятих праймерів (50нМ для зразків рРНК, 300 нМ для зразків ліганду zalpha11) та зонду (50нМ для рРНК, 100 нМ для ліганду zalpha11), 5,5мМ MgCl₂, по 300мкМ кожного з d-CTP, d-ATP, та d-GTP, та 600мкМ d-UTP, зворотної транскриптази (0,25од/мкл), полімерази ДНК AmpliTaq (0,025од/мкл) та інгібітору рибонуклеази (0,4од/мкл у загальному об'ємі 25мкл. Умови термічного циклування складалися з етапу RT при 48°C протягом 30 хвилин, етапу активації AmpliTaq

Gold при 95°C протягом 10 хвилин, з наступними 40 циклами ампліфікації протягом 15 с при 95°C та 1 хвилиною при 60°C. Відносні рівні РНК ліганду zalpha11 визначали за стандартною кривою способом, що описано у User Bulletin №2 (PE Biosystems; User Bulletin №2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, December 11, 1997), використовуючи виміри рРНК для нормалізації рівнів ліганду zalpha11. Зразки порівнювали відносно калібратору в межах кожного експерименту. Калібратор довільно вибрали на основі гарної якості РНК та рівня експресії, з яким інші зразки можна було б порядно порівнювати. Результати експериментів з аналізом експресії ліганду zalpha11 та рецептору zalpha11 у стимульованих та нестимульованих клітинах (приклад 43A) описано у прикладі 43E нижче.

Е. Експресія рецептору та ліганду zalpha11 людини у CD4⁺, CD8⁺ та CD19⁺-клітинах

Перший експеримент використовував описану вище RT-PCR для визначення експресії рецептору zalpha11 у нестимульованих та анти-CD3-стимульованих CD4⁺- та CD8⁺-зразках у моменти часу 0 годин (нестимульовані ("спочиваючі") клітини), та через 4 години, 15,5 годин та 24 години після стимуляції. Спочиваючий CD4⁺-зразок був довільно вибраний як калібратор та отримав величину 1,00. Збільшення було приблизно у 4 рази при експресії рецептору у нестимульованих CD4⁺-клітинах з 4 годин до 24 годин культивування та приблизно збільшення у 8 разів в той же період часу у анти-CD3-стимульованих CD4⁺-клітинах. CD8⁺-клітини виявили збільшення у сім разів при експресії рецептору zalpha11, що досягало максимуму на 4 годину та зменшувалося у додатковий час. З анти-CD3-стимуляцією CD8⁺-клітини мали постійне збільшення у вісім разів при експресії рецептору.

Цей перший експеримент використовував також RT-PCR для визначення експресії ліганду zalpha11 у тих же анти-CD3-стимульованих та нестимульованих CD4⁺- та CD8⁺-зразках. 4-годинний анти-CD3-стимульований CD8⁺-зразок був довільно вибраним як калібратор та отримав величину 1,00. Результати свідчать, що нестимульовані CD4⁺- та CD8⁺-клітини не експресують ліганду zalpha11. Ми спостерігали значне підвищення експресії у анти-CD3-стимульованих CD4⁺-клітинах на 4-й годині зі збільшенням приблизно у 300 разів сигналу, спостереженого на 15,5 годині. CD8⁺-клітини експресували невелику кількість ліганду при анти-CD3-стимуляції, однак це ймовірно обумовлено забрудненням CD8⁺-популяції невеликим числом CD4⁺-клітин.

Другий експеримент використовував RT-PCR для визначення експресії рецептору zalpha11 у анти-CD3-стимульованих, РМА+іономіцин-стимульованих та нестимульованих CD4⁺- та CD8⁺-зразках у моменти часу 0 годин, 3,5 години, 16 годин та 24 годин після активації. Спочиваючий CD8⁺-зразок було довільно вибрано як калібратор та надано величину 1,00. Спочиваючі CD4⁺- та CD8⁺-клітини не мали значної кількості експресії рецептору. Експресія була приблизно у три рази вище у РМА+іономіцин-стимульованих CD4⁺-

зразках у 3,5 години, 16 годин та 24 годин після стимуляції. Експресія у анти-CD3 активованих CD4⁺-клітинах досягала величини у 10 разів вище фону на 3,5 годину після стимуляції, далі падала назад до рівня у 4 рази вище фону на 16 годину після стимуляції. CD8⁺-клітини виявляли збільшення експресії у 4 рази на 3,5 годину після стимуляції PMA+іономіцин, зі зменшенням експресії у наступні моменти часу. Як у першому експерименті, анти-CD3-стимульовані CD8⁺-клітини знов виявили індукцію експресії рецептору у вісім разів вище фону.

Ці зразки з другого експерименту також використовували для визначення експресії ліганду α 11. 24-годинний стимульований PMA+іономіцин CD4⁺-зразок було довільно вибрано як калібратор та йому надано величину 1,00. Результати свідчать, що знов жодні з нестимульованих клітин не експресували ліганд α 11. Спостерігали приблизно 30-разову індукцію експресії ліганду у CD4⁺-клітинах, стимульованих анти-CD3 на 3,5 годину, як спостерігали і у попередньому експерименті (на 4 годину). Однак, індукція зі стимуляцією PMA+іономіцин була тільки приблизно 5-разовою на 3,5 годину, що падала у наступні моменти часу. Знов, CD8⁺-клітини експресували дуже невелику кількість ліганду, що ймовірно було викликано забрудненням CD4⁺-клітинами.

Кінцеві експерименти використовували RT-PCR для визначення експресії рецептору α 11 у анти-CD3- та анти-CD3/анти-CD28-стимульованих та нестимульованих CD4⁺-та CD8⁺-зразках у моменти часу 0 годин, 2 години, 4 години, та 16 годин після стимуляції.

CD19⁺-клітини, активовані PMA+іономіцин, також скринували на експресію рецептору на тих же інтервалах часу. Спочиваючий CD4⁺-зразок було довільно вибрано як калібратор та йому надано величину 1,00. 2-годинні анти-CD3-стимульовані CD4⁺-клітини мали тільки 4-разову індукцію рецептору, порівняно з 10-разовою індукцією, що спостерігали на 3,5 годину у попередньому експерименті. Комбінація анти-CD3 та анти-CD28 збільшувала експресію рецептору α 11 до восьми разів вище фону. 16-годинні стимульовані анти-CD3/анти-CD28 CD8⁺-клітини мали дуже низькі рівні експресії рецептору α 11, як це спостерігали у CD8⁺-клітинах у попередніх експериментах (вище). CD19⁺-клітини, стимульовані PMA+іономіцин, мали набагато сильнішу експресію рецептору α 11 зі збільшенням у 19 разів на 2 годину, але рівні експресії зменшувалися до рівнів спочиваючих клітин на 16 годину.

Ці зразки з кінцевого експерименту використовували також для визначення ліганду α 11 засобом RT-PCR. 16 годинний стимульований анти-CD3/анти-CD28 CD8⁺-зразок було довільно вибрано як калібратор та йому надано величину 1,00. Результати свідчать, що на 2 годину CD4⁺-клітини мали приблизно дворазову індукцію експресії ліганду α 11 зі стимуляцією анти-CD3 та 5-разову індукцію зі стимуляцією анти-CD3 плюс анти-CD28. Ці умови стимуляції індукували експресію ліганду протягом часу, з 16-годинними стимульованими CD4⁺-клітинами, виявляючи рівні експресії ліганду у 70 разів вище фону. CD8⁺-та

CD19⁺-клітини не виявляли експресії ліганду α 11.

Деяку кількість варіацій очікували між відборами крові (тобто множинності зразків у різні моменти часу від одного пацієнта та від багатьох пацієнтів). Відтак, хід даних аналізували у кожному дослідженні або від одного зразку крові і три вищезазначені експерименти порівнювали для загальних висновків. Хід описаних вище експериментів з PCR в реальному часі полягає в тому, що з усіх типів тестованих клітин, CD19⁺-В-клітини, активовані PMA+іономіцином, експресували найвищий рівні РНК рецептору α 11. CD4⁺-та CD8⁺-клітини можна також стимулювати для експресії рецептор, але при нижчому рівні, ніж у В-клітинах. Ліганд α 11 був експресованим майже виключно у стимульованих CD4⁺-Т-клітинах (та ні CD8⁺-Т-клітинами або CD19⁺-В-клітинами). Хоча стимуляція PMA+іономіцином індукує гарний сигнал ліганду α 11 у цьому дослідженні, помітно вищий сигнал отримували від CD4⁺-Т-клітин, стимульованих aHra-CD3 mAb або комбінацією анти-CD3 та анти-CD28 mAb, умовах, що краще імітують зіткнення антигенів *in vivo*.

Приклад 44 Залежна від ліганду α 11 проліферація В-клітинних клітин, стимульованих анти-CD40 або анти-IgM

А. Очистка В-клітин людини

Склянку, що містить 1×10^8 заморожених, попередньо вилучених з крові людини периферійних мононуклеарних клітин крові (PBMC), швидко розтоплювали при 37°C на водяній бані та ресуспендували у 25мл середовища В-клітин (середовище RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 10% інактивованої нагріванням сироватки зародка теляти, 5% L-глутаміну, 5% Pen/Strep) (Gibco BRL)) у тубах на 50мл (Falcon VWR, Seattle, WA). Клітини тестували на життєздатність, використовуючи трипан-блакитний (Gibco BRL). Десять мілілітрів Ficoll/Hypaque Plus (Pharmacia LKB Biotechnology Inc, Piscataway, NJ) нашаровували під суспензією клітин та центрифугували протягом 30 хвилин при 1800оберт/хвил і зупиняли гальмуванням. Поверхню розділу далі видаляли та переносили у нові 50мл туби Фалькона, доводили до кінцевого об'єму 40мл PBS, та центрифугували протягом 10 хвилин при 1200оберт/хвил і зупиняли гальмуванням. Життєздатність виділених клітин знов тестували, використовуючи трипан-блакитний. Альтернативно, свіжу відібрану від людини кров розбавляли 1:1 PBS (Gibco BRL) та нашаровували над Ficoll/Hypaque Plus (Pharmacia), перемішували та промивали як вище. Клітини, виділені зі свіжого або замороженого джерела давали еквіваленти результати.

В-клітини очищали від флотованих у Ficoll клітин периферійної крові нормальної людини-донора (вище) магнітними анти-CD 19-кульками (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) за інструкціями виробника. Чистоту утворених препаратів контролювали проточною цито-метрією з анти-CD22 FITC Ab (Pharmingen, SanDiego, CA). Препарати В-клітин мали звичайно чистоту більше 90%.

В. Очистка В-клітин миші

Суспензію спленоцитів миші виготовляли роздиранням селезінки дорослої миші C57B1/6

(Charles River Laboratories, Wilmington, MA) на шматки зігнутими голками у середовищі В-клітин. RBC видаляли піпотонічним лізисом. CD43-позитивні клітини видаляли магнітними CD43-кульками (Miltenyi Biotec) за інструкціями виробника. Чистоту утворених препаратів контролювали проточною цитометрією з анти-CD45R FITC Ab (Pharmingen). Препарати В-клітин мали звичайно чистоту більше 90%.

С. Проліферація анти-CD40-стимульованих В-клітин у присутності ліганду α 11 людини або миші

В-клітини від людини або миші ресуспендували при кінцевій концентрації 1×10^6 клітин/мл у середовищі В-клітин та засівали при 100 мкл/комірку у 96-комірковий планшет з U-подібним дном (Falcon, VWR), що мав різні умови стимуляції, доводячи кінцевий об'єм до 200 мкл/комірку. Для анти-CD40-стимуляції культури людини були доповнені 1 мкг/мл CD40 проти людини (Genzyme, Cambridge, MA), а культури миші були доповнені 1 мкг/мл CD40 проти миші (Serotec, UK). Ліганд α 11 людини або миші додавали при розбавленнях в межах 1 пг/мл-100 нг/мл. Специфічність впливу ліганду α 11 підтверджували інгібуванням ліганду α 11 25 мкг/мл розчинного α 11 CEE людини (приклад 10А). Усі обробки проводили у потроєнні. Клітини далі інкубували при 37°C у зволоженому інкубаторі протягом 120 годин (людини) або 72 годин (миші). За 16 годин до збору, 1 мкКи ^3H -тимідину (Amersham, Piscataway, NJ) додавали до цих комірок для визначення, чи проліферували В-клітини. Клітини збирали у 96-комірковий фільтрувальний планшет (UniFilter GF/C, Packard, Meriden, CT), використовуючи збирач клітин (Packard) та збирали за інструкціями виробника. Планшети сушили при 55°C протягом 20-30 хвилин та дно комірок ущільнювали непрозорим ущільнювачем планшета. До кожної комірки додавали 0,25 мл сцинтиляційної рідини (Mkroscint-0, Packard) та зчитували планшет, використовуючи сцинтиляційний лічильник TopCount Mkroplate Scintillation Counter (Packard).

Інкубація з лігандом α 11 при концентраціях 3 нг/мл або більше посилювала проліферацію, індуковану розчинним анти-CD40 залежно від дози для В-клітин миші та людини більше, ніж у 30 разів. В-клітини миші та людини реагували однаково на відповідний ним ліганд α 11. Для обох видів стимуляція була специфічною до ліганду α 11, оскільки її реверсувала наявність розчинного рецептору α 11 у культурі.

Д. Проліферація анти-IgM-стимульованих В-клітин у присутності ліганду α 11 людини або миші

В-клітини від людини або миші, як описано вище (приклад 44А та приклад 44В), засівали як описано вище (приклад 44С). Для анти-IgM-стимуляції клітин людини планшети попередньо покривали протягом ночі 10 мкг/мл F(ab')_2 IgM Ab проти людини (Southern Biotech Associates, Birmingham, Alabama) та промивали стерильним середовищем безпосередньо перед для використання. Культури були доповнені 0-10 нг/мл hIL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Для анти-IgM-стимуляції клітин миші розчинний анти-IgM

(Biosource, Camarillo, CA) додавали до культури при 10 мкг/мл. До кожної з попередніх умов анти-IgM/IL-4 додавали ліганд α 11 людини або миші при розбавленнях в межах 1 пг/мл-100 нг/мл, як описано вище. Специфічність впливу ліганду α 11 підтверджували інгібуванням розчином рецептору α 11 людини як описано вище (приклад 44С). Усі обробки проводили у потроєнні. Клітини інкубували, мітили ^3H -тимідином, збирали та аналізували, як описано у прикладі 44С.

Інкубація з лігандом α 11 при концентраціях 0,3 нг/мл або більше інгібувала проліферацію, індуковану нерозчинним анти-IgM (миші) або анти-IgM та IL-4 (людини) залежно від дози. Це інгібування було специфічним стосовно ліганду α 11, оскільки її реверсувала наявність розчинного рецептору α 11 у культурі

Приклад 45 Експресія розчинного рецептору α 11 людини у *E. coli*

А. Конструювання експресійного вектору pCZR225, що експресує конденсований поліпептид $\text{h}\alpha$ 11/MBP-6H

Експресійну плазмиду, що містить полінуклеотид, який кодує розчинний рецептор α 11 людини, конденсований С-термінально стосовно зв'язуючого мальтозу білку (MBP), конструювали гомологічною рекомбінацією. Фрагмент кДНК α 11 людини (SEQ ID NO: 7) виділяли, використовуючи PCR. Полінуклеотидна послідовність конденсованого поліпептиду розчинного рецептору MBP- α 11 показана послідовністю SEQ ID NO: 96. Два праймери використовували у продукування фрагменту α 11 людини у реакції PCR: (1) праймер ZC20,187 (SEQ ID NO: 98), що містить 40 по векторної фланкуючої послідовності та 25 по, відповідних аміно-закінченню α 11 людини, та (2) праймер ZC20J85 (SEQ ID NO: 99), що містить 40 по 3'-закінченню, відповідних фланкуючій послідовності вектору, та 25 по, відповідних карбокси-закінченню α 11 людини. Умови реакції PCR були такими: 25 циклів при 94°C протягом 30с, 50°C протягом 30с, та 72°C протягом 1 хвилини; з наступним просочуванням при 4°C, проводили з дублюванням. Два мкл зі 100 мкл реакційної суміші PCR проганяли на 1,0% гелі агарози з буфером 1 x TBE для аналізу, та спостерігали очікуваний фрагмент розміром приблизно 660 по. Залишкові 90 мкл реакційної суміші RT-PCR комбінували з другою PCR-тубою, осадженою 400 мкл абсолютного етанолу. Осадженому ДНК використовували для рекомбінації у розрізаний реципієнтний вектор Smal pTAP98 (приклад 31) для продукування констракту, що кодує конденсат MBP- α 11. Клони трансформували, ідентифікували та вирощували як описано у прикладі 31. Позитивні клони позначали pCZR225 та піддавали секвенсуванню. Полінуклеотидна послідовність для конденсованого поліпептиду розчинного рецептору MBP- α 11 показана послідовністю SEQ ID NO: 96, а відповідна поліпептидна послідовність показана послідовністю SEQ ID NO: 97. Позитивні клони використовували до вирощування у *E. coli*, як описано у прикладі 34 для білкової очистки конденсованого білку $\text{h}\alpha$ 11/MBP-6H (приклад 46, нижче).

Приклад 46 Очистка розчинного рецептору huzalpha11/MBP-6H з ферментованої *E. coli*

Поки не сказано інше, усі операції проводили при 4°C. Використовували такі способи очистки поліпептиду розчинного рецептору huzalpha11/MBP-6H. Клітини *E. coli*, що містять констракт pCZR225 та експресують розчинний рецептор huzalpha11/MBP-6H (приклад 45) вирощували у відварі SuperBroth II (12г/л казеїну, 24г/л екстракту дріжджів, 11,4г/л ди-калію фосфату, 1,7г/л моно-калію фосфату; Becton Dickenson, Cockeysville, MD). та заморожували у 0,5% гліцерині. Двадцять грам заморожених клітин у відварі SuperBroth II+гліцерин використовували для очистки білку. Заморожені клітини розтоплювали та розбавляли 1:10 у розчині інгібітору протеази (буфер для екстракції) перед лізуванням клітин та вивільненням білку розчинного рецептору huzalpha11/MBP-6H. Розбавлені клітини, що містять кінцеву концентрацію 20мМ Трис (JT Baker, Philipsburg, NJ), 100мМ хлориду натрію (NaCl Mallinkrodt, Paris, KY), 0,5мМ фенілметилсульфонілфлюориду (PMSF, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), 2мкг/мл лейпептину (Fluka, Switzerland), та 2мкг/мл апротиніну (Sigma). Для лізування клітин використовували систему руйнування клітин French Press (Constant Systems Ltd, Warwick, UK) з температурою -7-10°C та 30К. PSI. Розбавлені клітини перевіряли на подрібнення за даними A_{600} до та після обробки на French Press. Лізовані клітини центрифугували при 18000g протягом 45 хвилин для видалення обривків зруйнованих клітин, та використовували супернатант для очистки білку. Загальні концентрації цільового білку у супернатанті визначали за допомогою дослідження BCA- білку (Pierce, Rockford, EL), за інструкціями виробника.

Колонку з 25мл смоли Talon Metal Affinity (Clontech, Palo Alto, CA) (виготовлену як описано нижче) виливали у скляну колонку Bio-Rad, 2,5см діаметром×10см висоти. Колонку упаковували та урівноважували дією сили тяжіння 10 об'ємами колонки (CV) буферу Talon Equilibration (20мМ Трис, 100мМ NaCl, pH 8,0). Супернатант завантажували партіями до смоли Talon metal affinity та збовтували протягом ночі. Смоли виливали назад у колонку та промивали 10 CV урівноважувального буферу дією сили тяжіння, далі дією сили тяжіння елюювали 140мл буферу для елюювання (буфер Talon Equilibration+200мМ Imidazole-Fluka Chemical). Колонку зі смолою talon очищали 5 CV 20мМ 2-(N-морфоліно)етансульфоновою кислотою з pH 5,0 (MES, Sigma), 5 CV дистильованої води, а далі зберігали у 20% етанолі/0,1% азиді натрію. Чотирнадцять мл фракції збирали протягом повної елювальної хроматографії та поглинання фракцій зчитували при 280 та 320нм і дослідженні білку BCA; пропускали та об'єднані промивки також залишали та аналізували. Потрібні фракції елюції білку об'єднували та завантажували нерозбавленими до амілозної смоли (New England Biolabs, Beverly, MA).

Для отримання чистішого поліпептиду huzalpha11/MBP-6H, афінно елюювані зі смоли talon об'єднані фракції піддавали дії амілозної смоли (22мл) при pH 7,4. Колонку Bio-Rad, 2,5см

діаметром×10см висоти виливали, упаковували та урівноважували у 10 CV амілозного урівноважувального буферу-20мМ Трис (JT Baker), 100мМ NaCl (Mallinkrodt). 1мМ PMSF (Sigma), 10мМ β-меркаптоетанол (BME, ICN Biomedicals Inc. Aurora, OH) pH 7,4. Зразок завантажували дією сили тяжіння при швидкості потоку 0,5мл/хвилину. Колонку промивали 10 CV амілозного урівноважувального буферу, далі елюювали приблизно 2 CV амілозного урівноважувального буферу+10мМ мальтоза (Fluka Biochemical, Switzerland) дією сили тяжіння. Фракції по 5мл збирали протягом усієї хроматографії та зчитували поглинання при 280 та 320нм. Амілозну колонку регенерували 1 CV дистильованої води, 5 CV 0,1% (за масою/об'ємом) SDS (Sigma), 5 CV дистильованої води, а потім 5 CV амілозного урівноважувального буферу.

Потрібні фракції об'єднували та діалізували у діалізаторі Slide-A-Lyzer (Pierce) 4 x 4L PBS pH 7,4 (Sigma) для видалення забруднень низької молекулярної маси, буфер замінювали та обезсолювали. Після заміни PBS, зібраний матеріал репрезентував очищений поліпептид huzalpha11/MBP-6H. Очищений поліпептид huzalpha11/MBP-6H аналізували виявленням за допомогою SDS-PAGE Coomassie та Вестерн-блотингом з анти-кролячим HRP-сполученим антитілом (Rockland, Gilbertsville, PA). Концентрація поліпептиду huzalpha11/MBP-6H складала 1,92мг/мл, як визначено аналізом BCA.

Очищений поліпептид huzalpha11/MBP-6H виготовляли для ін'єкцій кролям та відсилали до R & R Research та Development (Stanwood, WA) для продукування антитіл. Кролів ін'єктували для продукування сироватки проти анти-huzalpha11/MBP-6H (приклад 47, нижче).

Приклад 47 Поліклональні антитіла рецептору zalpha11

Поліклональні антитіла виготовляли імунізацією двох самиць New Zealand білих кролів очищеним поліпептидом huzalpha11/MBP-6H (приклад 46), або очищеним рекомбінантним розчинним рецептором zalpha11CEE (приклад 10A). Відповідні поліклональні антитіла позначали як кролячі анти-huzalpha11/MBP-6H та кролячі анти-huzalpha11-CEE-ВНК відповідно. Кожного з кролів спочатку ін'єктували інтраперитонеально (IP) 200мг очищеного білку у повному ад'юванті Фрейнда (Pierce, Rockford, IL) з наступними інтраперитонеальними допоміжними ін'єкціями 100мг очищеного білку у неповному ад'юванті Фрейнда кожні три тижні. Через сім-десять діб після введення третьої допоміжної ін'єкції у тварин відбирали кров та збирали сироватку. Кролів далі допоміжно ін'єктували та відбирали у них кров кожні три тижні.

Zalpha11-специфічні поліклональні антитіла афінно очищали від кролячої сироватки, використовуючи білкову колонку CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), яку виготовляли, використовуючи 10мг очищеного поліпептиду huzalpha11/MBP-6H (приклад 32) на грам CNBr-SEPHAROSE, з наступним 20 x діалізом у PBS протягом ночі. Zalpha11-специфічні антитіла характеризували перевіркою титру ELISA, використовуючи 1мг/мл прийнятного білкового антигену як мішень антитіла. Нижчою межею визначення (LLD) кролячого анти-

huzalpha11/MBP-6H афінно очищеного антитіла є розбавлення 500пг/мл. LLD кролячого анти-huzalpha11-CEE-BHK афінно очищеного антитіла є розбавлення 50пг/мл.

Приклад 48 Розподіл рецептору zalpha11

Для визначення розподілу рецептору zalpha11 на різних типах клітин, ми створювали кролячі поліклональні та мишачі моноклональні антитіла (mAb), спрямовані проти рецептору людини (приклад 35 та приклад 47), і сполучали ці антитіла з біотином для використання у проточній цитометрії. Ми спочатку використовували поліклональні антитіла, які мали відносно низьку спорідненість, для виявлення панелі ліній клітин: IL-3-залежних ліній клітин-попередників В-клітин миші дикого типу BaF3 [Palacios та Steinmetz, вище; Mathey-Prevot et al., вище]; клітин BaF3, трансфектованих zalpha11 людини (приклад 4); лінії клітин Раджі (ATCC №CCL-86), RAMOS (Ramos, ATCC №CRL-1596), RPMI 8226 (ATCC №CCL-155), та Дауді (ATCC №CCL-213) лімфоми Буркітта людини; лінії лейкемічних клітин Джурката Т-клітин людини (ATCC №TIB-152); лінії клітин мієломоноцитної лейкемії людини Thp-1 (ATCC №TIB-202) та UT937 (ATCC №CRL-1593,2); промієломоноцитних клітин людини HLT60 (ATCC №CCL-240); лінії клітин лімфоми В-клітин миші A20 (ATCC No TIB-208); та лінії клітин тимоми миші EL4 (ATCC №TIB-39).

Клітини збирали, промивали одноразово промивочним буфером FACS з сироваткою (WBS). WBS складалася зі збалансованого сольового розчину Ханка (Gibco/BRL)+10мМ Гепес (Gibco/BRL)+1% BSA (Sigma)+10% нормальної козячої сироватки (Gemini Біопродукти, Woodland, CA)+10% нормальної кролячої сироватки (Sigma). Промивочний буфер (WB) був ідентичним WBS за винятком того, що він був позбавлений сироватки. Після промивки клітини ресуспендували у 100мкл WB, що містили 10мкг/мл кролячих анти-zalpha11 поліклональних антитіл (приклад 47). Клітини тримали на льоді з Ab протягом 20 хвилин, далі промивали WB та ресуспендували у WB, що містив козячий анти-кролячий-FITC (Biosource, International), інкубували ще 20 хвилин на льоді, далі промивали та ресуспендували у 400мкл WB для аналізу на проточному цитометр FACSCalibur (Becton Dickinson). Контрольні зразки виявляли тільки вторинним козячим анти-кролячим-FITC Ab. Позитивне виявлення визначали як підвищення відносно виявлення тільки вторинним. Хоча поліклональні антитіла мали низьку спорідненість, ми упевнено детектували експресію zalpha11 на трансфектантах BaF3/zalpha11 на Т-клітинах всіх чотирьох лімфом Буркітта людини (Раджі, RAMOS, Дауді, та RPMI 8226), та Джурката. Спочиваючі (недиференційовані) HL-60 клітини не приєднувалися до антитіл проти zalpha11, але ми виявляли позитивний сигнал на HL-60 клітинах, активованих протягом 24 годин PMA (Calbiochem, La Jolla, CA), який індукує диференціацію клітин HL-60 у моноцито-подібні клітини. Ми також спостерігали позитивний сигнал на клітинах UT937 та Thp-1, хоча цей сигнал може бути обумовленим неспецифічним приєднанням. Поліклональні антитіла слабо крос-реагували на лінію В-клітин миші A20, але ми не спостерігали виявлення тимоми миші EL4.

Чотири моноклональних антитіла проти zalpha11 (приклад 35) сполучали з біотином та скринували підгрупу описаних вище для експресії рецептору zalpha11 клітин (BaF3, BaF3/zalpha11, Раджі, Джурката, та спочиваючих HL-60). Клітини збирали, промивали, далі ресуспендували у 100мкл WB, що містив 15мкг/мл одного з кожних 4 біотинілованих mAb. Клітини інкубували з mAb протягом 20 хвилин на льоді, далі промивали 1,5мл WB та пелетували у центрифугі. Супернатант видаляли відсмоктуванням та пелети ресуспендували у 100мкл CyChrome-сполученого стрептавідину (CyC-SA; PharMingen), далі інкубували на льоді ще 20 хвилин та промивали та пелетували як перед цим. Контрольні туби містили клітини, виявлені тільки CyC-SA. Пелети ресуспендували у 400мкл WB та проводили проточну цитометрію як вищезазначено. Позитивне виявлення визначали як сигнал, що перевищує рівень фону виявлення CyC-SA поодиночі. Використовуючи транс-фектант BaF3/zalpha11 як контрольний, ми були здатні оцінити 4 mAb відповідними величинами інтенсивності флуоресценції (MFI), що може відбивати спорідненість антитіла та/або ступінь біотинілування mAb. mAb оцінювали таким чином, з найвищої до найнижчої MFI: 249.28.2.1.2.2. 247.10.2.15.4.6. 249.19.2.2.3.5. та 249.15.2.4.2.7. Клітини Раджі виявлялися позитивно моноклональним антитілами zalpha11. Клітини Джурката позитивно виявлялися моноклональним антитілами zalpha11, але не так сильно як на В-клітинах (Раджі). Отже, рецептор zalpha11 експресувався на цих В та Т-лініях клітин. Характеристики виявлення на неактивованих HL60 клітинах були ідентичними для усіх, та сигнал був дуже слабким. Ми вважаємо, що цей сигнал не відбиває дійсної експресії zalpha11 клітинами HL-60, а скоріше може бути обумовленим неспецифічним приєднанням mAb миші до клітини людини, ймовірно, за допомогою Fc-рецепторів.

Приклад 49 Вплив ліганду zalpha11 людини на В-клітини та токсичний конденсат ліганду zalpha11 з сапорином

Вплив ліганду zalpha11 людини тестували на таких лініях В-клітин людини: лінії клітин Раджі (ATCC №CCL-86), та RAMOS (ATCC №CRL-1596) лімфоми Буркітта людини; лінії клітин В-клітинної лімфоми EBV людини RPMI 1788 (ATCC №CRL-156); лінії клітин мієломи/плазмацитоми людини IM-9 (ATCC №CRL159); та EBV-трансформованої лінії В-клітин людини DAKIKI (ATCC №TIB-206), та клітини HS Sultan (ATCC №CRL-1484). Через приблизно 2-5 діб обробки лігандом zalpha11, зміни у експресії маркера поверхні знайшли у лініях клітин IM-9, Раджі, RAMOS, та RPMI1788, виявляючи, що ці клітини можуть реагувати на ліганд zalpha11. Лінії В-клітин людини, оброблені лігандом zalpha11, росли набагато повільніше, ніж необроблені клітини, при повторному засіванні на чашки для культури клітин. Ці клітини також мали збільшену експресію FAS-ліганд, як визначено проточною цитометрією (приклад 49D та приклад 49E), та помірно збільшену чутливість до активуючих FAS антитіл (приклад 49A). Ці результати свідчать, що ліганд zalpha11 міг би регулювати деякі типи В-клітинних новоутворень індукуванням їх диференціації до менш проліферативних та/або чутливіших

до FAS-ліганду станів. Більш того, рецептор $\alpha 11$ експресується на поверхні кількох з цих ліній клітин (дивися приклад 48). Отже, ліганд $\alpha 11$ та імунотоксичне сполучення сапорин-ліганд $\alpha 11$ людини (приклад 49В нижче), або інший конденсат токсин-ліганд $\alpha 11$ могли б бути терапевтично корисними при В-клітинних лейкозах та лімфомах.

А. Вплив ліганду $\alpha 11$ людини на лінію В-клітин.

Клітини IM-9 засівали у кількості приблизно 50000 клітини на мл+/-50мкг/мл очищеного ліганду $\alpha 11$ людини (приклад 29). Після 3 діб росту клітини збирали, промивали та підраховували далі повторно висівали у кількості приблизно 2500клітин/мл на 96-коміркові планшети у комірки з 0, 0,033, 0,1 або 0,33мкг/мл антитіла анти-FAS (R&D Systems, Minneapolis). Через дві доби проводили дослідження флуоресценції аламар-блакитного (приклад 2В) для визначення проліферації клітин.

Оброблені лігандом $\alpha 11$ клітини IM-9 зростали до густини тільки 27% необроблених клітин при відсутності антитіла анти-FAS. У присутності 0,33мкг/мл антитіла анти-FAS, оброблені лігандом $\alpha 11$ клітини інгібували додатково 52%, при тому що необроблені клітини були інгібовані тільки на 30%. Повне інгібування росту клітин оброблених лігандом $\alpha 11$ та 0,33мкг/мл антитіла анти-FAS складало 86%.

Коли IM-9 клітини попередньо обробляли протягом трьох діб з лігандом $\alpha 11$ чи без нього, а потім повторно засівали у кількості 100 клітини на комірку та вирощували з антитілом анти-FAS $\alpha 11$ чи без нього протягом 6 діб, зростання необроблених клітин, досліджене з аламар блакитним (приклад 2В), було інгібовано тільки на 25% антитілом анти-FAS, при тому що зростання оброблених лігандом $\alpha 11$ клітин було інгібовано на 95% відносно зростання необроблених клітин у відсутність антитіла анти-FAS.

В. Вплив імунотоксину сапорин-ліганд $\alpha 11$ людини на лінії В-клітин Конструювання та очистка імунотоксичного сполучення сапорин-ліганд $\alpha 11$ людини ($\alpha 11$ L-sap) описано у прикладі 50.

$\alpha 11$ L-sap людини був набагато потужнішим за сапорин при інгібуванні росту клітин. Коли оброблені клітини повторно засівали після трьох або чотирьох діб обробки, оброблені $\alpha 11$ L-sap клітини зростали дуже погано.

Клітини IM-9, RAMOS та K562 (ATCC №CCL-243, у кількості приблизно 2500 клітин/комірку засівали на 96-коміркові планшети з 0-250нг/мл сполучення або 0-250нг/мл сапорину [Stirpe et al. Biotechnology 10: 405-412, 1992] як контролем. Планшети інкубували далі 4 доби та проводили дослідження проліферації з аламар блакитним (приклад 5В). При максимальній концентрації сполучення сапорин-ліганд $\alpha 11$ людини, ріст клітин IM-9 та клітин RAMOS було інгібовано на 79% та 65%, відповідно. Клітини K562, що є пригніченими/негативними за течією для експресії рецептору $\alpha 11$ не відчували впливу $\alpha 11$ -sap, отже, виявляючи специфічність дії сполучення.

Клітини IM-9 засівали у кількості 50000клітин/мл у 6-коміркових планшети при 0-50нг/мл сполучення $\alpha 11$ L-sap людини. Через 3 доби клітини збирали та підраховували, далі повторно засівали у кількості 100-0,8 клітини на комірку у 2-кратних серійних розбавленнях, та 12 комірок на клітинне розбавлення без імунотоксину ліганду $\alpha 11$ -sap людини. Через 6 діб число комірок з ростом при кожному клітинному розбавленні was було оцінено згідно з результатами дослідження проліферації з аламар-блакитним (приклад 2В).

Коли число клітин визначали дослідженням з аламар-блакитним (приклад 2В), після 6 діб росту контрольні клітини, які засівали у кількості приблизно 12,5 та 6,25 клітини на комірку, ріст був еквівалентний обробленим $\alpha 11$ -sap клітинам, які засівали у кількості 100 та 50 клітин/комірку, відповідно. Отже, зростання виживання оброблених клітин IM-9 помітно послаблювалося навіть після видалення, при повторному засіванні, імунотоксину $\alpha 11$ -sap.

Обмежений тканинний розподіл рецептору $\alpha 11$ людини (приклад 48), та специфічність дії $\alpha 11$ -sap на експресуючі рецептор лінії клітин означають, що це сполучення може бути дозволеним *in vivo*.

С. Вплив імунотоксину ліганд $\alpha 11$ -сапорин людини на життєздатність лінії В-клітин

Клітини HS Sultan (ATCC №CRL-1484) засівали у кількості приблизно 40000 клітин на мл на 6-коміркові планшети та вирощували протягом п'яти діб без додавання цитокинів або з додаванням 40нг/мл очищеного ліганду $\alpha 11$ людини (приклад 29), або 25нг/мл сполучення $\alpha 11$ L-sap людини (приклад 50, нижче) або 20нг/мл IFN-альфа (RDI) або ліганду $\alpha 11$ та IFN-альфа. Ліганд $\alpha 11$ інгібував вирощування клітин Us Sultan на 63%. IFN-альфа інгібував ріст на 38%. Ліганд $\alpha 11$ плюс IFN-альфа інгібував ріст на 78%, вказуючи, що інгібіторний вплив ліганду $\alpha 11$ людини та IFN-альфа на зростання може складатися. $\alpha 11$ L-sap людини інгібував зростання HS Sultans на 92%.

Вищезазначені результати підтримують можливість використання ліганду $\alpha 11$ або $\alpha 11$ L-sap людини при лікуванні злоякісних або інших захворювань, що експресують рецептор $\alpha 11$, зокрема В-клітинного походження. Комбінація ліганду $\alpha 11$ з IFN-альфа є специфічно запропонованою їх адитивною дією на інгібування клітин HS Sultan. Деякі інші типи лімфоїдних злоякісних та інших захворювань можуть також експресувати рецептор $\alpha 11$, як активовані Т-клітини також експресують рецептор мРНК (приклад 48), а деякі з цих захворювань можуть також бути чутливими до ліганду $\alpha 11$ у терапії конденсатом $\alpha 11$ -токсин.

D. FAS (CD95) експресія на лінії В-клітин людини збільшується стимуляцією лігандом $\alpha 11$ людини

Лінії В-клітин людини HS Sultan (ATCC №CRL-1484), IM-9 (ATCC №CRL159), RPMI 8226 (ATCC №CCL-155), RAMOS (ATCC №CRL-1596), DAKJKI (ATCC №TIB-206), та RPMI1788 (ATCC №CRL-156), усі були оброблені 10-50нг/мл очищеного

ліганду α 11 людини (приклад 29) або без нього протягом 2-8 діб. Клітини далі виявляли анти-CD95 PE-сполученим антитілом (PharMingen, San Diego, CA), за протоколом виробника та аналізували засобом FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). У всіх лініях клітин, анти-CD95 (FAS або APO-1) виявлення було збільшеним, у деяких випадках більше ніж у 2 рази, при обробці лігандом α 11 людини.

Е. FAS (CD95) експресія первинних В-клітин селезінки миші збільшується стимуляцією лігандом α 11 людини

Первинні спленоцити миші отримували нарізанням селезінки від мишей C57/BL6 віком 8-12 тижнів. Еритроцити лізували обробкою препарату протягом 5 с водою далі пропускали через сито на 70 мікрон. Залишкові, спленоцити промивали та засівали у RPMI (JRH Bioscience) плюс 10% HIA-FBS Hyclone, Logan, UT), інтерлейкін 2 (IL-2) (R та D Systems) з лігандом α 11 людини або без нього, як описано вище. Їх далі інкубували при 37°C, у 5% CO₂ протягом 5 діб. Спленоцити збирали та виявляли анти-CD95 PE-сполученим антитілом (PharMingen) та анти-CD 19 FITC-сполученим антитілом (PharMingen) за протоколом виробника. Клітини аналізували проточною цитометрією засобом FACScalibur (Becton Dickinson). Селекцію на CD19⁺-В-клітинах миші, знайшли, що анти-CD95-виявлення збільшувалося на В-клітинах, оброблених IL-2 плюс ліганд α 11 людини порівняно з одним IL-2. Анти-CD95-виявлення було 37 відносних флуоресцентних одиниць (RFU) на В-клітинах з одним IL-2 та 55 RFU на В-клітинах, культивованих з IL-2 та лігандом α 11 людини.

Приклад 50 Конструювання та очистка токсичного конденсату ліганду α 11

Під забезпечений контракт 10мг ліганду α 11 людини (приклад 29) передали до Advanced Targeting Systems (ATS, San Diego, CA) для сполучення з рослинним токсином сапорином [Stupe et al., Biotechnology 10: 405-412, 1992]. Зимогенетичні отримані з ATS 1,3мг білкового сполучення включали 1,1 молекули сапорину на молекулу ліганду α 11 людини, сформованих у концентрації 1,14мг/мл у 20mM фосфату натрію, 300mM хлориду натрію, pH 7,2.

Приклад 51 Токсичний конденсат ліганду α 11 in vivo

А. Тестування сполучення α 11-сапорин у мишах

Сполучення α 11-сапорин (приклад 49) застосовували до мишей C57BL6 (саміці віком 12 тижнів, отримані від Taconic) при двох різних дозуваннях: 0,5 та 0,05мг/кг. Ін'єкції здійснювали внутрішньовенно у носії, що складається з 0,1% BSA (ICN, Costa Mesa, CA). Три ін'єкції здійснювали протягом одного тижня (доба 0, 2 та 7). Зразки крові брали з миші на добу 0 (попередня ін'єкція) та на доби 2 та 8 (пост-ін'єкції). Кров збирали у гепаринізовані туби (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), а підрахунок клітин проводили, використовуючи автоматичний гематологічний аналізатор (Abbot Cell-Dyn модель №CD-3500CS, Abbot Park, IL). Тварин умертвляли та розтинали на добу 8 після збору крові. Селезінку, тимус, печінку, нирки

та кістковий мозок збирали для гістопатології. Селезінку та тимус зважували та збирали додатковий зразок крові у сироваточних сепараційних тубах. Сироватку відсилали до Phoenix Central Labs. Everett, WA, для тестування у стандартній хімічній панелі. Зразки збирали також для проточної цитометрії, яку тут описано.

Підрахунок клітин циркулюючої крові та хімічні виміри сироватки помітно не відрізнялися для оброблених сполученням α 11 мишей та мишей, оброблених еквівалентною дозою несполученого токсину (сапорину). Гістологічний аналіз тканин у оброблених α 11-сапорином мишей не виявив значних змін відносно мишей, оброблених еквівалентною дозою несполученого токсину. Ці результати свідчать, що сполучення сапорину не було токсичним in vivo.

В. Тестування токсичного конденсату сапорину з лігандом α 11 на похідних від В-клітин пухлинах in vivo

Вплив ліганду α 11 людини та токсичного конденсату сапорину з лігандом α 11 (приклад 50) на клітини пухлини людини тестують in vivo, використовуючи мишачу модель ксенотрансплантату пухлини, що тут описано. Ксенотрансплантатні моделі спочатку тестують, використовуючи лінії клітин, вибрану на основі експерименту in vitro, як-то описаного у прикладі 49. Ці лінії клітин включають, але без обмеження: лінії клітин Раджі (ATCC №CCL-86), та Ramos (ATCC №CRL-1596) лімфоми Буркітта людини; лінію клітин людини RPMI 1788 (ATCC №CRL-156); лінію клітин мієломи/плазмацитоми людини IM-9 (ATCC №CRL159); лінію клітин людини DAKIKI (ATCC №TIB-206), та клітин HS Sultan (ATCC №CRL-1484). Клітини, похідні безпосередньо з пухлини людини можна також використовувати у цьому типі моделі. На цьому шляху, скринінг зразків пацієнта на чутливість до обробки лігандом α 11 або токсичним конденсатом сапорину з лігандом α 11 можна використовувати для вибору оптимальних показників для використання α 11 у анти-пухлинній терапії.

Після селекції прийнятної моделі ксенотрансплантату in vivo, описаної вище, індукована лігандом α 11 активність природних клітин-кілерів та/або впливу ліганду α 11 на похідні від В-клітин пухлини досліджують in vivo. Ліганд α 11 людини тестують на його здатність створювати цитотоксичні ефекторні клітини (наприклад, NK-клітини) з активністю проти похідних від В-клітин пухлин, використовуючи мишачу модель ксенотрансплантату пухлини, що тут описано. Більш того, може бути дослідженням безпосередній вплив ліганду α 11 людини на пухлини. Моделі ксенотрансплантату, що треба застосовувати, вибирають як описано вище. Протокол, використовуючи стимульовані лігандом α 11 клітини людини, розроблюють та тестують на ефективність у виснажених клітинах пухлини та промотування виживання мишей, прищеплених лініями клітин або первинними пухлинами.

Приклад 52 Ідентифікація штучних хромосомних клонів PL що містять геномну ДНК ліганду α 11 людини

Вставку кДНК ліганду $\alpha 11$ людини ампліфікували засобом PCR, використовуючи праймери на основі вектору. Продукт PCR ^{32}P -мітили та гібридизували з фільтрами високої густини, репрезентуючими бібліотеку PAC (PI Artificial Chromosome). Фільтри та заморожені вихідні розчини бібліотек отримували з Roswell Park Рак Institute, Buffalo, New York; бібліотекою сегментів була RPC16, з чотири-кратною глибиною охоплення. Фільтри гібридизували протягом ночі при 65°C у ExpressHyb (Clontech) та промивали за протоколом виробника. Декодуючі позитивні сигнали є результатом ідентифікації чотирьох клонів PAC, позначених як 23H17, 34A9, 105G9, та 236H14. PCR-аналіз, використовуючи праймери, специфічні стосовно 5' закінчення (ZC22,452 (SEQ ID NO: 100) та ZC 22,451 (SEQ ID NO: 101)), та 3'-закінчення (ZC 22,450 (SEQ ID NO: 102) та ZC 22,449 (SEQ ID NO: 103)) кодуємого регіону, показав, що PAC 34A9 та 105G9 містять обидва закінчення, в той час як PAC 23H17 та 236H14 містять тільки 5'-закінчення. PAC 23H17 розщеплювали за допомогою Eco RI та Not I та ідентифікували фрагмент розміром 9 по, який гібридизували з кДНК зонду ліганду $\alpha 11$. Цей фрагмент виділяли та субклонували, використовуючи способи, що описано, тут, у pBluescript II SK (+) (Stratagene), попередньо розщеплений за допомогою Eco RI та Not I. Секвенсування виявило, що цей фрагмент, що містить приблизно 380 пар основ регіону промотору, екзони 1, 2, та 3, усе з інтронів 1 та 2, і закінчується в межах інтрону 3.

3'-закінчення гену ліганду $\alpha 11$ людини отримували засобом PCR, використовуючи ДНК з PAC 34A9 як темплат, з праймерами ZC23,771 (SEQ ID NO: 104) та ZC22,449 (SEQ ID NO: 103). Таq-полімераза ДНК використовували, забезпеченою буфером додаванням 4% диметилсульфоксиду. Умови реакції були такими: 94°C , 5 хвилин, з наступними 35 циклами при 94°C протягом 30с, 52°C протягом 1 хвилини. 72°C протягом 3 хвилин, далі 72°C протягом 7 хвилин. Цей створений фрагмент розміром 2,9 ко, що містить частину екзону 3, усе з інтронів 3 та 4, усе з екзону 4, та кодуєчу частин екзону 5.

Геномна структура гена ліганду $\alpha 11$ людини є від 5'- до 3' такою: SEQ ID NO: 105, що містить приблизно 240 по промотору, екзон 1 (нуклеотидне число 240-455 послідовності SEQ ID NO: 105), інтрон 1 (нуклеотидне число 456-562 послідовності SEQ ED NO: 105), екзон 2 (нуклеотидне число 563-598 послідовності SEQ ID NO: 105), та частину інтрону 2, що містить 5' 748 пар основ (нуклеотидне число 599-1347 послідовності SEQ ED NO: 105); геп розміром приблизно 3 ко; SEQ ED NO: 106, що містить 3' 718 по інтрону 2, екзон 3 (нуклеотидне число 719-874 послідовності SEQ ED NO: 106), та частину 5'-закінчення інтрону 3 (нуклеотидне число 875-1656 послідовності SEQ ID NO: 106); геп розміром менше приблизно 800 по; SEQ ID NO: 107, що містить 644 по інтрону 3; геп розміром менше приблизно 800 по; та SEQ ED NO: 108, що містить 3' 435 по інтрону 3, екзон 4 (нуклеотидне число 436-513 послідовності SEQ ED NO: 108), інтрон 4 (нуклеотидне число 514-603 послідовності SEQ ED NO: 108), та частину 5'-

закінчення екзону 5 (нуклеотидне число 604-645 послідовності SEQ ED NO: 108).

Приклад 53 Дослідження приєднання ^{125}I -міченого ліганду $\alpha 11$ людини до ліній клітин

25 мікрограм очищеного ліганду $\alpha 11$ людини (приклад 29) мітили $2\text{ мКи } ^{125}\text{I}$, використовуючи кульки йоду (Pierce, Rockford Illinois), за інструкціями виробника. Цей мічений білок використовували для визначення приєднання ліганду $\alpha 11$ людини до клітин людини Раджі (ATCC №CCL-86), використовуючи приєднання до клітин мишей дикого типу BaF3, та клітин BaF3, трансфектованих рецептором $\alpha 11$ (клітини BaF3/h $\alpha 11$) як контрольних. Приєднання ліганду $\alpha 11$ до клітин BaF3/h $\alpha 11$ було очікуваним (позитивний контроль), в той час як не було очікуваним приєднання до клітин дикого типу BaF3 (негативний контроль) на основі дослідження результатів проліферації (приклад 5). Приблизно 5×10^5 Раджі-клітин/комірку, 1×10^6 BaF3/h $\alpha 11$ -клітин/комірку та 1×10^6 BaF3-клітин/комірку, засівали на 96-коміркові планшети. Десять нг/мл міченого ліганду $\alpha 11$ людини додавали з дублюванням до комірки, з серійним розбавленням неміченим конкурентним лігандом $\alpha 11$ людини, доданим з 250-кратним молярним надлишком при розбавленнях 1:4 до ,061-кратного молярного надлишку. Кожну точку отримували з дублюванням. Після додавання до комірки міченого ліганду $\alpha 11$ людини, її інкубували при 4°C протягом 2 годин для змоги приєднання ліганду до клітини. Клітини далі промивали 3х у буфері для зв'язування (RPMI-1710 (JRH Bioscience) з 1% BSA (Sigma)), та підраховували на гамма-лічильнику COBRA II ABTO-GAMMA (Packard Instrument Company, Meriden, CT).

Зв'язування міченого ліганду $\alpha 11$ з клітинами було очевидним для клітин Раджі та BaF3/h $\alpha 11$. На додаток, для клітин Раджі, середній 250-кратний молярний надлишок неміченого ліганду $\alpha 11$ зменшував зв'язування у три рази у присутності неспецифічного конкуренту (гамма-інтерферон від R&D Systems, Minneapolis, MN), та 3,7-кратний відносно відсутності конкуренту. Конкуренцію спостерігали залежною від дози для специфічного неміченого конкуренту, ліганду $\alpha 11$ людини. Отже, приєднання ліганду $\alpha 11$ до Раджі клітини було специфічним. Подібно, для позитивних контрольних клітин BaF3/ $\alpha 11$, 250-кратний молярний надлишок неміченого ліганду $\alpha 11$ зменшував зв'язування у 2 рази відносно неспецифічного конкуренту та у 3,06 рази відносно відсутності конкуренту. Отже, приєднання ліганду $\alpha 11$ до клітин BaF3/ $\alpha 11$ також було специфічним. Відсутність конкурентного зв'язування спостерігали з клітинами дикого типу BaF3. Отже, виявлено, що ліганд $\alpha 11$ специфічно приєднується до клітин Раджі, та до клітин BaF3/ $\alpha 11$, але не до негативних контрольних клітин BaF3.

Приклад 54 Експресія рецептору $\alpha 11$ на клітинах крові людини А. Виготовлення та культивування клітин периферійної крові людини Свіжу зібрану кров людини розбавляли 1:1 PBS (GIBCO BRL) та нашаровували поверх Ficol/Нупаке Plus (Pharmacia LICB Biotechnology Inc, Piscataway, NJ)

та центрифугували протягом 30 хвилин при 1800оберт/хвил давали зупинитися без гальмування. Міжфазний шар видаляли та переносили у нові туби Фалькона на 50мл (Falcon, VWR, Seattle, WA), доводили до кінцевого об'єму 40мл додаванням PBS та центрифугували протягом 10 хвилин при 1200оберт/хвил з гальмуванням. Життєздатність виділених клітин тестували, використовуючи трипан-блакитний (GIBCO BRL), та клітини ресуспендували при кінцевій концентрації 1×10^6 клітин/мл у клітинному середовищі (середовище RPMI1640, 10% інактивованої нагріванням сироватки зародка теляти, 5% L-глутаміну, 5% Pen/Strep) (GIBCO BRL).

Клітини культивували у 6-коміркових планшетах (Falcon, VWR) протягом 0, 4 або 24 годин з рядом різних описаних нижче стимулів. Анти-IgM, анти-CD40 та анти-CD3-стимуляцію робили як у прикладі 44 та прикладі 42. Міристат-ацетат фторболу (PMA) та іономіцин (Sigma, St. Louis, MO) (приклад 5C) додавали до прийнятих комірок при 10нг/мл та 0,5мг/мл відповідно. Клітини інкубували при 37°C у зволоженому інкубаторі протягом різного часу.

В. Виявлення та аналіз антитіл

Клітини збирали з планшетів, промивали та ресуспендували у охолоджену льодом проявочному середовищі (HBSS, 1% сироватки зародка теляти, 0,1% азиду натрію) у концентрації приблизно десять мільйонів клітин на мілілітр. Блокування Fc-рецептору та неспецифічного приєднання антитіл до клітини досягали додаванням до суспензії клітин 10% нормальної козячої сироватки (Gemini Bioproducts, Woodland, CA) та 10% нормальної сироватки людини (Ultraserum, Gemini). Аліквоти суспензії клітин змішували з FITC-міченим моноклональним антитілом проти одного з маркерів лінії диференціювання CDS, CD19 або CD14 (PharMingen, La Jolla, CA), та біотинілованим моноклональним антитілом проти рецептору $\alpha 11$ людини (hu- $\alpha 11$) (приклад 35). Специфічність виявлення визначали конкуренцією, використовуючи розчинний рецептор $\alpha 11$ CEE (приклад 10A) при десятикратному надлишку за масою. Після інкубації на льоді протягом 60 хвилин клітини двічі промивали охолодженим льодом проявочним середовищем та ресуспендували у 50мл проявочного середовища, що містило стрептавідин-PE (Caltag, Burlingame, CA). Після 30 хвилин інкубації на льоді, клітини двічі промивали холодним промивочним буфером (PBS, 1% сироватки зародка теляти, 0,1% азиду натрію) та ресуспендували у промивочному буфері, що містив 1мг/мл 7-AAD (Molecular Probes, Eugene, АБО) як маркер життєздатності. Дані у потоці отримували на живих клітинах, використовуючи проточний цитометр FACScalibur (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Отримання та аналіз проводили, використовуючи програму CellQuest software (BD Immunocytometry Systems).

Результати виявлення антитілом проти $\alpha 11$ свідчили, що рецептор $\alpha 11$ людини експресується на клітинах периферійної крові людини, що експресують CD3, CD19 або CD14. Виявлення на клітинах CD3 та CD19 було специфічним, як засвідчено абсолютним конкуванням з

розчинним рецептором $\alpha 11$. Виявлення на клітинах CD14 показало деяку специфічність для ліганду, як засвідчено частковим конкуванням з розчинним рецептором. Активізація Т-клітини анти-CD3 або В-клітин анти-CD40 призводила до зростання рівня $\alpha 11$ поверхні клітин на 24 годину. Відсутність рівня експресії $\alpha 11$ спостерігали на 4 годину з будь-яким стимулом на будь-якій популяції клітин. Обробка клітин лігандом $\alpha 11$ призводила до зменшеного виявлення $\alpha 11$ на CDS-позитивних та CD19-позитивних клітинах але не на CD14-позитивних клітинах на 4 та 24 годинах.

Приклад 55 Попередня оцінка стабільності у воді ліганду $\alpha 11$ людини

Для оцінки характеристик стабільності у воді ліганду $\alpha 11$ людини для сприяння біопереробці, створенню композицій та застосуванню *in vivo* провели попереднє вивчення. Метою було: 1) перевірка стабільності та повернення з Alzet Minipumps & звичайного зберігання та обробки, 2) визначення здатності до виявлення стабільності кількох аналітичних способів, включаючи катіонообмінну високоефективну рідину хроматографію (KX-BEPX), BEPX з оберненою фазою (OF-BEPX), BEPX з відбором за розміром (BP-BEPX), & біодослідження (проліферація BaF3/ $\alpha 11$ R (наприклад, приклад 2 та приклад 4), та 3) визначення обмежуючих стабільність шляхів розкладання та їх кінетичні залежності.

Аліквоти очищеного ліганду $\alpha 11$ людини (приклад 29) виготовляли розбавленням до 2мг/мл у PBS (рН 7,4) та зберігали у кріофлаконах з поліетилену низької густини (LDPE) (Nalgene, 1,8мл) при -80°C (контроль), 5°C, 30°C, та 37°C. Зразки досліджували з перервами через 29 днів засобами KX-, OF-, BP-BEPX, та біодослідженням. Аліквоти також зберігали при -80°C та піддавали циклічному заморожуванню/розморожуванню (f/t) (-80°C/RT; 5 x f/t, 10 x f/t). Відновлення ліганду $\alpha 11$ людини визначали відносно контролю при -80°C (1 f/t) у всіх дослідженнях.

Залишковий розчин ліганду $\alpha 11$ людини з контрольних зразків для -80°C знов заморожували (-80°C) після аналізу. Цю аліквоту (2 f/t) використовували для оцінки термічної та конформаційної стабільності ліганду $\alpha 11$ людини як функції рН, використовуючи циркулярний дихроїзм (CD). Розчини з концентрацією 2мг/мл розбавляли до 100мкг/мл у буфері PBS в межах рН 3,3-8,8. Спектри CD у далекому УФ контролювали при температурах 5-90°C з інтервалами 5°C (n=3/рН). Використовували спектрополяриметр CD Jasco 715 (Jasco, Easton, MD). Термічне розгортання контролювали змінами еліптичності при 222нм як функції температури. Оцінки T_m оцінювали на основі дво-режимної моделі розгортання. Дані встановлювали (сигмоїдальні), використовуючи засіб SlideWrite Plus for Windows v4-1 (Advanced Graphics Software; Encinitas, CA).

Відновлення та стабільність за Alzet Minipumps (Model №1007D; ALZA Corporation, Mountain View, CA) досліджували заповненням насосів 100мкл розчину 2мг/мл ліганду $\alpha 11$ людини, установкою насосів у 1,8мл LDPE, що містять 1мл PBS (рН 7,4), та зберіганням їх при 37°C. Вивільнен-

ня/відновлення ліганду $\alpha 11$ людини з мінінасосів досліджували засобами КХ-, ОФ-, та ВР-ВЕРХ на доби 2, 4, та 7. Активність досліджували біодослідженням на добу 7. Дослідження призначали для оцінки вивільнення з 3 насосів на час відбору зразків.

Хроматографічні дані свідчили, що способи КХ- та ВР-ВЕРХ виявляли стабільність, а спосіб ОФ-ВЕРХ - ні. Щонайменше 3 додаткові піки, що свідчили про безумовне розкладання продуктів, спостерігали засобом КХ-ВЕРХ. Засіб ВР-ВЕРХ показав видимий композит ліганду $\alpha 11$ людини, що елююється перед лігандом $\alpha 11$ людини. Однак, не спостерігали значних додаткових піків елюювання після піку ліганду $\alpha 11$ людини. Це означає, що продукти розкладання, що спостерігали засобом КХ-ВЕРХ найімовірніше є результатом модифікації амінокислот, як-то дезамідування, шоріше, ніж гідроліз/протеоліз, призводячи, до обмежених варіацій. Невеликий ступінь фронтування/протягання спостерігали засобом ОФ-ВЕРХ (відносно контролю) у зразках, для яких було виявлене значне розкладання засобами ВР- та КХ-ВЕРХ. Однак, видимі продукти розкладання було виявлено ОФ-ВЕРХ. Розкладання, що спостерігали засобом КХ-ВЕРХ, зросло як функція часу температури з безумовною кінетикою першого порядку. Процент ліганду $\alpha 11$ людини виявлений КХ-ВЕРХ після 29 діб при 37°C, 30°C, та 5°C складав 39%, 63%, та 98%, відповідно. Агрегація також зростала залежно від часу та температури. Процент агрегатів, виявлений у препаратах, що зберігали протягом 29 діб при 37°C, 30°C, та 5°C складав 7,4, 3,4 та нижче межі визначення (BDL), відповідно. Не спостерігали значної відмінності біодослідженням будь-якого зразку, вказуючи, що продукти розкладання мають еквівалентну активність до непошкодженого ліганду $\alpha 11$ людини. Не спостерігали розкладання будь-яким дослідженням зразків, підданих 10 циклам f/t.

Вивільнення ліганду $\alpha 11$ людини з Alzet Minipumps було узгодженим з теоретично очікуваним об'ємом вивільнення. Це означає, що значне налипання на поверхню не погіршує доставку ліганду $\alpha 11$ людини, використовуючи Alzet Minipumps з концентрацією наповнення 2 мг/мл. Розкладання узгоджується з тим, що попередньо спостерігали. Процент чистоти, що визначали вивільненням при КХ-ВЕРХ ліганду $\alpha 11$ людини після 2, 4, та 7 діб, складав 96%, 90%, та 79%, відповідно. Зрозуміло, що розкладання також відбувається після вивільнення ліганду $\alpha 11$ людини у середовище або розбавлення ним. Відтак, % чистоти в межах мінінасоса може дещо відрізнятися від того, що визначали у вивільненому середовищі. Біоактивність кожного зразку узгоджу-

ється з очікуваною кількістю ліганду $\alpha 11$ людини, що вивільнився з мінінасосів.

Спектри CD ліганду $\alpha 11$ людини у далекому УФ, як очікувано, узгоджувалися з інтерлейкінами, як-то EL-3 [J. Biochem, 23: 352-360, 1991], IL-4 [Biochemistry, 30: 1259-1264, 1991], та мутантами IL-6 [Biochemistry, 35: 11503-11511, 1996]. Крос-змін у спектрах CD у далекому УФ як функції рН не спостерігали. Результати свідчили, що рН для максимальної термічної/конформаційної стабільності був приблизно 7,4. Аналіз кривих розгортання базувався на дворежимному механізмі розгортання для можливості порівняння термічної/конформаційної стабільності як функції рН/композиції. Однак, один чи більше інтермедіатів можуть бути в процесі розгортання, оскільки кооперування було відносно низьким, що видно з мілкості кривих розгортання. Хоча вивчення не призначали спеціально для визначення, чи згортається знов після термічного розгортання при 90°C ліганд $\alpha 11$ людини, попередні дані свідчать, що щонайменше часткове згортання відбувається після охолодження зразку до 20°C.

Ці дослідження дають аналітичну парадигму для ідентифікації оцінки чистоти та підтвердження стабільності ліганду $\alpha 11$ людини. Наприклад, ВР-ВЕРХ можна використовувати для характеризування ступеню та швидкості агрегації у водних розчинах. Подібно, КХ-ВЕРХ можна використовувати для характеризування ступеню та швидкості розкладання ліганду $\alpha 11$ людини за відмінними від агрегації механізмами. Біодослідження можна використовувати для підтвердження активності ліганду $\alpha 11$ людини та продуктів його розкладання водою. Наприклад, варіації ліганду $\alpha 11$ людини, створені у водних розчинах та виявлені КХ-ВЕРХ можуть самі бути корисними як терапевтичні засоби, оскільки вони мають еквівалентну біоактивність. Також, факт, що ліганд $\alpha 11$ людини розкладається за кількома різними механізмами (агрегація, модифікації амінокислот) підказує кращу або однозначну композицію, що мінімізує швидкість кожного процесу розкладання, що може бути необхідним для довготривалої стабільності розчинів продукту.

Ідентифікація природи продуктів розкладання водою та визначення їх кінетичних залежностей (рН, концентрація, ексципієнти) розробляються. Стабільність ліганду $\alpha 11$ людини у сироватці/плазмі визначають для підтримки плану та інтерпретації вивчення *in vivo*.

З вищезазначеного, треба розуміти, що хоча специфічні втілення згідно з винаходом що тут описано призначені для ілюстрації, можна здійснити різні модифікації без виходу за рамки та мету винаходу. Відповідно, винахід є не обмежений нічим окрім доданої формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> NOVEL CYTOKINE ZALPHA11 LIGAND

<130> 99-16PC

<150> US 09/264,908

<151> 1999-03-09

<150> US 09/265,992

<151> 1999-03-11

<150> US 60/142,013

<151> 1999-07-01

<160> 115

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 642

<212> ДНК

<213> Людина

<220>

<221> CDS

<222> (47)...(532)

<400> 1

gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtactt atg aga tcc	55
Met Arg Ser	
1	

agt cct ggc aac atg gag agg att gtc atc tgt ctg atg gtc atc ttc	103
Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met Val Ile Phe	
5 10 15	

ttg ggg aca ctg gtc cac aaa tca agc tcc caa ggt caa gat cgc cac	151
Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln Asp Arg His	
20 25 30 35	

153	84387	154	
atg att aga atg cgt caa ctt ata gat att gtt gat cag ctg aaa aat			199
Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln Leu Lys Asn			
40	45	50	
tat gtg aat gac ttg gtc cct gaa ttt ctg cca gct cca gaa gat gta			247
Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro Glu Asp Val			
55	60	65	
gag aca aac tgt gag tgg tca gct ttt tcc tgt ttt cag aag gcc caa			295
Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln Lys Ala Gln			
70	75	80	
cta aag tca gca aat aca gga aac aat gaa agg ata atc aat gta tca			343
Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile Asn Val Ser			
85	90	95	
att aaa aag ctg aag agg aaa cca cct tcc aca aat gca ggg aga aga			391
Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala Gly Arg Arg			
100	105	110	115
cag aaa cac aga cta aca tgc cct tca tgt gat tct tat gag aaa aaa			439
Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys			
120	125	130	
cca ccc aaa gaa ttc cta gaa aga ttc aaa tca ctt ctc caa aag atg			487
Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met			
135	140	145	
att cat cag cat ctg tcc tct aga aca cac gga agt gaa gat tcc			532
Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser			
150	155	160	
tgaggatcta acttgcagtt ggacactatg ttacatactc taatatagta gtgaaagtca			592
tttctttgta ttccaagtgg aggagcccta ttaaattata taaagaaata			642

<210> 2

<211> 162

<212> PRT

<213> Людина

<400> 2

Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met			
1	5	10	15
Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln			
20	25	30	

155										84387										156									
Asp	Arg	His	Met	Ile	Arg	Met	Arg	Gln	Leu	Ile	Asp	Ile	Val	Asp	Gln														
	35						40				45																		
Leu	Lys	Asn	Tyr	Val	Asn	Asp	Leu	Val	Pro	Glu	Phe	Leu	Pro	Ala	Pro														
	50				55						60																		
Glu	Asp	Val	Glu	Thr	Asn	Cys	Glu	Trp	Ser	Ala	Phe	Ser	Cys	Phe	Gln														
65					70				75					80															
Lys	Ala	Gln	Leu	Lys	Ser	Ala	Asn	Thr	Gly	Asn	Asn	Glu	Arg	Ile	Ile														
			85					90					95																
Asn	Val	Ser	Ile	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Pro	Pro	Ser	Thr	Asn	Ala														
			100					105					110																
Gly	Arg	Arg	Gln	Lys	His	Arg	Leu	Thr	Cys	Pro	Ser	Cys	Asp	Ser	Tyr														
	115						120					125																	
Glu	Lys	Lys	Pro	Pro	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Leu														
	130				135						140																		
Gln	Lys	Met	Ile	His	Gln	His	Leu	Ser	Ser	Arg	Thr	His	Gly	Ser	Glu														
145					150					155				160															
Asp	Ser																												

<210> 3
 <211> 486
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Вироджена поліонуклеотидна послідовність ліганду
 zalphall людини

<221> misc_feature
 <222> (1)...(486)
 <223> n = A,T,C або G

<400> 3	
atgmgnwsnw snccnggnaa yatggarmgn athgtnatht gyytnatggt nathttyytn	60
ggnacnytn tncayaarws nwsnwsncar ggnccargaym gncayatgat hmgntatgmgn	120
carytnathg ayathgtnga ycarytnaar aaytaygtna aygayytngt nccngartty	180
ytncngcnc cngargaygt ngaracnaay tgygartggw sngcnttyws ntgyttycar	240
aargcncary tnaarwsngc naayacnggn aayaaygarm gnathathaa ygtwnsnath	300
aaraarytna armgnaarcc nccnwsnacn aaygcnggnm gnmgnccaraa rcaymgnytn	360
acntgyccnw sntgygayws ntaygaraar aarccnccna argarttyyt ngarmgntty	420
aarwsnytny tncaraarat gathcaycar cayytnwsnw snmgnaacna yggwnsngar	480
gaywsn	486

<210> 4
 <211> 535

157

84387

158

<212> ДНК

<213> М'язи

<220>

<221> Джерело

<222> (0)...(0)

<223> EST1483966 ; GenBank Acc #AA764063

<400> 4

taaacatgta tcatataagg atatgtcata ataaggatta atattatata attataaata	60
atttataata cttataatat cattgttttg ttcactaata aatctatgga tacatggtca	120
aaatggaaat gaatatTTTg ccaattatta atccccaag tcattgaaaa taagcataac	180
catttctactg acttggttaga ctctaaacta acataaaata catTTTcaga aataaattca	240
accgatctta cctttacatc ttgtggagct gatagaagtt caggatccta agaaaaattaa	300
ccaaagagta ttagttctga gttggtgata caagtcaaaa ggctcctttt gcattaatta	360
aaaaaatatt atttaaattg cattgtgaca aacatggcct taccaagtca tttcataga	420
ttttcagctg ttcaacaatg tcaataaggT gacgaagtct aatcaggagg cgatctggcc	480
cttgggggct tgatttatgg gccactgtcc ccaagaagat gactaccaga cagac	535

<210> 5

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер ZC17212

<400> 5

ggggaattcg aagccatgcc ctcttgggcc etc	33
--------------------------------------	----

<210> 6

<211> 30

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер ZC19914

<400> 6

caatggatgg gtcttttagca gcagtaggcc	30
-----------------------------------	----

<210> 7

<211> 1614

<212> ДНК

<213> Людина

159	84387	160	
<400> 7			
atgccgcgtg	gctgggcccgc	ccccttgctc	ctgctgctgc
cccgacctcg	tctgctacac	cgattacctc	cagacgggtca
aacctccacc	ccagcacgct	cacccttacc	tggcaagacc
gaggccacct	cctgcagcct	ccacaggtcg	gcccacaatg
tgccacatgg	atgtattcca	cttcatggcc	gacgacattt
cagtctggca	actactccca	ggagtgtggc	agctttctcc
gctccccctt	tcaacgtgac	tgtgaccttc	tcaggacagt
gattacgaag	accctgcctt	ctacatgctg	aagggcaagc
aggaaccggg	gagacccctg	ggctgtgagt	ccgaggagaa
agaagtgtct	ccctcctccc	cctggagttc	cgaaagact
cgggcagggc	ccatgcctgg	ctcctctac	caggggacct
gtcatctttc	agaccagtc	agaggagtta	aaggaaggct
ctcctcctgc	ttgtcatagt	cttcattcct	gccttctgga
tggaggctat	ggaagaagat	atgggcccgc	cccagccctg
tacaagggtg	gcagcggaga	cttcaagaaa	tgggtgggtg
ctggagctgg	gaccttgag	cccagaggtg	ccctccacc
ccaccacgga	gcccggccaa	gaggctgcag	ctcacggagc
gtggagtctg	acggtgtgcc	caagcccagc	ttctggccga
tcagcttaca	gtgaggagag	ggatcgccca	tacggcctgg
gtgctagatg	cagagggggc	atgcacctgg	ccctgcagct
gccctggacc	tggatgctgg	cctggagccc	agcccaggcc
gcagggacca	cagtcctgtc	ctgtggctgt	gtctcagctg
cccctgggaa	gcctcctgga	cagactaaag	ccacccttg
gggggactgc	cctgggggtg	ccggtcacct	ggaggggtct
cccctggccg	gcctggatat	ggacacgttt	gacagtggct
agccctgtgg	agtgtgactt	caccagcccc	ggggacgaag
cgccagtggg	tggtcattcc	tccgccactt	tcgagccctg
			gaccccaggc
			cagc

60
120
180
240
300
360
420
480
540
600
660
720
780
840
900
960
1020
1080
1140
1200
1260
1320
1380
1440
1500
1560
1614

<210> 8
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC19913

<400> 8
ggcctactgc tgctaaagac ccatccattg

30

<210> 9
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

161	84387	162
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC20097		
<400> 9		
acaŕctagat tagctggcct ggggtccagg cgt		33
<210> 10		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC12700		
<400> 10		
ggaggtctat ataagcagag c		21
<210> 11		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC5020		
<400> 11		
cactggagtg gcaacttcca g		21
<210> 12		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC6675		
<400> 12		
gtggatgccg aaccagtc		20
<210> 13		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		

163	84387	164
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC7727		
<400> 13		
tggtcacagc tacctgggct c		21
<210> 14		
<211> 26		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC8290		
<400> 14		
ccaccgagac tgcttgatc accttg		26
<210> 15		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC19572		
<400> 15		
gtcctgtggc tgtgtctcag		20
<210> 16		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC6622		
<400> 16		
ctgggctgga aactggcaca c		21
<210> 17		
<211> 18		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		

165	84387	166
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC7736		
<400> 17		
cactgtcaga aatggagc		18
<210> 18		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC9273		
<400> 18		
gggccctccc cgggcaccga gaga		24
<210> 19		
<211> 36		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC19905		
<400> 19		
acaggatccg tcagcatgcc gcgtggctgg gccgcc		36
<210> 20		
<211> 33		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC19906		
<400> 20		
acagaattct tagctggcct ggggtccagg cgt		33
<210> 21		
<211> 22		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC20114		

167	84387	168
<p><400> 21</p> <p>cctgccttct acatgctgaa gg</p> <p><210> 22</p> <p><211> 21</p> <p><212> ДНК</p> <p><213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігонуклеотидний праймер ZC19459</p>		22
<p><400> 22</p> <p>ctcctcctgc ttgtcatagt c</p> <p><210> 23</p> <p><211> 18</p> <p><212> ДНК</p> <p><213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігонуклеотидний праймер ZC19954</p>		21
<p><400> 23</p> <p>actgggctgg gggactgc</p> <p><210> 24</p> <p><211> 22</p> <p><212> ДНК</p> <p><213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігонуклеотидний праймер ZC20116</p>		18
<p><400> 24</p> <p>agcacagtca ctgtgtcaat gg</p> <p><210> 25</p> <p><211> 40</p> <p><212> ДНК</p> <p><213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігонуклеотидний праймер ZC13946</p>		22

169	84387	170
<400> 25		
ccctgcagtg atcaacatgg ccaagttgac cagtgccgtt		40
<210> 26		
<211> 45		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклетидний праймер ZC13945		
<400> 26		
gcccattggac tagtttcgaa aggtcgagtg tcagtcctgc tcctc		45
<210> 27		
<211> 34		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклетидний праймер ZC18698		
<400> 27		
tttttttctc gagacttttt tttttttttt tttt		34
<210> 28		
<211> 25		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклетидний праймер ZC14063		
<400> 28		
accagacat aatagctgac agact		25
<210> 29		
<211> 6		
<212> PRT		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Glu-Glu (CEE) Амінокислотні послідовності Tag		
<400> 29		

171		84387	172
Glu Tyr Met Pro Met Glu			
1	5		
<p><210> 30</p> <p><211> 36</p> <p><212> ДНК</p> <p><213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігонуклеотидний праймер ZC19931</p> <p><400> 30</p> <p>ggtttggtacc gcaagatgcc gcgtggctgg gccgcc</p>			
			36
<p><210> 31</p> <p><211> 29</p> <p><212> ДНК</p> <p><213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігонуклеотидний праймер ZC19932</p> <p><400> 31</p> <p>cggaggatcc gtgagggttc cagccttcc</p>			
			29
<p><210> 32</p> <p><211> 66</p> <p><212> ДНК</p> <p><213> Штучна послідовність</p> <p><220> Олігонуклеотидний праймер, що з'єднує фланкуючий регіон</p> <p><223> вектора та 5' закінчення екстрацелолар домену</p> <p><400> 32</p> <p>tccacttttgc ctttctctcc acaggtgtcc aggggaattca tcgataatgc cgcgtggctg</p> <p>ggccgc</p>			
			60
			66
<p><210> 33</p> <p><211> 699</p> <p><212> ДНК</p> <p><213> Людини</p> <p><400> 33</p>			

173	84387	174	
gagcccagat	cttcagacaa	aactcacaca	tgccaccgt
ggggcaccgt	cagtcttcct	cttccccca	aaaccaagg
acccctgagg	tcacatgct	ggtggtggac	gtgagccacg
aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaga
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc
ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc
atctccaaag	ccaaagggca	gccccgagaa	ccacaggtgt
gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga
cccgtgctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctctacagca
aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc
tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaataa

60
120
180
240
300
360
420
480
540
600
660
699

<210> 34
<211> 62
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Перший олігонуклеотидний праймер, що з'єднує 3' закінчення екстрацелюлярного домену та 5' закінчення Fc4

<400> 34
gcacgggtggg catgtgtgag ttttgtctga agatctgggc tcgtgagggg tccagccttc
ct

60
62

<210> 35
<211> 61
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Другий олігонуклеотидний праймер, що з'єднує 3' закінчення екстрацелюлярного домену та 5' закінчення Fc4

<400> 35
agaccagtc agaggagtta aaggaaggct ggaaccctca cgagcccaga tcttcagaca
a

60
61

<210> 36
<211> 67
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

175

84387

176

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер, що з'єднує 3' закінчення Fc4 та фланкуючий регіон вектору

<400> 36

gtgggcctct ggggtgggta caaccccaga gctgttttaa tctagattat ttacccggag
acagggga

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність амінокислоти з С-терміналом FLAG

<400> 37

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 38

<211> 26

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер ZC7764a

<400> 38

tttttttttt tttttttttt ttttta

<210> 39

<211> 26

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер ZC7764b

<400> 39

tttttttttt tttttttttt tttttc

<210> 40

<211> 19

177	84387	178
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22034		
<400> 40		
ttcaaatacac ttctccaaa		19
<210> 41		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22035		
<400> 41		
ttttggagaa gtgatttgaa		20
<210> 42		
<211> 16		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22050		
<400> 42		
gaatgcgtca acttat		16
<210> 43		
<211> 16		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22051		
<400> 43		
ggaccaagtc attcac		16
<210> 44		
<211> 25		
<212> ДНК		

179	84387	180
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22056		
<400> 44		
gtctgtctgg tagtcattctt cttgg		25
<210> 45		
<211> 25		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22057		
<400> 45		
cttgtggagc tgatagaagt tcagg		25
<210> 46		
<211> 26		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22205		
<400> 46		
agctgttcaa caatgtcaat aaggtg		26
<210> 47		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22206		
<400> 47		
cctcctgatt agacttcgtc acct		24
<210> 48		
<211> 27		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		

181	84387	182
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC9739		
<400> 48		
ccatcctaatacgaactcactatagggc		27
<210> 49		
<211> 23		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC9719		
<400> 49		
actcactatagggctcgagcggc		23
<210> 50		
<211> 25		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC14063		
<400> 50		
caccagacataatagctgacagact		25
<210> 51		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC5020		
<400> 51		
cactggagtggaacttcca g		21
<210> 52		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		

183	84387	184
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22421		
<400> 52		
ctaaaatggc tccttcaaaa		20
<210> 53		
<211> 40		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22604		
<400> 53		
casacaggcc ggccaccatg ggcttcagc ctccggccgc		40
<210> 54		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22641		
<400> 54		
atgcgttggt tctgattgtg		20
<210> 55		
<211> 3072		
<212> ДНК		
<213> м'язи		
<220>		
<221> CDS		
<222> (54).. (491)		
<400> 55		
gagaaccaga ccaaggccct gtcacagct cctggagact cagttctggt ggc atg		56
	Met	
	1	
gag agg acc ctt gtc tgt ctg gta gtc atc ttc ttg ggg aca gtg gcc		104
Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Val Val Ile Phe Leu Gly Thr Val Ala		
5 10 15		

185	84387	186	
cat aaa tca agc ccc caa ggg cca gat cgc ctc ctg att aga ctt cgt			152
His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu Arg			
20	25	30	
cac ctt att gac att gtt gaa cag ctg aaa atc tat gaa aat gac ttg			200
His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp Leu			
35	40	45	
gat cct gaa ctt cta tca gct cca caa gat gta aag ggg cac tgt gag			248
Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys Glu			
50	55	60	65
cat gca gct ttt gcc tgt ttt cag aag gcc aaa ctc aag cca tca aac			296
His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser Asn			
70	75	80	
cct gga aac aat aag aca ttc atc att gac ctc gtg gcc cag ctc agg			344
Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu Arg			
85	90	95	
agg agg ctg cct gcc agg agg gga gga aag aaa cag aag cac ata gct			392
Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile Ala			
100	105	110	
aaa tgc cct tcc tgt gat tgc tat gag aaa agg aca ccc aaa gaa ttc			440
Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu Phe			
115	120	125	
cta gaa aga cta aaa tgg ctc ctt caa aag atg att cat cag cat ctc			488
Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu			
130	135	140	145
tcc tagaacacat aggacccgaa gattcctgag gatccgagaa gattcccag			541
Ser			
gactgaggag acgccggaca ctatagacgc tcacgaatgc aggaqtacal cttgcctctt			601
gggattgcaa gtggagaagt acgatacggt atgataagaa caactcagaa aagctatagg			661
ttaagatcct ttcgccatt aactaagcag acattgtggt tccctgcaca gactccatgc			721
tgtcaacatg gaaaatctca actcaacaag agcccagctt cccgtgtcag qgatttctgg			781
tgcttctcaa gctgtggctt catcttattg cccaactgtg acattctttg attggaaggg			841
gaaaactaaa gcttttagca aaaatacagc tagggaattt gtcgaictgc gagagtaaga			901
cctcttarga tcctaacgga atgatgtaag ctggaaataa taagcataag atgaaattga			961
aaattgaagt ctttattctt taagaaaaac ttigtacttg aaagcatgtc tgaagagttt			1021

187	84387	188				
actcattacc	acaaacatct	agcatattga	taactaacat	ctttatactc	tacaagagag	1081
gctttccaga	taggtacagt	ttttcttctc	tattaggtct	atcaaaattt	aacctattat	1141
gagggtcacc	cctggctttc	actgtttttc	taaagaggca	aggggtgtagt	aagaagcagg	1201
cttaagttgc	cttcctccca	atgtcaagtt	cctttataag	ctaatagttt	aatcttgtag	1261
agatggcaat	gaaagcctgt	ggaagtgcaa	acctcactat	cttctggagc	caagtagaat	1321
tttcaagttt	gtagctctca	cctcaagtgg	ttatgggtgt	cctgtgatga	atctgctagc	1381
tccagcctca	gtctcctctc	ccacatcctt	tcctttcttt	cctctttgaa	acttctaaga	1441
aaaagcaatc	caaacaagtt	cagcacttaa	gacacattgc	atgcacactt	ttgataagtt	1501
aatccaacc	atctatttta	aatcaaaatc	aggagatgag	ccaagagacc	agaggttctg	1561
ttccagtttt	aaacagactt	ttactgaaca	tcccaatctt	ttaaccacag	aggctaaatt	1621
gagcaaatag	ttttgccatt	tgatataatt	tccaacagta	tgtttcaatg	tcaagttaaa	1681
aagtctacaa	agctattttc	cctggagtgg	tatcatcgct	ttgagaattt	cttatggtta	1741
aatggatct	gagatccaag	catggcctgg	gggatggttt	tgatctaagg	aaaaagggtg	1801
ctgtacctca	cagtgccttt	aaaacaagca	gagatcccgt	gtaccgccct	aagatagcac	1861
agactagtgt	taactgattc	ccagaaaagt	gtcacaatca	gaaccaacgc	attctcttaa	1921
actttaaaaa	tatgtattgc	aaagaacttg	tgtaactgta	aatgtgtgac	tgttgatgac	1981
attatacaca	catagcccac	gtaagtgtcc	aatggtgcta	gcattgggtg	ctgagtttgc	2041
tgctcgaaag	ctgaagcaga	gatgcagtcc	ttcacaagc	aatgatggac	agagagggga	2101
gtctccatgt	tttattcttt	tgttgtttct	ggctgtgtaa	ctggtgactt	cttgacattg	2161
tgatttttat	atttaagaca	atgtatttat	tttggtgtgt	ttattgttct	agccttttaa	2221
atcactgaca	atttctaata	aagaagtaca	aataattcaa	tgcagcacag	gctaagagct	2281
tgtatcgttt	ggaaaagcca	gtgaaggctt	ctccactagc	catgggaaag	ctacgcttta	2341
gagtaaacta	gacaaaattg	cacagcagtc	ttgaacctct	ctgtgctcaa	gactcagcca	2401
gtcctttgac	attattgttc	actgtgggtg	ggaacacatt	ggacctgaca	cactgttggtg	2461
tgtccatgaa	ggttgccact	ggtgtaagct	ttttttggtt	ttcattctct	tatctgtaga	2521
acaagaatgt	ggggctttcc	taagtctatt	ctgtatttta	ttctgaactt	cgtatgtctg	2581
agtttttaag	ttttgagtac	tcttacagga	acacctgacc	acacttttga	gttaaatttt	2641
atcccaagtg	tgatatttag	ttgttcaaaa	aggggaaggga	tatacatata	tacatacata	2701
catacatata	tatatatata	tatatatata	tatatatata	tatatatata	tatatatata	2761
tatatataga	gagagagaga	gagagagaga	gagaaagaga	gagaggttgt	tgtaggtcat	2821
aggagttcag	aggaaatcag	ttatggccgt	taatactgta	gctgaaagtg	ttttctttgt	2881
gaataaattc	atagcattat	tgatctatgt	tattgctctg	ttttatttac	agtcacacct	2941
gagaatttag	ttttaatatg	aatgatgtac	tttataactt	aatgattatt	tattatgtat	3001
ttggttttga	atgtttgtgt	tcatggcttc	ttatttaaga	cctgatcata	ttaaagtcta	3061
cccagtcagg	a					3072

<210> 56
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> М'язи

<400> 56
 Met Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Val Val Ile Phe Leu Gly Thr Val
 1 5 10 15

189	84387	190
Ala His Lys Ser Ser Pro Gln Gly	Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu	
20	25	30
Arg His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys	Ile Tyr Glu Asn Asp	
35	40	45
Leu Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp	Val Lys Gly His Cys	
50	55	60
Glu His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser		
65	70	75
Asn Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu		
85	90	95
Arg Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile		
100	105	110
Ala Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu		
115	120	125
Phe Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His		
130	135	140
Leu Ser		
145		

<210> 57
 <211> 34
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC22283

<400> 57
 cgctcgagac catggagagg acccttgtct gtct 34

<210> 58
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC22284

<400> 58
 gctctagaat cttctcggaat cctcaggaat c 31

<210> 59
 <211> 100
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

191	84387	192
<220>		
<223> Олігонуклеотид ZC12749		
<400> 59		
gtaccttccc gtaaattccct ccccttcccg gaattacaca cgcgtatttc ccagaaaagg		6
aactgtagat ttctaggaat tcaatccttg gccacgcgtc		10
<210> 60		
<211> 100		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотид ZC12748		
<400> 60		
tgcgacgcg tggccaagga ttgaattcct agaaatctac agttcctttt ctgggaaata		60
cgcgtgtgta attccgggaa ggggagggat ttacgggaag		100
<210> 61		
<211> 32		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22143		
<400> 61		
cgtatcggcc ggccaccatg agatccagtc ct		32
<210> 62		
<211> 32		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22144		
<400> 62		
cgtacgggcg cgcctcagga atcttcactt cc		32
<210> 63		
<211> 483		
<212> ДНК		

193

84387

194

<213> Людина

<400> 63

tccagtcctg gcaacatgga gaggattgtc atctgtctga tggatcatctt cttggggaca	60
ctgggtccaca aatcaagctc ccaagggtcaa gatcgccaca tgattagaat gcgtcaactt	120
atagatatgg ttgatcagct gaaaaattat gtgaatgact tgggccctga atttctgcca	180
gctccagaag atgtagagac aaactgtgag tggtcagctt ttctctgttt tcagaaggcc	240
caactaaagt cagcaaatc aggaacaat gaaaggataa tcaatgtatc aattaaaaag	300
ctgaagagga aaccaccttc cacaatgca gggagaagac agaaacacag actaacatgc	360
ccttcatgtg attcttatga gaaaaacca ccaaaagaat tcctagaaag attcaaatca	420
cttctccaaa agatgattca tcagcatctg tcctctagaa cacacggaag tgaagattcc	480
tga	483

<210> 64

<211> 57

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22052

<400> 64

tcatataggc cgcccatatg cccgggcgcc accatggatt ccagtcctgg caacatg	57
--	----

<210> 65

<211> 57

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22053

<400> 65

gtacaacccc agagctgttt taaggcgcgc ctctagatca ggaatcttca cttccgt	57
--	----

<210> 66

<211> 32

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер ZC23115

<400> 66

gtatacggcc ggccaccatg gagaggacc tt	32
------------------------------------	----

195	84387	196
<210> 67		
<211> 32		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC23116		
<400> 67		
cgatcggcg cgccttagga gagatgctga tg		32
<210> 68		
<211> 35		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC20892		
<400> 68		
gtatacgttt aaacgscacc atgscgctg gctgg		35
<210> 69		
<211> 32		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC20893		
<400> 69		
cgatcggcg cgccttacaа tggatgggtc tt		32
<210> 70		
<211> 39		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22054		
<400> 70		
cccggggtcg acaccatgga ttccagtcct ggcaacatg		39

197

84387

198

<210> 71

<211> 32

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22055

<400> 71

tgcagtttaa actcaggaat cttcacttcc gt

32

<210> 72

<211> 40

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Пептид Huza1pha11L-1

<400> 72

Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp

1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala

20 25 30

Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys

35 40

<210> 73

<211> 32

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Пептид Huza1pha11L-3

<400> 73

Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu

1 5 10 15

Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser

20 25 30

<210> 74

<211> 29

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

199	84387	200
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC23444		
<400> 74		
gcccgggscg atccatggat tccagtcct		29
<210> 75		
<211> 32		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC23445		
<400> 75		
cgcgccctcg agtcaggaat cttcacttcc gt		32
<210> 76		
<211> 17		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC447		
<400> 76		
taacaatttc acacagg		17
<210> 77		
<211> 18		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC976		
<400> 77		
cgttgtaaaa cgacggcc		18
<210> 78		
<211> 66		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		

201	84387	202
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22128		
<400> 78		
tcaccacgcg aattcggtag cgctggttcc gcgtggatcc caagatcgcc acatgattag		60
aatgcg		66
<210> 79		
<211> 68		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22127		
<400> 79		
tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca tcaggaatct tcacttccgt		60
gtgttcta		68
<210> 80		
<211> 40		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC19372		
<400> 80		
tgatgatgaa gccctgaaag acgscagac taattcgagc		40
<210> 81		
<211> 60		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC19351		
<400> 81		
acgscagac taattcgagc tcccaccatc accatcacca cgcgaattcg gtaccgctgg		60
<210> 82		
<211> 60		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		

203	84387	204
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC19352		
<400> 82		
actcactata gggcgaattg cccgggggat ccacgcgga	ccagcggtag cgaattcgcg	61
<210> 83		
<211> 42		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC19371		
<400> 83		
acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tg		42
<210> 84		
<211> 1560		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1)...(1560)		
<223> zalpha11 поліонуклеотидна маса MBP-людини		
<400> 84		
atg aaa act gaa gaa ggt aaa ctg gta atc tgg att aac ggc gat aaa		48
Met Lys Thr Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys		
1 5 10 15		
ggc tat aac ggt ctc gct gaa gtc ggt aag aaa ttc gag aaa gat acc		
Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr		96
20 25 30		
gga att aaa gtc acc gtt gag cat ccg gat aaa ctg gaa gag aaa ttc		
Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe		144
35 40 45		
cca cag gtt gcg gca act ggc gat ggc cct gac att atc ttc tgg gca		
Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala		192
50 55 60		

205	84387	206	
cac gac cgc ttt ggt ggc tac gct caa tct ggc ctg ttg gct gaa atc			240
His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile			
65	70	75	80
acc ccg gac aaa gcg ttc cag gac aag ctg tat ccg ttt acc tgg gat			288
Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp			
	85	90	95
gcc gta cgt tac aac ggc aag ctg att gct tac ccg atc gct gtt gaa			336
Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu			
	100	105	110
gcg tta tcg ctg att tat aac aaa gat ctg ctg ccg aac ccg cca aaa			384
Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys			
	115	120	125
acc tgg gaa gag atc ccg gcg ctg gat aaa gaa ctg aaa gcg aaa ggt			432
Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly			
	130	135	140
aag agc gcg ctg atg ttc aac ctg caa gaa ccg tac ttc acc tgg ccg			480
Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro			
	145	150	155
ctg att gct gct gac ggg ggt tat gcg ttc aag tat gaa aac ggc aag			528
Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys			
	165	170	175
tac gac att aaa gac gtg ggc gtg gat aac gct ggc gcg aaa gcg ggt			576
Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly			
	180	185	190
ctg acc ttc ctg gtt gac ctg att aaa aac aaa cac atg aat gca gac			624
Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp			
	195	200	205
acc gat tac tcc atc gca gaa gct gcc ttt aat aaa ggc gaa aca gcg			672
Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala			
	210	215	220
atg acc atc aac ggc ccg tgg gca tgg tcc aac atc gac acc agc aaa			720
Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys			
	225	230	235
			240

207	84387	208	
gtg aat tat ggt gta acg gta ctg ccg acc ttc aag ggt caa cca tcc Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser 245 250 255			768
aaa ccg ttc gtt ggc gtg ctg agc gca ggt att aac gcc gcc agt ccg Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro 260 265 270			816
aac aaa gag ctg gca aaa gag ttc ctc gaa aac tat ctg ctg act gat Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp 275 280 285			864
gaa ggt ctg gaa gcg gtt aat aaa gac aaa ccg ctg ggt gcc gta gcg Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala 290 295 300			912
ctg aag tct tac gag gaa gag ttg gcg aaa gat cca cgt att gcc gcc Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala 305 310 315 320			960
acc atg gaa aac gcc cag aaa ggt gaa atc atg ccg aac atc ccg cag Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln 325 330 335			1008
atg tcc gct ttc tgg tat gcc gtg cgt act gcg gtg atc aac gcc gcc Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala 340 345 350			1056
agc ggt cgt cag act gtc gat gaa gcc ctg aaa gac gcg cag act aat Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn 355 360 365			1104
tcg agc tcc cac cat cac cat cac cac gcg aat tcg gta ccg ctg gtt Ser Ser Ser His His His His His His Ala Asn Ser Val Pro Leu Val 370 375 380			1152
ccg cgt gga tcc caa gat cgc cac atg att aga atg cgt caa ctt ata Pro Arg Gly Ser Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile 385 390 395 400			1200
gat att gtt gat cag ctg aaa aat tat gtg aat gac ttg gtc cct gaa Asp Ile Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu 405 410 415			1248

209	84387	210	
ttt ctg cca gct cca gaa gat gta	gag aca aac tgt gag tgg tca gct		1296
Phe Leu Pro Ala Pro Glu Asp Val	Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala		
420	425	430	
ttt tcc tgt ttt cag aag gcc caa cta	aag tca gca aat aca gga aac		1344
Phe Ser Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu	Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn		
435	440	445	
aat gaa agg ata atc aat gta tca att	aaa aag ctg aag agg aaa cca		1392
Asn Glu Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile	Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro		
450	455	460	
cct tcc aca aat gca ggg aga aga cag	aaa cac aga cta aca tgc cct		1440
Pro Ser Thr Asn Ala Gly Arg Arg Gln	Lys His Arg Leu Thr Cys Pro		
465	470	475	480
tca tgt gat tct tat gag aaa aaa cca	ccc aaa gaa ttc cta gaa aga		1488
Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro	Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg		
485	490	495	
ttc aaa tca ctt ctc caa aag atg att	cat cag cat ctg tcc tct aga		1536
Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile	His Gln His Leu Ser Ser Arg		
500	505	510	
aca cac gga agt gaa gat tcc tga			1560
Thr His Gly Ser Glu Asp Ser *			
515			

<210> 85

<211> 519

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Конденсований поліпептид ліганду MBP zalphall людини

<400> 85

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

211					84387					212					
Pro	Gln	Val	Ala	Ala	Thr	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Ile	Ile	Phe	Trp	Ala
50					55					60					
His	Asp	Arg	Phe	Gly	Gly	Tyr	Ala	Gln	Ser	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Ile
65				70					75					80	
Thr	Pro	Asp	Lys	Ala	Phe	Gln	Asp	Lys	Leu	Tyr	Pro	Phe	Thr	Trp	Asp
			85					90					95		
Ala	Val	Arg	Tyr	Asn	Gly	Lys	Leu	Ile	Ala	Tyr	Pro	Ile	Ala	Val	Glu
			100					105					110		
Ala	Leu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Asn	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Asn	Pro	Pro	Lys
			115				120					125			
Thr	Trp	Glu	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	Lys	Glu	Leu	Lys	Ala	Lys	Gly
			130			135					140				
Lys	Ser	Ala	Leu	Met	Phe	Asn	Leu	Gln	Glu	Pro	Tyr	Phe	Thr	Trp	Pro
145				150					155					160	
Leu	Ile	Ala	Ala	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ala	Phe	Lys	Tyr	Glu	Asn	Gly	Lys
			165					170					175		
Tyr	Asp	Ile	Lys	Asp	Val	Gly	Val	Asp	Asn	Ala	Gly	Ala	Lys	Ala	Gly
			180					185					190		
Leu	Thr	Phe	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Lys	Asn	Lys	His	Met	Asn	Ala	Asp
			195				200					205			
Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Ala	Glu	Ala	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Glu	Thr	Ala
			210			215					220				
Met	Thr	Ile	Asn	Gly	Pro	Trp	Ala	Trp	Ser	Asn	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys
225				230					235					240	
Val	Asn	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Pro	Thr	Phe	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser
			245					250					255		
Lys	Pro	Phe	Val	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Gly	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser	Pro
			260				265					270			
Asn	Lys	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu	Leu	Thr	Asp
			275				280					285			
Glu	Gly	Leu	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Ala
			290			295					300				
Leu	Lys	Ser	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Asp	Pro	Arg	Ile	Ala	Ala
305				310					315					320	
Thr	Met	Glu	Asn	Ala	Gln	Lys	Gly	Glu	Ile	Met	Pro	Asn	Ile	Pro	Gln
			325					330					335		
Met	Ser	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ala	Val	Arg	Thr	Ala	Val	Ile	Asn	Ala	Ala
			340					345					350		
Ser	Gly	Arg	Gln	Thr	Val	Asp	Glu	Ala	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	Thr	Asn
			355				360				365				
Ser	Ser	Ser	His	His	His	His	His	His	Ala	Asn	Ser	Val	Pro	Leu	Val
			370			375					380				
Pro	Arg	Gly	Ser	Gln	Asp	Arg	His	Met	Ile	Arg	Met	Arg	Gln	Leu	Ile
385				390					395					400	

213										84387										214									
Asp	Ile	Val	Asp	Gln	Leu	Lys	Asn	Tyr	Val	Asn	Asp	Leu	Val	Pro	Glu														
				405					410					415															
Phe	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Asp	Val	Glu	Thr	Asn	Cys	Glu	Trp	Ser	Ala														
			420					425					430																
Phe	Ser	Cys	Phe	Gln	Lys	Ala	Gln	Leu	Lys	Ser	Ala	Asn	Thr	Gly	Asn														
	435						440					445																	
Asn	Glu	Arg	Ile	Ile	Asn	Val	Ser	Ile	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Pro														
	450				455						460																		
Pro	Ser	Thr	Asn	Ala	Gly	Arg	Arg	Gln	Lys	His	Arg	Leu	Thr	Cys	Pro														
465					470					475				480															
Ser	Cys	Asp	Ser	Tyr	Glu	Lys	Lys	Pro	Pro	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Arg														
			485					490					495																
Phe	Lys	Ser	Leu	Leu	Gln	Lys	Met	Ile	His	Gln	His	Leu	Ser	Ser	Arg														
			500					505					510																
Thr	His	Gly	Ser	Glu	Asp	Ser																							
			515																										

<210> 86
 <211> 64
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC22849

<400> 86	
tcaccacgcg aattcggtag cgctggttcc gcgtggatcc ccagatcgcc tcttgattag	60
actt	64

<210> 87
 <211> 64
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC22850

<400> 87	
tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca ctaggagaga tgctgatgaa	60
tcat	64

<210> 88
 <211> 1533
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

215

84387

216

<220>

<223> Конденсований поліпептид ліганду MBP zalphall мишиний

<221> CDS

<222> (1)...(1533)

<400> 88

atg aaa act gaa gaa ggt aaa ctg gta atc tgg att aac ggc gat aaa	48
Met Lys Thr Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys	
1 5 10 15	
ggc tat aac ggt ctc gct gaa gtc ggt aag aaa ttc gag aaa gat acc	96
Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr	
20 25 30	
gga att aaa gtc acc gtt gag cat ccg gat aaa ctg gaa gag aaa ttc	144
Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe	
35 40 45	
cca cag gtt gcg gca act ggc gat ggc cct gac att atc ttc tgg gca	192
Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala	
50 55 60	
cac gac cgc ttt ggt ggc tac gct caa tct ggc ctg ttg gct gaa atc	240
His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile	
65 70 75 80	
acc ccg gac aaa gcg ttc cag gac aag ctg tat ccg ttt acc tgg gat	288
Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp	
85 90 95	
gcc gta cgt tac aac ggc aag ctg att gct tac ccg atc gct gtt gaa	336
Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu	
100 105 110	
gcg tta tcg ctg att tat aac aaa gat ctg ctg ccg aac ccg cca aaa	384
Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys	
115 120 125	
acc tgg gaa gag atc ccg gcg ctg gat aaa gaa ctg aaa gcg aaa ggt	432
Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly	
130 135 140	

217	84387	218	
aag agc gcg ctg atg ttc aac ctg caa gaa ccg tac ttc acc tgg ccg			480
Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro			
145	150	155	160
ctg att gct gct gac ggg ggt tat gcg ttc aag tat gaa aac ggc aag			528
Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys			
	165	170	175
tac gac att aaa gac gtg ggc gtg gat aac gct ggc gcg aaa gcg ggt			576
Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly			
	180	185	190
ctg acc ttc ctg gtt gac ctg att aaa aac aaa cac atg aat gca gac			624
Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp			
	195	200	205
acc gat tac tcc atc gca gaa gct gcc ttt aat aaa ggc gaa aca gcg			672
Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala			
	210	215	220
atg acc atc aac ggc ccg tgg gca tgg tcc aac atc gac acc agc aaa			720
Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys			
	225	230	235
gtg aat tat ggt gta acg gta ctg ccg acc ttc aag ggt caa cca tcc			768
Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser			
	245	250	255
aaa ccg ttc gtt ggc gtg ctg agc gca ggt att aac gcc gcc agt ccg			816
Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro			
	260	265	270
aac aaa gag ctg gca aaa gag ttc ctc gaa aac tat ctg ctg act gat			864
Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp			
	275	280	285
gaa ggt ctg gaa gcg gtt aat aaa gac aaa ccg ctg ggt gcc gta gcg			912
Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala			
	290	295	300
ctg aag tct tac gag gaa gag ttg gcg aaa gat cca cgt att gcc gcc			960
Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala			
	305	310	315
			320

219	84387	220	
acc atg gaa aac gcc cag aaa ggt gaa atc atg ccg aac atc ccg cag			1008
Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln			
325	330	335	
atg tcc gct ttc tgg tat gcc gtg cgt act gcg gtg atc aac gcc gcc			1056
Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala			
340	345	350	
agc ggt cgt cag act gtc gat gaa gcc ctg aaa gac gcg cag act aat			1104
Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn			
355	360	365	
tcg agc tcc cac cat cac cat cac cac gcg aat tcg gta ccg ctg gtt			1152
Ser Ser Ser His His His His His His Ala Asn Ser Val Pro Leu Val			
370	375	380	
ccg cgt gga tcc cca gat cgc ctc ctg att aga ctt cgt cac ctt att			1200
Pro Arg Gly Ser Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu Arg His Leu Ile			
385	390	395	400
gac att gtt gaa cag ctg aaa atc tat gaa aat gac ttg gat cct gaa			1248
Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp Leu Asp Pro Glu			
405	410	415	
ctt cta tca gct cca caa gat gta aag ggg cac tgt gag cat gca gct			1296
Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys Glu His Ala Ala			
420	425	430	
ttt gcc tgt ttt cag aag gcc aaa ctc aag cca tca aac cct gga aac			1344
Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser Asn Pro Gly Asn			
435	440	445	
aat aag aca ttc atc att gac ctc gtg gcc cag ctc agg agg agg ctg			1392
Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu Arg Arg Arg Leu			
450	455	460	
cct gcc agg agg gga gga aag aaa cag aag cac ata gct aaa tgc cct			1440
Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile Ala Lys Cys Pro			
465	470	475	480
tcc tgt gat tcg tat gag aaa agg aca ccc aaa gaa ttc cta gaa aga			1488
Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg			
485	490	495	

221	84387	222	
cta aaa tgg ctc ctt caa aag atg att cat cag cat ctc tcc tga			1533
Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser *			
500	505	510	

<210> 89
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Конденсований поліпептид ліганду MBP zalpha11 мишачий

<400> 89

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

225	84387	226
<210> 91		
<211> 23		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22279		
<400> 91		
aacaggaaaa agctgaccac tca		23
<210> 92		
<211> 31		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Зонд TagMan ліганду zalpha11 людини, ZG32		
<400> 92		
tctgccagct ccaagaatg tagagaaaa c		31
<210> 93		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22277		
<400> 93		
ccaggagtgt ggcagctttc		20
<210> 94		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22276		
<400> 94		
gcttgccctt cagcatgtag a		21

227	84387	228
<210> 95		
<211> 23		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Зонд TagMan zalpha11 людини, ZG31		
<400> 95		
cggctccccc tttcaacgtg act		23
<210> 96		
<211> 1821		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1)...(1821)		
<223> Полінуклеотидна послідовність розчинного рецептору MBP- zalpha11		
<400> 96		
atg aaa atc gaa gaa ggt aaa ctg gta atc tgg att aac ggc gat aaa		48
Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys		
1 5 10 15		
ggc tat aac ggt ctc gct gaa gtc ggt aag aaa ttc gag aaa gat acc		96
Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr		
20 25 30		
gga att aaa gtc acc gtt gag cat ccg gat aaa ctg gaa gag aaa ttc		144
Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe		
35 40 45		
cca cag gtt gcg gca act ggc gat ggc cct gac att atc ttc tgg gca		192
Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala		
50 55 60		
cac gac cgc ttt ggt ggc tac gct caa tct ggc ctg ttg gct gaa atc		240
His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile		
65 70 75 80		

229	84387	230	
acc ccg gac aaa gcg ttc cag gac aag ctg tat ccg ttt acc tgg gat			288
Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp			
85	90	95	
gcc gta cgt tac aac ggc aag ctg att gct tac ccg atc gct gtt gaa			336
Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu			
100	105	110	
gcg tta tcg ctg att tat aac aaa gat ctg ctg ccg aac ccg cca aaa			384
Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys			
115	120	125	
acc tgg gaa gag atc ccg gcg ctg gat aaa gaa ctg aaa gcg aaa ggt			432
Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly			
130	135	140	
aag agc gcg ctg atg ttc aac ctg caa gaa ccg tac ttc acc tgg ccg			480
Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro			
145	150	155	160
ctg att gct gct gac ggg ggt tat gcg ttc aag tat gaa aac ggc aag			528
Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys			
165	170	175	
tac gac att aaa gac gtg ggc gtg gat aac gct ggc gcg aaa gcg ggt			576
Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly			
180	185	190	
ctg acc ttc ctg gtt gac ctg att aaa aac aaa cac atg aat gca gac			624
Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp			
195	200	205	
acc gat tac tcc atc gca gaa gct gcc ttt aat aaa ggc gaa aca gcg			672
Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala			
210	215	220	
atg acc atc aac ggc ccg tgg gca tgg tcc aac atc gac acc agc aaa			720
Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys			
225	230	235	240
gtg aat tat ggt gta acg gta ctg ccg acc ttc aag ggt caa cca tcc			768
Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser			
245	250	255	

231	84387	232	
aaa ccg ttc gtt ggc gtg ctg agc gca ggt att aac gcc gcc agt ccg Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro			816
260	265	270	
aac aaa gag ctg gca aaa gag ttc ctc gaa aac tat ctg ctg act gat Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp			864
275	280	285	
gaa ggt ctg gaa gcg gtt aat aaa gac aaa ccg ctg ggt gcc gta gcg Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala			912
290	295	300	
ctg aag tct tac gag gaa gag ttg gcg aaa gat cca cgt att gcc gcc Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala			960
305	310	315	320
acc atg gaa aac gcc cag aaa ggt gaa atc atg ccg aac atc ccg cag Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln			1008
325	330	335	
atg tcc gct ttc tgg tat gcc gtg cgt act gcg gtg atc aac gcc gcc Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala			1056
340	345	350	
agc ggt cgt cag act gtc gat gaa gcc ctg aaa gac gcg cag act aat Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn			1104
355	360	365	
tcg agc tcc cac cat cac cat cac cac gcg aat tcg gta ccg ctg gtt Ser Ser Ser His His His His His His Ala Asn Ser Val Pro Leu Val			1152
370	375	380	
ccg cgt gga tcc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag Pro Arg Gly Ser Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln			1200
385	390	395	400
acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu			1248
405	410	415	
acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr			1296
420	425	430	

233	84387	234	
tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac			1344
Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr			
435	440	445	
acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt			1392
Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser			
450	455	460	
gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc			1440
Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser			
465	470	475	480
ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act			1488
Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr			
485	490	495	
gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa			1536
Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu			
500	505	510	
gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag			1584
Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln			
515	520	525	
tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg			1632
Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu			
530	535	540	
atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc			1680
Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg			
545	550	555	560
aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc			1728
Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly			
565	570	575	
tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt			1776
Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe			
580	585	590	
cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac cct cac tag			1821
Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His *			
595	600	605	

235

84387

236

<210> 97

<211> 606

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Поліпептидин послідовності розчинного рецептору MBP-zalpha11

<400> 97

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

237					84387					238					
Glu	Gly	Leu	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Ala
290						295					300				
Leu	Lys	Ser	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Asp	Pro	Arg	Ile	Ala	Ala
305				310						315					320
Thr	Met	Glu	Asn	Ala	Gln	Lys	Gly	Glu	Ile	Met	Pro	Asn	Ile	Pro	Gln
			325						330					335	
Met	Ser	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ala	Val	Arg	Thr	Ala	Val	Ile	Asn	Ala	Ala
			340					345					350		
Ser	Gly	Arg	Gln	Thr	Val	Asp	Glu	Ala	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	Thr	Asn
	355					360					365				
Ser	Ser	Ser	His	His	His	His	His	His	Ala	Asn	Ser	Val	Pro	Leu	Val
370						375					380				
Pro	Arg	Gly	Ser	Cys	Pro	Asp	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Asp	Tyr	Leu	Gln
385				390						395					400
Thr	Val	Ile	Cys	Ile	Leu	Glu	Met	Trp	Asn	Leu	His	Pro	Ser	Thr	Leu
			405						410					415	
Thr	Leu	Thr	Trp	Gln	Asp	Gln	Tyr	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	Glu	Ala	Thr
			420					425					430		
Ser	Cys	Ser	Leu	His	Arg	Ser	Ala	His	Asn	Ala	Thr	His	Ala	Thr	Tyr
	435					440						445			
Thr	Cys	His	Met	Asp	Val	Phe	His	Phe	Met	Ala	Asp	Asp	Ile	Phe	Ser
	450				455						460				
Val	Asn	Ile	Thr	Asp	Gln	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Gln	Glu	Cys	Gly	Ser
465				470						475					480
Phe	Leu	Leu	Ala	Glu	Ser	Ile	Lys	Pro	Ala	Pro	Pro	Phe	Asn	Val	Thr
			485						490					495	
Val	Thr	Phe	Ser	Gly	Gln	Tyr	Asn	Ile	Ser	Trp	Arg	Ser	Asp	Tyr	Glu
			500				505						510		
Asp	Pro	Ala	Phe	Tyr	Met	Leu	Lys	Gly	Lys	Leu	Gln	Tyr	Glu	Leu	Gln
	515					520						525			
Tyr	Arg	Asn	Arg	Gly	Asp	Pro	Trp	Ala	Val	Ser	Pro	Arg	Arg	Lys	Leu
	530					535					540				
Ile	Ser	Val	Asp	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	Leu	Glu	Phe	Arg
545				550						555					560
Lys	Asp	Ser	Ser	Tyr	Glu	Leu	Gln	Val	Arg	Ala	Gly	Pro	Met	Pro	Gly
			565						570				575		
Ser	Ser	Tyr	Gln	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Asp	Pro	Val	Ile	Phe
			580					585					590		
Gln	Thr	Gln	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Trp	Asn	Pro	His		
	595					600						605			

<210> 98

<211> 65

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

239	84387	240
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC20187		
<400> 98		
tcaccacgcg aattcggtag cgctggttcc gcgtggatcc tgccccgacc tcgtctgcta		60
caccg		65
<210> 99		
<211> 68		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC20185		
<400> 99		
tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca ctagtgaggg ttccagcctt		60
cctttaac		68
<210> 100		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22452		
<400> 100		
tcttcttggg gacactggtc c		21
<210> 101		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22451		
<400> 101		
aatcatgtgg cgaatcttqac c		21
<210> 102		
<211> 21		
<212> ДНК		

241	84387	242
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22450		
<400> 102		
сagactaaca tgcccttcat g		21
<210> 103		
<211> 23		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC22449		
<400> 103		
ttcacttccg tgtgttctag agg		23
<210> 104		
<211> 18		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC23771		
<400> 104		
accaccttcc acaaatgc		18
<210> 105		
<211> 1347		
<212> ДНК		
<213> Людина		
<400> 105		
gaattcaccc attctctctt tttcctgtca aagatgcaga tggggcacat ttcgttgact		60
ccatcaatcc ctgccccac acattagcac atgcacacgt atacctagcc agtggaaaag		120
aaaaaagagt tactcacati catccatitt acaaagattt ccagggtgca atgggagggc		180
tttacctctc cctgaaggat gaataaatag gtagcttaac tgacaacctg ttctcagtca		240
agctgaagtg aaaacgagac caaggtctag ctctactggt ggtacttatg agatccagtc		300
ctggcaacat ggagaggatt gtcattctgtc tgatggtcac cttcttgggg aactggtcc		360
acaaatcaag ctcccaaggc caagatcgcc acatgattag aatgcgtcaa cttatagata		420
ttgttgatca gctgaaaaat tatgtgaatg acttggttaag actatatitg tcacaacaaa		480
atctaaatca tacttttcaa ttaatatataa aggagggttt ggcttataaa aataactcag		540

243	84387	244				
aacaaatttt	cttttgctct	aggtccctga	atctctgcca	gctccagaag	atgtagaggt	600
aagaccagtt	gaatttat	ctgaaaatac	attggacata	agtttttaaa	tccaataaga	660
aagacattag	catgattata	taggagtata	ctgaatttta	atgaacttag	cggtctaata	720
attgatgaaa	tatttat	tattttggtt	aaattcattg	atttaccaaa	aaccaactaa	780
aaaatgctat	atttatattcc	tcataaacta	tgtttatctt	caagaatctc	taagagtact	840
cctaagtagt	attgctgaga	cagaataaca	aaactagaaa	cgaaatctat	actctgatca	900
gtttctgaac	aatgcacagc	tagttactct	ttaagagccc	ttgggcatga	aagcttttga	960
gccttctttg	ttatcctacc	gaagaaacat	agatacatac	agtaggaagc	agaattaacc	1020
ttttaataac	aaacttaaaa	aagaaagaaa	gaaagaatta	gattacaggg	acagcatgga	1080
gaaatggtgg	tgtggaaatc	aaagctgtcc	tttagaatat	aattcacata	taccttggcc	1140
tcagtgagtc	ttgtctttgg	ccttccgtga	ggtcttttga	aagaaccatt	ttcaacaatt	1200
catcccgtct	cttaagccat	ttaaatccat	tagagttcca	ggaagaagag	gcctggcatg	1260
agttcagagt	gctgtcccg	tgatcttttt	ctcagtaact	tctacgatct	gatcttctgg	1320
tctggtaccc	tgaggtataa	atgcaat				1347

<210> 106
 <211> 1656
 <212> ДНК
 <213> Людина

<400> 106						
cctcaactgc	ttgattcagg	cagaatccta	accctaaact	gagctgggag	tatgaaaagg	60
gttttagaaa	agtcattgtg	tgatctatgg	caagtataat	gattcttaga	tgtaaaatat	120
gctatcagag	ggaggtaccc	acttcccttc	tccaaaggag	gggctttaat	tcattttctt	180
catctgttaa	ctttacaaat	atatgttgat	cattaactgg	caagacacta	tgcttgccgc	240
tgtacagaat	aaaatgctgc	tcaagacatg	tcattgataga	tacattaaca	gaaaccacaa	300
acaaatgaaa	aatgttcttc	atcagactat	aacataattt	acccaaagct	gccactagtc	360
acagtgtaa	tttttagagcc	tcataactca	gcaaattgtg	cctaaaccga	actaactctc	420
ctttataaaa	cacaaaggtc	ttgtccacca	cccagacatc	aaaatggtcc	tctgtgtagc	480
atcaggaata	aagcattgtg	aagaagttag	gctcctttct	ctcttatctg	cgaagcaggg	540
gattgtccct	ttttcccatc	ccaaagatta	agtaggaggt	gaaatcatac	ctcactcatc	600
tggtgaaacg	atgtaatgca	cgacattgca	gaagagatag	aaatagagga	ttgggaaagc	660
tatcttttac	tttctgaata	atgtttgtta	acatatatac	aaattgttta	tccttcagac	720
aaactgtgag	tggtcagctt	tttctgtttt	tcagaaggcc	caactaaagt	cagcaaatat	780
aggaaacaat	gaaaggataa	taaatgtatc	aattaaaaag	ctgaagagga	aaccaccttc	840
cacaaatgca	gggagaaagac	agaaacacag	actagtaaga	ttgtcatttg	tcattctctt	900
tatttgtact	tataaactat	atatcttgca	ttacataaac	atacacacac	acctgtagcc	960
agggctgctg	gtgtcttctt	tacctatagt	tatgccttat	tatacatggt	gctttttttt	1020
tttaagacag	agtctcactc	tgtcacccag	gctggagtgc	agtggcgtga	lctctgctca	1080
ccgcaagatc	cacctcccgg	ttlcacgcca	ttctcctcct	acctcagcct	cctgaglace	1140
tgggactaca	ggtgcccgcc	accatgcccg	gctaattttg	tttttgattt	tttagtaaa	1200
acagggtttc	accatgttag	ccaggatggg	ctcgatctcc	tgaccccggt	atccgcccgc	1260
cttggcctcc	caaagtgtgg	ggattacagg	catgagccac	cgcacccggc	ctatacgtgg	1320
tgcattttaa	gaagttaggg	cactctttta	agccacacaga	cttgaaagta	ttcaaaaacc	1380
caattataat	ttcctagtag	tccttggcag	ctggaatatg	ttaatatagc	ttctcaagg	1440

245	84387	246	
gaggaagtca	ttaggcagag	aatccaactg	tgattttgga
atattggtcac	agataacttg	tattcttatt	aacaggagct
gaaaagagcc	tacaagaaga	ctagggcaaa	tcttaaaactt
ttactatctg	tacatcagca	gagtcagtat	tgaatt
			1500
			1560
			1620
			1656

<210> 107
 <211> 644
 <212> ДНК
 <213> Людина

<400> 107	
agctaaactt	agaactctcc
ctacaaagga	gttaagtcac
aacgtatatac	tactatcttt
atgctaacta	ccaagcaatg
ataaactaag	aaagcttttt
atctccctag	taatcacata
aacatttttaa	acaataccct
tttataatgt	atatcaaagc
aggaatatat	caaataagca
agtaatgtag	acaaaaataa
tcccagcact	ttgggaggcc
	gaggcaggcg
	gattcatctta
	tagatgagga
	aaagtgagat
	taggtcagaa
	tgagaattag
	tggcattgag
	ctctcactac
	aacatcacac
	tggtatgag
	gcttggtgtt
	tggatctaaa
	tagggataaa
	gacaaagagc
	gtgagcaatc
	catatatgaa
	aaactgttca
	aaaacaagga
	aatcctgttt
	tttccaatta
	gaatgtcca
	agtgaaaaga
	ggtaaaaccc
	ttatcccttt
	aatttagtaa
	ttctacttct
	tgaaaaatta
	tttacagaga
	tgttcttttg
	gtggtggctc
	atgcctgtat
	gatc
	60
	120
	180
	240
	300
	360
	420
	480
	540
	600
	644

<210> 108
 <211> 645
 <212> ДНК
 <213> Людина

<220>
 <221> м'язи
 <222> (1)...(645)
 <223> n = A,T,C or G

<400> 108	
aaaaaaaaaa	aaaaaaataa
cctatgtgga	aacagacca
gaaatcctgt	gatatgttaa
atgtaaatgc	acaataataa
attgcagtgg	gattcctatc
tccaaacagt	tttatgtact
gaaaaaaaat	tttaagaaac
ttcattgatt	tctagacatg
ttcctagaaa	gattcaaatc
tctgctttat	ctttacctat
cagatgattc	atcagcatct
	ccnttggtgc
	caaaaatagt
	aagagtgcac
	gaagattatt
	taacacttag
	atcaccaact
	ggtataaata
	acattaaaac
	gactttttcc
	atlgltacll
	acataattta
	tgtttttaat
	ttaaagaaga
	ctgttacttt
	agaaaaaacc
	acccaaagaa
	ccttaagtgt
	catttgattt
	ctcacggtat
	actatitcca
	gtgaa
	60
	120
	180
	240
	300
	360
	420
	480
	540
	600
	645

247

84387

248

<210> 109

<211> 36

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер ZC25970

<400> 109

atgcattcta gactaggaga gatgctgatg aatcat

36

<210> 110

<211> 36

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігонуклеотидний праймер ZC25969

<400> 110

atgcattccg gacataaatc aagcccccса gggcca

36

<210> 111

<211> 153

<212> PRT

<213> Людина

<400> 111

Met	Tyr	Arg	Met	Gln	Leu	Leu	Ser	Cys	Ile	Ala	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu
1				5					10					15	
Val	Thr	Asn	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu
			20					25					30		
Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile
		35					40					45			
Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe
	50					55				60					
Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu
65					70					75				80	
Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys
				85					90					95	
Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile
			100					105						110	
Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala
			115				120					125			

249					84387					250					
Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe
130					135					140					
Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr							
145					150										

<210> 112
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Людина

<400> 112

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

<210> 113
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> Людина

<400> 113

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

251					84387					252					
Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile
50						55					60				
Gln	Ser	Met	His	Ile	Asp	Ala	Thr	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ser	Asp	Val	His
65					70					75				80	
Pro	Ser	Cys	Lys	Val	Thr	Ala	Met	Lys	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Leu	Gln
				85					90					95	
Val	Ile	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Asp	Ala	Ser	Ile	His	Asp	Thr	Val	Glu
			100					105					110		
Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Val
		115					120					125			
Thr	Glu	Ser	Gly	Cys	Lys	Glu	Cys	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ile
	130					135					140				
Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Val	His	Ile	Val	Gln	Met	Phe	Ile	Asn
145					150					155					160
Thr	Ser														

<210> 114
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Людини

<400> 114															
Met	Trp	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Val	Ala	Cys	Ser	Ile
1				5					10					15	
Ser	Ala	Pro	Ala	Arg	Ser	Pro	Ser	Pro	Ser	Thr	Gln	Pro	Trp	Glu	His
			20					25					30		
Val	Asn	Ala	Ile	Gln	Glu	Ala	Arg	Arg	Leu	Leu	Asn	Leu	Ser	Arg	Asp
		35					40					45			
Thr	Ala	Ala	Glu	Met	Asn	Glu	Thr	Val	Glu	Val	Ile	Ser	Glu	Met	Phe
	50					55					60				
Asp	Leu	Gln	Glu	Pro	Thr	Cys	Leu	Gln	Thr	Arg	Leu	Glu	Leu	Tyr	Lys
65					70					75				80	
Gln	Gly	Leu	Arg	Gly	Ser	Leu	Thr	Lys	Leu	Lys	Gly	Pro	Leu	Thr	Met
				85					90					95	
Met	Ala	Ser	His	Tyr	Lys	Gln	His	Cys	Pro	Pro	Tnr	Pro	Glu	Thr	Ser
			100					105					110		
Cys	Ala	Thr	Gln	Ile	Ile	Thr	Phe	Glu	Ser	Phe	Lys	Glu	Asn	Leu	Lys
		115					120					125			
Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Ile	Pro	Phe	Asp	Cys	Trp	Glu	Pro	Val	Gln	Glu
	130					135					140				

<210> 115
 <211> 538
 <212> PRT

<213> Людини

<400> 115

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

255	84387	256
Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp		
340	345	350
Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp		
355	360	365
Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala		
370	375	380
Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro		
385	390	395
Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp		
405	410	415
Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser		
420	425	430
Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg		
435	440	445
Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro		
450	455	460
Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser		
465	470	475
Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly		
485	490	495
Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp		
500	505	510
Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro		
515	520	525
Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser		
530	535	

	1	15 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90
hIL-2	-----	-----	APTSSSTKK	TQLQLEHLLDLQMLNGINNYKN	-----	---PKLTRMLTFKFY	MPKKATE---LKHLO
hIL-15	-----	AGIH	VFILGCFSAGLPKTE	ANWVNVISDLKKI-EDLIQSMHIDAT	-----	---LY	TESOVHPSCKVTAMK
zall-L1g	-----	-----	SSSQGDRHMIRM	ROLIDIVDQLKNYVNLVPEF	-----	---LP	APEDVETNCEWSAFS
hIL-4	-----	-----	HKCD-	ITLQEIITLNSLTEQKTLCTELTYTDI	-----	---FA	ASKNTTE---KETF
mIL-4	-----	-----	HIHGCDK	NHLREIIGILNEVTGEGTPCTEMDVPNV	-----	---LT	ATKNTTE---SELV
HGM-CSF	-----	-----	SPSPSTOPWEHV	NAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETV	-----	---E	VISEMFO---LQEPY
mGM-CSF	-----	-----	IIVTRPWKHV	EAIKEALNLDMPVTL---NEEV	-----	---E	VVSNEFS---FKKLT
	91	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180
hIL-2	CLCEELKPLEEVNL	AQSKNFHLRPRDLIS	NINVIVLGLKGSE	-----	-----	---TTFMCE-	YADETATIVFELNRW
hIL-15	CFLELOVISLESQ	ASIHDTVENLIILAN	NSLSSNGNVTESG	-----	-----	---CKECEE	LEEK--NIKEFLOSF
zall-L1g	CFQKAQLKSANTGNN	ERIINVSIKLKRKP	PSTNAGRRQKHRL	-----	-----	---TCPSCDS	YEKK--PPKEFLERF
hIL-4	CRAATVLRQFYSHNE	KDTRCLGATAQOFHR	HKQLIRFLKRLDRNLWGLAGL	-----	-----	---NSCPV	KEANQSTLENFLERL
mIL-4	CRASKVLRIFYKXHG	K-TPCLKKNSSVLME	LQRLFRFRGLDS	-----	-----	---SISCTM	NEKSTSLKDFLESL
HGM-CSF	CLOTRLELYKQGLRG	SLTKLKGPLTMASH	YKQHCPTPE	-----	-----	---TSCA-	--TQIITFESFKENL
mGM-CSF	CVQTRLKIFEQGLRG	NFTKLKGALNMTASY	YQTYCPPTPE	-----	-----	---TDCE-	--TQVTTYADFIDSL
hIL-2	ITFCQSIIISTL	132					
hIL-15	VHIVQMFINTS1	134					
zall-L1g	KSLLOKMIHHLSSR	THGSEDS	136				
hIL-4	KTIMREKYSKCSS	129					
mIL-4	KSIMQMDYS	120					
HGM-CSF	KDFLLVIPFDC--WE	119					
mGM-CSF	KTFLLTQIPFEC--KK	PSQK	118				

