



УКРАЇНА

(19) UA (11) 84830 (13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 15/09

A61K 38/00

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 29/00

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) РОЗЧИННИЙ РЕЦЕПТОР ІНТЕРЛЕЙКІНУ-20

1

2

(21) 2002075992

(22) 22.12.2000

(24) 10.12.2008

(86) PCT/US00/35307, 22.12.2000

(31) 09/471,774

(32) 23.12.1999

(33) US

(31) 60/213,416

(32) 22.06.2000

(33) US

(46) 10.12.2008, Бюл.№ 23, 2008 р.

(72) ФОСТЕР ДОНАЛД К., ЗУ ВЕНФЕНГ, МЕД-ДЕН КАРЕН Л., КЕЛЛІ ДЖЕЙМС Д., СПРІЧЕР СІН-ДІ А., БРАНДТ КАМЕРОН С., РІКСОН МАРК У., ПРЕСНЕЛЛ СКОТТ Р., ФОКС БРАЙЯН А.

(73) ЗАЙМОДЖЕНЕТИКС, ІНК.

(56) WO9903982 A, 28.01.99.

WO0039161 A, 06.07.2000.

US5945511 A, 31.08.99.

WO9946281 A, 19.09.99.

WO9946379 A, 16.09.99.

WO9961630 A, 02.12.99.

WO9937772 A, 26.07.99.

(57) 1. Виділений розчинний рецептор IL-20, що включає субодиницю IL-20RA та субодиницю IL-20RB, ковалентно зв'язані разом поліпептидним лінкером або дисульфідним зв'язком, в якому субодиниця IL-20RA являє собою поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 12, 38, 55, 63 і 65, а субодиниця IL-20RB являє собою поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 15, 59, 61, 67, 68 і 69.

2. Розчинний рецептор за п. 1, в якому субодиниця IL-20RA та субодиниця IL-20RB зв'язані разом поліпептидним лінкером.

3. Розчинний рецептор за п. 2, в якому поліпептидний лінкер має приблизно 100-240 амінокислотних залишків.

4. Розчинний рецептор за п. 3, в якому поліпептидний лінкер має приблизно 170 амінокислотних залишків.

5. Розчинний рецептор за п. 1, в якому субодиниця IL-20RA і субодиниця IL-20RB, кожна, мають поліпептидний лінкер, злитий з цією субодиницею, а кожний з поліпептидних лінкерів має принаймні один цистеїновий залишок, причому з цистеїном від поліпептидного лінкера субодиниці IL-20RA та з цистеїном від поліпептидного лінкера субодиниці IL-20RB утворений принаймні один дисульфідний зв'язок.

6. Розчинний рецептор за п. 5, в якому субодиниця IL-20RA злита з усією константною зоною або з ділянкою константної зони важкого ланцюга молекули імуноглобуліну, а субодиниця IL-20RB злита з усією константною зоною або з ділянкою константної зони легкого ланцюга молекули імуноглобуліну, а легкий ланцюг та важкий ланцюг зв'язані один з одним дисульфідним зв'язком.

7. Розчинний рецептор за п. 6, в якому константна зона важкого ланцюга складається з домену CH1, домену CH2 та шарнірної послідовності, яка з'єднує домен CH1 з доменом CH2.

8. Розчинний рецептор за п. 6, в якому субодиниця IL-20RA, злита з константною зоною важкого ланцюга, є амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 23, 53, 54 і 62, а субодиниця IL-20RB, злита з константною зоною легкого ланцюга молекули імуноглобуліну, є амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 21, 57, 58 і 60.

9. Розчинний рецептор за п. 5, в якому субодиниця IL-20RB злита з усією константною зоною або з ділянкою константної зони важкого ланцюга молекули імуноглобуліну, а субодиниця IL-20RA злита з усією константною зоною або з ділянкою константної зони легкого ланцюга молекули імуноглобуліну, а легкий ланцюг та важкий ланцюг зв'язані один з одним дисульфідним зв'язком.

(13) C2

(11) 84830

(19) UA

10. Розчинний рецептор за п. 1, в якому субодиниці IL-20RA та IL-20RB зв'язані дисульфідним зв'язком і в якому перша субодиниця є поліпептидом з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 53 і 54, а друга субодиниця є поліпептидом з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 57 і 58.

11. Розчинний рецептор за п. 1, в якому субодиниці IL-20RA та IL-20RB зв'язані дисульфідним зв'язком і в якому перша субодиниця є поліпептидом з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 23 і 62, а друга субодиниця є поліпептидом з амінокислотною

послідовністю, вибраною з групи, що складається з SEQ ID NO: 21 і 60.

12. Розчинний рецептор за п. 9, в якому константна зона важкого ланцюга містить CH1 домен, CH2 домен і шарнірну послідовність, яка їх зв'язує.

13. Розчинний рецептор за п. 1, який являє собою мультимерний, гетеродимерний або гетеротетрамерний рецепторний комплекс.

14. Розчинний рецептор за п. 1, який є глікозилізованим або містить мітку спорідненості.

15. Розчинний рецептор за п. 14, в якому міткою спорідненості є білок, зв'язуючий мальтозу, або домен імуноглобуліну.

Цитокіни - це розчинні білки, які впливають на ріст та диференціювання багатьох типів клітин. Їхні рецептори складаються з одного або більше білків з цілісною мембраною, які зв'язують високоафінний цитокін та трансдукують цей акт зв'язування до клітини через цитоплазматичні ділянки конкретних субодиниць рецептора. Рецептори цитокіну було згруповано в декілька класів на основі подібностей їхніх позаклітинних доменів зв'язування ліганду. Наприклад, ланцюги рецептора, які відповідають за зв'язування та/або трансдукцію ефекту інтерферонів, є членами сімейства рецепторів цитокіну типу II (CPC2), яке базується на позаклітинному домені з характерним залишком 200. Виявлена *in vivo* активність цих інтерферонів показує величезний клінічний потенціал та необхідність інших цитокінів, речовин, що мають спорідненість до цитокіну та речовин-антагоністів цитокіну. Деякі цитокіни утягнуті в ряд запальних процесів і можуть провокувати такі хвороби, як ревматоїдний артрит, хворобу Крона, псоріаз, порок серця і т.д. Отже, існує необхідність виявлення цитокінів та їхніх рецепторів, які беруть участь у виникненні запалення. Потім можна буде використовувати такі виділені розчинні рецептори цитокіну для інгібування запалення, посередником якого є цитокін.

Фіг.1-8 - схематичні зображення різних варіантів розчинного рецептора, запропонованого даним винаходом.

Виходячи із згаданої необхідності, даний винахід пропонує нещодавно виявлений розчинний рецептор до інтерлейкіну-20 (IL-20). Цей розчинний рецептор можна застосовувати для знижуючого регулювання IL-20 і, таким чином, лікування хвороб, що протікають із запаленням, наприклад псоріазу та запалення легень.

IL-20 раніше мав назву "Zcyto 10" [міжнародна патентна заявка № WO 99/27103] і містить амінокислотні послідовності SEQ ID NOs: 1-9. Рецептор до IL-20 складається з двох ланцюгів, альфа-ланцюга і бета-ланцюга. Альфа-ланцюг, надалі іменований IL-20RA, раніше мав назву Zcyto R7 [патент США №5945511]. Бета-ланцюг, надалі іменований IL-20RB, раніше мав назву DIRS1 [міжнародна патентна заявка № PCT/US 99/03735]. Даний винахід пропонує розчинний рецептор, який

складається з позаклітинного домену IL-20RA та позаклітинного домену IL-20RB.

Даний винахід стосується виділеного розчинного рецептора, що складається з субодиниці "IL-20RA" та субодиниці "IL-20RB", де субодиниця IL-20RA являє собою поліпептид з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, що складається з SEQ ID NOs: 12, 38, 55, 63 і 65, а субодиниця IL-20RB являє собою поліпептид з амінокислотною послідовністю, вибраною з групи, що складається з SEQ ID NOs: 15, 59, 61, 67, 68 і 69. Субодиниці IL-20RA та IL-20RB зазвичай зв'язані разом за допомогою поліпептидного лінкера. Зв'язування можна здійснювати будь-яким способом, але, як правило, це пептидний зв'язок або дисульфідний зв'язок між поліпептидом, з'єднаним з субодиницею IL-20RA, та поліпептидом, з'єднаним з субодиницею IL-20RB. Об'єктом даного винаходу є також виділені поліпептиди, які кодують нові поліпептиди IL-20RA та IL-20RB, запропоновані даним винаходом.

В одному варіанті субодиниця IL-20RA злита з константною зоною важкого ланцюга молекули імуноглобуліну (Ig) або з ділянкою константної зони, а субодиниця IL-20RB злита з константною зоною легкого ланцюга молекули Ig таким чином, що константна зона легкого ланцюга дисульфідно зв'язана з константною зоною важкого ланцюга, як правило з цистеїновим залишком в шарнірній зоні важкого ланцюга. Може бути навпаки: субодиниця IL-20RA може бути зливою з константною зоною легкого ланцюга молекули Ig, а субодиниця IL-20RB може бути зливою з константною зоною важкого ланцюга молекули Ig.

В ще одному варіанті запропонованого розчинного рецептора субодиниця IL-20RA злита з константною зоною важкого ланцюга молекули Ig, являє собою амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NOs: 23, 53, 54 і 62, а субодиниця IL-20RB, злита з константною зоною легкого ланцюга молекули Ig, являє собою амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NOs: 21, 57, 58 і 60.

Заявлено також білок з першим поліпептидом та другим поліпептидом, в якому перший поліпептид являє собою амінокислотну послідовність SEQ ID NO 66, а другий поліпептид - амінокислотну

послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NOs: 70 і 71. Отриманий в результаті білок можна застосовувати для генерації антитіл проти субодиниці IL-20RA та субодиниці IL-20RB.

Визначення термінів

Перед детальним викладанням даного винаходу для кращого його розуміння корисно визначити наступні терміни.

Терміни "амінокінцевий" та "карбоксикінцевий" використано в даному описі для позначення положень в поліпептидах. В контексті, де це можливо, ці терміни використано з посиланням на конкретну послідовність або ділянку поліпептиду для позначення просторової близькості або відносного положення. Наприклад, певна послідовність, розташована карбоксикінцево до контрольної послідовності в поліпептиді, знаходиться найближче до місця прикріплення до карбоксильного кінця контрольної послідовності, але необов'язково на карбоксильному кінці повного поліпептиду.

В даному описі термін "білок, злитий з антитілом" означає рекомбінантну молекулу, яка включає компонент антитіла та терапевтичний агент. Прикладами терапевтичних агентів, що підходять для таких злитих білків, є імунomodulators (злитий білок "антитіло-імунomodulator") та токсини (злитий білок "антитіло-токсин").

Термін "пара комплемент-антикомплемента" означає неідентичні частини, які утворюють нековалентно зв'язану стабільну пару за відповідних умов. Наприклад, біотин та авідин (або стрептоavidin) є прототипними членами пари комплемент-антикомплемента. Іншими прикладами пар комплемент-антикомплемента є: пари рецептор-ліганд, пари антитіло-антиген (або гаптен, або епітоп), пари смисловий-антисмисловий полінуклеотид і т.п. У тих випадках, коли потрібна подальша дисоціація пари комплемент-антикомплемента, краще якщо ця пара має афінність зв'язування $<10^9 \text{ M}^{-1}$.

Термін "комплемента молекули полінуклеотиду" - це молекула полінуклеотиду з комплементарною послідовністю основ та зворотною орієнтацією порівняно з контрольною послідовністю. Наприклад, послідовність 5' ATGCACGGG 3' є комплементарною до 5' CCCGTGCAT 3'.

Термін "континг" означає полінуклеотид, який має суміжний відрізок ідентичної або комплементарної послідовності по відношенню до іншого полінуклеотиду. Кажуть, що суміжні послідовності "перекривають" конкретний відрізок полінуклеотидної послідовності або повністю, або вздовж часткового відрізка даного полінуклеотиду. Наприклад, характерними контингами до полінуклеотидної послідовності 5'-ATGGCTTAGCTT-3' є 5'-TAGCTTgagtct-3' та 3'-gtcgaCTACCGA-5'.

Термін "вироджена нуклеотидна послідовність" означає послідовність нуклеотидів, яка включає один або більше вироджених кодонів (порівняно з контрольною молекулою полінуклеотиду, яка кодує поліпептид). Вироджені кодони містять різні триплети нуклеотидів, але кодують один і той же амінокислотний залишок (тобто триплети GAU і GAC, кожен, кодує аспарагінову кислоту (Asp)).

Термін "вектор експресії" використано для позначення молекули ДНК, лінійної або кільцевої, яка включає сегмент, що кодує потрібний поліпеп-

тид, функціонально зв'язаний з додатковими сегментами, що забезпечують його транскрипцію. Такі додаткові сегменти включають послідовність промотора і термінатора і можуть також включати одну або більше точок початку реплікації, один або більше селектованих маркерів, енхансер, сигнал поліаденілювання тощо. Вектори експресії, як правило, походять від плазмідної або вірусної ДНК, або можуть містити елементи обох.

Термін "виділений" стосовно полінуклеотиду означає, що цей полінуклеотид було видалено з його природного генетичного середовища, і він, таким чином, є вільним від інших сторонніх або небажаних кодуєчих послідовностей і перебуває у формі, придатній для використання в створених шляхом генної інженерії білоксинтезуючих системах. Такі виділені молекули є відокремленими від їхнього природного середовища і включають кДНК і геномні клони. Згідно з даним винаходом виділені молекули ДНК вільні від інших генів, з якими вони зазвичай асоційовані, але можуть включати природно існуючі нетрансльовані 5'- і 3'-зони, наприклад промотори і термінатори. Ідентифікація асоційованих зон очевидна для фіхівців в цій галузі [див., наприклад, Dynan and Tijan, Nature 316: 774-78 (1985)].

"Виділений" поліпептид або білок перебувають у стані, відмінному від його природного середовища, наприклад окремо від крові та тканини тварини. У кращій формі виділений поліпептид є вільним від інших поліпептидів, зокрема інших поліпептидів тваринного походження. Краще забезпечити високочисту форму поліпептидів, тобто більш ніж 95% чистоти, ще краще більш ніж 99% чистоти. При використанні в даному контексті термін "виділений" не включає наявності цього самого поліпептиду в альтернативних фізичних формах, наприклад у вигляді димеру або, навпаки, у вигляді глікозилізованих або дериватизованих форм.

Термін "функціонально зв'язаний" стосовно сегментів ДНК означає, що ці сегменти розташовані так, що функціонують узгоджено для досягнення намічених цілей, наприклад транскрипція ініціюється у промоторі та проходить далі через кодуєчий сегмент в термінатор.

"Полінуклеотид" - це одно- або дволанцюговий полімер деоксирибонуклеотидних або рибонуклеотидних основ, що зчитуються з 5'- до 3'-кінця. Полінуклеотиди включають РНК і ДНК і їх можна виділяти з природних джерел, синтезувати *in vitro* або складати з комбінації природних та синтетичних молекул. Розміри полінуклеотидів подають в парах нуклеотидів (скорочено "п.н."), нуклеотидах ("нт"), або тисячах пар нуклеотидів ("т.п.н."). Там, де дозволяє контекст, останні два терміни можуть описувати полінуклеотиди, які є одно- або дволанцюговими. Коли цей термін застосовано до дволанцюгових молекул, він, як правило, означає загальну довжину і його слід сприймати як еквівалент терміну "пара нуклеотидів". Фахівцям в цій галузі відомо, що два ланцюги дволанцюгового полінуклеотиду можуть трохи відрізнятися по довжині і що їхні кінці можуть бути з шаховим розташуванням в результаті ферментативного розщеплення; таким чином всі нуклеотиди в дволанцюговій молекулі полінуклеотиду можуть і не бути парними. Такі

непарні кінці зазвичай не перевищують по довжині 20 нуклеотидів.

"Поліпептид" - це полімер, що складається з амінокислотних залишків, з'єднаних пептидними зв'язками, незалежно від того, чи створений він природним шляхом чи штучно. Поліпептиди з менш ніж 10 амінокислотних залишків зазвичай називають "пептидами".

Термін "промотор" використано тут в його значенні, відомому фахівцям, для позначення ділянки гена, який містить послідовності ДНК, що забезпечують зв'язування полімерази РНК та ініціацію транскрипції. Послідовності промоторів, як правило, але не завжди, виявляють в некодуючих 5'-зонах генів.

"Білок" - це макромолекула, що включає один або більше поліпептидних ланцюгів. Білок може також включати непептидні компоненти, наприклад карбогідратні групи. Карбогідрати та інші не-пептидні замішувачі можуть додаватися до білка через клітину, в якій цей білок утворюється, і будуть варіюватися в залежності від типу клітини. В даному описі білки визначено виходячи з їхніх амінокислотних скелетних структур; замішувачі, наприклад карбогідратні групи, взагалі точно не визначені, але тим не менш можуть бути присутніми.

Термін "рецептор" означає зв'язаний з клітиною білок, який зв'язується з біоактивною молекулою (тобто лігандом) і опосередковує вплив ліганду на клітину. Мембранозв'язані рецептори характеризуються багатодоменною структурою, яка включає позаклітинний домен зв'язування ліганду і внутрішньоклітинний домен ефектора, який зазвичай бере участь у сигнальній трансдукції. Зв'язування ліганду з рецептором призводить до конформаційної зміни в рецепторі, яка викликає взаємодію між доменом ефектора та іншою молекулою(ами) в клітині. Ця взаємодія, в свою чергу, веде до зміни метаболізму клітин. Метаболічні акти, які пов'язані з взаємодіями рецептор-ліганд, включають транскрипцію генів, фосфорилування, дефосфорилування, збільшення утворення циклічного АМФ, мобілізацію клітинного кальцію, мобілізацію мембранних ліпідів, клітинну адгезію, гідроліз ліпідів інозиту та гідроліз фосфоліпідів. Взагалі, рецептори можуть бути мембранозв'язаними, цитозольними або ядерними, мономерними (наприклад, рецептор тиреотропного гормону, бета-адренергічний рецептор) або мултимерними (наприклад, рецептор PDGF, рецептор гормону росту, рецептор IL-3, рецептор GM-CSF, рецептор G-CSF, рецептор еритропоетину та рецептор IL-6).

Термін "секреторна сигнальна послідовність" означає послідовність ДНК, яка кодує поліпептид ("секреторний пептид"), який як компонент більшого поліпептиду спрямовує цей більший поліпептид по секреторному шляху клітини, в якій він синтезується. Більший поліпептид зазвичай розщеплюється і виводить секреторний пептид під час проходження по секреторному шляху.

Термін "сплайсваріант" використано в даному описі для позначення альтернативних форм РНК, транскрибованих з гена. Сплайсваріація виникає природно завдяки використанню альтернативних сплайсинг-сайтів в транскрибованій молекулі РНК, або не так часто між окремо транскрибованими

молекулами РНК, і може дати в результаті декілька мРНК, транскрибованих з того самого гена. Сплайсваріанти можуть кодувати поліпептиди, які мають змінену амінокислотну послідовність. Термін "сплайсваріант" також використано тут для позначення білка, закодованого сплайсваріантом мРНК, транскрибованого з гена.

Слід розуміти, що молекулярні маси та довжини полімерів, визначені неточними аналітичними методами (наприклад, гель-електрофорезом), є приблизними величинами. Якщо таку величину виражено у вигляді "приблизно" X, то слід розуміти, що точність величини X визначена з похибкою $\pm 10\%$.

Як говорилося вище, IL-20 (колишня назва Zcyto 10) визначено, і способи отримання IL-20 та антитіл проти IL-20 можна знайти в [заявці РСТ/US98/25228, WO №99/27103, опублікованій 25 листопада 1998 року, та патентній заявці США №09/313458, поданій 17 травня 1999 року]. Полі-нуклеотид і поліпептид IL-20 людини представлені послідовностями SEQ ID NOs: 1-4, а IL-20 миші - послідовностями SEQ ID NOs: 5-9.

Було відкрито рецептор до IL-20, який являє собою гетеродимер, що складається з поліпептиду, іменованого "IL-20RA" (колишня назва Zcyto R7), і поліпептиду, іменованого "IL-20RB". Поліпептид IL-20RA, нуклеїнова кислота, яка кодує його, антитіла проти IL-20RA та способи їх отримання описано в [пат. США №5945511, виданому 31 серпня 1999 року]. SEQ ID NOs: 10-12 - це полінуклеотиди та поліпептиди IL-20RA. Позаклітинний домен IL-20RA людини являє собою поліпептид, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NOs: 12, 55, 63 і 65, причому субодиноця рецептора повної довжини являє собою послідовність SEQ ID NO 11. Позаклітинний домен IL-20RA миші являє собою SEQ ID NO 38, при цьому SEQ ID NO 37 є IL-20RA всієї миші.

Позаклітинний домен IL-20RB (SEQ ID NOs: 13-14 і як варіанти SEQ ID NOs: 18 і 19) являє собою поліпептид, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NOs: 15, 59, 61, 67, 68 і 69. Краще, якщо позаклітинний домен поліпептиду IL-20RA і позаклітинний домен поліпептиду IL-20RB ковалентно зв'язані разом. У кращому варіанті одна позаклітинна поліпептидна субодиноця має константну зону важкого ланцюга імуноглобуліну, злику з його карбоксикінцем, а друга позаклітинна субодиноця має константну зону легкого ланцюга імуноглобуліну (Ig), злику з його карбоксикінцем таким чином, що згадані два поліпептиди разом утворюють розчинний рецептор, і між важким і легким ланцюгами Ig утворюється дисульфідний зв'язок. В іншому варіанті пептидний лінкер може бути злитим з двома карбоксикінцями поліпептидів і утворювати ковалентно зв'язаний розчинний рецептор.

SEQ ID NOs: 22 і 23 - це структурні компоненти позаклітинного домена IL-20RA, злитого з константною зоною мутованого людського імуноглобуліну гамма-1, отримані згідно з процедурою Прикладу 5. SEQ ID NO 62 - це спрогнозована зріла послідовність без сигнальної послідовності. SEQ ID NOs: 20 і 21 - це структурні компоненти позаклітинного домену IL-20RB, злитого з константною зоною легкого дикого типу легкого ланцюга каппа імуногло-

буліну людини, отримані згідно з процедурою Прикладу 5. SEQ ID NO 60 - це спрогнозована зріла послідовність без сигнальної послідовності. На Фіг.1 зображений гетеротетрамер, отриманий у Прикладі 5.

SEQ ID NOs: 52 і 53 - це структурні компоненти позаклітинного домену IL-20RA, злитого з константною зоною мутованого людського Ig гамма-1, отримані згідно з процедурою Прикладу 12. SEQ ID NO 54 - це спрогнозована зріла послідовність без сигнальної послідовності. SEQ ID NOs: 56 і 57 - це структурні компоненти позаклітинного домену IL-20RB, злитого з константною зоною дикого типу легкого ланцюга каппа імунoglobуліну людини, отримані згідно з процедурою Прикладу 12. SEQ ID NO 58 - це спрогнозована зріла послідовність без сигнальної послідовності. Отриманий в результаті гетеротетрамер є майже ідентичним гетеротетрамеру, отриманому в Прикладі 5, причому головна різниця полягає в тому, що між позаклітинними доменами та початками константних зон імунoglobуліну немає поліпептидного лінкера (22 на Фіг.1). Далі термін "позаклітинний домен рецептора" означає позаклітинний домен рецептора або ділянку цього позаклітинного домену, необхідну для зв'язування з його лігандом, якщо лігандом є IL-20.

Позаклітинні домени IL-20RA та IL-20RB можна зв'язувати разом багатьма шляхами таким чином, щоб утворений в результаті розчинний рецептор міг зв'язуватись з IL-20. На Фіг.1-8 показано ряд варіантів втілення даного винаходу. Однакові елементи на кожному з малюнків позначені однаковими числами. На Фіг.1 показаний варіант здійснення даного винаходу згідно з Прикладом 5, який детально буде описано нижче. Структурний компонент розчинного рецептора, позначений числом 10, складається з двох поліпептидних ланцюгів сайту зв'язування IL-20, позначених числами 12 і 14. Кожний сайт зв'язування складається з позаклітинного домену IL-20RA, позначеного числом 16, та позаклітинного домену IL-20RB, позначеного числом 18.

Позаклітинний домен IL-20RA, 16, зв'язується з доменом CH1, 20, в константній зоні важкого ланцюга людського імунoglobуліну гамма-1 за допомогою лінкера 22, в результаті чого утворюється SEQ ID NO 72. Домен CH1, 20, потім зв'язується з доменом CH2, 24, за допомогою шарнірної зони 23. Домен CH2, 24, зв'язується з доменом CH3, 26, за допомогою шарнірної зони 25.

При порівнянні структурного компонента Фіг.1 з послідовністю SEQ ID NO 22 видно, що позаклітинний домен IL-20RA, 16, проходить від амінокислотних залишків 36 валіну до амінокислотного залишку 249 глутаміну послідовності SEQ ID NO 22 включно. Поліпептидний лінкер 22 проходить від амінокислотного залишку 250 гліцину до амінокислотного залишку 264 серину послідовності SEQ ID NO 22 включно. Домен CH1 (22 на Фіг.1) проходить від амінокислотного залишку 265 аланіну до амінокислотного залишку 362 валіну послідовності SEQ ID NO 22 включно. Шарнірна зона 23 Фіг.1 проходить від амінокислотного залишку 363 глутамінової кислоти до амінокислотного залишку 377 проліну послідовності SEQ ID NO 22 включно. Ла-

нцюги 12 і 14 дисульфідно зв'язані разом за допомогою дисульфідних зв'язків 28 і 30. Ці дисульфідні зв'язки утворені між важкими ланцюгами завдяки цистеїновим залишкам в позиціях 373 і 376 послідовності SEQ ID NO 22 кожного із двох згаданих важких ланцюгів.

Позаклітинний домен IL-20RB 18, зв'язаний з константною зоною легкого ланцюга CL (34 на Фіг.1) каппа людського Ig за допомогою поліпептидного лінкера 32, в результаті чого утворюється послідовність SEQ ID NO 72. Позаклітинний домен IL-20RB, 18, проходить від амінокислотного залишку 30 валіну до амінокислотного залишку 230 аланіну послідовності SEQ ID NO 20 включно. Поліпептидний лінкер 32 проходить від амінокислотного залишку 231 гліцину до амінокислотного залишку 245 серину послідовності SEQ ID NO 20 включно. Зона CL (34) каппа проходить від амінокислотного залишку 246 аргініну до фінального амінокислотного залишку 352 цистеїну послідовності SEQ ID NO 20 включно. Цистеїн в позиції 352 послідовності SEQ ID NO 20 утворює дисульфідний зв'язок (36 на Фіг.1) з цистеїном в позиції 376 послідовності SEQ ID NO 22. Таким чином, константна зона 34 легкого ланцюга зв'язується з шарнірною зоною 23 дисульфідним зв'язком 36. Таким шляхом позаклітинний домен IL-20RA (16) зв'язується з позаклітинним доменом IL-20RB (18) і утворює розчинний рецептор.

Якби цистеїнові залишки в позиціях 373 і 376 послідовності SEQ ID NO 22 перейшли до інших амінокислотних залишків, то згадані два зв'язуючі поліпептиди IL-20 (12 і 14) не зв'язалися би дисульфідно разом і утворили б структурний компонент, показаний на Фіг.2, з шарнірною зоною 27.

На Фіг.3 показано запропонований даним винаходом дуже простий розчинний рецептор 38, в якому позаклітинний домен IL-20RA (16) зв'язаний з позаклітинним доменом IL-20RB (18) за допомогою поліпептидного лінкера 40. Поліпептидний лінкер проходить від амінокінця позаклітинного домену IL-20RA (16) і з'єднується з карбоксильним кінцем позаклітинного домену IL-20RB (18). Поліпептидний лінкер повинен бути довжиною 100-240 амінокислот, краще довжиною приблизно 170 амінокислотних залишків. Підійшов би лінкер, що складається з гліцинового та серинового залишків. Допустимий лінкер може мати багато одиниць послідовності SEQ ID NO 72, краще приблизно 12.

На Фіг.4 показано варіант структури, в якій позаклітинний домен IL-20RA (16) зв'язаний з позаклітинним доменом IL-20RB (18) за допомогою лінкера 40, як і на Фіг.3. Хоча позаклітинний домен IL-20RA (16) зв'язаний з доменом CH1 (20), як на Фіг.1, поліпептидним лінкером 42, лінкер 42 повинен мати в довжину приблизно 30 амінокислотних залишків. Ідеальним лінкером був би такий, що складається з гліцину та серину, як у послідовності SEQ ID NO 72, і шарнірної зони 23 Фіг.1.

На Фіг.5 показано інший можливий варіант структури, запропонованої даним винаходом. В цьому варіанті карбоксильний кінець позаклітинного домену IL-20RB (18) зв'язується з амінокінцем позаклітинного домену IL-20RA (16) за допомогою поліпептидного лінкера 44 довжиною приблизно 15 амінокислотних залишків, наприклад SEQ ID

NO 72. Від карбоксикінця позаклітинного домену IL-20RA (16) до домену CH2 проходить поліпептидний лінкер 46 довжиною приблизно 30 амінокислотних залишків. Краще, якби карбоксильний кінець лінкера 46 складався із шарнірної зони, що тягнеться від амінокислотного залишку 363 глутамінової кислоти до амінокислотного залишку 377 проліну послідовності SEQ ID NO 22 включно. В ідеалі поліпептидний лінкер 46 на своєму карбоксильному кінці повинен був би мати принаймні один цистеїновий залишок, щоб міг утворитися дисульфідний зв'язок.

Розчинний рецептор IL-20 з Фіг.6 є ідентичним розчинному рецептору з Фіг.1, за винятком того, що домену CH3 (26 на Фіг.1) немає у варіанті структури Фіг.6. Зона CH3 починається з амінокислотного залишку 488 гліцину і тягнеться до останнього залишку 594 послідовності SEQ ID NO 22.

На Фіг.7 показано структурний компонент розчинного рецептора IL-20, ідентичний структурному компоненту Фіг.1, за винятком того, що немає ані домену CH2, ані домену CH3. Домени CH2 і CH3 проходять від амінокислотного залишку 378 аланіну до кінця поліпептидної послідовності SEQ ID NO 22.

На Фіг.8 показано структурний компонент, в якому і IL-20RA (16) і IL-20RB (18) мають поліпептидний лінкер 48, злитий з їхніми відповідними карбоксильними кінцями. Кожний поліпептидний лінкер має два цистеїнові залишки, так що при експресії цистеїни утворюють два дисульфідні зв'язки 50 і 52. В цьому випадку поліпептидний лінкер складається із шарнірної зони (23 на Фіг.1). Ця шарнірна зона складається із амінокислотних залишків 363 глутаміну, які проходять до амінокислотного залишку 377 послідовності SEQ ID NO 22 включно.

В іншому аспекті даний винахід пропонує спосіб продукування розчинного рецептора, що складається з позаклітинних доменів IL-20RA та IL-20RB, який полягає у: а) введенні в клітину-хазяїна першої послідовності ДНК, яка складається з транскрипційного промотора, функціонально зв'язаного з першою секреторною сигнальною послідовністю, яка проходить нижче поряд і у відповідній рамці зчитування ДНК, яка кодує позаклітинну ділянку IL-20RA, і ДНК, яка кодує константну зону легкого ланцюга Ig; б) введенні в згадану клітину-хазяїна другого структурного компонента ДНК, який складається з транскрипційного промотора, функціонально зв'язаного з другим секреторним сигналом, що проходить нижче поряд і у відповідній рамці зчитування послідовності ДНК, яка кодує позаклітинну ділянку IL-20RB, і послідовності ДНК, яка кодує домен константної зони важкого ланцюга Ig, вибраний з групи, що складається з C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} і C_{H4}; в) вирощуванні клітини-хазяїна у відповідному середовищі вирощування у фізіологічних умовах, які роблять можливою секрецію злитого білка, який складається з позаклітинних доменів IL-20RA та IL-20RB; і г) виділенні поліпептиду із клітини-хазяїна. В одному варіанті друга послідовність ДНК крім того кодує шарнірну зону важкого ланцюга Ig, причому ця шарнірна зона з'єднана з доменом константної зони важкого ланцюга. В іншому варіанті друга послідовність ДНК додатко-

во кодує варіабельну зону імуноглобуліну, з'єднану вище від неї і у відповідній рамці зчитування з константною зоною важкого ланцюга імуноглобуліну.

В ще одному варіанті запропоновано спосіб продукування розчинного рецептора, що складається з позаклітинних доменів IL-20RA та IL-20RB, який полягає в: а) введенні в клітину-хазяїна першої послідовності ДНК, яка складається з транскрипційного промотора, функціонально зв'язаного з першою секреторною сигнальною послідовністю, яка проходить нижче поряд і у відповідній рамці зчитування, ДНК, яка кодує позаклітинну ділянку IL-20RB, і ДНК, яка кодує константну зону легкого ланцюга імуноглобуліну; б) введенні в згадану клітину-хазяїна другого структурного компонента ДНК, що складається з транскрипційного промотора, функціонально зв'язаного з другим секреторним сигналом, що проходить нижче поряд і у відповідній рамці зчитування, послідовності ДНК, яка кодує позаклітинну ділянку IL-20RA, і послідовності ДНК, яка кодує домен константної зони важкого ланцюга Ig, вибраний з групи, що складається з C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} і C_{H4}; в) вирощуванні клітини-хазяїна у відповідному середовищі вирощування у фізіологічних умовах, які роблять можливою секрецію димеризованого гетеродимерного злитого білка, який складається з позаклітинних доменів IL-20RA і IL-20RB; і г) виділенні цього димеризованого поліпептиду з клітини-хазяїна. В одному варіанті друга послідовність ДНК крім того кодує шарнірну зону важкого ланцюга Ig, причому ця шарнірна зона з'єднана з доменом константної зони важкого ланцюга. В іншому варіанті друга послідовність ДНК крім того кодує варіабельну зону імуноглобуліну, з'єднану вище від неї і у відповідній рамці зчитування, з константною зоною важкого ланцюга імуноглобуліну [патент США №5843725].

Полінуклеотид, зазвичай послідовність кДНК, кодує описані поліпептиди. Послідовність кДНК, яка кодує поліпептид, запропонований даним винаходом, складається з ряду кодонів, причому кожний амінокислотний залишок цього поліпептиду кодується одним кодоном, а кожний кодон складається з трьох нуклеотидів. Амінокислотні залишки кодуються своїми кодонами таким чином:

Аланін (Ala) кодується кодоном GCA, GCC, GCG або GCT.

Цистеїн (Cys) кодується кодоном TGC або TGT.

Аспарагінова кислота (Asp) кодується кодоном GAC або GAT.

Глутамінова кислота (Glu) кодується кодоном GAA або GAG.

Фенілаланін (Phe) кодується кодоном TTC або TTT.

Гліцин (Gly) кодується кодоном GGA, GGC, GGG або GGT.

Гістидин (His) кодується кодоном CAC або CAT.

Ізолейцин (Ile) кодується кодоном ATA, ATC або ATT.

Лізін (Lys) кодується кодоном AAA або AAG.

Лейцин (Leu) кодується кодоном TTA, TTG, CTA, CTC, CTG або CTT.

Метіонін (Met) кодується кодоном ATG.

Аспарагін (Asn) кодується кодоном AAC або AAT.

Пролін (Pro) кодується кодоном CCA, CCC, CCG або CCT.

Глутамін (Gln) кодується кодоном CAA або CAG.

Аргінін (Arg) кодується кодоном AGA, AGG, CGA, CGC, CGG або CGT.

Серин (Ser) кодується кодоном AGC, AGT, TCA, TCC, TCG або TCT.

Треонін (Thr) кодується кодоном ACA, ACC, ACG або ACT.

Валін (Val) кодується кодоном GTA, GTC, GTG або GTT.

Триптофан (Trp) кодується кодоном TGG.

Тирозин (Tyr) кодується кодоном TAC або TAT.

Слід визнати, що заявлений і описаний тут запропонований даним винаходом поліпунклеотид розуміють як такий, що являє собою як смисловий ланцюг, так і антисмисловий ланцюг, і що ДНК, оскільки вона дволанцюгова, має як смисловий ланцюг, так і антисмисловий ланцюг, з'єднані разом своїми водневими зв'язками. Заявлено також матричну РНК (мРНК), яка кодує запропоновані поліпептиди, і саме цю мРНК кодує описана тут кДНК. Матрична РНК буде кодувати поліпептид, використовуючи такі самі кодони, як ті, що визначені в даному описі, за винятком того, що кожний тимінуклеотид (Т) замінено урацилнуклеотидом (У).

Фахівці в цій галузі також розуміють, що різні види можуть бути схильними до "вибору кращих кодонів". [Див., наприклад, Grantham, et al., *Nuc. Acids Res.* 8: 1893-1912 (1980); Haas et al., *Curr. Biol.* 6: 315-324 (1996); Wain-Hobson et al., *Gene* 13: 355-364 (1981); Grosjean and Fiers, *Gene* 18: 199-209 (1982); Holm, *Nuc. Acids Res.* 14: 3075-3087 (1986); Ikemura, *J. Mol. Biol.* 158: 573-597 (1982)]. Використаний в даному описі термін "вибір кращих кодонів" або "кращі кодони" - це спеціальний термін, яким називають кодони трансляції білка, які найчастіше використовують в клітинах конкретного виду, таким чином віддаючи перевагу одному або декільком представникам можливих кодонів, які кодує кожен амінокислоту. Наприклад, амінокислота треонін може кодуватися кодоном ACA, ACC, ACG або ACT, але в клітинах ссавців найчастіше використовується кодон ACC; в інших видах, наприклад клітинах комах, дріжджах, вірусах або бактеріях, можуть бути кращими різні кодони треоніну. Кращі кодони для конкретного виду можна вводити в запропоновані поліпунклеотиди різними відомими способами. Введення послідовностей кращих кодонів у рекомбінантну ДНК може, наприклад, підсилити утворення білка, роблячи трансляцію білка більш ефективною в межах конкретної клітини або виду. Послідовності, які містять кращі кодони, можна тестувати на експресію в різних видах і оптимізувати, а також тестувати на функціональність, про що йдеться в даному описі.

Способи синтезування амінокислот та аміноацилювання тРНК відомі. Транскрипцію та трансляцію плазмід, які містять нонсенс-мутації, здійснюють у безклітинній системі, яка включає екстракт *E. Coli* S30 і комерційно доступні ферме-

нти та інші реагенти. Білки очищують хроматографією. [Див., наприклад, Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2722 (1991); Ellman et al., *Methods Enzymol.* 202: 301 (1991); Chung et al., *Science* 259: 806-809 (1993); and Chung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1014-1019 (1993)]. В іншому способі трансляцію здійснюють в ооцитах *Xenopus* шляхом мікроін'єкції мутованої мРНК та хімічно аміноацильованих супресорних тРНК, [Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* 271: 19991-19998 (1996)]. В третьому способі клітини *E. Coli* вирощують за відсутності природної амінокислоти (наприклад, фенілаланіну) та у присутності необхідної амінокислоти(амінокислот), яка(які) не зустрічається(ються) у природі (наприклад, 2-азафенілаланін, 3-азафенілаланін, 4-азафенілаланін або 4-флуорофенілаланін). Таку амінокислоту, що не зустрічається у природі, включають в білок замість її природного двійника. [Див., Koide et al., *Biochem.* 33: 7470-7476 (1994)]. Природні амінокислотні залишки можна конвертувати у види, яких немає в природі, шляхом хімічної модифікації *in vitro*. Хімічну модифікацію можна поєднувати із сайт-спрямованим мутагенезом для подальшого розширення інтервалу заміни, [Wynn and Richards, *Protein Sci.* 2: 395-403 (1993)].

Амінокислотні залишки можна замінювати обмеженою кількістю неконсервативних амінокислот, амінокислот, які не кодується генетичним кодом, амінокислот, які не зустрічаються у природі, та неприродних амінокислот.

Незамінні амінокислоти в запропонованих поліпептидах можна ідентифікувати відомими методами, наприклад сайт-спрямованим мутагенезом або аланін-сканувальним мутагенезом, [Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989); Bass et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4498-502 (1991)]. При аланін-сканувальному мутагенезі у кожний залишок в молекулі вводять одиничні аланін-мутації, і отримані в результаті молекули-мутанти тестують на біологічну активність, про що йтиметься далі, щоб ідентифікувати амінокислотні залишки, які є вирішальними для активності молекули. [Див. також Hilton et al., *J. Biol. Chem.* 271: 4699-708 (1996)]. Сайти взаємодії ліганд-рецептор також можна визначити фізичним аналізом структури, наприклад, такими методами, як ядерний магнітний резонанс, кристалографія, дифракція електронів або фотоафінне мічення, у поєднанні з мутацією амінокислот з мнимими сайтами контакту. [Див., наприклад, de Vos et al., *Science* 255: 306-312 (1992); Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224: 899-904 (1992); Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309: 59-64 (1992)].

Можна здійснювати багаторазові заміни амінокислот та проводити тестування, застосовуючи відомі методи мутагенезу та рентгеноскопії, наприклад такі, які описано [Reidhaar-Olson and Sauer, *Science* 241: 53-57 (1988) or Bowie and Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156 (1989)]. Стисло, ці автори описують методи одночасної рандомізації двох або більше положень в поліпептиді, вибираючи функціональний поліпептид, і наступного секвенування поліпептидів, що пройшли мутаційний процес, для визначення спектра допустимих заміни в кожному положенні. Можна

застосовувати й інші методи, такі як прояв фага, наприклад, [Lowman et al., *Biochem.* 30: 10832-10837 (1991); Ladner et al., Патент США №5223409; Huse, WIPO Publication WO 92/06204], та зоно-спрямований мутагенез, [Derbyshire et al., *Gene* 46: 145 (1986); Ner et al., *DNA* 7: 127(1988)].

Варіанти ДНК і поліпептидних послідовностей описаного IL-20, IL-20RA та IL-20RB, можна генерувати шляхом переміщення ДНК, описаного [Stemmer, *Nature* 370: 389-391 (1994); Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-10751 (1994) and WIPO Publication WO 97/20078]. Стисло, різні ДНК утворюють гомологічною рекомбінацією *in vitro* шляхом довільної фрагментації материнської ДНК з наступним повторним збиранням з використанням реакції преципітації (РПЦ), в результаті чого отримують довільно введені точкові мутації. Цей метод можна модифікувати, застосовуючи сімейство материнських ДНК, наприклад алельні варіанти або дезорибонуклеїнові кислоти із різних видів, щоб додати варіабельності процесу. Селекція або рентгеноскопія для виявлення потрібної активності з наступними додатковими ітераціями мутагенезу та аналіз забезпечують швидку "еволюцію" послідовностей шляхом добору для досягнення необхідних мутацій при одночасному доборі проти шкідливих змін.

Описані методи мутагенезу можна поєднувати з високопродуктивними автоматизованими методами рентгеноскопії для виявлення активності клонованих мутагенозованих поліпептидів в клітинах-хазяях. Мутагенозовані молекули ДНК, які кодуєть активні поліпептиди, можна виділяти із клітин-хазяїв і швидко секвенувати, використовуючи сучасне обладнання. Ці методи дають можливість швидко визначати важливість окремих амінокислотних залишків в поліпептиді, що становить інтерес, і їх можна застосовувати до поліпептидів невідомої структури.

Продуктування білка

Поліпептиди можна продукувати у створених шляхом генетичної інженерії клітинах-хазяях відомими методами. Придатними клітинами-хазяями є такі типи клітин, які можна трансформувати або трансфектувати за допомогою екзогенної ДНК і вирощувати в культурі, і які включають бактерії, грибові клітини і культивовані вищі еукаріотні клітини. Перевагу віддають еукаріотним клітинам, зокрема культованим клітинам багатоклітинних організмів. Методики маніпулювання клонованими молекулами ДНК і введення екзогенної ДНК у велику кількість клітин-хазяїв описані [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), and Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987)].

Взагалі, послідовність ДНК, яка кодує поліпептид, функціонально зв'язана з іншими генетичними елементами, потрібними для її експресії, і, як правило, включає транскрипційний промотор і термінатор, в межах вектора експресії. Цей вектор, як правило, також містить один або більше селектованих маркерів і один або більше реплікаторів, хоча фахівцям в цій галузі відомо, що в межах конкретних систем селектовані маркери можна забез-

печувати на окремих векторах, а реплікацію екзогенної ДНК можна забезпечувати шляхом інтеграції в геном клітини-хазяїна. Добір промоторів, термінаторів, селектованих маркерів, векторів та інших елементів - це звичайний розрахунок. Багато таких елементів описано в спеціальній літературі і їх можна отримати через комерційних постачальників.

Щоб спрямувати поліпептид у секреторний шлях клітини-хазяїна, у векторі експресії створюють секреторну сигнальну послідовність (також відому як лідер-послідовність, послідовність-посередник, або пре-послідовність). Секреторна сигнальна послідовність може являти собою послідовність природних поліпептидів, може походити від іншого секретованого білка (наприклад, tPA) або бути синтезованою *de novo*. Секреторна сигнальна послідовність функціонально зв'язана з послідовністю ДНК, тобто ці дві послідовності з'єднані у правильній рамці зчитування і розташовані так, щоб спрямовувати щойно синтезований поліпептид в секреторний шлях клітини-хазяїна. Секреторні сигнальні послідовності зазвичай мають положення 5' у послідовності ДНК, яка кодує поліпептид, що становить інтерес, хоча певні секреторні сигнальні послідовності можуть знаходитись будь-де у послідовності ДНК, що становить інтерес [див., наприклад, Welch et al., патент США №5037743; Holland et al., патент США №5143830].

З іншого боку, секреторну сигнальну послідовність, яка міститься в поліпептидах, запропонованих даним винаходом, застосовують для спрямування інших поліпептидів у секреторний шлях. Даний винахід пропонує такі злиті поліпептиди. Секреторна сигнальна послідовність, що міститься у запропонованих злитих поліпептидах головним чином злита аміно-термінально з додатковим пептидом і спрямовує цей додатковий пептид в секреторний шлях. Такі структурні компоненти мають багато застосувань, відомих в цій галузі. Наприклад, ці нові злиті структурні компоненти секреторної сигнальної послідовності можуть спрямовувати секрецію активного компонента нормально несекретованого білка, наприклад рецептора. Такі злиття можна застосовувати *in vivo* або *in vitro* для спрямування пептидів по секреторному шляху.

В межах даного винаходу придатними хазяями є вирощені клітини ссавців. Методи введення екзогенної ДНК в клітини-хазяї ссавців включають трансфекцію за допомогою фосфату кальцію [Wigler et al., *Cell* 14: 725 (1978); Corsaro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7: 603 (1981); Graham and Van der Eb, *Virology* 52: 456 (1973)], електропорацію [Neumann et al., *EMBO J.* 1: 841-845 (1982)], трансфекцію за допомогою діетиламіноетил-декстрану [Ausubel et al., *ibid.*], трансфекцію за допомогою ліпосом [Hawley-Nelson et al., *Focus* 15: 73 (1993); Ciccarone et al., *Focus* 15: 80 (1993)] та вірусні вектори [Miller and Rosman, *BioTechniques* 7: 980 (1989); Wang and Finer, *Nature Med* 2: 714 (1996)]. Продуктування рекомбінованих поліпептидів у вирощених клітинах ссавців описується, наприклад, у таких [патентах США: Levinson et al., Патент США №4713339; Hagen et al., Патент США №4784950; Palmiter et al., Патент США №4579821; and Ringold, Патент США

№4656134]. Придатними вирощеними клітинами ссавців є: COS-1 (ATCC No. CRL 1650), COS-7 (ATCC No. CRL 1651), BHK (ATCC No. CRL 1632), BHK 570 (ATCC No. CRL 10314), 293 (ATCC No. CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)), а також клітинні лінії яєчника китайського хом'яка (наприклад, CHO-K1; ATCC No. CCL 61). Фахівцям в цій галузі відомі інші придатні клітинні лінії, які можна придбати з громадських сховищ, наприклад Американської колекції культур (ATCC, Rockville, Maryland). Взагалі, перевагу віддають сильним промоторам транскрипції, наприклад промоторам з вірусу SV-40 або цитомегаловірусу. [Див., наприклад, патент США №4956288]. Інші придатні промотори включають промотори з генів металотіонеїну [патенти США №№ 4579821 і 4601978] та аденовірусний головний пізній промотор.

Для селекції вирощених клітин ссавців, в які було уведено сторонню ДНК, як правило, використовують "селекцію за лікарськими препаратами". Такі клітини зазвичай називають "трансфектантами". Клітини, які було вирощено у присутності вибіркового агента і які здатні передавати ген, що становить інтерес, до їхнього потомства називають "стабільними трансфектантами". Кращим селективним маркером є ген, який кодує резистентність до антибіотичного неоміцину. Селекцію здійснюють у присутності лікарського препарату типу неоміцину, наприклад G-418, або подібного до нього. Селекційні системи можна також використовувати для підвищення рівня експресії гена, що становить інтерес, і цей процес називається "ампліфікацією". Ампліфікацію здійснюють шляхом вирощування трансфектантів у присутності невеликої кількості вибіркового агента і наступного збільшення кількості вибіркового агента з метою добору клітин, які продукують високі рівні продуктів уведених генів. Кращим селективним маркером, здатним до ампліфікації, є дигідротетрациклін, яка дає резистентність до метотрексату. Можна також застосовувати інші гени з резистентністю до лікарських препаратів (наприклад, з резистентністю до піроміцину, резистентністю до багатьох лікарських препаратів, пуроміцин-ацетилтрансферазу). Для відсортування трансфектованих клітин від нетрансфектованих клітин такими методами, як сортування за допомогою клітинного сортера із збудженням флуоресценції або магнітна сепарація з використанням гранул, можна використовувати інші маркери, які вводять змінений фенотип, наприклад, зелений флуоресцентний білок або білки клітинної поверхні, наприклад CD4, CD8, Class I MHC, плацентарна лужна фосфатаза

Як хазяї можна також використовувати інші вищі еукаріотні клітини, в тому числі рослинні клітини, клітини комах або клітини птахів. Таке використання *Agrobacterium rhizogenes* як вектора для експресії генів в рослинних клітинах розглянуто [Sinkar et al., J. Biosci. (Bangalore) 11: 47 (1987)]. Трансформацію клітин комах та продуктування сторонніх поліпептидів описано в [роботі Guarino et al., патенти США №5162222 та міжнародній заявці WO 94/064463]. Клітини комах можна заражати рекомбінантними бакуловірусами, отриманими від

вірусу *Autographa californica* ядерного поліедрозу (AcNPV). ДНК, яка кодує поліпептид, вводять в бакуловірусний геном замість послідовності, яка кодує ген поліедрину AcNPV, одним з двох способів. Перший спосіб - це традиційний спосіб гомологічної рекомбінації ДНК між AcNPV дикого типу та вектором переносу, який містить ген, фланкований послідовностями AcNPV. Відповідні клітини комах, наприклад клітини SF9, заражають вірусом AcNPV дикого типу і трансфектують з вектором переносу, який містить поліпептид, функціонально зв'язаний з промотором гена поліедрину AcNPV, термінатором або фланкуючими послідовностями. [Див. King, L.A. and Possee, R.D., The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, (Chapman & Hall, London); O'Reilly, D.R. et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual (Oxford University Press, New York, New York, 1994); and, Richardson, C.D., Ed., Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, (Humana Press, Totowa, NJ 1995)]. Природна рекомбінація всередині клітини комах дасть в результаті рекомбінантний бакуловірус, який містить кодуєчі послідовності, стимульовані промотором поліедрину. Рекомбінантні вірусні штами створюють відомими в цій галузі способами.

При другому способі створення рекомбінантних бакуловірусів застосовують систему на основі транспозону, описану [Luckow, V. A. et al., J. Virol 67: 4566 (1993)]. Ця система продається в комплекті Bac-to-Bac (ф. "Life Technologies", Rockville, MD). Ця система використовує вектор переносу pFastBad™ (ф. "Life Technologies"), що містить транспозон Tn7 для переміщення ДНК, яка кодує поліпептид, в геном бакуловірусу, який міститься в *E. Coli* як велика плазміда, що має назву "бакміда". Цей вектор переносу pFastBad™ використовує промотор поліедрину AcNPV для стимуляції експресії гена, що становить інтерес. Однак pFastBad™ можна значною мірою модифікувати. Промотор поліедрину можна видалити і замінити промотором основного білка бакуловірусу (також відомим як P_{orf}, p6.9 або промотор MP), який експресують раніше при зараженні бакуловірусом і який показав себе кращим для експресії секретованих білків. [Див., Hill-Perkins, M.S. and Possee, R.D., J. Gen. Virol 71: 971 (1990); Bonning, B.C., J. Gen. Virol 75: 1551 (1994); and, Chazenbalk, G.D., and Rapoport, B., J. Biol.Chem. 270: 1543 (1995)]. В таких структурних компонентах вектора переносу можна використовувати короткий або довгий варіант промотора основного білка. Більш того, можна будувати вектори переносу, які замінюють природні секреторні сигнальні послідовності секреторними сигнальними послідовностями, отриманими з білків комах. Наприклад, для заміни природної секреторної сигнальної послідовності в структурних компонентах можна використовувати секреторну сигнальну послідовність із EGT (Ecdysteroid Glucosyltransferase), мелітину (Melittin) медоносної бджоли (ф. "Invitrogen", Carlsbad, CA) або бакуловірусу gp67 (ф. "PharMingen", San Diego, CA). Крім того, вектори переносу можуть включати внутрішньоскелетне злиття з ДНК, яка кодує мітку епітопу на C- або N-кінці експресованого поліпептиду, наприклад мітку Glu-Glu епітопу, [Grussenmeyer, T. et

al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7952 (1985)]. Використовуючи відомий в цій галузі метод, вектор переносу, що містить рекомбінантний ген, трансформують в *E. Coli*, та піддають рентгенокопії на виявлення бакмід, які містять перерваний ген *LacZ*, що є ознакою рекомбінантних бакуловірусів. Бакмідну ДНК, яка містить геном рекомбінантних бакуловірусів, виділяють, застосовуючи відомий метод, і використовують для трансфектування клітин *Spodoptera frugiperda*, наприклад клітин Sf9. Потім утворюють рекомбінантний вірус, який експресує поліпептид. Рекомбінантні вірусні штами отримують відомими в цій галузі способами.

Рекомбінантний вірус використовують для зараження клітин-хазяїв, як правило, лінії клітин, отриманої від "походного черв'яка", *Spodoptera frugiperda*. [Див., Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press, Washington, D.C., 1994)]. Іншою придатною лінією клітин є лінія клітин HighFiveO™ (ф. "Invitrogen"), отримана з *Trichoplusia ni* [патент США №5300435]. Для вирощування і зберігання цих клітин використовують комерційно доступні безсироваткові середовища. Придатними середовищами для клітин Sf9 є Sf900 II™ (ф. "Life Technologies") або ESF 921™ (ф. "Expression Systems"); для клітин T.ni - середовища Ex-cell0405™ (ф. "JRH Biosciences", Lenexa, KS) або ExpressFiveO™ (ф. "Life Technologies"). Ці клітини виростають від щільності інюкації приблизно 2.5×10^5 клітин до щільності 1.2×10^6 клітин, і в цей час додають рекомбінантний вірусний штам при множинності зараження 0,1-10, більш типово приблизно 3. Клітини, заражені рекомбінантним вірусом, як правило, продукують рекомбінантний поліпептид на 12-72 годині після зараження і секретують його з перемінною ефективністю у вищезгадане середовище. Культуру збирають, як правило, через 48 годин після зараження. Для відокремлення клітин від середовища (надосадкової рідини) застосовують центрифугування. Надосадкову рідину, що містить поліпептид, фільтрують крізь мікропористі фільтри, як правило, з розміром пор 0,45 мкм. Застосовані процедури описано в доступних лабораторних інструкціях [King, L.A. and Possee, R.D., *ibid.*, O'Reilly, D.R. et al., *ibid.*; Richardson, C.D., *ibid.*]. Використовуючи описані там способи, можна здійснити наступну очистку поліпептиду від надосадкової рідини.

В межах даного винаходу можна також використовувати грибові клітини, в тому числі дріжджові. Види дріжджів, що становлять інтерес в цьому відношенні, включають *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* та *Pichia methanolica*. Способи трансформування клітин *S.cerevisiae* за допомогою екзогенної ДНК та продукування з них рекомбінантних поліпептидів описано, наприклад, в таких [патентах: Kawasaki, Патент США №4599311; Kawasaki et al., Патент США №4931373; Brake, Патент США №4870008; Welch et al., Патент США №5037743; and Murray et al., Патент США №4845075]. Трансформовані клітини селектують за фенотипом, визначенням селективного маркером, зазвичай резистивністю до лікарського препарату або здатністю рости за відсутності конкретної поживної речовини (наприклад, лейци-

ну). Кращою векторною системою для використання в *Saccharomyces cerevisiae* є векторна система POT1, описана [Kawasaki et al. (патент США №4931373)], яка дає можливість селектувати трансформовані клітини шляхом вирощування в середовищі, що містить глюкозу. Придатними промоторами і термінаторами для використання в дріжджах є промотори і термінатори з генів гліколітичних ферментів [див., наприклад, Kawasaki, Ne Patent No.4599311; Kingsman et al., Патент США №4615974; and Bitter, Патент США №4977092] та генів алкогольдегідрогенази. [Див. також патенти США №№ 4990446, 5063154, 5139936 та 4661454]. Відомі також трансформаційні системи для інших дріжджів, в тому числі *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guillemondii* and *Candida maltosa*. [Див., наприклад, Gleeson et al., J.Gen.Microbiol. 132: 3459 (1986) and Cregg, патент США №4882279]. Згідно з методами, описаними [McKnight et al. в патенті США №4935349], можна використовувати клітини *Aspergillus*. У [патенті США №5162228, автори Sumino et al.], описано способи трансформування *Acremonium chrysogenum*. У [патенті США № 4486533, автор Lambowitz], описано способи трансформування *Neurospora*.

Використання *Pichia methanolica* як хазяїна для продукування рекомбінантних білків описано в [міжнародних заявках №№ WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 та WO 98/02565]. Молекули ДНК для використання в трансформуванні *P.methanolica* можна звичайно отримати у вигляді дволанцюгових кільцевих плазмід, які краще лінеаризувати перед трансформацією. Для продукування поліпептиду в *P.methanolica*, краще, щоб промотор і термінатор в плазміді були промотором і термінатором гена *P.methanolica*, наприклад спиртовикористовуючого гена (AUG1 або AUG2). Інші придатні промотори включають промотори генів формальдегідтранскетази, форміатдегідрогенази та каталази. Щоб полегшити інтеграцію ДНК в хромосому-хазяїна, краще мати повний сегмент експресії плазмиди, фланкованої з обох боків послідовностями ДНК-хазяїна. Для використання в *Pichia methanolica* кращим селективним маркером є ген *P.methanolica* ADE2, який кодує фосфорибозил-5-аміноімідазол карбоксилазу (AIRC; EC 4.1.1.21), що дає можливість клітинам-хазяям *ade2* рости за відсутності аденіну. Для великомасштабних промислових процесів, де необхідно мінімізувати використання метанолу, краще використовувати клітини-хазяї, в яких знищено обидва гени, що використовують метанол (AUG1 та AUG2). Для продукування секретованих білків перевагу віддають клітинам-хазяям, позбавленим генів вакулярної протеази (PEP4 та PRB1). Для полегшення інтродукції в клітини *P.methanolica* плазмідовмісної ДНК, яка кодує поліпептид, що становить інтерес, застосовують електропорацію. Краще трансформувати клітини *P.methanolica* електропорацією, використовуючи експоненціально зростаюче, імпульсне електричне поле з напруженістю 2,5-4,5кВ/см, краще приблизно 3,75кВ/см, та сталою

часу (t) 1-40 мілісекунд, найкраще приблизно 20 мілісекунд.

В межах даного винаходу прийнятними клітинами-хазяями також є прокаріотні клітини-хазяї, в тому числі штамми бактерій *Escherichia coli*, *Bacillus* та інші роди. Методи трансформування цих хазяїв та експресування послідовностей сторонньої ДНК, клонованих в них, добре відомі в цій галузі [див., наприклад, Sambrook et al., *ibid.*]. При експресуванні поліпептиду в таких бактеріях, як *E. coli*, поліпептид можна утримувати в цитоплазмі, як правило, у вигляді нерозчинних гранул або можна спрямовувати у періплазматичний простір за допомогою бактеріальної секретійної послідовності. У першому випадку клітини лізують, і гранули видаляють та денатурують, використовуючи, наприклад, ізотіоціанат гуанідину або сечовину. Денатурований поліпептид можна потім повторно скласти та димеризувати шляхом розбавлення денатуруючого засобу, наприклад шляхом діалізу поруч з розчином сечовини та комбінації відновленого та окисненого глутатіону, та наступного діалізу поруч з буферним соляним розчином. У другому випадку поліпептид можна видалити з періплазматичного простору в розчинній та функціональній формі шляхом розривання клітин (наприклад, в результаті обробки ультразвуком або осмотичного шоку), щоб вивільнити вміст періплазматичного простору та видалити білок, виключаючи таким чином необхідність денатурації та повторного складання.

Трансформовані або трансфектовані клітини-хазяї культивують згідно із звичайними процедурами у культуральному середовищі, яке містить поживні речовини та інші компоненти, необхідні для вирощування вибраних клітин-хазяїв. Відомо багато відповідних середовищ, в тому числі середовища визначеного складу та комплексні середовища, які, як правило, включають джерело вуглецю, джерело азоту, незамінні амінокислоти, вітаміни та мінерали. Середовища можуть також містити такі компоненти, як фактори росту або сироватку, при необхідності. Середовище для вирощування, як правило, буде вибирати клітини, які містять екзогенно додану ДНК в результаті, наприклад, селекції за лікарськими препаратами або недостатності незамінної поживної речовини, що доповнюється селектованим маркером, який переноситься на векторі експресії або котрансфектується в клітину-хазяїна. Клітини *P. methanolicus* вирощують в середовищі, яке містить відповідні джерела вуглецю, азоту і поживні речовини у невеликих кількостях, при температурі приблизно 25-35°C. Рідкі культури достатньо збагачують повітрям за допомогою відомих засобів, наприклад струмуючи невеликі колби або барботуючи ферментери. Кращим культуральним середовищем для *P. methanolicus* є YEPD (2% D-глюкози, 2% пептону Bacto™ (ф. "Difco Laboratories", Detroit, MI), 1% дріжджового екстракту Bacto™ (ф. "Difco Laboratories"), 0,004% аденіну та 0,006% L-лейцину).

Виділення білка

Запропоновані даним винаходом поліпептиди краще очистити до чистоти >80%, краще до >90% чистоти, ще краще до >95% чистоти, а найкраще до фармацевтично чистого стану, тобто більше

ніж 99,9% чистоти стосовно до забруднюючих макромолекул, зокрема інших білків та нуклеїнових кислот, та звільнити від інфекційних та пірогенних агентів. У кращому варіанті очищений поліпептид, головним чином, не містить інших поліпептидів, зокрема інших поліпептидів тваринного походження.

Експресовані рекомбінантні поліпептиди (або хімерні поліпептиди) можна очищувати, застосовуючи фракціонування та/або традиційні методи очищення та середовища. Для фракціонування проб можна застосовувати преципітацію сульфату амонію та кислотне або хаотропне екстрагування. Наприклад, етапи очищення можуть включати гідроксиапатит, розмірну ексклюзію, рідинну хроматографію високого розділення та рідинну хроматографію високого розділення з оберненою фазою. Відповідні хроматографічні середовища включають отримані шляхом заміщення декстрини, агарозу, целюлозу, поліакриламід, спеціальні оксиди кремнію тощо. Перевагу віддають похідним поліетиленіміну (PEI), діетиламіноетилену (DEAE), глутамінаміноетилену (GAE) та глутаміну (Г). Прикладами хроматографічних середовищ є середовища, отримані шляхом заміщення за допомогою фенілових, бутилових або октилових груп, наприклад Феніл-сефароза FF (ф. "Pharmacia"), Тойоперлбутил 650 (ф. "TosO Haas", Montgomeryville, PA), Октил-сефароза (ф. "Pharmacia") і т.п.; або поліакрилатні смоли, наприклад Амберхром CG 71 (ф. "Toso Haas"), і т.п. Відповідні тверді носії включають скляні гранули, смоли на основі оксиду кремнію, целюлозні смоли, гранули агарози, гранули зшиті агарози, гранули полістиролу, смоли зшитого поліакриламідом і т.п., які є нерозчинними в умовах, в яких їх слід використовувати. Ці носії можна модифікувати реактивними групами, які роблять можливою прив'язаність білків аміногрупами, карбоксильними групами, сульфгідрильними групами, гідроксильними групами та/або карбогідратними частками. Прикладами хімічних технологій спряження є активація бромціану, активація N-гідроксисукциніміду, активація епоксистолюки, сульфгідрильна активація, активація гідразиду, та карбоксил-та аміно-похідні для хімічних технологій спряження. Ці та інші тверді середовища добре відомі і широко застосовуються в цій галузі. Вибір конкретного методу - справа звичайного планування дослідів і визначається частково властивостями вибраного носія. [Див., наприклад, *Affinity Chromatography: Principles & Methods* (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988)].

Поліпептиди можна виділяти, використовуючи їхні властивості. Наприклад, для очищення збагачених гістидином білків, в тому числі білків, що містять мітки полігістидину, можна застосувати адсорбційну хроматографію іммобілізованих іонів металу. Стисло, спочатку заряджають гель іонами двовалентного металу, щоб утворити хелат (Sulkowski, *Trends in Biochem. Sci.* 3:1 (1985)). Збагачені гістидином білки будуть адсорбуватися в цю матрицю з різними ступенями спорідненості, в залежності від використаного іону металу, і будуть вимиватися в результаті конкурентної елюції, знижуючи pH, або використання сильних хелатоутворюючих агентів. Інші способи очищення включають

ють очистку глікозилізованих білків шляхом хроматографії спорідненості до лектину та іоно-обмінної хроматографії. Білок, злитий з Fc-ділянкою імунoglobуліну, можна очистити, використовуючи "колодку білка A" *Methods in Enzymol.*, Vol.182, "Guide to Protein Purification", M.Deutscher, (ed.), page 529-539 (Acad. Press, San Diego, 1990). Як додаткові варіанти даного винаходу для полегшення очищення можна здійснити злиття поліпептиду, що становить інтерес, і мітки спорідненості (наприклад, білок, зв'язуючий мальтозу, домен імунoglobуліну).

В даному описі термін "антитіла" включає в себе поліклональні антитіла, афіно-очищені поліклональні антитіла, моноклональні антитіла, антиген-зв'язуючі фрагменти, наприклад протеолітичні F(ab')₂ і Fab-фрагменти. Сюди також включено створені шляхом генетичної інженерії інтактні антитіла або фрагменти, наприклад химерні антитіла, Fv-фрагменти, одноланцюгові антитіла і подібні до них, а також синтетичні антиген-зв'язуючі пептиди і поліпептиди. Нелюдські антитіла можна наблизити до людських, пересаджуючи нелюдські комплемент-залежні армініни на людську остовну структуру і константні зони, або вводячи цілі нелюдські варіабельні домени (довільно "покриваючи" їх поверхнею, схожою на людську, шляхом заміни доступних залишків, результатом чого є "аблаковане" антитіло). В деяких випадках наближені до людських антитіла можуть утримувати нелюдські залишки в межах людських остовних доменів варіабельної зони для підсилення належних зв'язуючих характеристик. Шляхом наближення антитіл до людських можна збільшити біологічний період піврозпаду, і потенціал несприятливих імунних реакцій при призначенні людям зменшується.

Для виявлення антитіл, які прив'язуються до білка або пептиду, можна застосувати багато відомих видів аналізу. Приклади аналізу детально описані в [Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (Eds.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)]. Репрезентативні приклади таких аналізів включають: протитечійний імуоелектрофорез, радіоімуноаналіз, радіоімунопреципітаційний аналіз, імуоферментний спот-аналіз, дот-блоттинг або вестерн-блоттинг аналіз, аналіз інгібування або конкуренції, пошаровий аналіз.

Запропоновані даним винаходом розчинні рецептори можна використовувати для зниження/регулювання IL-20, який, як виявили, приймає участь у ряді запальних процесів. Зокрема, виявили, що IL-20 підвищує/регулює IL-8. До хвороб, що протікають із запаленням, в яких IL-8 відіграє значну роль і для яких зменшення IL-8 було б вигідним, відносяться: розвинуте респіраторне захворювання, септичний шок, ураження багатьох органів, ушкодження легенів, які викликають запалення, наприклад астма або бронхіт, бактеріальна пневмонія, псоріаз, екзема, атонічний та контактний дерматит, хвороби кишків, які протікають із запаленням, наприклад неспецифічний виразковий коліт та хвороба Крона. Отже, для лікування цих хвороб пацієнту можна призначати запропонований рецептор до IL-20.

Біологія IL-20, його рецептор та роль в псоріазі

Два безіменні рецептори цитокіну класу II, обидва з яких експресовано в шкірі, було ідентифіковано як субодиниці рецептора IL-20. Обидві субодиниці рецептора IL-20 необхідні для зв'язування ліганду, що відрізняє їхню роль від ролі субодиниць в чотирьох інших відомих рецепторах цитокіну класу II. Крім шкіри IL-20RA та IL-20RB також коекспресовано в ряді тканин людини, в тому числі яєчнику, наднирковій залозі, яєчку, слинній залозі, м'язі, легені, нирці, серці і в меншій мірі в тонкій кишці, які стають додатковими "тканинами-мішенями" для дії IL-20. Автори дійшли висновку, що гетеродимерний рецептор IL-20 структурно схожий на інші рецептори цитокіну класу II і його експресовано в шкірі, де було продемонстровано активність ліганду IL-20.

Дві групи даних свідчать про те, що IL-20 та його рецептор причетні до псоріазу. Це мультигенне шкірне захворювання характеризується підвищеною проліферацією кератиноциту, зміненням диференціюванням кератиноциту та інфільтрацією імунних клітин у шкіру. Перша група даних про роль IL-20 у псоріазі показує, що спостережуваний гіперкератоз та потовщений епідерміс у трансгенних мишей схожі на псоріатичні аномалії людини. Зменшені кількості тонофіламентів, що пов'язано, як гадають, з дефективною кератинізацією, є головною ознакою псоріазу людини. Інтрамітохондріальні включення було виявлено і в хімічно індукованому, і в стрічальному у природі гіперпластичних станах шкіри у мишей. Причина таких включень та їхні впливи на мітохондріальну функцію, якщо вони є, невідомі. Автори дійшли висновку, що миші з трансгенним IL-20 виявляють багато характеристик, які спостерігають при псоріазі людини.

Друга група даних, яка свідчить про причетність рецептору IL-20 до псоріазу, показує, що мРНК і IL-20RA, і IL-20RB в людській псоріатичній шкірі помітно упорядковані порівняно з нормальною шкірою. Обидві субодиниці рецептора IL-20 експресовані в кератиноцитах в усьому епідермісі, і також експресовані в субполярній імуокомпетентних та ендотеліальних клітин. Гадають, що підвищена експресія активованого рецептора IL-20 може змінювати взаємодії між ендотеліальними клітинами, імуокомпетентними клітинами та кератиноцитами, що веде до дисрегуляції проліферації та диференціювання кератиноцитів.

Вирішальним етапом в розумінні функції нового цитокіну є ідентифікація та характеристика його спорідненого по жіночій лінії рецептора. Був успішно застосований структурний метод виділення нового інтерлейкіну, який вресі-решт привів до виділення його рецептора. IL-20 стимулює трансдукцію в клітинній лінії HaCaT кератиноциту, підтримуючи пряму дію цього нового ліганду в шкірі. Крім того, білки IL-1 β , EGF та TNF- α , які, як відомо, є активними в кератиноцитах і зв'язані з проліферативними та тро-запальними сигналами в шкірі, підсилюють реакцію на IL-20. І в клітинах HaCaT, і в клітинах BHK, які експресують рецептор IL-20, IL-20 подає сигнали через STAT3. Таким чином, IL-20 зв'язує свій рецептор на кератиноцитах і стимулює шлях трансдукції сигналу, що містить STAT3.

Використання антагоніста до IL-20 для лікування псоріазу

Як зазначено у вище та у прикладах, наведених нижче, IL-20 бере участь в патології псоріазу. Тому, запропоновані даним винаходом рецептори можна призначати особі для знижувального регулювання IL-20 і, таким чином, лікування псоріазу.

Псоріаз - це одна з найбільш розповсюджених дерматологічних хвороб, від якої страждає 1-2% населення світу. Це хронічне запалення шкіри, яке характеризується еритематозними, чітко розмежованими папулами та закругленими бляшками, покритими сріблястою, схожою на сльоду лускою. Ураження шкіри при псоріазі супроводжуються непостійним свербінням. Ураження псоріазом часто розвивається з травмованих ділянок. Крім того, псоріаз можуть загострити інші зовнішні фактори, в тому числі інфекції, стрес та лікарські засоби, наприклад літій, β -блокатори та протималярійні засоби.

Найбільш розповсюджена різновидність псоріазу - бляшковий псоріаз. Пацієнти, хворі на бляшковий псоріаз, мають постійні, повільно зростаючі бляшки, які залишаються здебільшого незмінними впродовж тривалого часу. Найчастіше бляшковий псоріаз буває на ліктях, колінах, сідничній борозні та волосистій частині шкіри голови. Ураження має тенденцію до симетрії. Інверсний псоріаз уражає інтертригінозні зони, в тому числі пахвову ямку, пахвинну ділянку, зону під грудьми та пупок, і також має тенденцію уражати волосисту частину шкіри голови, долоні та підшви стоп. Окремі ураження мають вигляд чітко розмежованих бляшок і можуть бути зоволоженими, що зумовлено їхнім місцем розташування. Бляшковий псоріаз, як правило, розвивається повільно і протікає безболісно. Його прояви рідко спонтанно зменшуються.

У дітей та молодих дорослих найчастіше буває псоріаз у вигляді висипу (краплеподібний псоріаз). Він розвивається гостро у осіб, які не мають псоріазу або у людей з хронічним бляшковим псоріазом. Пацієнти виявляють у себе багато маленьких еритематозних лускатих папул, часто після зараження верхніх дихальних шляхів β -гемолітичними стрептококами. У пацієнтів з псоріазом можуть також розвинутих пустульозні ураження. Вони можуть локалізуватися на долонях та підшвах стоп або можуть генералізуватися і асоціюватися з лихоманкою, нездужанням, діареєю та артралгіями.

Приблизно половина всіх пацієнтів з псоріазом має ураження нігтів пальців рук, які проявляються у вигляді точкових віспинок, потовщення нігтів або піднігтьового гіперкератозу. Приблизно 5-10% пацієнтів з псоріазом мають асоційовані скарги на суглоби, які найчастіше бувають у пацієнтів з ураженням нігтів пальців рук. Хоча деякі пацієнти мають співпадаючий прояв класичного ревматоїдного артриту, багато пацієнтів мають захворювання суглобів, яке входить в один із п'яти типів, пов'язаних з псоріазом: 1) захворювання, обмежене одним або кількома маленькими суглобами (70% всіх випадків); 2) захворювання, схоже на серонегативний ревматоїдний артрит; 3) ураження периферичних міжфалангових суглобів; 4) тяжкий деструк-

тивний артрит з розвитком "артритних каліцтв"; 5) хвороба, обмежена хребтом.

Псоріаз можна лікувати шляхом призначення антагоністів до IL-20. Кращими антагоністами є або розчинний рецептор до IL-20, або антитіла, фрагменти антитіла або одноланцюгові антитіла, які зв'язуються або з рецептором IL-20, або з IL-20. Антагоністи до IL-20 можна призначати окремо або у поєднанні з іншими призначеними лікувальними заходами, наприклад змазуючими речовинами, кератолітиками, локальними кортикостероїдами, локальними похідними вітаміну D, антраліном, системними антиметаболітами, наприклад метотрексатом, лікуванням псораленом-ультрафіолетовим світлом, етретинамом, ізотретиноїном, циклоспорином та локальним кальципотріолом, похідним вітаміну D. Ці антагоністи, зокрема розчинний рецептор або антитіла, що зв'язуються з IL-20 або рецептором IL-20, можна призначати особі підшкірно, внутрішньовенно або трансдермально, використовуючи крем або трансдермальну пляму, що містить антагоніст IL-20. При призначенні підшкірно цей антагоніст можна вприскувати в одну або більше псоріатичних бляшок. При призначенні трансдермально антагоніст можна наносити прямо на бляшки, застосовуючи крем, що містить антагоніст до IL-20.

Використання антагоністів до IL-20 для лікування запальних станів легенів

Розчинний рецептор IL-20, запропонований даним винаходом, можна призначати особі, яка страждає на астму, бронхіт, муковісцидоз або інший вид запалення легенів, для лікування згаданих хвороб. Антагоністи можна вводити будь-яким відповідним способом, в тому числі внутрішньовенно, підшкірно, шляхом бронхіального лаважу та використання легкого препарату, що містить антагоніст до IL-20.

Введення розчинного рецептора IL-20

Кількості розчинного рецептора IL-20, необхідні для ефективного лікування, залежатимуть від багатьох факторів, в тому числі від засобів введення, місця введення, фізіологічного стану пацієнта та інших призначених лікарських засобів. Отже, лікувальні дози слід титрувати для оптимізації безпеки та ефективності. Як правило, дози, використані *in vitro*, можуть підказати вірний напрямок визначення правильних доз цих реагентів для приймання *in vivo*. Випробування на тваринах ефективних доз для лікування конкретних порушень забезпечать надалі обґрунтований критерій визначення дози для людини. Способи введення включають: пероральний, внутрішньовенний, перитонеальний, внутрішньом'язовий, трансдермальний або введення в легеню або трахею у розпилюваній формі за допомогою розпилювача аерозольного інгалятора. Фармацевтично прийнятними носіями є, наприклад, вода, соляні та буферні розчини. Межі дозування, як правило, розраховують, виходячи з 1-1000мкг на кілограм маси тіла на день. Для дорослого середнього віку доза розчинного рецептора IL-20 складала б приблизно 25мг два рази на тиждень у вигляді ін'єкції під шкіру. При лікуванні псоріазу ін'єкції можна робити в місцях псоріатичних уражень. Для підшкірного або внутрішньовенного введення антагоніста IL-20

антитіло або розчинний рецептор може бути у буферному соляному розчині фосфату. При шкірних хворобах, наприклад псоріазі, антагоніст до IL-20 можна застосовувати у вигляді мазі або трансдермальної плями. Дози можуть бути вищими або нижчими, що визначає лікар-спеціаліст в цій галузі. Повне обговорення технологій приготування лікарського засобу та меж дозування можна знайти в [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., (Mack Publishing Co., Easton, Penn., 1996), and Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 9th Ed. (Pergamon Press 1996)].

Даний винахід далі ілюструється наступними необмежуваними прикладами.

Приклад 1

Підсилювальне регулювання IL-8 за допомогою IL-20

Способи:

Нормальні людські епідермальні новонароджені кератиноцити (від ф. "Clonetics") при пасажі 2 висівали і вирощували до злиття у 12-ячковому планшеті для тканинних культур. Середовища для вирощування кератиноцитів придбали у фірми "Clonetics". Коли клітини досягали злиття, їх промивали середовищами для вирощування кератиноцитів без факторів росту, тобто базальними середовищами для кератиноцитів (БСК). Клітини витримували без сироватки у БСК впродовж 72 годин перед додаванням досліджуваних сполук. Як позитивні контрольні групи використовували тромбін при концентрації 1 л.о./мл та трипсин у кількості 25 нМ. Додавали один мл середовища на ямку. Як негативну контрольну групу застосовували тільки БСК.

Поповнювали IL-20 у БСК і додавали при різних концентраціях, від 2,5 мкг/мл до 618 нг/мл в першому експерименті та від 2,5 мкг/мл до 3 нг/мл в другому експерименті.

Клітини інкубували при 37°C, 5% CO₂ впродовж 48 годин. Надосадкові рідини видаляли та заморожували при -80°C впродовж кількох днів, щоб проаналізувати рівні IL-8 та GM-CSF. Для визначення продукування цитокіну використовували, за інструкціями фірми-виробника, набір реагентів для імуноаналізу № D8050 з IL-8 людини (ф. "RandD Systems Inc.") та набір для імуноаналізу № HSGMO з GM-CSF людини (ф. "RandD Systems Inc.").

Результати

Результати показали, що експресії IL-8 та GM-CSF були індуковані IL-20.

Приклад 2

Клонування IL-20RB

Клонування зони кодування IL-20RB

Підготували два праймери для реакції преципітації (РПЦ) на основі послідовності з [міжнародної патентної заявки № PCT/US99/03735 (публікація № WO 99/46379), поданої 8 березня 1999р.] SEQ ID NO 16 містить кодон ATG (Met1) із сайтом рестрикції EcoRI, SEQ ID NO 17 містить термінуючий кодон (TAG) із сайтом рестрикції XhoI. Ампліфікацію РПЦ здійснювали, використовуючи ДНК з бібліотеки кДНК кератиноциту (HaCaT) людини як матрицю і послідовності SEQ ID NO 16 та SEQ ID NO 17 як праймери. Реакцію преципітації (РПЦ) проводили таким чином: інкубація при 94°C впро-

довж 1хв. 3 наступними 30 циклами при 94°C впродовж 30сек. і при 68°C впродовж 2хв., і після додаткових 4хв. при 68°C реакцію консервували при 4°C. Продукти РПЦ виливали на 1% агарозний гель і досліджували стрічку ДНК в 1 т.п.н. Продукти РПЦ відокремлювали від гелю і ДНК очищували, використовуючи набір реагентів QIAquick для екстракції гелю (ф. "Qiagen"). Очищену ДНК розщеплювали за допомогою EcoRI та XhoI і клонували у вектор pZP, який назвали pZP7N. Плазміда pZP - це вектор експресії ссавця, що містить касету експресії, яка має промотор металотіонеїн-1 миші, лідерний пептид tPA людини, множинні сайти рестрикції для уведення кодуєчих послідовностей, мітку Glu-Glu та термінатор гормону росту людини. Ця плазміда також має реплікатор E.coli, одиницю експресії селектованого маркера ссавця, яка має промотор SV40, енхансер та реплікатор, а також ген DHFR і термінатор SV40. Секвенували декілька клонів IL-20RB-pZP7N. Всі вони містили три неконсервативні мутації порівняно з послідовністю IL-20RB, описаною у [PCT/US 99/03735]: (послідовність IL-20RB-pZP7N), 146 Pro (CCC) - Thr (ACC), 148 His (CAT) - Asp (GAT) та 171 Thr (ACG) - Arg (AGG).

Щоб перевірити ці три заміни в клоні IL-20RB-pZP7N, здійснювали ампліфікацію РПЦ, використовуючи як матриці три різні джерела кДНК - марафонську кДНК фетальної шкіри, ДНК з бібліотеки кДНК HaCaT і ДНК з бібліотеки кДНК гладкого м'яза простати. Продукти РПЦ очищали від гелю та секвенували. Послідовність кожного з трьох продуктів РПЦ відповідала послідовності клону IL-20RB-pZP7N. IL-20RB - це SEQ ID NOs: 13 і 14, а зрілий позаклітинний домен - це SEQ ID NO 15.

Приклад 3

Зв'язування IL-20 з гетеродимером IL-20RB/IL-20RA

Для перевірки того, чи зв'язується IL-20 з гетеродимером IL-20RA-IL-20RB, було застосовано аналіз на зв'язування на основі клітин.

Вектори експресії, що містили відомі та безіменні рецептори цитокіну класу II (в тому числі IL-20RA та IL-20RB), тимчасово трансфектували в клітини COS в різних комбінаціях, які потім аналізували на їхню здатність зв'язувати білок IL-20, мічений біотином. Результати показали, що гетеродимер IL-20RB-IL-20RA - це рецептор до IL-20. Застосовану процедуру описано нижче.

Трансфекцію клітин COS здійснювали у 12-ячковому планшеті для тканинних культур таким чином: 0,5 мкг ДНК змішували з середовищем, що містило 5 мкл ліпофектаміну у 92 мкл безсироваткового модифікованого за способом Дюльбекко середовища Ігла (МДСІ) (55 мг пірвату натрію, 146 мг L-глутаміну, 5 мг трансферину, 2,5 мг інсуліну, 1 мкг селену та 5 мг фетюїну у 500 мл МДСІ), інкубували при кімнатній температурі впродовж 30 хв. і потім додавали до 400 мкл безсироваткового МДСІ. Ці 500 мкл суміші потім додавали до клітин, вирощених до щільності 1,5×10⁵ клітин COS/ямку, та інкубували впродовж 5 годин при 37°C. Потім додавали 500 мкл МДСІ з 20% ембріонної бичачої сироватки (ФБС) та інкубували всю ніч.

Аналіз, модифікацію "секреторної пастки" [Davis, S., et al., Cell 87: 1161-1169 (1996)], проводили таким чином: клітини промивали фізіологічним розчином з фосфатним буфером (ФРФБ)/1% альбуміном бичачої сироватки (АБС) та блокували впродовж 1 години, використовуючи для цього ТНБ (0,1M Tris-HCl, 0,15M NaCl та 0,5% блокуючого реагента (набір № NEL701 від ф. "NEN Renaissance TSA-Direct") у воді). Потім здійснювали 1-годинну інкубацію, використовуючи 3мкг/мл біотинильованого білка в ТНБ. Клітини промивали ФРФБ/1% АБС та інкубували ще годину, використовуючи розбавлений у співвідношенні 1:300 стрептавідин-пероксидаза хрину (набір ф. "NEN") в ТНБ. Далі здійснювали промивку, клітини фіксували впродовж 15хв., використовуючи 1,8% формальдегіду у фізіологічному розчині з фосфатним буфером (ФРФБ). Клітини потім промивали ТНТ (0,1M Tris-HCl, 0,15M NaCl і 0,05% Tween-20 у воді). Позитивні сигнали зв'язування виявили після 5-хвилинної інкубації з використанням тираміду флуоресцеїну, розбавленого у співвідношенні 1:50 в буферному розчині (набір реагентів ф. "NEN"). Клітини промивали ТНТ, фіксували за допомогою підтримуючого середовища Vectashield (ф. "Vector Labs"), розбавленого у співвідношенні 1:5 в ТНТ, і візуалізовували, використовуючи фільтр FITC на інвертованому флуоресцентному мікроскопі.

Приклад 4

Підсилювальне регулювання за допомогою IL-20 цитокінів, що викликають запалення

Обробка клітин

Клітинну лінію кератиноцитів людини, HaCaT, вирощували при 37°C ще кілька днів після злиття у колбах для тканинних культур T-75. Потім нормальне середовище для вирощування (МДСІ+10% ФБС) видаляли і заміняли безсироватковим середовищем. Далі клітини інкубували впродовж двох днів при 37°C. МДСІ потім видаляли і за одну обробку обробляли чотири колби клітин, кожну однією з наступних сумішей, впродовж чотирьох годин при 37°C: рекомбінантним людським (рл) IL-1 альфа при концентрації 5нг/мл, рл IL-1 альфа при концентрації 20нг/мл, рл IL-1 альфа при концентрації 5нг/мл+IL-20 при концентрації 1мкг/мл, рл IL-20 при концентрації 10нг/мл.

Виділення РНК

Після обробки цитокінів середовище видаляли, і клітини лізували, використовуючи розчин тіоціанату гуанідію. Всю РНК виділяли із клітинного лізату шляхом центрифугування впродовж ночі на основі градієнту хлориду цезію. Наступного дня осад РНК у колбі після центрифугування повторно суспендували у розчині триетанол/додецилсульфат натрію (ТЕ/ДСН) і етанол осаджували. Потім визначали кількість РНК, використовуючи спектрофотометр, далі обробляли ДНКазою, як описано в [Section V.B. of Clontech's Atlas™ cDNA Expression Arrays User Manual (version PT3140-1/PR9X390, published 11/5/99)]. Якість зразків РНК перевіряли на основі розрахунків чистоти, які ґрунтувались на конкретних даних, та на основі візуалізації на агарозному гелі. Геномне забруднення зразків РНК виключали в результаті аналізу РПЦ гена β-актину

Синтез зонду

За протоколами ф. "Clontech" щодо поліА+збагачення здійснювали синтез зонду та гібридизацію з послідовностями Atlas™ [див. вище Atlas™ Pure Total RNA Labeling System User Manual, PT3231-1/PR961157, published 6/22/99]. Стисло, поліА+РНК виділяли з 50мг всієї РНК, використовуючи магнітні гранули, покриті стрептавідином (ф. "Clontech", Paolo Alto, CA), і сепаратор магнітних частинок. ПоліА+РНК потім помічали ^{alpha32}P-dATP шляхом РПЦ з контролем за допомогою рентгенівських променів або гамма-променів. В цій реакції використовували праймери CDS ф. "Clontech", специфічні до генів 268 у послідовності Atlas™ людський цитокін/рецептор (№7744-1). Мічений зонд виділяли, застосовуючи хроматографію на колонках і визначали кількість в сцинтиляційній рідині.

Гібридизація на мембранах-матрицях

Матриці Atlas™ попередньо гібридизували, використовуючи ExpressHyb ф. "Clontech" та ДНК сперми лосося, денатуровану в теплі при концентрації 100мг/мл, впродовж принаймні 30хв. при 68°C при безперервному збовтуванні. Мембрани потім гібридизували, використовуючи $1,9 \times 10^6$ CPM/мл (всього $1,14 \times 10^7$ CPM), всю ніч при 68°C при безперервному збовтуванні. Наступного дня мембрани промивали 4 рази по 30хв. у 2X SSC (розчин хлориду і цитрату натрію), 1% SDS (додецилсульфат натрію) при 68°C і ще раз впродовж 30хв. в 0,1X SSC, 0,5% SDS при 68°C, і ще один, останній, раз при кімнатній температурі впродовж 5хв. в 2X SSC. Мембрани послідовностей потім укладали в пластикові мішки ф. "Kodak", герметично закривали і впродовж всієї ночі піддавали дії фосфорного екрану блоку формування зображення при кімнатній температурі. Наступного дня фосфорні екрани сканували на фосфорному блоці формування зображення і аналізували, використовуючи програмні засоби 0,1 AtlasImage™ ф. "Clontech".

Результати

Гени, які позитивно регулюються за допомогою IL-20

1. Фактор некрозу пухлини (ФНП) позитивно регулювався в 1,9-2,4 рази.

2. Фактори 1 і 2 плацентарного росту позитивно регулювалися в 1,9-2,0 рази.

3. Фактор І коагуляції позитивно регулювався в 2,0-2,5.

4. Рецептор кальцитоніну позитивно регулювався в 2,2-2,3 рази.

5. ФНП-стимулюючий гіалуронатзв'язуючий білок TSG-6 позитивно регулювався в 2,1-2,2 рази.

6. Попередник рецептора-1 васкулярного ендотеліального фактора росту, рецептор тиразин-протеїн-кінази (FLT-1) (SFLT) позитивно регулювався в 2,1-2,7 рази.

7. MRP-8 (Ca-зв'язуючий білок у макрофагах, MEF-споріднених) позитивно регулювався в 2,9-4,1.

8. MRP-14 (Ca-зв'язуючий білок у макрофагах, MIF-споріднених) позитивно регулювався в 3,0-3,8 рази.

9. Релаксини H2 позитивно регулювався в 3,14 рази.

10. Рецептор III 300kDa трансформуючого фактора-бета росту позитивно регулювався в 2,4-3,6 рази.

Гени, що показують синергію при обробці інтерлейкіном-20 (IL-20) та інтерлейкіном-1 (IL-1)

1. Кістковий мофогенний білок 2a позитивно регулювався в 1,8 рази при обробці тільки інтерлейкіном-20 (IL-20), у 2,5 рази при обробці тільки інтерлейкіном-1 (IL-1) і у 8,2 рази при обробці IL-20 та IL-1.

2. MRP-8 позитивно регулювався в 2,9 рази при обробці тільки IL-20, у 10,7 разів при обробці тільки IL-1 і у 18,0 разів при обробці IL-20 та IL-1.

3. Фактор еритроїдного диференціювання позитивно регулювався в 1,9 рази при обробці тільки IL-20, у 9,7 разів при обробці тільки IL-1 і у 19,0 разів при обробці IL-20 та IL-1.

4. MRP-14 (Ca-зв'язуючий білок у макрофагах, MIF-споріднених) позитивно регулювався в 3,0 рази при обробці тільки IL-20, у 12,2 разів при обробці тільки IL-1 і у 20,3 разів при обробці IL-20 та IL-1.

5. Гепарин-зв'язуючий EGF-подібний фактор позитивно регулювався в 2,0 рази при обробці тільки IL-20, у 14 разів при обробці тільки IL-1 і у 25,0 разів при обробці IL-20 та IL-1.

6. β -тромбоглобулін-подібний білок позитивно регулювався в 1,5 рази при обробці тільки IL-20, у 15 разів при обробці тільки IL-1 і у 27 разів при обробці IL-20 та IL-1.

7. Отриманий з мозоку нейротрофний фактор позитивно регулювався в 1,7 рази при обробці тільки IL-20, у 25 разів при обробці тільки IL-1 і у 48 разів при обробці IL-20 та IL-1.

8. Хемотаксичний фактор активації моноцитів позитивно регулювався в 1,3 рази при обробці тільки IL-20, у 32 рази при обробці тільки IL-1 і у 56 разів при обробці IL-20 та IL-1.

Приклад 5

Злитий гетеротетрамер IL-20R/ARB - рецептор Ig

Для експресії рекомбінантного злитого білка IL-20- рецептор Ig використовували вектор експресії pEZE3. Плазмиду pEZE3 отримали з pDC312. Плазмиду pDC312 отримали за ліцензією ф. "Immunex Corporation". Плазмиди pDC312 та pEZE3 містять сегмент EASE, описаний у [WO 97/25420]. Присутність сегменту EASE у векторі експресії може поліпшувати експресію рекомбінантних білків у 2-8 разів у стабільних клітинних групах.

Плазміда pEZE3 - це трицистронний вектор експресії, який можна використовувати для експресії трьох різних білків в клітинах ссавців, краще в клітинах яєчника китайського хом'яка. Одиниця експресії pEZE3 містить енхансер/промотор цитомегаловірусу, трироздільну лідерну послідовність аденовірусу, сайт множинного клонування для введення кодуєчої зони для першого рекомбінантного білка, внутрішній сайт входження рибосоми поліовірусу типу 2, другий сайт множинного клонування для введення кодуєчої зони для другого рекомбінантного білка, внутрішній сайт входження рибосоми вірусу енцефаломіокардиту, кодуєчий сегмент дигідрофолатредуктази миші і термінатор транскрипції SV40. Крім того, pEZE3 містить точку

початку реплікації E.coli і бактеріальний ген β -лактамази.

Злитий білок IL-20- рецептор Ig - це дисульфідно зв'язаний гетеротетрамер, який складається з двох ланцюгів позаклітинного домену людського IL-20RB, злитого з константною зоною легкого ланцюга каппа людського імуноглобуліну дикого типу, і двох ланцюгів позаклітинного домену білка IL-20RA людини, злитого з константною зоною мурованого людського імуноглобуліну гамма-1. Константна зона людського імуноглобуліну гамма-1 містить амінокислотні заміни для зменшення зв'язування Fc γ RI і фіксації комплексу C1q.

Зливу конструкцію IL-20RB - константна зона легкого ланцюга каппа імуноглобуліна людини отримували за допомогою перекриваючої РПЦ. Кодуючий сегмент IL-20RB складається з амінокислот 1-230. Матрицю для РПЦ-ампліфікації сегменту IL-20R генерували, використавши структурний компонент експресії константної зони легкого ланцюга каппа людського IL-20RB, як описано далі у Прикладі 12. Для ампліфікації сегменту IL-20RB використовували олігонуклеотидні праймери SEQ ID NO 24 і SEQ ID NO 25. Використовували всю константну зону легкого ланцюга каппа людського імуноглобуліну дикого типу. Матрицю для ампліфікації РПЦ сегменту константної зони легкого ланцюга каппа людського імуноглобуліну дикого типу генерували, використавши структурний компонент експресії константної зони легкого ланцюга каппа людського IL-20RB, як описано у Прикладі 12. Для ампліфікації константної зони легкого ланцюга каппа людського імуноглобуліну дикого типу використовували олігонуклеотидні *znhfdrb* SEQ ID NO 26 і SEQ ID NO 27. Ці два білок-кодуєчі домени зв'язували шляхом перекриваючої РПЦ, використовуючи олігонуклеотидні послідовності SEQ ID NO 24 і SEQ ID NO 27. Між цими двома білковими доменами вставляли пептидний лінкер (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO 72). Пептидний лінкер (Gly₄Ser)₃ кодували на праймерах РПЦ: SEQ ID NO 26 і SEQ ID NO 25. Отриманий в результаті злитий структурний компонент позаклітинний домен IL-20RB/константна зона легкого ланцюга показано послідовностями SEQ ID NOs: 20 і 21. Цей спроектований зрілий поліпептид, без сигнальної послідовності, являє собою SEQ ID NO 60. Ділянка позаклітинного домену IL-20RB, яку було фактично використано, являла собою амінокислотну послідовність SEQ ID NO 61. N-термінальне секвенування дало в результаті очікувану амінокислотну послідовність.

Зливу конструкцію IL-20RA людини - константна зона важкого ланцюга імуноглобуліну гамма 1 людини генерували шляхом перекриваючої РПЦ чотирьох окремих фрагментів причому кожний генерували окремою ампліфікацією РПЦ. Перший фрагмент містив оптимізовану сигнальну послідовність tPA (активатор плазміногена тканини). Цю сигнальну послідовність tPA ампліфікували, використовуючи олігонуклеотидні праймери: SEQ ID NO 28 і SEQ ID NO 29, застосовувавши як матрицю власний раніше генерований вектор експресії. Другий фрагмент містив зону, кодуєчу позаклітинний домен IL-20RA, яка складалася з амінокислот 30-243 послідовності SEQ ID NO 11. Для ампліфі-

кації цього сегменту IL-20RA використовували олігонуклеотидні праймери SEQ ID NO 30 і SEQ ID NO 31, застосовуючи як матрицю раніше генерований клон IL-20RA.

Константну зону важкого ланцюга гамма-1 людини генерували з 2 сегментів. Перший сегмент, що містив домен CH1, ампліфікували, використовуючи олігонуклеотидні праймери SEQ ID NO 32 і SEQ ID NO 33, застосовуючи як матрицю клон константної зони важкого ланцюга людського імуноглобуліну гамма-1 дикого типу. Другий сегмент, який містив шарнір, що залишився, домени CH2 і CH3 константної зони важкого ланцюга людського імуноглобуліну гамма-1 генерували шляхом ампліфікації РПЦ, використовуючи олігонуклеотидні праймери SEQ ID NO 34 і SEQ ID NO 35. Матрицю для цієї ампліфікації РПЦ взяли з раніше генерованого структурного компонента Fc конструкції імуноглобуліну гамма-1 людини, який містив кодо-ни для амінокислотних замін, щоб зменшити зв'язування FcγRI і фіксацію комплексу C1q, як описано у Прикладі 12.

Ці чотири кодуючі домени зв'язували шляхом перекриваючої РПЦ, використовуючи олігонуклеотидні SEQ ID NO 28 і SEQ ID NO 35. Між білковими домонами IL-20RA і CH1 вставляли пептидний лінкер (Gly₄Ser)₃. Пептидний лінкер (Gly₄Ser)₃ кодували на РПЦ-праймерах: SEQ ID NO 32 і SEQ ID NO 31. Злитий білок "позаклітинний домен IL-20RA/домен константної зони важкого ланцюга людського імуноглобуліну гамма 1" і послідовність ДНК показані в SEQ ID NOs: 22 і 23. Очікувана зріла поліпептидна послідовність (без сигнальної послідовності) являє собою SEQ ID NO 62. Фактично використана ділянка позаклітинного домену IL-20RA являла собою SEQ ID N) 63.

Кодуючий сегмент, злитий з константною зоною легкого ланцюга каппа людського імуноглобуліну позаклітинного домену IL-20RB, клонували в другий кодуючий сегмент миші, тоді як кодуючий сегмент, злитий з константною зоною важкого ланцюга людського імуноглобуліну гамма-1 позаклітинного домену IL-20RA людини, клонували в перший кодуючий сегмент миші плазмиди pEZE3. Цю плазмиду використали для трансфекції клітин яєчника китайського хом'яка. Клітини селекували в середовищі без гіпоксантину або тимідину, і трансген ампліфікували, використавши метотрексат. Наявність білка аналізували вестерн-блоттингом, використовуючи константну зону важкого ланцюга нелюдського імуноглобуліну гамма-1 і антитіла легкого ланцюга каппа нелюдського імуноглобуліну. N-термінальне секвенування показало, що оптимізований лідер tPA не був повністю розщеплений. Маса, яку досліджували, показала, що першим залишком поліпептидної послідовності була піроглутамінова кислота, N-термінальною послідовністю виявилась піроEEEIHAELRRFRVPCVSGG (SEQ ID NO 64), причому підкреслена ділянка являла собою залишки лідера tPA.

Приклад 6

Трансгенний фенотип IL-20

IL-20 і людини, і миші переэкспресували у трансгенних мишей, використовуючи різні промотори. Щоб досягти циркулюючих рівнів білка, спо-

чатку використовували промотор альбуміну миші, специфічний до печінки, який спрямовує експресію людського IL-20. Наступні дослідження проводили, використовуючи промотор кератин 14 (K14), який, головним чином, націлює експресію на епідерміс та інші багат шарові сквамозні епітеліальні тканини; промотор металотіонеїн-1 миші, який дає широку картину експресії, і промотор EμLCK, який стимулює експресію в клітинах лімфоїдного ряду. В усіх чотирьох випадках отримали аналогічні результати, можливо, тому, що всі ці промотори підвищували циркуляційні рівні IL-20.

В усіх випадках трансгенні мишенята, які експресували трансген IL-20, були меншими, ніж не-трансгенні брати з приплоду, мали ніби відполірований зовнішній вигляд із щільною зморшкованою шкірою і вмирили впродовж кількох днів після народження. В шлунках мишенят було молоко, що вказувало на їхню здатність його смоктати. Ці миші мали розпухлі кінцівки, хвіст, зони ніздрів та рота і мали проблеми з пересуванням. Крім того, ці миші були слабкими, позбавленими видимої жирової тканини, мали уповільнений розвиток вух та пальців стопи. Низькі рівні експресії в печінці (менш ніж 100 молекул мРНК на клітину) були достатніми і для летальності новонародженого, і для дефектів шкіри. Трансгенні миші без видимого фенотипу ані експресували цей трансген, ані експресували його на рівнях, які можна було б детектувати, або були мозаїчними.

Гістологічний аналіз шкіри мишей з трансгеном IL-20 показав потовщений епідерміс, гіперкератоз та твердий роговий шар порівняно з не-трансгенними мишенятами. Іноді спостерігали сероклітинні струпи. Аналіз шкіри трансгенних мишей за допомогою електронного мікроскопа показав включення інтрамітохондріального ліпоїду, гранули мозаїчного кератогліаліну і відносно мало тонофіламентів, подібних до філаментів, які спостерігали в псоріатичній шкірі людини і в моделях хвороб шкіри мишей. Крім того, багато з трансгенних мишей мали апоптотичні тимусні лімфоцити. Ніяких інших аномалій гістологічний аналіз не виявив. Ці результати гістологічного аналізу та аналізу за допомогою електронного мікроскопа підтвердили і розширили отримані шляхом спостереження макроскопічні зміни шкіри.

Приклад 7

Специфічність та спорідненість IL-20 до його рецептора

Специфічність та спорідненість IL-20 до його рецептора визначали, використовуючи клітини BHK, стабільно трансфектовані IL-20RA, IL-20RB або обома субодинами рецептора. Аналіз на зв'язування з використанням ліганду, міченого радіоактивним ізотопом, показав, що IL-20 зв'язується з трансфектантами BHK, які експресують і IL-20RA, і IL-20RB, а не з трансфектованими клітинами і не з трансфектантами, які експресують будь-яку одну субодинами рецептора. Зв'язування IL-20, міченого ізотопом ¹²⁵I, виключали в присутності 100-кратного надлишку неміченого IL-20, а не 100-кратного надлишку неспорідненого цитокіну, IL-21. Визначили, що зв'язувальна схожість (K_D) IL-20 і гетеродимерного рецептора IL-20RA/IL-20RB складає приблизно 1,5нМ.

Приклад 8

Активация рецептора IL-20

Щоб визначити, чи веде зв'язування IL-20 до активації рецептора, фактор-залежну пре-В клітинну лінію BaF3 котрансфектували IL-20RA та IL-20RB і обробляли інтерлейкіном-20 (IL-20) при різних концентраціях. IL-20 стимулював проліферацію в залежності від дози і давав виявлюваний сигнал при 1,1pM, з половинною максимальною відповіддю при 3,4pM. Помітили, що концентрація IL-20 для половинної максимальної проліферативної відповіді в клітинах BaF3 в 1000 разів нижча, ніж концентрація для половинної максимальної зв'язувальної схожості в клітинах BHK. Можливим поясненням такої великої різниці може бути використання різних клітинних ліній, різні рівні експресії рецепторів і різні результати аналізів. IL-20 також стимулював сигнальну трансдукцію у біологічно релевантній клітинній лінії людських кератиноцитів HaCaT, які природно експресують IL-20RA і IL-20RB. Отже, IL-20 зв'язує і активує гетеродимерний рецептор IL-20RA/IL-20RB при концентраціях, очікуваних для цитокіну. Негативні контрольні групи містили нетрансфектовані BaF3.

Приклад 9

Аналіз експресії IL-20RA і IL-20RB

Щоб визначити експресійну картину IL-20RA і IL-20RB, проводили РПЦ з контролем за допомогою рентгенівських променів або гамма-променів на ряді тканин людини. Найбільше обидві субодиниці рецептора експресувалися в шкірі та яєчку. Важливим результатом є те, що IL-20RA і IL-20RB, обидва, було експресовано в шкірі, де вони були проміжною ланкою у відповіді, викликаній IL-20. І IL-20RA, і IL-20RB також було експресовано в моноцитах, легені, яєчнику, м'язі, яєчку, наднирковій залозі, серці, слинній залозі та плаценті. IL-20RA також є в мозку, нирці, печінці, ободовій кишці, тонкій кишці, шлунку, щитовидній залозі, підшлунковій залозі, матці та простаті, а IL-20RB немає.

Приклад 10

мРНК IL-20RA та IL-20RB позитивно регулюються при псоріазі

Застосовували *in situ* гібридизацію, щоб визначити, чи змінюється експресія рецептора IL-20 при псоріазі. Проби шкіри від чотирьох пацієнтів, хворих на псоріаз, і трьох неуразжених пацієнтів аналізували за допомогою зондів, специфічних до мРНК двох вищезгаданих субодиниць рецептора. Всі чотири проби псоріатичної шкіри мали високі рівні мРНК IL-20RA і IL-20RB в кератиноцитах, тоді як проби нормальної шкіри не мали виявлюваних рівнів мРНК жодної субодиниці рецептора. Позитивні сигнали у псоріатичній шкірі також спостерігали в мононуклеарних імункомпетентних клітинах і в ендотеліальних клітинах в субпопуляції судин. Тому, і IL-20RA, і IL-20RB експресували в кератиноцитах, імункомпетентних клітинах та ендотеліальних клітинах, тобто основних типах клітин, які, як гадають, взаємодіють при псоріазі.

Приклад 11

Клонування IL-20RA миші

Генерували зонд міжвидової гібридизації, який містив фрагмент повномірної кДНК, кодуєючий IL-20RA людини. Проводили саузерн-блоттинг геномної ДНК миші і нозерн-блоттинг РНК миші, щоб

показати, що кДНК людського IL-20RA можливо специфічно гібридизувати з послідовностями миші. Результати нозерн-блоттингу показали, що РНК IL-20RA миші є присутньою в 15- і 17-денному ембріоні миші, так само як серце, мозок, легеня, печінка, нирка, яєчка, селезінка, тимус, шлунок і тонка кишка.

Щоб провести скринінг геномної бібліотеки миші, використовували зонд гібридизації повномірної ДНК людського IL-20RA. Цю бібліотеку, отриману від ф. "Clontech" (Palo Alto, CA), генерували з часткового розщеплення MboI геномної ДНК миші і клонували в сайт *BatHI* бактеріофага лямбда EMBL3 SP6/T7. Позитивний бактеріофаг був очищений від бляшок, і ДНК бактеріофага отримували, використовуючи систему очищення ДНК "Promega's Wizard Lambda Preps DNA Purification System". З цього позитивного бактеріофага генерували два фрагменти рестрикційного ферменту, фрагмент *EcoRI* довжиною 5,7т.п.н. і фрагмент *Sad* довжиною 8,0т.п.н., і клонували в *pBluescript*. Аналіз послідовності ДНК виявив наявність 3 екзонів від ортологу миші до IL-20RA людини.

Сконструювали праймери РПЦ з 5' UTR, послідовність SEQ ID NO 40, і 3' UTR, послідовність SEQ ID NO 41, щоб генерувати повномірну послідовність IL-20RA миші шляхом ампліфікації РПЦ. КДНК 15- та 17-денного ембріону миші використовували як матрицю для ампліфікації РПЦ. Для підтвердження продукти РПЦ субклонували та секвенували. Послідовностями миші були SEQ ID NOs: 36 і 37. Зрілий позаклітинний домен являв собою SEQ ID NO 38.

Приклад 12

Конструювання гетеротетрамера рецептора IL-20

Сконструювали вектор, експресуючий секретований гетеродимер hIL-20RA/hIL-20RB. В цьому структурному компоненті позаклітинний домен hIL-20RA був злитий з важким ланцюгом імунoglobulinу гамма 1 класу G (*IgG γ 1*), а позаклітинна ділянка IL-20RB була злита з легким ланцюгом каппа людини (легкий ланцюг κ людини).

Конструювання векторів злиття *IgG* гамма 1 і легкого ланцюга κ людини

Важкий ланцюг *IgG γ 1* клонували у вектор експресії *Zem229R* ссавця (депонований під №69447 Американської колекції клітинних культур (АККК)) таким чином, що кожен позаклітинний ділянку рецептора з сайтом 5' *EcoRI* і сайтом 3' *NheI* можна було клонувати, отримуючи в результаті злиття "N-термінальний позаклітинний домен-С-термінальний *IgG γ 1*". Фрагмент *IgG γ 1*, застосований в цьому структурному компоненті, отримували, використовуючи РПЦ для виділення послідовності *IgG γ 1* з бібліотеки кДНК печінки зародка людини (ф. "Clontech") як матриці. Реакцію преципітації з використанням олігопослідовностей SEQ ID NO 42 і SEQ ID NO 43 проводили таким чином: 40 циклів при 94°C впродовж 60сек., при 53°C впродовж 60сек. і при 72°C впродовж 120сек.; і при 72°C впродовж 7 хвилин. Продукти РПЦ відокремлювали шляхом електрофорезу в агарозному гелі і очищували, використовуючи набір реагентів *QiaQuick™* для екстракції гелю (ф. "Qiagen Inc.", Valencia, CA). Виділений фрагмент ДНК, довжиною

990п.о., біологічно обробляли, використовуючи MluI і EcoRI (Boehringer-Mannheim), екстрагували за допомогою набору QiaQuick™ для екстракції гелю і вшивали за допомогою олігопослідовностей SEQ ID NO 44 і SEQ ID NO 45, які містили лінкер MluI/EcoRI, в Zem229R, попередньо оброблений MluI і EcoRI, застосовуючи описані тут стандартні методи молекулярної біології. Цей родовий клонуючий вектор назвали Vector No.76 hlgGammal w/ Ch1 No.786 Zem229R (Вектор №76). Полінуклеотидна послідовність позаклітинного домену hIL-20RA, злитого з важким ланцюгом IgG гамма 1, показана в SEQ ID NO 52, а відповідна поліпептидна послідовність - в SEQ ID NO 53, причому зрілий поліпептид, без сигнальної послідовності, являє собою SEQ ID NO 54. Ділянкою використаного позаклітинного домену IL-20RA була SEQ ID NO 55.

Людський легкий ланцюг к клонували у вектор експресії Zem229R (депонований під №69446 AKKK) таким чином, що будь-яку позаклітинну ділянку рецептора з сайтом 5' EcoRI і сайтом 3' KpnI можна було клонувати, отримуючи в результаті злиття "N-термінальний позаклітинний домен-С-термінальний легкий ланцюг к людини". Фрагмент людського легкого ланцюга к, використаний в цьому структурному компоненті, отримували, застосовуючи РПЦ для виділення послідовності легкого ланцюга к людини з бібліотеки кДНК печінки зародка людини (ф. "Clontech"), згаданої вище. Реакцію преципітації проводили, використовуючи олігопослідовності SEQ ID NO 46 і SEQ ID NO 47. Продукти РПЦ відокремлювали шляхом електрофорезу в агарозному гелі і очищували, застосовуючи набір QiaQuick™ (ф. "Qiagen") для екстракції гелю. Виділений фрагмент ДНК, довжиною 315п.о., біологічно обробляли MluI і EcoRI (Boehringer-Mannheim), екстрагували за допомогою набору QiaQuick™ для екстракції гелю і вшивали за допомогою лінкера MluI/EcoRI, описаного вище, в Zem228R, попередньо оброблений MluI та EcoRI, застосовуючи описані тут стандартні методи молекулярної біології. Цей родовий клонуючий вектор назвали Vector No.77 hklight No.774 Zem228R (Вектор №77). Полінуклеотидна послідовність позаклітинної ділянки IL-20RB, злитої з легким ланцюгом к людини, показана в SEQ ID NO 56, а відповідна поліпептидна послідовність - в SEQ ID NO 57, причому зрілий поліпептид, без сигнальної послідовності, являє собою SEQ ID NO 58. Ділянкою фактично застосованого позаклітинного домену IL-20RB була SEQ ID NO 59.

Вставляння позаклітинних доменів людського IL-20RA і IL-20RB в злиті векторні конструкції

Використовуючи описані вище сконструйовані вектори, отримали структурний компонент з IL-20RA людини, злитим з IgGγ1. Цю структуру будували, здійснюючи РПЦ для отримання рецептора людського IL-20RA з Вектора №102 hIL-20RA/IgG за допомогою олігопослідовностей SEQ ID NO 48 і SEQ ID NO 49 за таких умов: 30 циклів при 94°C впродовж 60сек., при 57°C впродовж 60сек. і при 72°C впродовж 120сек., і ще при 72°C впродовж 7 хвилин. Отриманий в результаті продукт РПЦ біологічно обробляли EcoRI та NheI, очищували від гелю описаним вище способом і вшивали у Вектор

№76, попередньо оброблений EcoRI та NheI і очищений від диска. Отриманий в результаті вектор секвенували для підтвердження того, що злиття людський IL-20RA/IgG гамма 1 (hIL-20RA/Chl IgG) вірне. Вектор hIL-20RA/Chl IgG gamma 1 No. 1825 Zem229R назвали Вектором №195. Отримана таким чином послідовність IL-20RA/Chl IgGγ1 представлена як SEQ ID NOs: 52 і 53. N-термінальне секвенування вказувало на присутність прогнозованої зрілої поліпептидної послідовності SEQ ID NO 54.

Сконструювали також окремий структурний компонент з IL-20RB, злитим з легким ланцюгом к. Структуру IL-20RB/легкий ланцюг к людини отримували, як описано вище, шляхом РПЦ з DR1/7N-4 за допомогою олігопослідовностей SEQ ID NO 50 і SEQ ID NO 51, розщепленням смуги EcoRI та KpnI і наступного вшивання цього продукту в попередньо розщеплений EcoRI та KpnI і очищений від смуги на гелі Вектор №77 (див. вище). Отриманий в результаті вектор секвенували для підтвердження того, що злиття IL-20RB/легкий ланцюг к людини (IL-20RB/klight) вірне. Цей структурний компонент IL-20RB/klight представлено послідовностями SEQ ID NOs: 56 і 57. N-термінальне секвенування цього результуючого поліпептиду вказувало на наявність прогнозованої зрілої амінокислотної послідовності SEQ ID NO 58. SEQ ID NO 59 - це зріла ділянка використаного позаклітинного домену IL-20RB.

Коекспресія рецепторів IL-20RA та IL-20RB людини

Приблизно 16мкг кожного з вищеописаних векторів №194 і №195 трансфектували в клітини BHK-570 (AKKK № CRL-10314), використавши реагент Lipofectamine™ (ф. "Gibco/BRL") за інструкціями виробника. Трансфектовані клітини селектували впродовж 10 днів у розчині МДСІ+5% ФБС (ф. "Gibco/BRL"), що містив 1мкМ метотрексату (МТС) (ф. "Sigma", St.Louis, MO) і 0,5мг/мл G418 (ф. "Gibco/BRL"). Отриману в результаті групу трансфектантів знову селектували в 10мкМ МТС і 0,5мг/мл G418 впродовж 10 днів.

Результуючу групу двічі селектованос клітин використовували для продукування білка. Три факторії (ф. "Nunc, Denmark") цієї групи застосовували для виготовлення 8 L безсироваткового кондиціонованого середовища. Це кондиціоноване середовище пропускали над 1мл-колонкою білка А та елюювали на 10 фракцій по 750мл. Чотири з цих фракцій з виявленою найвищою концентрацією групували і піддавали діалізу (відсічка 10 kD MW) поруч з ФБС. І нарешті, діалізований матеріал піддали біохімічному аналізу (Pierce) і виявили концентрацію 317мкМ. Всього ж з очистки цих 8 L кондиціонованого середовища отримали 951мкг.

Приклад 13

Зв'язування IL-20 активує PCAT3 в клітинній лінії кератиноцитів HaCaT

IL-20 зв'язує клітинні лінії, трансфектовані обома субодиницями його рецептора. Однак ці клітинні лінії надекспресують рецептор IL-20 відносно його нормального рівня, і їхня релевантність до фізіологічної ролі IL-20 незрозуміла. Щоб дослідити сигнальну трансдукцію IL-20 у біологічно релевантному типі клітин, використовували клітинну

лінію людських кератиноцитів HaCaT, яка експресує ендогенні IL-20RA та IL-20RB, Клітини HaCaT заражали рекомбінантним аденовірусом, що містить інформаційний структурний компонент, щоб дати можливість виявлення внутрішньоклітинного передавання сигналу. Цей структурний компонент складається з гена Photinus-люциферин-4 монооксигенази, стимульованого послідовностями промотор/енхансер, які складаються з елементу, реагуючого на сироватку (EPC), та елементів, які є перетворювачами сигналів та активаторами трансдукції (PCATами). Ця аналітична система виявляє продуктивні взаємодії ліганд-рецептор та показує можливі компоненти сигнальної трансдукції справа, які беруть участь в активації рецептора. Обробка тільки інтерлейкіном-20 (IL-20) призвела до дозо-залежного збільшення активації люциферази, причому напівмаксимальна реакція відбувалась приблизно при 2,3нМ. Наступні інформаційні аналізи люциферази з використанням аденовірусних векторів, які містили тільки EPC або тільки PCATи, давали виявлювану інформаційну активність тільки через PCATи.

Щоб визначити, чи діють інші цитокіни узгоджено з IL-20, клітини HaCaT обробляли тільки IL-20 або у комбінації з однією субмаксимальною дозою фактора росту епідерміса, IL-1 β або TNF α . В присутності кожного з цих трьох білків обробка інтерлейкіном-20 дала в результаті дозо-залежне збільшення активності люциферази. IL-20 у поєднанні з IL-1 β дає в результаті напівмаксимальну реакцію, приблизно при 0,5нМ, що у 5 разів нижче, ніж при обробці тільки інтерлейкіном-20. Крім того, активацію інформаційного гена можливо виявити при 0,1нМ IL-20, тобто при дозі, яка є принаймні в 10 разів меншою, ніж необхідна доза тільки IL-20.

Щоб визначити, чи необхідне парування рецептора для стимуляції інтерлейкіном-20 PCAT-люциферази, використовували клітини BHK, трансфековані IL-20RA і IL-20RB або обома субодинацями рецептора. Як це було і при аналізах на зв'язування, тільки клітини, трансфековані обо-

ма субодинацями рецептора, реагували на IL-20 і робили це з напівмаксимальною реакцією при 5,7нМ. Помітили, що концентрація IL-20 для напівмаксимальної реакції у клітинах BHK в 400 разів менша за концентрацію для напівмаксимальної реакції у клітинах HaCaT. Можливо, що для напівмаксимальної реакції в клітинах BHK потрібна менша концентрація IL-20, порівняно з клітинами HaCaT, завдяки більш високим рівням рецептора в трансфектантах рецептора BHK IL-20.

Щоб ідентифікувати PCAT-білки, утігнуті в дію IL-20, застосовували аналіз на ядерну транслокацію і клітини HaCaT, з ендогенними рецепторами IL-20, і клітини BHK, трансфековані IL-20RA і IL-20RB, обробляли білком IL-20, і транслокацію факторів транскрипції PCAT3 і PCAT1 із цитоплазми в ядро аналізували методом імуофлуоресценції.

В нестимульованих клітинах HaCaT забарвлювання PCAT3 відбувалось, переважно, у цитоплазмі. Обробка клітин HaCaT інтерлейкіном-20 дала в результаті виразну акумуляцію PCAT3 в ядрі. У відповідь на збільшення концентрацій IL-20 ядерна транслокація відбувалась при напівмаксимальній концентрації IL-20 7нМ. На відміну від транслокації PCAT3 клітини HaCaT, оброблені IL-20, не показали будь-якої виявлюваної ядерної акумуляції PCAT1.

Щоб підтвердити, що рецептор IL-20 є необхідним для стимуляції інтерлейкіном-20 ядерної транслокації PCAT3, використовували клітини BHK, трансфековані IL-20RA та IL-20RB. У клітинах BHK, позбавлених рецептора IL-20, PCAT3 залишався цитозольним після обробки інтерлейкіном-20. В протилежність цьому, в клітинах BHK, трансфекованих рецептором IL-20, PCAT3 транслокувався в ядро під впливом IL-20. І знову, PCAT1 залишився цитозольним незалежно від обробки інтерлейкіном-20 або експресії рецептора IL-20. Зробили висновок, що рецептор IL-20 необхідний для опосередкованої інтерлейкіном-20 активації PCAT3.

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> Soluble Interleukin-20 Receptor

<130> 99-107PC

<150> 09/471,774

<151> 1999-12-23

<150> 60/213,416

<151> 2000-06-22

<160> 72

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 176

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

```

43

84830

44

Ile Leu Ser His Phe Glu Lys Leu Glu Pro Gln Ala Ala Val Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Glu Leu Asp Ile Leu Leu Gln Trp Met Glu Glu Thr Glu
 165 170 175

<210> 2

<211> 152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3

<211> 151

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Lys Ala Ser Ser Leu Ala Phe Ser Leu Leu Ser Ala Ala Phe Tyr
 1 5 10 15
 Leu Leu Trp Thr Pro Ser Thr Gly Leu Lys Thr Leu Asn Leu Gly Ser
 20 25 30

45	84830	46
Cys Val Ile Ala Thr Asn Leu Gln Glu Ile Arg Asn Gly Phe Ser Asp		
35	40	45
Ile Arg Gly Ser Val Gln Ala Lys Asp Gly Asn Ile Asp Ile Arg Ile		
50	55	60
Leu Arg Arg Thr Glu Ser Leu Gln Asp Thr Lys Pro Ala Asn Arg Cys		
65	70	75
Cys Leu Leu Arg His Leu Leu Arg Leu Tyr Leu Asp Arg Val Phe Lys		
85	90	95
Asn Tyr Gln Thr Pro Asp His Tyr Thr Leu Arg Lys Ile Ser Ser Leu		
100	105	110
Ala Asn Ser Phe Leu Thr Ile Lys Lys Asp Leu Arg Leu Cys Leu Glu		
115	120	125
Pro Gln Ala Ala Val Val Lys Ala Leu Gly Glu Leu Asp Ile Leu Leu		
130	135	140
Gln Trp Met Glu Glu Thr Glu		
145	150	

<210> 4
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
Leu Lys Thr Leu Asn Leu Gly Ser Cys Val Ile Ala Thr Asn Leu Gln
1 5 10 15
Glu Ile Arg Asn Gly Phe Ser Asp Ile Arg Gly Ser Val Gln Ala Lys
20 25 30
Asp Gly Asn Ile Asp Ile Arg Ile Leu Arg Arg Thr Glu Ser Leu Gln
35 40 45
Asp Thr Lys Pro Ala Asn Arg Cys Cys Leu Leu Arg His Leu Leu Arg
50 55 60
Leu Tyr Leu Asp Arg Val Phe Lys Asn Tyr Gln Thr Pro Asp His Tyr
65 70 75 80
Thr Leu Arg Lys Ile Ser Ser Leu Ala Asn Ser Phe Leu Thr Ile Lys
85 90 95
Lys Asp Leu Arg Leu Cys Leu Glu Pro Gln Ala Ala Val Val Lys Ala
100 105 110
Leu Gly Glu Leu Asp Ile Leu Leu Gln Trp Met Glu Glu Thr Glu
115 120 125

<210> 5
 <211> 176
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

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

<210> 6

<211> 152

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

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

49	84830	50
Thr Leu Arg Lys Ile Ser Ser Leu Ala Asn Ser Phe Leu Ile Ile Lys		
	85	90
Lys Asp Leu Ser Val Cys His Ser His Met Ala Cys His Cys Gly Glu		95
	100	105
Glu Ala Met Glu Lys Tyr Asn Gln Ile Leu Ser His Phe Ile Glu Leu		110
	115	120
Glu Leu Gln Ala Ala Val Val Lys Ala Leu Gly Glu Leu Gly Ile Leu		125
	130	135
Leu Arg Trp Met Glu Glu Met Leu		140
145	150	

<210> 7
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7	
Cys Val Ile Thr Ala Asn Leu Gln Ala Ile Gln Lys Glu Phe Ser Glu	
1	5
Ile Arg Asp Ser Val Gln Ala Glu Asp Thr Asn Ile Asp Ile Arg Ile	10
	15
	20
Leu Arg Thr Thr Glu Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ser Leu Asp Arg Cys	25
	30
	35
Cys Phe Leu Arg His Leu Val Arg Phe Tyr Leu Asp Arg Val Phe Lys	40
	45
	50
Val Tyr Gln Thr Pro Asp His His Thr Leu Arg Lys Ile Ser Ser Leu	55
	60
65	70
Ala Asn Ser Phe Leu Ile Ile Lys Lys Asp Leu Ser Val Cys His Ser	75
	80
	85
His Met Ala Cys His Cys Gly Glu Glu Ala Met Glu Lys Tyr Asn Gln	90
	95
	100
Ile Leu Ser His Phe Ile Glu Leu Glu Leu Gln Ala Ala Val Val Lys	105
	110
	115
Ala Leu Gly Glu Leu Gly Ile Leu Leu Arg Trp Met Glu Glu Met Leu	120
	125
130	135
	140

<210> 8
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

51					84830					52					
Met	Lys	Gly	Phe	Gly	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Phe
1				5				10						15	
Leu	Leu	Trp	Thr	Pro	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Thr	Leu	His	Leu	Gly	Ser
			20				25					30			
Cys	Val	Ile	Thr	Ala	Asn	Leu	Gln	Ala	Ile	Gln	Lys	Glu	Phe	Ser	Glu
	35					40				45					
Ile	Arg	Asp	Ser	Val	Ser	Leu	Asp	Arg	Cys	Cys	Phe	Leu	Arg	His	Leu
	50					55				60					
Val	Arg	Phe	Tyr	Leu	Asp	Arg	Val	Phe	Lys	Val	Tyr	Gln	Thr	Pro	Asp
65				70				75						80	
His	His	Thr	Leu	Arg	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Ile
			85				90						95		
Ile	Lys	Lys	Asp	Leu	Ser	Val	Cys	His	Ser	His	Met	Ala	Cys	His	Cys
			100				105						110		
Gly	Glu	Glu	Ala	Met	Glu	Lys	Tyr	Asn	Gln	Ile	Leu	Ser	His	Phe	Ile
	115					120						125			
Glu	Leu	Glu	Leu	Gln	Ala	Ala	Val	Val	Lys	Ala	Leu	Gly	Glu	Leu	Gly
	130			135				140							
Ile	Leu	Leu	Arg	Trp	Met	Glu	Glu	Met	Leu						
145				150											

<210> 9
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9															
Leu	Lys	Thr	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Cys	Val	Ile	Thr	Ala	Asn	Leu	Gln
1			5					10						15	
Ala	Ile	Gln	Lys	Glu	Phe	Ser	Glu	Ile	Arg	Asp	Ser	Val	Ser	Leu	Asp
		20					25					30			
Arg	Cys	Cys	Phe	Leu	Arg	His	Leu	Val	Arg	Phe	Tyr	Leu	Asp	Arg	Val
	35					40				45					
Phe	Lys	Val	Tyr	Gln	Thr	Pro	Asp	His	His	Thr	Leu	Arg	Lys	Ile	Ser
	50			55				60							
Ser	Leu	Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Ile	Ile	Lys	Lys	Asp	Leu	Ser	Val	Cys
65			70					75						80	
His	Ser	His	Met	Ala	Cys	His	Cys	Gly	Glu	Glu	Ala	Met	Glu	Lys	Tyr
			85				90						95		
Asn	Gln	Ile	Leu	Ser	His	Phe	Ile	Glu	Leu	Glu	Leu	Gln	Ala	Ala	Val
		100					105					110			
Val	Lys	Ala	Leu	Gly	Glu	Leu	Gly	Ile	Leu	Leu	Arg	Trp	Met	Glu	Glu
	115			120				125							

53	84830	54
Met Leu		
130		
<210> 10		
<211> 3516		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<221> CDS		
<222> (237)...(1895)		
<400> 10		
tccagctggg tagccggggg agcgcgcgtg ggggctccgc gagtcgctcg cccttggttt	60	
ctggggaagc ctgggggacg cggctgtggc ggaggcgccc tgggactcag gtcgcctgga	120	
gcgtggcacg cagagcccca ggcgcggagc tgaggccgcg cggccgcgct tggccccagc	180	
gggcgtggga ctgagcagtc tgctgcccc cgacatgtga cccagcccc cgcgcc atg	239	
	Met	
	1	
cgg gct ccc ggc cgc ccg gcc ctg cgg ccg ctg ccg ctg ccg ccg ctg	287	
Arg Ala Pro Gly Arg Pro Ala Leu Arg Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu		
5 10 15		
ctg ctg ttg ctc ctg gcg gcg cct tgg gga cgg gca gtt ccc tgt gtc	335	
Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Pro Trp Gly Arg Ala Val Pro Cys Val		
20 25 30		
tct ggt ggt ttg cct aaa cct gca aac atc acc ttc tta tcc atc aac	383	
Ser Gly Gly Leu Pro Lys Pro Ala Asn Ile Thr Phe Leu Ser Ile Asn		
35 40 45		
atg aag aat gtc cta caa tgg act cca cca gag ggt ctt caa gga gtt	431	
Met Lys Asn Val Leu Gln Trp Thr Pro Pro Glu Gly Leu Gln Gly Val		
50 55 60 65		
aaa gtt act tac act gtg cag tat ttc ata tat ggg caa aag aaa tgg	479	
Lys Val Thr Tyr Thr Val Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Gln Lys Lys Trp		
70 75 80		
ctg aat aaa tca gaa tgc aga aat atc aat aga acc tac tgt gat ctt	527	
Leu Asn Lys Ser Glu Cys Arg Asn Ile Asn Arg Thr Tyr Cys Asp Leu		
85 90 95		

55	84830	56	
tct gct gaa act tct gac tac	gaa cac cag tat tat gcc aaa gtt aag		575
Ser Ala Glu Thr Ser Asp Tyr	Glu His Gln Tyr Tyr Ala Lys Val Lys		
100	105	110	
gcc att tgg gga aca aag tgt tcc aaa tgg gct gaa agt gga cgg ttc			623
Ala Ile Trp Gly Thr Lys Cys Ser Lys Trp Ala Glu Ser Gly Arg Phe			
115	120	125	
tat cct ttt tta gaa aca caa att ggc cca cca gag gtg gca ctg act			671
Tyr Pro Phe Leu Glu Thr Gln Ile Gly Pro Pro Glu Val Ala Leu Thr			
130	135	140	145
aca gat gag aag tcc att tct gtt gtc ctg aca gct cca gag aag tgg			719
Thr Asp Glu Lys Ser Ile Ser Val Val Leu Thr Ala Pro Glu Lys Trp			
150	155	160	
aag aga aat cca gaa gac ctt cct gtt tcc atg caa caa ata tac tcc			767
Lys Arg Asn Pro Glu Asp Leu Pro Val Ser Met Gln Gln Ile Tyr Ser			
165	170	175	
aat ctg aag tat aac gtg tct gtg ttg aat act aaa tca aac aga acg			815
Asn Leu Lys Tyr Asn Val Ser Val Leu Asn Thr Lys Ser Asn Arg Thr			
180	185	190	
tgg tcc cag tgt gtg acc aac cac acg ctg gtg ctc acc tgg ctg gag			863
Trp Ser Gln Cys Val Thr Asn His Thr Leu Val Leu Thr Trp Leu Glu			
195	200	205	
ccg aac act ctt tac tgc gta cac gtg gag tcc ttc gtc cca ggg ccc			911
Pro Asn Thr Leu Tyr Cys Val His Val Glu Ser Phe Val Pro Gly Pro			
210	215	220	225
cct cgc cgt gct cag cct tct gag aag cag tgt gcc agg act ttg aaa			959
Pro Arg Arg Ala Gln Pro Ser Glu Lys Gln Cys Ala Arg Thr Leu Lys			
230	235	240	
gat caa tca tca gag ttc aag gct aaa atc atc ttc tgg tat gtt ttg			1007
Asp Gln Ser Ser Glu Phe Lys Ala Lys Ile Ile Phe Trp Tyr Val Leu			
245	250	255	
ccc ata tct att acc gtg ttt ctt ttt tct gtg atg ggc tat tcc atc			1055

57	84830	58
Pro Ile Ser Ile Thr Val Phe Leu Phe Ser Val Met Gly Tyr Ser Ile 260 265 270		
tac cga tat atc cac gtt ggc aaa gag aaa cac cca gca aat ttg att Tyr Arg Tyr Ile His Val Gly Lys Glu Lys His Pro Ala Asn Leu Ile 275 280 285		1103
ttg att tat gga aat gaa ttt gac aaa aga ttc ttt gtg cct gct gaa Leu Ile Tyr Gly Asn Glu Phe Asp Lys Arg Phe Phe Val Pro Ala Glu 290 295 300 305		1151
aaa atc gtg att aac ttt atc acc ctc aat atc tcg gat gat tct aaa Lys Ile Val Ile Asn Phe Ile Thr Leu Asn Ile Ser Asp Asp Ser Lys 310 315 320		1199
att tct cat cag gat atg agt tta ctg gga aaa agc agt gat gta tcc Ile Ser His Gln Asp Met Ser Leu Leu Gly Lys Ser Ser Asp Val Ser 325 330 335		1247
agc ctt aat gat cct cag ccc agc ggg aac ctg agg ccc cct cag gag Ser Leu Asn Asp Pro Gln Pro Ser Gly Asn Leu Arg Pro Pro Gln Glu 340 345 350		1295
gaa gag gag gtg aaa cat tta ggg tat gct tcg cat ttg atg gaa att Glu Glu Glu Val Lys His Leu Gly Tyr Ala Ser His Leu Met Glu Ile 355 360 365		1343
ttt tgt gac tct gaa gaa aac acg gaa ggt act tct ttc acc cag caa Phe Cys Asp Ser Glu Glu Asn Thr Glu Gly Thr Ser Phe Thr Gln Gln 370 375 380 385		1391
gag tcc ctc agc aga aca ata ccc ccg gat aaa aca gtc att gaa tat Glu Ser Leu Ser Arg Thr Ile Pro Pro Asp Lys Thr Val Ile Glu Tyr 390 395 400		1439
gaa tat gat gtc aga acc act gac att tgt gcg ggg cct gaa gag cag Glu Tyr Asp Val Arg Thr Thr Asp Ile Cys Ala Gly Pro Glu Glu Gln 405 410 415		1487
gag ctc agt ttg cag gag gag gtg tcc aca caa gga aca tta ttg gag Glu Leu Ser Leu Gln Glu Glu Val Ser Thr Gln Gly Thr Leu Leu Glu 420 425 430		1535

59	84830	60	
tcg cag gca gcg ttg gca gtc ttg ggc ccg caa acg tta cag tac tca			1583
Ser Gln Ala Ala Leu Ala Val Leu Gly Pro Gln Thr Leu Gln Tyr Ser			
435	440	445	
tac acc cct cag ctc caa gac tta gac ccc ctg gcg cag gag cac aca			1631
Tyr Thr Pro Gln Leu Gln Asp Leu Asp Pro Leu Ala Gln Glu His Thr			
450	455	460	465
gac tcg gag gag ggg ccg gag gaa gag cca tcg acg acc ctg gtc gac			1679
Asp Ser Glu Glu Gly Pro Glu Glu Glu Pro Ser Thr Thr Leu Val Asp			
470	475	480	
tgg gat ccc caa act ggc agg ctg tgt att cct tcg ctg tcc agc ttc			1727
Trp Asp Pro Gln Thr Gly Arg Leu Cys Ile Pro Ser Leu Ser Ser Phe			
485	490	495	
gac cag gat tca gag ggc tgc gag cct tct gag ggg gat ggg ctc gga			1775
Asp Gln Asp Ser Glu Gly Cys Glu Pro Ser Glu Gly Asp Gly Leu Gly			
500	505	510	
gag gag ggt ctt cta tct aga ctc tat gag gag ccg gct cca gac agg			1823
Glu Glu Gly Leu Leu Ser Arg Leu Tyr Glu Glu Pro Ala Pro Asp Arg			
515	520	525	
cca cca gga gaa aat gaa acc tat ctc atg caa ttc atg gag gaa tgg			1871
Pro Pro Gly Glu Asn Glu Thr Tyr Leu Met Gln Phe Met Glu Glu Trp			
530	535	540	545
ggg tta tat gtg cag atg gaa aac tgaagccaac acttcctttt gccttttggt			1925
Gly Leu Tyr Val Gln Met Glu Asn			
550			
tcctgtgcaa acaagtgagt caccctttg atcccagcca taaagtacct gggatgaaag			1985
aagttttttc cagtttgtca gtgtctgtga gaattactta tttcttttct ctattctcat			2045
agcacgtgtg tgattgggtc atgcatgtag gtctcttaac aatgatgggtg ggcctctgga			2105
gtccaggggc tggccggttg ttctatgcag agaaagcagt caataaatgt ttgccagact			2165
gggtgcagaa tttattcagg tgggtgtact ctggcctctt gggttcattat tttcaaacaa			2225
gcacacttgt acaattattt tctgggtact tcccatatgc acatagcact gtaaaaaata			2285
tttcccaaag atcactcatt ttataaatac cactttttca gaattgggtt tattgcgagc			2345
aggaggagat acttaaaaca tgcacatata ccaggttggt ggtaagttgg tcacatgtga			2405
aaacctcaac tatttaataca tcatgattca tattttgagt gaatacatca ggcacagacc			2465
ttcatgatat cacacactct tggctacttt aagaggccat cttaataact ttatgagtag			2525
ttctggagtg taaacataaa cgagtattct ttgtagtca gaaaagtgtc ctctcaataa			2585

61	84830	62	
tttagtaggg gcttattgtc tctcaaaact aacctaagaag aaaatgacac attttataat			2645
agaatattac atttatttct ggaagtgtgt tttcaaaaag atattttacat agtctgtaaa			2705
ctagaaagtg ttaggttaaag ctctagggtta ctgtgttact attataatat taaacattcg			2765
aataggcagt cgttcaaaga ctctttggaa tatctatgaa tgaatatcct ctattcttat			2825
aatattaaaaa cccataagta aatataggac atacaagaga aatgagttaa atgactatgt			2885
aaggagagt ttattaaaat ttgatgaaat ttactgtagg aactaaacta tgccataaaa			2945
caatagcttt ctagttcatt tccagtaact gttcccatct cctttaccac ttgttaagaa			3005
aattaaattc ttcagtcacg ctgctttaaa atgggacaaa atctattaag ttgaaccata			3065
tataattgtg gatatttggc tgtttttaat ctgacaagca gtaacttcat atggtttgcc			3125
ttaatatata tttgttttag tcatgaactc ataatccatt gatgctcttt catgagaaga			3185
gatatgaccc atatttcctt attgatatta ttggtacagg cagacaaccc tggtaggaga			3245
gatggattct ggggtcatga cctttcgtga ttatccgcaa atgcaaacag tttcagatct			3305
aatggtttta tttaggaggt aattatatta atcagagtgt tctgttattc tcaatcttta			3365
tagaaacgat tctgctggtt ttgaagaaca gatgtattac actaactgta aaagtagttc			3425
aagagtgaga aagaataaat tgttattaag agcaaaagaa aaataaagtg attgatgata			3485
aaaaaaaaa aaaaaaagcg gccgcctcga g			3516

<210> 11
 <211> 553
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

63								84830							64						
Trp	Lys	Arg	Asn	Pro	Glu	Asp	Leu	Pro	Val	Ser	Met	Gln	Gln	Ile	Tyr						
				165					170					175							
Ser	Asn	Leu	Lys	Tyr	Asn	Val	Ser	Val	Leu	Asn	Thr	Lys	Ser	Asn	Arg						
			180					185						190							
Thr	Trp	Ser	Gln	Cys	Val	Thr	Asn	His	Thr	Leu	Val	Leu	Thr	Trp	Leu						
		195					200					205									
Glu	Pro	Asn	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Val	Glu	Ser	Phe	Val	Pro	Gly						
	210					215					220										
Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Gln	Pro	Ser	Glu	Lys	Gln	Cys	Ala	Arg	Thr	Leu						
225					230					235					240						
Lys	Asp	Gln	Ser	Ser	Glu	Phe	Lys	Ala	Lys	Ile	Ile	Phe	Trp	Tyr	Val						
				245					250					255							
Leu	Pro	Ile	Ser	Ile	Thr	Val	Phe	Leu	Phe	Ser	Val	Met	Gly	Tyr	Ser						
			260					265					270								
Ile	Tyr	Arg	Tyr	Ile	His	Val	Gly	Lys	Glu	Lys	His	Pro	Ala	Asn	Leu						
	275						280					285									
Ile	Leu	Ile	Tyr	Gly	Asn	Glu	Phe	Asp	Lys	Arg	Phe	Phe	Val	Pro	Ala						
	290					295					300										
Glu	Lys	Ile	Val	Ile	Asn	Phe	Ile	Thr	Leu	Asn	Ile	Ser	Asp	Asp	Ser						
305					310					315					320						
Lys	Ile	Ser	His	Gln	Asp	Met	Ser	Leu	Leu	Gly	Lys	Ser	Ser	Asp	Val						
				325					330					335							
Ser	Ser	Leu	Asn	Asp	Pro	Gln	Pro	Ser	Gly	Asn	Leu	Arg	Pro	Pro	Gln						
			340					345					350								
Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Lys	His	Leu	Gly	Tyr	Ala	Ser	His	Leu	Met	Glu						
	355						360					365									
Ile	Phe	Cys	Asp	Ser	Glu	Glu	Asn	Thr	Glu	Gly	Thr	Ser	Phe	Thr	Gln						
	370					375						380									
Gln	Glu	Ser	Leu	Ser	Arg	Thr	Ile	Pro	Pro	Asp	Lys	Thr	Val	Ile	Glu						
385					390					395					400						
Tyr	Glu	Tyr	Asp	Val	Arg	Thr	Thr	Asp	Ile	Cys	Ala	Gly	Pro	Glu	Glu						
			405						410					415							
Gln	Glu	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Glu	Val	Ser	Thr	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu						
			420					425					430								
Glu	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Gly	Pro	Gln	Thr	Leu	Gln	Tyr						
	435						440					445									
Ser	Tyr	Thr	Pro	Gln	Leu	Gln	Asp	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Gln	Glu	His						
	450					455					460										
Thr	Asp	Ser	Glu	Glu	Gly	Pro	Glu	Glu	Glu	Pro	Ser	Thr	Thr	Leu	Val						
465					470					4											

65		84830		66											
Phe	Asp	Gln	Asp	Ser	Glu	Gly	Cys	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Asp	Gly	Leu
			500					505					510		
Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Tyr	Glu	Glu	Pro	Ala	Pro	Asp
		515					520					525			
Arg	Pro	Pro	Gly	Glu	Asn	Glu	Thr	Tyr	Leu	Met	Gln	Phe	Met	Glu	Glu
		530				535					540				
Trp	Gly	Leu	Tyr	Val	Gln	Met	Glu	Asn							
545					550										

<210> 12
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
Val Pro Cys Val Ser Gly Gly Leu Pro Lys Pro Ala Asn Ile Thr Phe
1 5 10 15
Leu Ser Ile Asn Met Lys Asn Val Leu Gln Trp Thr Pro Pro Glu Gly
20 25 30
Leu Gln Gly Val Lys Val Thr Tyr Thr Val Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly
35 40 45
Gln Lys Lys Trp Leu Asn Lys Ser Glu Cys Arg Asn Ile Asn Arg Thr
50 55 60
Tyr Cys Asp Leu Ser Ala Glu Thr Ser Asp Tyr Glu His Gln Tyr Tyr
65 70 75 80
Ala Lys Val Lys Ala Ile Trp Gly Thr Lys Cys Ser Lys Trp Ala Glu
85 90 95
Ser Gly Arg Phe Tyr Pro Phe Leu Glu Thr Gln Ile Gly Pro Pro Glu
100 105 110
Val Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys Ser Ile Ser Val Val Leu Thr Ala
115 120 125
Pro Glu Lys Trp Lys Arg Asn Pro Glu Asp Leu Pro Val Ser Met Gln
130 135 140
Gln Ile Tyr Ser Asn Leu Lys Tyr Asn Val Ser Val Leu Asn Thr Lys
145 150 155 160
Ser Asn Arg Thr Trp Ser Gln Cys Val Thr Asn His Thr Leu Val Leu
165 170 175
Thr Trp Leu Glu Pro Asn Thr Leu Tyr Cys Val His Val Glu Ser Phe
180 185 190
Val Pro Gly Pro Pro Arg Arg Ala Gln Pro Ser Glu Lys Gln Cys Ala
195 200 205
Arg Thr Leu Lys Asp Gln Ser Ser Glu Phe Lys Ala Lys
210 215 220

67

84830

68

<210> 13
 <211> 971
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (18)...(950)

<400> 13

gaattcgagt ctaccaa atg cag act ttc aca atg gtt cta gaa gaa atc	50
Met Gln Thr Phe Thr Met Val Leu Glu Glu Ile	
1 5 10	
tggtg aca agt ctt ttc atg tgg ttt ttc tac gca ttg att cca tgt ttg	98
Trp Thr Ser Leu Phe Met Trp Phe Phe Tyr Ala Leu Ile Pro Cys Leu	
15 20 25	
ctc aca gat gaa gtg gcc att ctg cct gcc cct cag aac ctc tct gta	146
Leu Thr Asp Glu Val Ala Ile Leu Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ser Val	
30 35 40	
ctc tca acc aac atg aag cat ctc ttg atg tgg agc cca gtg atc gcg	194
Leu Ser Thr Asn Met Lys His Leu Leu Met Trp Ser Pro Val Ile Ala	
45 50 55	
cct gga gaa aca gtg tac tat tct gtc gaa tac cag ggg gag tac gag	242
Pro Gly Glu Thr Val Tyr Tyr Ser Val Glu Tyr Gln Gly Glu Tyr Glu	
60 65 70 75	
agc ctg tac acg agc cac atc tgg atc ccc agc agc tgg tgc tca ctc	290
Ser Leu Tyr Thr Ser His Ile Trp Ile Pro Ser Ser Trp Cys Ser Leu	
80 85 90	
act gaa ggt cct gag tgt gat gtc act gat gac atc acg gcc act gtg	338
Thr Glu Gly Pro Glu Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val	
95 100 105	
cca tac aac ctt cgt gtc agg gcc aca ttg ggc tca cag acc tca gcc	386
Pro Tyr Asn Leu Arg Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln Thr Ser Ala	
110 115 120	

69	84830	70	
tgg agc atc ctg aag cat ccc ttt aat aga aac tca acc atc ctt acc			434
Trp Ser Ile Leu Lys His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr Ile Leu Thr			
125	130	135	
cga cct ggg atg gag atc acc aaa gat ggc ttc cac ctg gtt att gag			482
Arg Pro Gly Met Glu Ile Thr Lys Asp Gly Phe His Leu Val Ile Glu			
140	145	150	155
ctg gag gac ctg ggg ccc cag ttt gag ttc ctt gtg gcc tac tgg agg			530
Leu Glu Asp Leu Gly Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Arg			
	160	165	170
agg gag cct ggt gcc gag gaa cat gtc aaa atg gtg agg agt ggg ggt			578
Arg Glu Pro Gly Ala Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly			
	175	180	185
att cca gtg cac cta gaa acc atg gag cca ggg gct gca tac tgt gtg			626
Ile Pro Val His Leu Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val			
	190	195	200
aag gcc cag aca ttc gtg aag gcc att ggg agg tac agc gcc ttc agc			674
Lys Ala Gln Thr Phe Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser			
	205	210	215
cag aca gaa tgt gtg gag gtg caa gga gag gcc att ccc ctg gta ctg			722
Gln Thr Glu Cys Val Glu Val Gln Gly Glu Ala Ile Pro Leu Val Leu			
	220	225	230
gcc ctg ttt gcc ttt gtt ggc ttc atg ctg atc ctt gtg gtc gtg cca			770
Ala Leu Phe Ala Phe Val Gly Phe Met Leu Ile Leu Val Val Val Pro			
	240	245	250
ctg ttc gtc tgg aaa atg ggc cgg ctg ctc cag tac tcc tgt tgc ccc			818
Leu Phe Val Trp Lys Met Gly Arg Leu Leu Gln Tyr Ser Cys Cys Pro			
	255	260	265
gtg gtg gtc ctc cca gac acc ttg aaa ata acc aat tca ccc cag aag			866
Val Val Val Leu Pro Asp Thr Leu Lys Ile Thr Asn Ser Pro Gln Lys			
	270	275	280
tta atc agc tgc aga agg gag gag gtg gat gcc tgt gcc acg gct gtg			914
Leu Ile Ser Cys Arg Arg Glu Glu Val Asp Ala Cys Ala Thr Ala Val			
	285	290	295

71	84830	72	
atg tct cct gag gaa ctc ctc agg gcc tgg atc tca taggtttgcg			960
Met Ser Pro Glu Glu Leu Leu Arg Ala Trp Ile Ser			
300	305	310	

gaaggctcga g		971
--------------	--	-----

<210> 14
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14	
Met Gln Thr Phe Thr Met Val Leu Glu Glu Ile Trp Thr Ser Leu Phe	
1 5 10 15	
Met Trp Phe Phe Tyr Ala Leu Ile Pro Cys Leu Leu Thr Asp Glu Val	
20 25 30	
Ala Ile Leu Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ser Val Leu Ser Thr Asn Met	
35 40 45	
Lys His Leu Leu Met Trp Ser Pro Val Ile Ala Pro Gly Glu Thr Val	
50 55 60	
Tyr Tyr Ser Val Glu Tyr Gln Gly Glu Tyr Glu Ser Leu Tyr Thr Ser	
65 70 75 80	
His Ile Trp Ile Pro Ser Ser Trp Cys Ser Leu Thr Glu Gly Pro Glu	
85 90 95	
Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val Pro Tyr Asn Leu Arg	
100 105 110	
Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln Thr Ser Ala Trp Ser Ile Leu Lys	
115 120 125	
His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr Ile Leu Thr Arg Pro Gly Met Glu	
130 135 140	
Ile Thr Lys Asp Gly Phe His Leu Val Ile Glu Leu Glu Asp Leu Gly	
145 150 155 160	
Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Arg Arg Glu Pro Gly Ala	
165 170 175	
Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly Ile Pro Val His Leu	
180 185 190	
Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val Lys Ala Gln Thr Phe	
195 200 205	
Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gln Thr Glu Cys Val	
210 215 220	
Glu Val Gln Gly Glu Ala Ile Pro Leu Val Leu Ala Leu Phe Ala Phe	
225 230 235 240	

75	84830	76
<210> 16		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 16		
gcgaattcga gtctacaaa tgcagacttt cac		3:
<210> 17		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 17		
cgctcgagcc ttccgcaaac ctatgagatc ca		3:
<210> 18		
<211> 1379		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<221> CDS		
<222> (132)...(1034)		
<400> 18		
tcgaccacg cgtccgcgt gcgactcaga cctcagctcc aacatatgca ttctgaagaa	60	
agatggctga gatggacaga atgctttatt ttggaaagaa acaatgttct aggtcaaact	120	
gagtctacca a atg cag act ttc aca atg gtt cta gaa gaa atc tgg aca	170	
Met Gln Thr Phe Thr Met Val Leu Glu Glu Ile Trp Thr		
1 5 10		
agt ctt ttc atg tgg ttt ttc tac gca ttg att cca tgt ttg ctc aca	218	
Ser Leu Phe Met Trp Phe Phe Tyr Ala Leu Ile Pro Cys Leu Leu Thr		
15 20 25		
gat gaa gtg gcc att ctg cct gcc cct cag aac ctc tct gta ctc tca	266	
Asp Glu Val Ala Ile Leu Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ser Val Leu Ser		
30 35 40 45		
acc aac atg aag cat ctc ttg atg tgg agc cca gtg atc gcg cct gga	314	

77	84830	78
Thr Asn Met Lys His Leu Leu Met Trp Ser Pro Val Ile Ala Pro Gly		
50	55	60
gaa aca gtg tac tat tct gtc gaa tac cag ggg gag tac gag agc ctg		362
Glu Thr Val Tyr Tyr Ser Val Glu Tyr Gln Gly Glu Tyr Glu Ser Leu		
65	70	75
tac acg agc cac atc tgg atc ccc agc agc tgg tgc tca ctc act gaa		410
Tyr Thr Ser His Ile Trp Ile Pro Ser Ser Trp Cys Ser Leu Thr Glu		
80	85	90
ggc cct gag tgt gat gtc act gat gac atc acg gcc act gtg cca tac		458
Gly Pro Glu Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val Pro Tyr		
95	100	105
aac ctt cgt gtc agg gcc aca ttg ggc tca cag acc tca gcc tgg agc		506
Asn Leu Arg Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln Thr Ser Ala Trp Ser		
110	115	125
atc ctg aag cat ccc ttt aat aga aac tca acc atc ctt acc cga cct		554
Ile Leu Lys His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr Ile Leu Thr Arg Pro		
130	135	140
ggg atg gag atc ccc aaa cat ggc ttc cac ctg gtt att gag ctg gag		602
Gly Met Glu Ile Pro Lys His Gly Phe His Leu Val Ile Glu Leu Glu		
145	150	155
gac ctg ggg ccc cag ttt gag ttc ctt gtg gcc tac tgg acg agg gag		650
Asp Leu Gly Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Thr Arg Glu		
160	165	170
cct ggt gcc gag gaa cat gtc aaa atg gtg agg agt ggg ggt att cca		698
Pro Gly Ala Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly Ile Pro		
175	180	185
gtg cac cta gaa acc atg gag cca ggg gct gca tac tgt gtg aag gcc		746
Val His Leu Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val Lys Ala		
190	195	205
cag aca ttc gtg aag gcc att ggg agg tac agc gcc ttc agc cag aca		794
Gln Thr Phe Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gln Thr		
210	215	220

79	84830	80
gaa tgt gtg gag gtg caa gga gag gcc att ccc ctg gta ctg gcc ctg		842
Glu Cys Val Glu Val Gln Gly Glu Ala Ile Pro Leu Val Leu Ala Leu		
225	230	235
ttt gcc ttt gtt ggc ttc atg ctg atc ctt gtg gtc gtg cca ctg ttc		890
Phe Ala Phe Val Gly Phe Met Leu Ile Leu Val Val Val Pro Leu Phe		
240	245	250
gtc tgg aaa atg ggc cgg ctg ctc cag tac tcc tgt tgc ccc gtg gtg		938
Val Trp Lys Met Gly Arg Leu Leu Gln Tyr Ser Cys Cys Pro Val Val		
255	260	265
gtc ctc cca gac acc ttg aaa ata acc aat tca ccc cag gtt aat cag		986
Val Leu Pro Asp Thr Leu Lys Ile Thr Asn Ser Pro Gln Val Asn Gln		
270	275	280 285
ctg cag aag gga gga ggt gga tgc ctg tgc cac ggc tgt gat gtc tcc		1034
Leu Gln Lys Gly Gly Gly Gly Cys Leu Cys His Gly Cys Asp Val Ser		
290	295	300
tgaggaactc ctgagggcct ggatctcata tcaggtttgc ggaagggccc aggtgaagcc		1094
gagaacctgg tctgcatgac atggaaacca tgaggggaca agttgtgttt ctgttttccg		1154
ccacggacaa gggatgagag aagtaggaag agcctgttgt ctacaagtct agaagcaacc		1214
atcagaggca ggggtggttg tctaacagaa caactgactg aggctatggg ggttgtgacc		1274
tctagacttt gggttccac ttgcttggct gagcaaccct gggaaaagtg acttcatccc		1334
ttcgggtcca agttttctca tctgtaatgg gggatcccta caaaactg		1382

<210> 19
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

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

81	84830	82
His Ile Trp Ile Pro Ser Ser Trp Cys Ser Leu Thr Glu Gly Pro Glu		
85	90	95
Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val Pro Tyr Asn Leu Arg		
100	105	110
Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln Thr Ser Ala Trp Ser Ile Leu Lys		
115	120	125
His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr Ile Leu Thr Arg Pro Gly Met Glu		
130	135	140
Ile Pro Lys His Gly Phe His Leu Val Ile Glu Leu Glu Asp Leu Gly		
145	150	155
Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Thr Arg Glu Pro Gly Ala		
165	170	175
Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly Ile Pro Val His Leu		
180	185	190
Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val Lys Ala Gln Thr Phe		
195	200	205
Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gln Thr Glu Cys Val		
210	215	220
Glu Val Gln Gly Glu Ala Ile Pro Leu Val Leu Ala Leu Phe Ala Phe		
225	230	235
Val Gly Phe Met Leu Ile Leu Val Val Val Pro Leu Phe Val Trp Lys		
245	250	255
Met Gly Arg Leu Leu Gln Tyr Ser Cys Cys Pro Val Val Val Leu Pro		
260	265	270
Asp Thr Leu Lys Ile Thr Asn Ser Pro Gln Val Asn Gln Leu Gln Lys		
275	280	285
Gly Gly Gly Gly Cys Leu Cys His Gly Cys Asp Val Ser		
290	295	300

<210> 20
 <211> 1081
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (9)...(1067)

<400> 20

ggccggcc atg cag act ttc aca atg gtt cta gaa gaa atc tgg aca agt
 Met Gln Thr Phe Thr Met Val Leu Glu Glu Ile Trp Thr Ser
 1 5 10

50

83	84830	84
ctt ttc atg tgg ttt ttc tac gca ttg att cca tgt ttg ctc aca gat Leu Phe Met Trp Phe Phe Tyr Ala Leu Ile Pro Cys Leu Leu Thr Asp 15 20 25 30		98
gaa gtg gcc att ctg cct gcc cct cag aac ctc tct gta ctc tca acc Glu Val Ala Ile Leu Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ser Val Leu Ser Thr 35 40 45		146
aac atg aag cat ctc ttg atg tgg agc cca gtg atc gcg cct gga gaa Asn Met Lys His Leu Leu Met Trp Ser Pro Val Ile Ala Pro Gly Glu 50 55 60		194
aca gtg tac tat tct gtc gaa tac cag ggg gag tac gag agc ctg tac Thr Val Tyr Tyr Ser Val Glu Tyr Gln Gly Glu Tyr Glu Ser Leu Tyr 65 70 75		242
acg agc cac atc tgg atc ccc agc agc tgg tgc tca ctc act gaa ggt Thr Ser His Ile Trp Ile Pro Ser Ser Trp Cys Ser Leu Thr Glu Gly 80 85 90		290
cct gag tgt gat gtc act gat gac atc acg gcc act gtg cca tac aac Pro Glu Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val Pro Tyr Asn 95 100 105 110		338
ctt cgt gtc agg gcc aca ttg ggc tca cag acc tca gcc tgg agc atc Leu Arg Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln Thr Ser Ala Trp Ser Ile 115 120 125		386
ctg aag cat ccc ttt aat aga aac tca acc atc ctt acc cga cct ggg Leu Lys His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr Ile Leu Thr Arg Pro Gly 130 135 140		434
atg gag atc ccc aaa cat ggc ttc cac ctg gtt att gag ctg gag gac Met Glu Ile Pro Lys His Gly Phe His Leu Val Ile Glu Leu Glu Asp 145 150 155		482
ctg ggg ccc cag ttt gag ttc ctt gtg gcc tac tgg acg agg gag cct Leu Gly Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Thr Arg Glu Pro 160 165 170		530
ggg gcc gag gaa cat gtc aaa atg gtg agg agt ggg ggt att cca gtg Gly Ala Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly Ile Pro Val 175 180 185 190		578

85	84830	86	
cac cta gaa acc atg gag cca ggg gct gca tac tgt gtg aag gcc cag			626
His Leu Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val Lys Ala Gln			
195	200	205	
aca ttc gtg aag gcc att ggg agg tac agc gcc ttc agc cag aca gaa			674
Thr Phe Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gln Thr Glu			
210	215	220	
tgt gtg gag gtg caa gga gag gcc gga ggt ggt ggc agt gga ggc ggc			722
Cys Val Glu Val Gln Gly Glu Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
225	230	235	
ggc agc gga ggc ggt ggc agt cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc			770
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe			
240	245	250	
atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt			818
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val			
255	260	265	270
gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg			866
Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp			
275	280	285	
aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca			914
Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr			
290	295	300	
gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg			962
Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr			
305	310	315	
ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc			1010
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val			
320	325	330	
acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga			1058
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly			
335	340	345	350
gag tgt taa tctagaggcg cgcc			1081
Glu Cys *			

<210> 21
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

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

89	84830	90
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val		
275	280	285
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln		
290	295	300
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser		
305	310	315
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His		
325	330	335
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
340	345	350

<210> 22
 <211> 1801
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)...(1789)

<400> 22	
gtcgacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg	49
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu	
1 5 10	
tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg	97
Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu	
15 20 25 30	
aga cgc ttc cgt aga gtt ccc tgt gtc tct ggt ggt ttg cct aaa cct	145
Arg Arg Phe Arg Arg Val Pro Cys Val Ser Gly Gly Leu Pro Lys Pro	
35 40 45	
gca aac atc acc ttc tta tcc atc aac atg aag aat gtc cta caa tgg	193
Ala Asn Ile Thr Phe Leu Ser Ile Asn Met Lys Asn Val Leu Gln Trp	
50 55 60	
act cca cca gag ggt ctt caa gga gtt aaa gtt act tac act gtg cag	241
Thr Pro Pro Glu Gly Leu Gln Gly Val Lys Val Thr Tyr Thr Val Gln	
65 70 75	
tat ttc ata tat ggg caa aag aaa tgg ctg aat aaa tca gaa tgc aga	289

91	84830	92
Tyr Phe Ile Tyr Gly Gln Lys Lys Trp Leu Asn Lys Ser Glu Cys Arg		
80	85	90
aat atc aat aga acc tac tgt gat ctt tct gct gaa act tct gac tac		337
Asn Ile Asn Arg Thr Tyr Cys Asp Leu Ser Ala Glu Thr Ser Asp Tyr		
95	100	105 110
gaa cac cag tat tat gcc aaa gtt aag gcc att tgg gga aca aag tgt		385
Glu His Gln Tyr Tyr Ala Lys Val Lys Ala Ile Trp Gly Thr Lys Cys		
	115	120 125
tcc aaa tgg gct gaa agt gga cgg ttc tat cct ttt tta gaa aca caa		433
Ser Lys Trp Ala Glu Ser Gly Arg Phe Tyr Pro Phe Leu Glu Thr Gln		
	130	135 140
att ggc cca cca gag gtg gca ctg act aca gat gag aag tcc att tct		481
Ile Gly Pro Pro Glu Val Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys Ser Ile Ser		
	145	150 155
gtt gtc ctg aca gct cca gag aag tgg aag aga aat cca gaa gac ctt		529
Val Val Leu Thr Ala Pro Glu Lys Trp Lys Arg Asn Pro Glu Asp Leu		
	160	165 170
cct gtt tcc atg caa caa ata tac tcc aat ctg aag tat aac gtg tct		577
Pro Val Ser Met Gln Gln Ile Tyr Ser Asn Leu Lys Tyr Asn Val Ser		
	175	180 185 190
gtg ttg aat act aaa tca aac aga acg tgg tcc cag tgt gtg acc aac		625
Val Leu Asn Thr Lys Ser Asn Arg Thr Trp Ser Gln Cys Val Thr Asn		
	195	200 205
cac acg ctg gtg ctc acc tgg ctg gag ccg aac act ctt tac tgc gta		673
His Thr Leu Val Leu Thr Trp Leu Glu Pro Asn Thr Leu Tyr Cys Val		
	210	215 220
cac gtg gag tcc ttc gtc cca ggg ccc cct cgc cgt gct cag cct tct		721
His Val Glu Ser Phe Val Pro Gly Pro Pro Arg Arg Ala Gln Pro Ser		
	225	230 235
gag aag cag tgt gcc agg act ttg aaa gat caa ggt gga ggc ggt tca		769
Glu Lys Gln Cys Ala Arg Thr Leu Lys Asp Gln Gly Gly Gly Gly Ser		
	240	245 250

93	84830	94	
ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gcc tcc acc aag ggc cca			817
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
255	260	265	270
tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca			865
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr			
	275	280	285
gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg			913
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
	290	295	300
gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg			961
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
	305	310	315
gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc			1009
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr			
	320	325	330
gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat			1057
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn			
	335	340	345
cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct			1105
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser			
	355	360	365
tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag			1153
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu			
	370	375	380
ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc			1201
Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
	385	390	395
atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc			1249
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
	400	405	410
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag			1297

95	84830	96
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 415 420 425 430		
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 435 440 445	1345	
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 450 455 460	1393	
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser 465 470 475	1441	
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 480 485 490	1489	
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 495 500 505 510	1537	
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 515 520 525	1585	
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 530 535 540	1633	
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 545 550 555	1681	
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 560 565 570	1729	
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 575 580 585 590	1777	

97
tct ccg ggt aaa taatctagat ct
Ser Pro Gly Lys

84830

98

1801

<210> 23
<211> 594
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
20 25 30
Phe Arg Arg Val Pro Cys Val Ser Gly Gly Leu Pro Lys Pro Ala Asn
35 40 45
Ile Thr Phe Leu Ser Ile Asn Met Lys Asn Val Leu Gln Trp Thr Pro
50 55 60
Pro Glu Gly Leu Gln Gly Val Lys Val Thr Tyr Thr Val Gln Tyr Phe
65 70 75 80
Ile Tyr Gly Gln Lys Lys Trp Leu Asn Lys Ser Glu Cys Arg Asn Ile
85 90 95
Asn Arg Thr Tyr Cys Asp Leu Ser Ala Glu Thr Ser Asp Tyr Glu His
100 105 110
Gln Tyr Tyr Ala Lys Val Lys Ala Ile Trp Gly Thr Lys Cys Ser Lys
115 120 125
Trp Ala Glu Ser Gly Arg Phe Tyr Pro Phe Leu Glu Thr Gln Ile Gly
130 135 140
Pro Pro Glu Val Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys Ser Ile Ser Val Val
145 150 155 160
Leu Thr Ala Pro Glu Lys Trp Lys Arg Asn Pro Glu Asp Leu Pro Val
165 170 175
Ser Met Gln Gln Ile Tyr Ser Asn Leu Lys Tyr Asn Val Ser Val Leu
180 185 190
Asn Thr Lys Ser Asn Arg Thr Trp Ser Gln Cys Val Thr Asn His Thr
195 200 205
Leu Val Leu Thr Trp Leu Glu Pro Asn Thr Leu Tyr Cys Val His Val
210 215 220
Glu Ser Phe Val Pro Gly Pro Pro Arg Arg Ala Gln Pro Ser Glu Lys
225 230 235 240
Gln Cys Ala Arg Thr Leu Lys Asp Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
260 265 270

99					84830					100					
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
		275					280					285			
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
		290				295					300				
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
						310					315				320
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				325					330					335	
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			340					345					350		
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		355					360					365			
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala
		370				375					380				
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				390							395				400
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
			405						410					415	
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		420						425					430		
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		435					440					445			
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
		450					455				460				
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu
				470							475				480
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				485					490					495	
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			500					505					510		
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
		515					520					525			
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
		530				535					540				
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				550							555				560
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				565					570					575	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			580					585					590		
Gly	Lys														

101	84830	102
<210> 24		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 24		
ggccggccat gcagactttc acaatggt		29
<210> 25		
<211> 52		
<212> DNA		
<213> homo sapiens		
<400> 25		
tccgctaccg ccgctccac tgccaccacc tccggcctct ccttgacac		52
<210> 26		
<211> 53		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 26		
gtggaggcgg cggtagcgga ggcggtggca gtcgaactgt ggctgcacca tct		53
<210> 27		
<211> 38		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 27		
ggcgcgcctc tagattaaca ctctcccctg ttgaagct		38
<210> 28		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 28		
gtcgaccatg gatgcaatga agagagggt		30
<210> 29		
<211> 30		
<212> DNA		

103	84830	104
<213> Homo sapiens		
<400> 29		
cacaggggaac tctacggaag cgtctcaact		30
<210> 30		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 30		
cttccgtaga gttccctgtg tctctggtgg ttt		33
<210> 31		
<211> 53		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 31		
gccagagcca cctccgcctg aaccgcctcc acctgatct ttcaaagtcc tgg		53
<210> 32		
<211> 51		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 32		
caggcggagg tggctctggc ggtggcggat cggcctccac caagggccca t		51
<210> 33		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 33		
ctgggcacgg tgggcatgtg		20
<210> 34		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 34		

105	84830	106	
cacatgccca ccgtgccag			20
<210> 35			
<211> 31			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 35			
agatctagat tatttaccg gagacaggga g			31
<210> 36			
<211> 1806			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<220>			
<221> CDS			
<222> (38)...(1675)			
<400> 36			
cgccgcgttc ccgagatgtg acccgaactg acagccc atg cac act ccc ggg acc			55
		Met His Thr Pro Gly Thr	
		1 5	
ccg gcg ccg ggc cac ccg gac ccg ccg cca ctg ttg ctg ctc acg ctg			103
Pro Ala Pro Gly His Pro Asp Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Thr Leu			
		10 15 20	
ctt ctg ctg ctg gcc gct tcg gga cgc gca gtt cct tgt gtc ttc tgt			151
Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ser Gly Arg Ala Val Pro Cys Val Phe Cys			
		25 30 35	
ggt ttg cct aaa cct aca aat atc acc ttc tta tcc atc aac atg aag			199
Gly Leu Pro Lys Pro Thr Asn Ile Thr Phe Leu Ser Ile Asn Met Lys			
		40 45 50	
aat gtc ctg cat tgg aat cca cca gag agt cta cac gga gtt gaa gtc			247
Asn Val Leu His Trp Asn Pro Pro Glu Ser Leu His Gly Val Glu Val			
		55 60 65 70	
aca tac act gtg caa tat ttc ata tat ggg cag aag aaa tgg ctg aat			295
Thr Tyr Thr Val Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Gln Lys Lys Trp Leu Asn			
		75 80 85	

107	84830	108	
gcc tct aaa tgc ggg agt atc aac agg acc tac tgt gac ctt tct gtt			343
Ala Ser Lys Cys Gly Ser Ile Asn Arg Thr Tyr Cys Asp Leu Ser Val			
90	95	100	
gag acc tca gac tat gaa cac cag ttc tat gcc aaa gtg aag gcc att			391
Glu Thr Ser Asp Tyr Glu His Gln Phe Tyr Ala Lys Val Lys Ala Ile			
105	110	115	
tgg gaa gcc agg tgc tcc gaa tgg gcc gag acg gaa cgc ttc tat cct			439
Trp Glu Ala Arg Cys Ser Glu Trp Ala Glu Thr Glu Arg Phe Tyr Pro			
120	125	130	
ttc ttg gaa act caa gtc agc cca cca gag att gcc ctg aca act ggc			487
Phe Leu Glu Thr Gln Val Ser Pro Pro Glu Ile Ala Leu Thr Thr Gly			
135	140	145	150
gag aag tcc atc tct att gcc ctg aca gca cca gag aag tgg aaa aga			535
Glu Lys Ser Ile Ser Ile Ala Leu Thr Ala Pro Glu Lys Trp Lys Arg			
155	160	165	
aat cca caa gac cac act gtt tct atg caa cag ata tac ccc aat ttg			583
Asn Pro Gln Asp His Thr Val Ser Met Gln Gln Ile Tyr Pro Asn Leu			
170	175	180	
aag tac aat gtg tct gtg tat aac act aag tcg aga aga acg tgg tcc			631
Lys Tyr Asn Val Ser Val Tyr Asn Thr Lys Ser Arg Arg Thr Trp Ser			
185	190	195	
cag tgt gtc acc aac agc aca ctg gtc ctc agc tgg ctg gag ccc aac			679
Gln Cys Val Thr Asn Ser Thr Leu Val Leu Ser Trp Leu Glu Pro Asn			
200	205	210	
act ctg tat tgt gtc cac gtg gag tcc ctt gtc cca ggg ccc cct cgc			727
Thr Leu Tyr Cys Val His Val Glu Ser Leu Val Pro Gly Pro Pro Arg			
215	220	225	230
ctc ccg atg cct tct cag aag cag tgc atc agt act ttg gaa gtt caa			775
Leu Pro Met Pro Ser Gln Lys Gln Cys Ile Ser Thr Leu Glu Val Gln			
235	240	245	
aca tca gca tgg aag gct aaa gtc atc ttc tgg tat gtc ttc ctc aca			823

109	84830	110
Thr Ser Ala Trp Lys Ala Lys Val 250	Ile Phe Trp Tyr Val 255	Phe Leu Thr 260
tct gtt atc gtg ttt ctt ttc tcc gca att ggc tac ttg gtt tac cgt Ser Val Ile Val Phe Leu Phe Ser Ala Ile Gly Tyr Leu Val Tyr Arg 265 270 275		871
tac atc cat gtt ggc aag gaa aaa cac cca gca aat ttg gta ctg att Tyr Ile His Val Gly Lys Glu Lys His Pro Ala Asn Leu Val Leu Ile 280 285 290		919
tat aga aat gaa att ggc aca aga gtc ttt gaa cct act gaa aca atc Tyr Arg Asn Glu Ile Gly Thr Arg Val Phe Glu Pro Thr Glu Thr Ile 295 300 305 310		967
aca ctt aat ttt atc acc ttc agt atg ttg gat gat act aaa att tct Thr Leu Asn Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Asp Asp Thr Lys Ile Ser 315 320 325		1015
cca aag gat atg aat tta ctg gac aaa agc agt gat gac atc agt gtt Pro Lys Asp Met Asn Leu Leu Asp Lys Ser Ser Asp Asp Ile Ser Val 330 335 340		1063
aat gac cct gag cac aat gag gcc tgg gag ccg cac tgg gag gag gtg Asn Asp Pro Glu His Asn Glu Ala Trp Glu Pro His Trp Glu Glu Val 345 350 355		1111
gag ggg caa cat tta gga tgc tct tcg cat ttg atg gac gct gtc tgt Glu Gly Gln His Leu Gly Cys Ser Ser His Leu Met Asp Ala Val Cys 360 365 370		1159
ggg gct gag caa aga gac gga gac acc tcc cta acc cag cat ggg tgg Gly Ala Glu Gln Arg Asp Gly Asp Thr Ser Leu Thr Gln His Gly Trp 375 380 385 390		1207
ctt aac agc acc atc ccc aca gga gag aca gac act gag cct caa tac Leu Asn Ser Thr Ile Pro Thr Gly Glu Thr Asp Thr Glu Pro Gln Tyr 395 400 405		1255
aaa gtc cta agt gac ttc tac ggg gag ggt gaa atc caa ctg tcc tgt Lys Val Leu Ser Asp Phe Tyr Gly Glu Gly Glu Ile Gln Leu Ser Cys 410 415 420		1303

111	84830	112	
gag ccg gaa gag gcg gcc aga aca gag aaa ata tct gag cca ctg gtg			1351
Glu Pro Glu Glu Ala Ala Arg Thr Glu Lys Ile Ser Glu Pro Leu Val			
425	430	435	
act tca gca aac ttg gac cca cag ctt gaa gac cta cat cac ctg ggt			1399
Thr Ser Ala Asn Leu Asp Pro Gln Leu Glu Asp Leu His His Leu Gly			
440	445	450	
cag gag cat act gtc tcc gag gat ggg cca gag gaa gag aca tct ata			1447
Gln Glu His Thr Val Ser Glu Asp Gly Pro Glu Glu Glu Thr Ser Ile			
455	460	465	470
aca gta gtg gat tgg gac cct caa act ggc agg ctg tgt atc cct tcc			1495
Thr Val Val Asp Trp Asp Pro Gln Thr Gly Arg Leu Cys Ile Pro Ser			
475	480	485	
tta cct atc ttt ggc cgt gat cct gag aac tat ggt cat tat gag aga			1543
Leu Pro Ile Phe Gly Arg Asp Pro Glu Asn Tyr Gly His Tyr Glu Arg			
490	495	500	
gac cag ctc tta gag ggt ggc ctt ttg tct aga ctc tat gag aac cag			1591
Asp Gln Leu Leu Glu Gly Gly Leu Leu Ser Arg Leu Tyr Glu Asn Gln			
505	510	515	
gca cct gac aag cca gag aaa gaa aat gaa aac tgt ctc aca cgg ttt			1639
Ala Pro Asp Lys Pro Glu Lys Glu Asn Glu Asn Cys Leu Thr Arg Phe			
520	525	530	
atg gag gaa tgg ggg tta cat gta caa atg gaa agc tagtgccagg			1685
Met Glu Glu Trp Gly Leu His Val Gln Met Glu Ser			
535	540	545	
ctttctgttg actgccaaca aatgaaggaa ccatcccagg gggatgaacag tgttcaggtt			1745
atcagtgta gcaatgagac tgttctctct gttcatgaac tttgtcagcc ctgcctcatc			1805
c			1806

<210> 37

<211> 546

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

113					84830					114					
Met	His	Thr	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Pro	Gly	His	Pro	Asp	Pro	Pro	Pro
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Ala
			20					25					30		
Val	Pro	Cys	Val	Phe	Cys	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Thr	Asn	Ile	Thr	Phe
		35					40					45			
Leu	Ser	Ile	Asn	Met	Lys	Asn	Val	Leu	His	Trp	Asn	Pro	Pro	Glu	Ser
		50				55					60				
Leu	His	Gly	Val	Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Val	Gln	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Gly
65						70					75				80
Gln	Lys	Lys	Trp	Leu	Asn	Ala	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Ile	Asn	Arg	Thr
			85						90				95		
Tyr	Cys	Asp	Leu	Ser	Val	Glu	Thr	Ser	Asp	Tyr	Glu	His	Gln	Phe	Tyr
			100					105					110		
Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ile	Trp	Glu	Ala	Arg	Cys	Ser	Glu	Trp	Ala	Glu
		115					120					125			
Thr	Glu	Arg	Phe	Tyr	Pro	Phe	Leu	Glu	Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Pro	Glu
						135					140				
Ile	Ala	Leu	Thr	Thr	Gly	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Ile	Ala	Leu	Thr	Ala
145						150					155				160
Pro	Glu	Lys	Trp	Lys	Arg	Asn	Pro	Gln	Asp	His	Thr	Val	Ser	Met	Gln
			165						170				175		
Gln	Ile	Tyr	Pro	Asn	Leu	Lys	Tyr	Asn	Val	Ser	Val	Tyr	Asn	Thr	Lys
			180					185					190		
Ser	Arg	Arg	Thr	Trp	Ser	Gln	Cys	Val	Thr	Asn	Ser	Thr	Leu	Val	Leu
			195				200					205			
Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Asn	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Val	Glu	Ser	Leu
		210				215					220				
Val	Pro	Gly	Pro	Pro	Arg	Leu	Pro	Met	Pro	Ser	Gln	Lys	Gln	Cys	Ile
225						230					235				240
Ser	Thr	Leu	Glu	Val	Gln	Thr	Ser	Ala	Trp	Lys	Ala	Lys	Val	Ile	Phe
			245						250					255	
Trp	Tyr	Val	Phe	Leu	Thr	Ser	Val	Ile	Val	Phe	Leu	Phe	Ser	Ala	Ile
			260				265						270		
Gly	Tyr	Leu	Val	Tyr	Arg	Tyr	Ile	His	Val	Gly	Lys	Glu	Lys	His	Pro
		275					280					285			
Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Ile	Tyr	Arg	Asn	Glu	Ile	Gly	Thr	Arg	Val	Phe
		290				295					300				
Glu	Pro	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr	Leu	Asn	Phe	Ile	Thr	Phe	Ser	Met	Leu
305						310					315				320
Asp	Asp	Thr	Lys	Ile	Ser	Pro	Lys	Asp	Met	Asn	Leu	Leu	Asp	Lys	Ser
			325						330					335	

115					84830					116						
Ser	Asp	Asp	Ile	Ser	Val	Asn	Asp	Pro	Glu	His	Asn	Glu	Ala	Trp	Glu	
340					345					350						
Pro	His	Trp	Glu	Glu	Val	Glu	Gly	Gln	His	Leu	Gly	Cys	Ser	Ser	His	
355					360					365						
Leu	Met	Asp	Ala	Val	Cys	Gly	Ala	Glu	Gln	Arg	Asp	Gly	Asp	Thr	Ser	
370					375					380						
Leu	Thr	Gln	His	Gly	Trp	Leu	Asn	Ser	Thr	Ile	Pro	Thr	Gly	Glu	Thr	
385					390					395					400	
Asp	Thr	Glu	Pro	Gln	Tyr	Lys	Val	Leu	Ser	Asp	Phe	Tyr	Gly	Glu	Gly	
405					410					415						
Glu	Ile	Gln	Leu	Ser	Cys	Glu	Pro	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr	Glu	Lys	
420					425					430						
Ile	Ser	Glu	Pro	Leu	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Leu	Asp	Pro	Gln	Leu	Glu	
435					440					445						
Asp	Leu	His	His	Leu	Gly	Gln	Glu	His	Thr	Val	Ser	Glu	Asp	Gly	Pro	
450					455					460						
Glu	Glu	Glu	Thr	Ser	Ile	Thr	Val	Val	Asp	Trp	Asp	Pro	Gln	Thr	Gly	
465					470					475					480	
Arg	Leu	Cys	Ile	Pro	Ser	Leu	Pro	Ile	Phe	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Asn	
485					490					495						
Tyr	Gly	His	Tyr	Glu	Arg	Asp	Gln	Leu	Leu	Glu	Gly	Gly	Leu	Leu	Ser	
500					505					510						
Arg	Leu	Tyr	Glu	Asn	Gln	Ala	Pro	Asp	Lys	Pro	Glu	Lys	Glu	Asn	Glu	
515					520					525						
Asn	Cys	Leu	Thr	Arg	Phe	Met	Glu	Glu	Trp	Gly	Leu	His	Val	Gln	Met	
530					535					540						
Glu	Ser															
545																

<210> 38
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 38															
Val	Pro	Cys	Val	Phe	Cys	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Thr	Asn	Ile	Thr	Phe
1				5				10				15			
Leu	Ser	Ile	Asn	Met	Lys	Asn	Val	Leu	His	Trp	Asn	Pro	Pro	Glu	Ser
20					25					30					
Leu	His	Gly	Val	Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Val	Gln	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Gly
35					40					45					
Gln	Lys	Lys	Trp	Leu	Asn	Ala	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Ile	Asn	Arg	Thr
50					55					60					

117					84830					118					
Tyr	Cys	Asp	Leu	Ser	Val	Glu	Thr	Ser	Asp	Tyr	Glu	His	Gln	Phe	Tyr
65					70					75					80
Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ile	Trp	Glu	Ala	Arg	Cys	Ser	Glu	Trp	Ala	Glu
				85					90					95	
Thr	Glu	Arg	Phe	Tyr	Pro	Phe	Leu	Glu	Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Pro	Glu
			100					105					110		
Ile	Ala	Leu	Thr	Thr	Gly	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Ile	Ala	Leu	Thr	Ala
		115					120					125			
Pro	Glu	Lys	Trp	Lys	Arg	Asn	Pro	Gln	Asp	His	Thr	Val	Ser	Met	Gln
		130				135					140				
Gln	Ile	Tyr	Pro	Asn	Leu	Lys	Tyr	Asn	Val	Ser	Val	Tyr	Asn	Thr	Lys
145				150					155						160
Ser	Arg	Arg	Thr	Trp	Ser	Gln	Cys	Val	Thr	Asn	Ser	Thr	Leu	Val	Leu
			165						170				175		
Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Asn	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Val	Glu	Ser	Leu
		180						185					190		
Val	Pro	Gly	Pro	Pro	Arg	Leu	Pro	Met	Pro	Ser	Gln	Lys	Gln	Cys	Ile
		195				200					205				
Ser	Thr	Leu	Glu	Val	Gln	Thr	Ser	Ala							
	210					215									

<210> 39
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 39

Val	Pro	Cys	Val	Phe	Cys	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Thr	Asn	Ile	Thr	Phe
1				5					10					15	
Leu	Ser	Ile	Asn	Met	Lys	Asn	Val	Leu	His	Trp	Asn	Pro	Pro	Glu	Ser
			20					25				30			
Leu	His	Gly	Val	Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Val	Gln	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Gly
		35				40						45			
Gln	Lys	Lys	Trp	Leu	Asn	Ala	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Ile	Asn	Arg	Thr
	50					55					60				
Tyr	Cys	Asp	Leu	Ser	Val	Glu	Thr	Ser	Asp	Tyr	Glu	His	Gln	Phe	Tyr
65					70					75					80
Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ile	Trp	Glu	Ala	Arg	Cys	Ser	Glu	Trp	Ala	Glu
			85						90					95	
Thr	Glu	Arg	Phe	Tyr	Pro	Phe	Leu	Glu	Thr	Gln	Val	Ser	Pro	Pro	Glu
			100					105					110		
Ile	Ala	Leu	Thr	Thr	Gly	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Ile	Ala	Leu	Thr	Ala
		115					120					125			

119					84830					120						
Pro	Glu	Lys	Trp	Lys	Arg	Asn	Pro	Gln	Asp	His	Thr	Val	Ser	Met	Gln	
130					135					140						
Gln	Ile	Tyr	Pro	Asn	Leu	Lys	Tyr	Asn	Val	Ser	Val	Tyr	Asn	Thr	Lys	
145					150					155					160	
Ser	Arg	Arg	Thr	Trp	Ser	Gln	Cys	Val	Thr	Asn	Ser	Thr	Leu	Val	Leu	
				165					170					175		
Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Asn	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Val	Glu	Ser	Leu	
			180					185					190			
Val	Pro	Gly	Pro	Pro	Arg	Leu	Pro	Met	Pro	Ser	Gln	Lys	Gln	Cys	Ile	
	195					200					205					
Ser	Thr	Leu	Glu	Val	Gln	Thr	Ser	Ala	Trp	Lys	Ala	Lys	Val	Ile	Phe	
210					215					220						
Trp	Tyr	Val	Phe	Leu	Thr	Ser	Val	Ile	Val	Phe	Leu	Phe	Ser	Ala	Ile	
225					230					235					240	
Gly	Tyr	Leu	Val	Tyr	Arg	Tyr	Ile	His	Val	Gly	Lys	Glu	Lys	His	Pro	
				245					250					255		
Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Ile	Tyr	Arg	Asn	Glu	Ile	Gly	Thr	Arg	Val	Phe	
			260					265					270			
Glu	Pro	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr	Leu	Asn	Phe	Ile	Thr	Phe	Ser	Met	Leu	
	275					280					285					
Asp	Asp	Thr	Lys	Ile	Ser	Pro	Lys	Asp	Met	Asn	Leu	Leu	Asp	Lys	Ser	
290					295					300						
Ser	Asp	Asp	Ile	Ser	Val	Asn	Asp	Pro	Glu	His	Asn	Glu	Ala	Trp	Glu	
305					310					315					320	
Pro	His	Trp	Glu	Glu	Val	Glu	Gly	Gln	His	Leu	Gly	Cys	Ser	Ser	His	
				325					330					335		
Leu	Met	Asp	Ala	Val	Cys	Gly	Ala	Glu	Gln	Arg	Asp	Gly	Asp	Thr	Ser	
			340					345					350			
Leu	Thr	Gln	His	Gly	Trp	Leu	Asn	Ser	Thr	Ile	Pro	Thr	Gly	Glu	Thr	
	355					360					365					
Asp	Thr	Glu	Pro	Gln	Tyr	Lys	Val	Leu	Ser	Asp	Phe	Tyr	Gly	Glu	Gly	
370					375					380						
Glu	Ile	Gln	Leu	Ser	Cys	Glu	Pro	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr	Glu	Lys	
385					390					395					400	
Ile	Ser	Glu	Pro	Leu	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Leu	Asp	Pro	Gln	Leu	Glu	
				405					410					415		
Asp	Leu	His	His	Leu	Gly	Gln	Glu	His	Thr	Val	Ser	Glu	Asp	Gly	Pro	
			420					425					430			
Glu	Glu	Glu	Thr	Ser	Ile	Thr	Val	Val	Asp	Trp	Asp	Pro	Gln	Thr	Gly	
	435					440					445					
Arg	Leu	Cys	Ile	Pro	Ser	Leu	Pro	Ile	Phe	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Asn	
450					455					460						

121	84830	122
Tyr Gly His Tyr Glu Arg Asp Gln Leu Leu Glu Gly Gly Leu Leu Ser		
465	470	475
Arg Leu Tyr Glu Asn Gln Ala Pro Asp Lys Pro Glu Lys Glu Asn Glu		
	485	490
Asn Cys Leu Thr Arg Phe Met Glu Glu Trp Gly Leu His Val Gln Met		
	500	505
Glu Ser		510

<210> 40
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 40
 cgccgcgttc ccgagatg 18

<210> 41
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 41
 ggatgaggca gggctgacaa agtt 24

<210> 42
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 acttgtggaa ttcgctagca ccaagggccc atcggg 36

<210> 43
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 gcctagaacg cgttcattta cccggagaca gg 32

<210> 44
 <211> 8
 <212> DNA

123	84830	124
<213> Homo sapiens		
<400> 44		
aattgaga		8
<210> 45		
<211> 8		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 45		
cgcgtctc		8
<210> 46		
<211> 37		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 46		
gtcacttgaa ttcggtaccg cctctgttgt gtgcctg		37
<210> 47		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 47		
gacctgaacg cgtctaacac tctcccctgt tg		32
<210> 48		
<211> 38		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 48		
tcagtcggaa ttcgcagaag ccatgcgggc tcccgcc		38
<210> 49		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 49		

125	84830	126	
ctgtgacgct agcctctgat gattgatctt tcaaa			35
<210> 50 <211> 43 <212> DNA <213> Homo sapiens			
<400> 50 gatgtctgaa ttgcgagaag ccatgcagac tttcacaatg gtt			43
<210> 51 <211> 86 <212> DNA <213> Homo sapiens			
<400> 51 aagacggtac cagatttcaa ctgctcatca gatggcggga agatgaagac agatggtgca gccacagtgg cctctccttg cacctc			60 86
<210> 52 <211> 1720 <212> DNA <213> Homo sapiens			
<220> <221> CDS <222> (1)...(1713)			
<400> 52 atg cgg gct ccc ggc cgc ccg gcc ctg cgg ccg ctg ctg ctg ttg ctc Met Arg Ala Pro Gly Arg Pro Ala Leu Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu 1 5 10 15			48
ctg gcg gcg cct tgg gga cgg gca gtt ccc tgt gtc tct ggt ggt ttg Leu Ala Ala Pro Trp Gly Arg Ala Val Pro Cys Val Ser Gly Gly Leu 20 25 30			96
cct aaa cct gca aac atc acc ttc tta tcc atc aac atg aag aat gtc Pro Lys Pro Ala Asn Ile Thr Phe Leu Ser Ile Asn Met Lys Asn Val 35 40 45			144
cta caa tgg act cca cca gag ggt ctt caa gga gtt aaa gtt act tac			192

127	84830	128
Leu Gln Trp Thr Pro Pro Glu Gly Leu Gln Gly Val Lys Val Thr Tyr		
50	55	60
act gtg cag tat ttc ata tat ggg caa aag aaa tgg ctg aat aaa tca		240
Thr Val Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Gln Lys Lys Trp Leu Asn Lys Ser		
65	70	75
gaa tgc aga aat atc aat aga acc tac tgt gat ctt tct gct gaa act		288
Glu Cys Arg Asn Ile Asn Arg Thr Tyr Cys Asp Leu Ser Ala Glu Thr		
	85	90
tct gac tac gaa cac cag tat tat gcc aaa gtt aag gcc att tgg gga		336
Ser Asp Tyr Glu His Gln Tyr Tyr Ala Lys Val Lys Ala Ile Trp Gly		
	100	105
aca aag tgt tcc aaa tgg gct gaa agt gga cgg ttc tat cct ttt tta		384
Thr Lys Cys Ser Lys Trp Ala Glu Ser Gly Arg Phe Tyr Pro Phe Leu		
	115	120
gaa aca caa att ggc cca cca gag gtg gca ctg act aca gat gag aag		432
Glu Thr Gln Ile Gly Pro Pro Glu Val Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys		
	130	135
tcc att tct gtt gtc ctg aca gct cca gag aag tgg aag aga aat cca		480
Ser Ile Ser Val Val Leu Thr Ala Pro Glu Lys Trp Lys Arg Asn Pro		
	145	150
gaa gac ctt cct gtt tcc atg caa caa ata tac tcc aat ctg aag tat		528
Glu Asp Leu Pro Val Ser Met Gln Gln Ile Tyr Ser Asn Leu Lys Tyr		
	165	170
aac gtg tct gtg ttg aat act aaa tca aac aga acg tgg tcc cag tgt		576
Asn Val Ser Val Leu Asn Thr Lys Ser Asn Arg Thr Trp Ser Gln Cys		
	180	185
gtg acc aac cac acg ctg gtg ctc acc tgg ctg gag ccg aac act ctt		624
Val Thr Asn His Thr Leu Val Leu Thr Trp Leu Glu Pro Asn Thr Leu		
	195	200
tac tgc gta cac gtg gag tcc ttc gtc cca ggg ccc cct cgc cgt gct		672
Tyr Cys Val His Val Glu Ser Phe Val Pro Gly Pro Pro Arg Arg Ala		
	210	215

129	84830	130	
cag cct tct gag aag cag tgt gcc agg act ttg aaa gat caa tca tca			720
Gln Pro Ser Glu Lys Gln Cys Ala Arg Thr Leu Lys Asp Gln Ser Ser			
225	230	235	240
gag gct agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc			768
Glu Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser			
	245	250	255
aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac			816
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp			
	260	265	270
tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc			864
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr			
	275	280	285
agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac			912
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr			
	290	295	300
tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag			960
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln			
	305	310	315
acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac			1008
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp			
	325	330	335
aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg			1056
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro			
	340	345	350
tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc			1104
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro			
	355	360	365
cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca			1152
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
	370	375	380
tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac			1200
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn			
	385	390	395
			400

131	84830	132	
tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg			1248
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
405	410	415	
 gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc			1296
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			
420	425	430	
 ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc			1344
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser			
435	440	445	
 aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa			1392
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
450	455	460	
 ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat			1440
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp			
465	470	475	480
 gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc			1488
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
485	490	495	
 tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag			1536
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
500	505	510	
 aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc			1584
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
515	520	525	
 ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg			1632
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
530	535	540	
 aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac			1680
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
545	550	555	560
 acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tgacgcg			1720

133

84830

134

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565 570

<210> 53

<211> 571

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

135				84830				136							
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
		275					280					285			
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
	290					295					300				
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
305					310					315					320
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
			325						330					335	
Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
		340						345					350		
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
	355						360					365			
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
	370					375					380				
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
385					390					395					400
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
			405						410					415	
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
		420						425					430		
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
	435					440					445				
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
	450					455					460				
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp
465					470					475					480
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			485						490					495	
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
		500						505					510		
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
	515					520						525			
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
	530				535						540				
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
545					550					555					560
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
			565						570						

<210> 54
 <211> 547
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

137

84830

138

<400> 54

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

139					84830					140					
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
				325					330					335	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			340					345					350		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		355					360					365			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	370					375					380				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
385						390					395				400
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
			405					410						415	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			420					425					430		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
	435						440					445			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
	450					455					460				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
465						470					475				480
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
			485					490						495	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			500				505						510		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
	515						520					525			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	530					535					540				
Pro	Gly	Lys													
545															

<210> 55
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 Val Pro Cys Val Ser Gly Gly Leu Pro Lys Pro Ala Asn Ile Thr Phe
 1 5 10 15
 Leu Ser Ile Asn Met Lys Asn Val Leu Gln Trp Thr Pro Pro Glu Gly
 20 25 30
 Leu Gln Gly Val Lys Val Thr Tyr Thr Val Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly
 35 40 45

141										84830										142										
Gln	Lys	Lys	Trp	Leu	Asn	Lys	Ser	Glu	Cys	Arg	Asn	Ile	Asn	Arg	Thr															
50						55					60																			
Tyr	Cys	Asp	Leu	Ser	Ala	Glu	Thr	Ser	Asp	Tyr	Glu	His	Gln	Tyr	Tyr															
65					70					75					80															
Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ile	Trp	Gly	Thr	Lys	Cys	Ser	Lys	Trp	Ala	Glu															
				85					90					95																
Ser	Gly	Arg	Phe	Tyr	Pro	Phe	Leu	Glu	Thr	Gln	Ile	Gly	Pro	Pro	Glu															
			100				105						110																	
Val	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Leu	Thr	Ala															
		115				120						125																		
Pro	Glu	Lys	Trp	Lys	Arg	Asn	Pro	Glu	Asp	Leu	Pro	Val	Ser	Met	Gln															
		130				135				140																				
Gln	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Lys	Tyr	Asn	Val	Ser	Val	Leu	Asn	Thr	Lys															
145				150					155					160																
Ser	Asn	Arg	Thr	Trp	Ser	Gln	Cys	Val	Thr	Asn	His	Thr	Leu	Val	Leu															
				165					170					175																
Thr	Trp	Leu	Glu	Pro	Asn	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Val	Glu	Ser	Phe															
			180				185						190																	
Val	Pro	Gly	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Gln	Pro	Ser	Glu	Lys	Gln	Cys	Ala															
		195				200						205																		
Arg	Thr	Leu	Lys	Asp	Gln	Ser	Ser	Glu																						
	210					215																								

<210> 56
 <211> 1011
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1008)

<400> 56																				
atg	cag	act	ttc	aca	atg	gtt	cta	gaa	gaa	atc	tgg	aca	agt	ctt	ttc	48				
Met	Gln	Thr	Phe	Thr	Met	Val	Leu	Glu	Glu	Ile	Trp	Thr	Ser	Leu	Phe					
1				5				10					15							
atg	tgg	ttt	ttc	tac	gca	ttg	att	cca	tgt	ttg	ctc	aca	gat	gaa	gtg	96				
Met	Trp	Phe	Phe	Tyr	Ala	Leu	Ile	Pro	Cys	Leu	Leu	Thr	Asp	Glu	Val					
			20			25						30								
gcc	att	ctg	cct	gcc	cct	cag	aac	ctc	tct	gta	ctc	tca	acc	aac	atg	144				

143	84830	144
Ala Ile Leu Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ser Val Leu Ser Thr Asn Met		
35	40	45
aag cat ctc ttg atg tgg agc cca gtg atc gcg cct gga gaa aca gtg		192
Lys His Leu Leu Met Trp Ser Pro Val Ile Ala Pro Gly Glu Thr Val		
50	55	60
tac tat tct gtc gaa tac cag ggg gag tac gag agc ctg tac acg agc		240
Tyr Tyr Ser Val Glu Tyr Gln Gly Glu Tyr Glu Ser Leu Tyr Thr Ser		
65	70	75
cac atc tgg atc ccc agc agc tgg tgc tca ctc act gaa ggt cct gag		288
His Ile Trp Ile Pro Ser Ser Trp Cys Ser Leu Thr Glu Gly Pro Glu		
85	90	95
tgt gat gtc act gat gac atc acg gcc act gtg cca tac aac ctt cgt		336
Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val Pro Tyr Asn Leu Arg		
100	105	110
gtc agg gcc aca ttg ggc tca cag acc tca gcc tgg agc atc ctg aag		384
Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln Thr Ser Ala Trp Ser Ile Leu Lys		
115	120	125
cat ccc ttt aat aga aac tca acc atc ctt acc cga cct ggg atg gag		432
His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr Ile Leu Thr Arg Pro Gly Met Glu		
130	135	140
atc acc aaa gat ggc ttc cac ctg gtt att gag ctg gag gac ctg ggg		480
Ile Thr Lys Asp Gly Phe His Leu Val Ile Glu Leu Glu Asp Leu Gly		
145	150	155
ccc cag ttt gag ttc ctt gtg gcc tac tgg agg agg gag cct ggt gcc		528
Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Arg Arg Glu Pro Gly Ala		
165	170	175
gag gaa cat gtc aaa atg gtg agg agt ggg ggt att cca gtg cac cta		576
Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly Ile Pro Val His Leu		
180	185	190
gaa acc atg gag cca ggg gct gca tac tgt gtg aag gcc cag aca ttc		624
Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val Lys Ala Gln Thr Phe		
195	200	205

145	84830	146	
gtg aag gcc att ggg agg tac agc gcc ttc agc cag aca gaa tgt gtg			672
Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gln Thr Glu Cys Val			
210	215	220	
gag gtg caa gga gag gcc act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc			720
Glu Val Gln Gly Glu Ala Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe			
225	230	235	240
ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct ggt acc gcc tct gtt gtg tgc			768
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys			
	245	250	255
ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg			816
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val			
	260	265	270
gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag			864
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln			
	275	280	285
gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc			912
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser			
	290	295	300
aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat			960
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His			
305	310	315	320
cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt			1008
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	325	330	335
tag			1011

<210> 57
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 57
 Met Gln Thr Phe Thr Met Val Leu Glu Glu Ile Trp Thr Ser Leu Phe
 1 5 10 15

147				84830				148							
Met	Trp	Phe	Phe	Tyr	Ala	Leu	Ile	Pro	Cys	Leu	Leu	Thr	Asp	Glu	Val
			20					25				30			
Ala	Ile	Leu	Pro	Ala	Pro	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Thr	Asn	Met
		35				40					45				
Lys	His	Leu	Leu	Met	Trp	Ser	Pro	Val	Ile	Ala	Pro	Gly	Glu	Thr	Val
	50				55					60					
Tyr	Tyr	Ser	Val	Glu	Tyr	Gln	Gly	Glu	Tyr	Glu	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ser
65					70					75					80
His	Ile	Trp	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Cys	Ser	Leu	Thr	Glu	Gly	Pro	Glu
			85					90						95	
Cys	Asp	Val	Thr	Asp	Asp	Ile	Thr	Ala	Thr	Val	Pro	Tyr	Asn	Leu	Arg
		100						105					110		
Val	Arg	Ala	Thr	Leu	Gly	Ser	Gln	Thr	Ser	Ala	Trp	Ser	Ile	Leu	Lys
	115					120					125				
His	Pro	Phe	Asn	Arg	Asn	Ser	Thr	Ile	Leu	Thr	Arg	Pro	Gly	Met	Glu
	130				135					140					
Ile	Thr	Lys	Asp	Gly	Phe	His	Leu	Val	Ile	Glu	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly
145					150					155					160
Pro	Gln	Phe	Glu	Phe	Leu	Val	Ala	Tyr	Trp	Arg	Arg	Glu	Pro	Gly	Ala
			165						170					175	
Glu	Glu	His	Val	Lys	Met	Val	Arg	Ser	Gly	Gly	Ile	Pro	Val	His	Leu
		180				185					190				
Glu	Thr	Met	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Tyr	Cys	Val	Lys	Ala	Gln	Thr	Phe
	195					200					205				
Val	Lys	Ala	Ile	Gly	Arg	Tyr	Ser	Ala	Phe	Ser	Gln	Thr	Glu	Cys	Val
	210				215						220				
Glu	Val	Gln	Gly	Glu	Ala	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe
225					230					235					240
Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys
			245						250					255	
Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
		260						265					270		
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln
	275					280					285				
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser
	290				295						300				
Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His
305					310					315					320
Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
			325						330					335	

<210> 58

<211> 307

150

[illegible]

305

<210> 59
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59

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

<210> 60
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60

Asp	Glu	Val	Ala	Ile	Leu	Pro	Ala	Pro	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Leu	Ser
1				5					10					15	

153					84830					154					
Thr	Asn	Met	Lys	His	Leu	Leu	Met	Trp	Ser	Pro	Val	Ile	Ala	Pro	Gly
			20					25					30		
Glu	Thr	Val	Tyr	Tyr	Ser	Val	Glu	Tyr	Gln	Gly	Glu	Tyr	Glu	Ser	Leu
		35					40					45			
Tyr	Thr	Ser	His	Ile	Trp	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Cys	Ser	Leu	Thr	Glu
	50					55					60				
Gly	Pro	Glu	Cys	Asp	Val	Thr	Asp	Asp	Ile	Thr	Ala	Thr	Val	Pro	Tyr
65					70					75					80
Asn	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Thr	Leu	Gly	Ser	Gln	Thr	Ser	Ala	Trp	Ser
				85					90					95	
Ile	Leu	Lys	His	Pro	Phe	Asn	Arg	Asn	Ser	Thr	Ile	Leu	Thr	Arg	Pro
			100					105					110		
Gly	Met	Glu	Ile	Pro	Lys	His	Gly	Phe	His	Leu	Val	Ile	Glu	Leu	Glu
	115						120					125			
Asp	Leu	Gly	Pro	Gln	Phe	Glu	Phe	Leu	Val	Ala	Tyr	Trp	Thr	Arg	Glu
	130					135				140					
Pro	Gly	Ala	Glu	Glu	His	Val	Lys	Met	Val	Arg	Ser	Gly	Gly	Ile	Pro
145					150					155					160
Val	His	Leu	Glu	Thr	Met	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Tyr	Cys	Val	Lys	Ala
				165					170					175	
Gln	Thr	Phe	Val	Lys	Ala	Ile	Gly	Arg	Tyr	Ser	Ala	Phe	Ser	Gln	Thr
		180						185					190		
Glu	Cys	Val	Glu	Val	Gln	Gly	Glu	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	195						200					205			
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
	210					215					220				
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
225					230					235					240
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln
			245					250					255		
Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val
		260						265					270		
Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu
	275						280					285			
Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
	290					295					300				
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
305					310					315					320
Gly	Glu	Cys													

<210> 61

<211> 201

<212> PRT

155

84830

156

<213> Homo sapiens

<400> 61

```

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

```

<210> 62

<211> 559

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

```

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

```

157					84830					158					
Gln	Lys	Lys	Trp	Leu	Asn	Lys	Ser	Glu	Cys	Arg	Asn	Ile	Asn	Arg	Thr
50					55					60					
Tyr	Cys	Asp	Leu	Ser	Ala	Glu	Thr	Ser	Asp	Tyr	Glu	His	Gln	Tyr	Tyr
65					70					75					80
Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ile	Trp	Gly	Thr	Lys	Cys	Ser	Lys	Trp	Ala	Glu
				85					90					95	
Ser	Gly	Arg	Phe	Tyr	Pro	Phe	Leu	Glu	Thr	Gln	Ile	Gly	Pro	Pro	Glu
			100					105					110		
Val	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Leu	Thr	Ala
	115					120					125				
Pro	Glu	Lys	Trp	Lys	Arg	Asn	Pro	Glu	Asp	Leu	Pro	Val	Ser	Met	Gln
	130					135					140				
Gln	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Lys	Tyr	Asn	Val	Ser	Val	Leu	Asn	Thr	Lys
145					150					155					160
Ser	Asn	Arg	Thr	Trp	Ser	Gln	Cys	Val	Thr	Asn	His	Thr	Leu	Val	Leu
				165					170					175	
Thr	Trp	Leu	Glu	Pro	Asn	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Val	Glu	Ser	Phe
		180						185					190		
Val	Pro	Gly	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Gln	Pro	Ser	Glu	Lys	Gln	Cys	Ala
	195					200					205				
Arg	Thr	Leu	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
	210				215						220				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
225					230					235					240
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
				245					250					255	
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
		260						265					270		
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
	275					280					285				
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
	290				295						300				
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
305					310					315					320
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
				325					330					335	
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val
		340						345					350		
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
	355					360					365				
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
	370				375						380				

159					84830					160					
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
385					390					395					400
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
				405				410					415		
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
			420				425					430			
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
		435				440					445				
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
	450				455					460					
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
465				470						475				480	
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
			485				490					495			
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
		500				505						510			
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
	515				520					525					
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
	530			535						540					
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
545				550					555						

<210> 63
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63

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

161					84830					162						
Val	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Leu	Thr	Ala	
115					120					125						
Pro	Glu	Lys	Trp	Lys	Arg	Asn	Pro	Glu	Asp	Leu	Pro	Val	Ser	Met	Gln	
130					135					140						
Gln	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Lys	Tyr	Asn	Val	Ser	Val	Leu	Asn	Thr	Lys	
145					150					155					160	
Ser	Asn	Arg	Thr	Trp	Ser	Gln	Cys	Val	Thr	Asn	His	Thr	Leu	Val	Leu	
165					170					175						
Thr	Trp	Leu	Glu	Pro	Asn	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Val	Glu	Ser	Phe	
180					185					190						
Val	Pro	Gly	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Gln	Pro	Ser	Glu	Lys	Gln	Cys	Ala	
195					200					205						
Arg	Thr	Leu	Lys	Asp	Gln											
210																

<210> 64
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64															
Glu	Glu	Ile	His	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Arg	Arg	Val	Pro	Cys	Val
1			5						10				15		
Ser	Gly	Gly													

<210> 65
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 65															
Leu	Pro	Lys	Pro	Ala	Asn	Ile	Thr	Phe	Leu	Ser	Ile	Asn	Met	Lys	Asn
1			5					10				15			
Val	Leu	Gln	Trp	Thr	Pro	Pro	Glu	Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Lys	Val	Thr
20					25					30					
Tyr	Thr	Val	Gln	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Gly	Gln	Lys	Lys	Trp	Leu	Asn	Lys
35					40					45					
Ser	Glu	Cys	Arg	Asn	Ile	Asn	Arg	Thr	Tyr	Cys	Asp	Leu	Ser	Ala	Glu
50					55					60					
Thr	Ser	Asp	Tyr	Glu	His	Gln	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ile	Trp
65				70				75						80	
Gly	Thr	Lys	Cys	Ser	Lys	Trp	Ala	Glu	Ser	Gly	Arg	Phe	Tyr	Pro	Phe
85					90					95					

163					84830					164					
Leu	Glu	Thr	Gln	Ile	Gly	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Glu
			100					105					110		
Lys	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Leu	Thr	Ala	Pro	Glu	Lys	Trp	Lys	Arg	Asn
		115					120					125			
Pro	Glu	Asp	Leu	Pro	Val	Ser	Met	Gln	Gln	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Lys
		130					135					140			
Tyr	Asn	Val	Ser	Val	Leu	Asn	Thr	Lys	Ser	Asn	Arg	Thr	Trp	Ser	Gln
145							150					155			160
Cys	Val	Thr	Asn	His	Thr	Leu	Val	Leu	Thr	Trp	Leu	Glu	Pro	Asn	Thr
			165						170					175	
Leu	Tyr	Cys	Val	His	Val	Glu	Ser	Phe	Val	Pro	Gly	Pro	Pro	Arg	Arg
		180						185						190	
Ala	Gln	Pro	Ser	Glu	Lys	Gln	Cys	Ala	Arg	Thr	Leu	Lys	Asp	Gln	
		195					200						205		

<210> 66
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66

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

<210> 67

165

84830

166

<211> 196

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

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

<210> 68

<211> 203

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

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

167					84830					168					
Glu	Thr	Val	Tyr	Tyr	Ser	Val	Glu	Tyr	Gln	Gly	Glu	Tyr	Glu	Ser	Leu
		35					40					45			
Tyr	Thr	Ser	His	Ile	Trp	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Cys	Ser	Leu	Thr	Glu
		50				55					60				
Gly	Pro	Glu	Cys	Asp	Val	Thr	Asp	Asp	Ile	Thr	Ala	Thr	Val	Pro	Tyr
65						70					75				80
Asn	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Thr	Leu	Gly	Ser	Gln	Thr	Ser	Ala	Trp	Ser
				85					90					95	
Ile	Leu	Lys	His	Pro	Phe	Asn	Arg	Asn	Ser	Thr	Ile	Leu	Thr	Arg	Pro
			100					105					110		
Gly	Met	Glu	Ile	Pro	Lys	His	Gly	Phe	His	Leu	Val	Ile	Glu	Leu	Glu
		115					120					125			
Asp	Leu	Gly	Pro	Gln	Phe	Glu	Phe	Leu	Val	Ala	Tyr	Trp	Thr	Arg	Glu
		130				135					140				
Pro	Gly	Ala	Glu	Glu	His	Val	Lys	Met	Val	Arg	Ser	Gly	Gly	Ile	Pro
145						150					155				160
Val	His	Leu	Glu	Thr	Met	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Tyr	Cys	Val	Lys	Ala
				165					170					175	
Gln	Thr	Phe	Val	Lys	Ala	Ile	Gly	Arg	Tyr	Ser	Ala	Phe	Ser	Gln	Thr
			180					185					190		
Glu	Cys	Val	Glu	Val	Gln	Gly	Glu	Ala	Ile	Pro					
		195					200								

<210> 69
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 69															
Leu	Pro	Ala	Pro	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Thr	Asn	Met	Lys	His
1				5					10					15	
Leu	Leu	Met	Trp	Ser	Pro	Val	Ile	Ala	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Tyr	Tyr
			20					25					30		
Ser	Val	Glu	Tyr	Gln	Gly	Glu	Tyr	Glu	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ser	His	Ile
		35					40					45			
Trp	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Cys	Ser	Leu	Thr	Glu	Gly	Pro	Glu	Cys	Asp
		50				55					60				
Val	Thr	Asp	Asp	Ile	Thr	Ala	Thr	Val	Pro	Tyr	Asn	Leu	Arg	Val	Arg
65						70					75				80
Ala	Thr	Leu	Gly	Ser	Gln	Thr	Ser	Ala	Trp	Ser	Ile	Leu	Lys	His	Pro
				85					90					95	
Phe	Asn	Arg	Asn	Ser	Thr	Ile	Leu	Thr	Arg	Pro	Gly	Met	Glu	Ile	Pro
			100					105					110		

169				84830				170							
Lys	His	Gly	Phe	His	Leu	Val	Ile	Glu	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Pro	Gln
		115					120					125			
Phe	Glu	Phe	Leu	Val	Ala	Tyr	Trp	Thr	Arg	Glu	Pro	Gly	Ala	Glu	Glu
	130				135						140				
His	Val	Lys	Met	Val	Arg	Ser	Gly	Gly	Ile	Pro	Val	His	Leu	Glu	Thr
145					150					155					160
Met	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Tyr	Cys	Val	Lys	Ala	Gln	Thr	Phe	Val	Lys
			165						170					175	
Ala	Ile	Gly	Arg	Tyr	Ser	Ala	Phe	Ser	Gln	Thr	Glu	Cys	Val	Glu	Val
			180						185					190	
Gln	Gly	Glu	Ala												
		195													

<210> 70
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 70			
Cys	Ser	Leu	Thr
1		5	
Ala	Thr	Val	Pro
		20	
Thr	Ser	Ala	Trp
		35	
Ile	Leu	Thr	Arg
50		55	
Val	Ile	Glu	Leu
65		70	
Tyr	Trp	Arg	Arg
		85	
Ser	Gly	Gly	Ile
		100	
Tyr	Cys	Val	Lys
		115	
Ala	Phe	Ser	Gln
		130	
			135

<210> 71
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

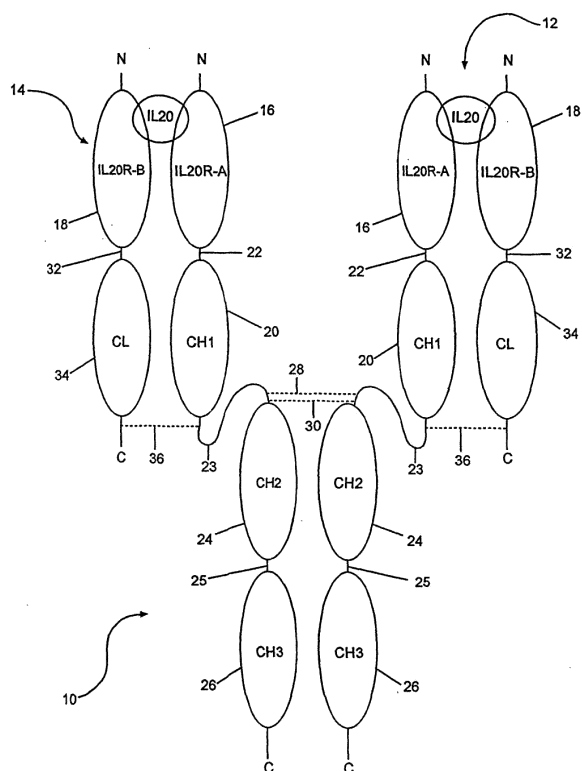
171	84830	172
<400> 71		
Cys Ser Leu Thr Glu Gly Pro Glu Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr		
1 5 10 15		
Ala Thr Val Pro Tyr Asn Leu Arg Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln		
20 25 30		
Thr Ser Ala Trp Ser Ile Leu Lys His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr		
35 40 45		
Ile Leu Thr Arg Pro Gly Met Glu Ile Pro Lys His Gly Phe His Leu		
50 55 60		
Val Ile Glu Leu Glu Asp Leu Gly Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala		
65 70 75 80		
Tyr Trp Thr Arg Glu Pro Gly Ala Glu Glu His Val Lys Met Val Arg		
85 90 95		
Ser Gly Gly Ile Pro Val His Leu Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala		
100 105 110		
Tyr Cys Val Lys Ala Gln Thr Phe Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser		
115 120 125		
Ala Phe Ser Gln Thr Glu Cys		
130 135		

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 72	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
1 5 10 15	

173

84830



174

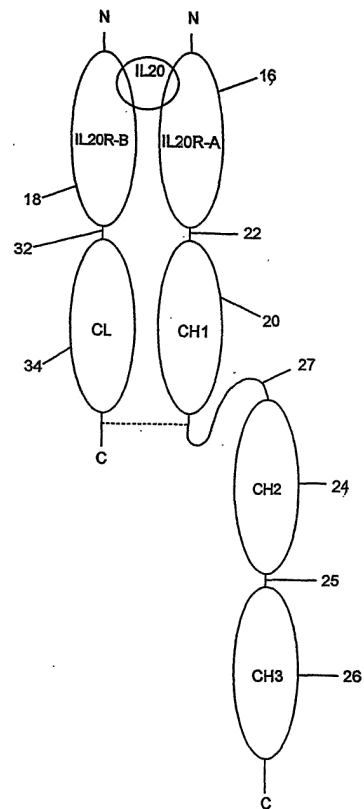


FIG. 1

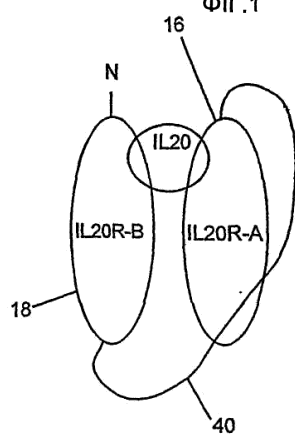


FIG. 2

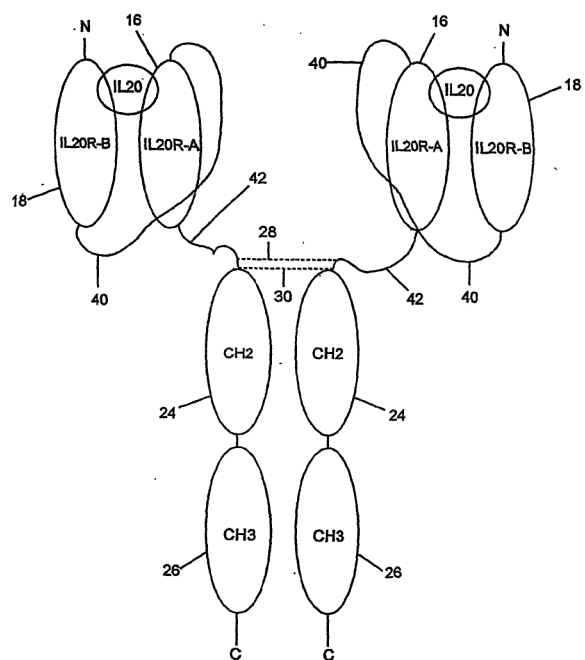


FIG. 3

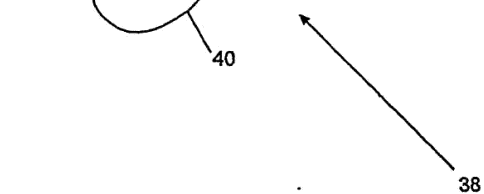
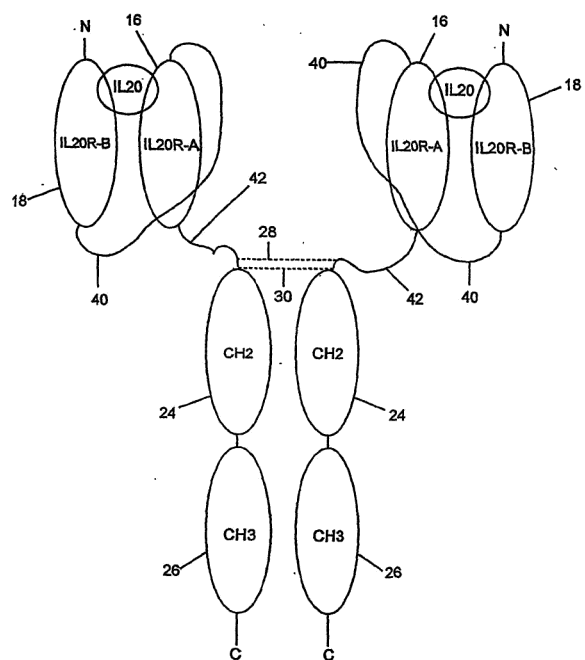
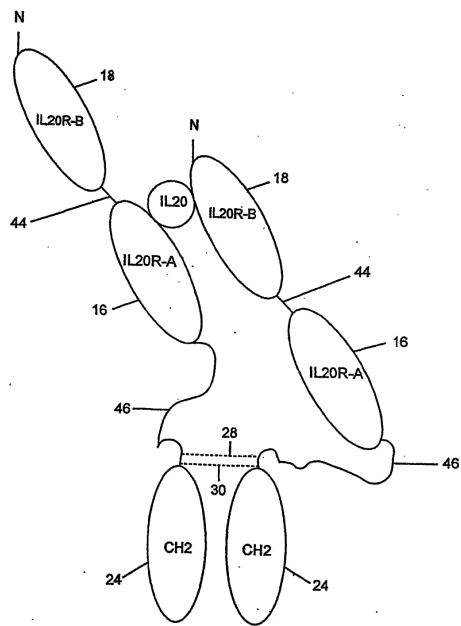


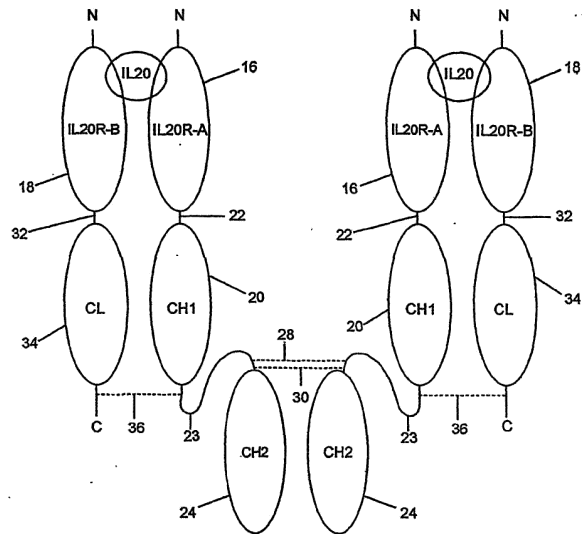
FIG. 4



175



84830



176

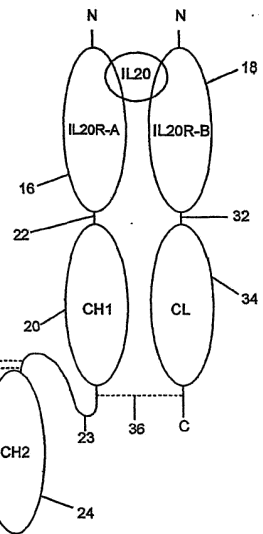


FIG. 5

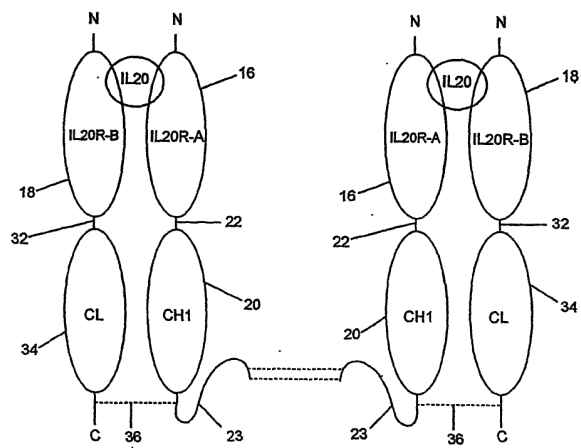


FIG. 7

FIG. 6

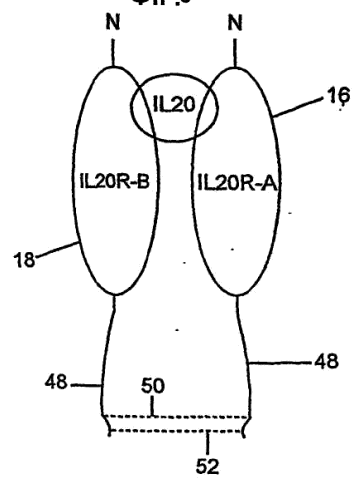


FIG. 8

