



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 84540

(13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 5/10

C12N 15/19

C12N 15/62

C12N 15/63

C07K 14/52 (2008.01)

C07K 14/54 (2008.01)

G01N 33/53

G01N 33/567

A61K 38/19

A61K 39/395

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) НОВИЙ ЦИТОКІН ZCYTOR17 ЛІГАНД

1

2

(21) 20040705854

(22) 21.01.2003

(24) 10.11.2008

(86) PCT/US03/01984, 21.01.2003

(31) 60/350,325

(32) 18.01.2002

(33) US

(31) 60/357,323

(32) 25.04.2002

(33) US

(31) 60/435,315

(32) 19.12.2002

(33) US

(46) 10.11.2008, Бюл.№ 21, 2008 р.

(72) СПРІЧЕР СІНДІ А., КУЙДЖПЕР ДЖОЗЕФ Л.,  
ДАСОВИЧ МАРІЯ М., ГРАНТ ФРЕНСІС ДЖ.,  
ХЕММОНД АНЖЕЛА К., НОВАК ДЖУЛІЯ Е.,  
ГРОСС ДЖЕЙН А., ДІЛЛОН СТЕЙСІ Р.

(73) ЗАЙМОДЖЕНЕТИКС, ІНК.

(56) US 5925735 A, 20.06.99.

(57) 1. Виділений поліпептид, що викликає  
продукування протизапальних цитокінів, який  
містить послідовність амінокислотних залишків, що  
є принаймні на 90 % ідентичною послідовності  
амінокислотних залишків, вибраний з групи:

(a) поліпептиду, показаного від залишку 38 (Val) до  
152 (Leu) у SEQ ID NO: 2;

(b) поліпептиду, показаного від залишку 27 (Leu)  
до 164 (Thr) у SEQ ID NO: 2;

(c) поліпептиду, показаного від залишку 24 (Thr) до  
164 (Thr) у SEQ ID NO: 2; та

(d) поліпептиду, показаного від залишку 1 (Met) до  
164 (Thr) у SEQ ID NO: 2.

2. Виділений поліпептид за п. 1, в якому амінокис-  
лотними залишками 72, 133 та 147 є цистеїн.

3. Виділений поліпептид за п. 1, який зв'язується з  
рецептором zcytor17, як показано у SEQ ID NO: 5  
або SEQ ID NO: 71.

4. Виділений поліпептид, що містить принаймні 14  
суміжних амінокислотних залишків SEQ ID NO: 2  
або SEQ ID NO: 11, вибраних з групи:

(a) амінокислотні залишки 38-52 SEQ ID NO: 2;

(b) амінокислотні залишки 83-98 SEQ ID NO: 2;

(c) амінокислотні залишки 104-117 SEQ ID NO: 2;

(d) амінокислотні залишки 137-152 SEQ ID NO: 2;

(e) амінокислотні залишки 38-52 SEQ ID NO: 11.

5. Злитий білок, що містить принаймні чотири по-  
ліпептиди, в якому порядок поліпептидів від N-  
кінця до C-кінця такий:

перший поліпептид, що містить послідовність амі-  
нокислотних залишків 38-52 SEQ ID NO: 2;

перший спейсер з 6-27 амінокислотних залишків;

другий поліпептид, що містить послідовність амі-  
нокислотних залишків, які вибрано з групи:

(a) амінокислотні залишки спіралі B IL-2 SEQ ID  
NO: 168;

(b) амінокислотні залишки спіралі B IL-4 65-83  
SEQ ID NO: 164;

(c) амінокислотні залишки спіралі B IL-3 73-86  
SEQ ID NO: 102;

(d) амінокислотні залишки спіралі B GM-CSF 72-81  
SEQ ID NO: 166; та

(e) амінокислотні залишки 83-98 SEQ ID NO: 2;

другий спейсер з 5-11 амінокислотних залишків;

третій поліпептид, що містить послідовність аміно-  
кислотних залишків, які вибрано з групи, що скла-  
дається з:

(a) амінокислотні залишки спіралі C IL-2 102-116  
SEQ ID NO: 162;

(b) амінокислотні залишки спіралі C IL-4 94-118  
SEQ ID NO: 164;

(13) C2

(11) 84540

(19) UA

(c) амінокислотні залишки спіралі C IL-3 91-103 SEQ ID NO: 102;  
 (d) амінокислотні залишки спіралі C GM-CSF 85-103 SEQ ID NO: 166; та  
 (e) амінокислотні залишки 104-117 SEQ ID NO: 2; третій спейсер з 3-29 амінокислотних залишків; та четвертий поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи:  
 (a) амінокислотні залишки спіралі D IL-2 134-149 SEQ ID NO: 162;  
 (b) амінокислотні залишки спіралі D IL-3 123-141 SEQ ID NO: 102;  
 (c) амінокислотні залишки спіралі D IL-4 133-151 SEQ ID NO: 164;  
 (d) амінокислотні залишки спіралі D GM-CSF 120-131 SEQ ID NO: 166; та  
 (e) амінокислотні залишки 137-152 SEQ ID NO: 2.  
 6. Злитий білок, що містить принаймні чотири поліпептиди, в якому порядок поліпептидів від N-кінця до C-кінця такий:  
 перший поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи:  
 (a) амінокислотні залишки спіралі A IL-2 27-48 SEQ ID NO: 162;  
 (b) амінокислотні залишки спіралі A IL-4 30-42 SEQ ID NO: 164;  
 (c) амінокислотні залишки спіралі A IL-3 35-45 SEQ ID NO: 102;  
 (d) амінокислотні залишки спіралі A GM-CSF 30-44 SEQ ID NO: 166; та  
 (e) амінокислотні залишки 38-52 SEQ ID NO: 2;  
 перший спейсер з 6-27 амінокислотних залишків;  
 другий поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи:  
 (a) амінокислотні залишки спіралі B IL-2 SEQ ID NO: 168;  
 (b) амінокислотні залишки спіралі B IL-4 65-83 SEQ ID NO: 164;  
 (c) амінокислотні залишки спіралі B IL-3 73-86 SEQ ID NO: 102;  
 (d) амінокислотні залишки спіралі B GM-CSF 72-81 SEQ ID NO: 166; та  
 (e) амінокислотні залишки 83-98 SEQ ID NO: 2;  
 другий спейсер з 5-11 амінокислотних залишків;  
 третій поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи:  
 (a) амінокислотні залишки спіралі C IL-2 102-116 SEQ ID NO: 162;  
 (b) амінокислотні залишки спіралі C IL-4 94-118 SEQ ID NO: 164;  
 (c) амінокислотні залишки спіралі C IL-3 91-103 SEQ ID NO: 102;  
 (d) амінокислотні залишки спіралі C GM-CSF 85-103 SEQ ID NO: 166; та  
 (e) амінокислотні залишки 104-117 SEQ ID NO: 2;  
 третій спейсер з 3-29 амінокислотних залишків; та четвертий поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків 137-152 SEQ ID NO: 2.  
 7. Злитий білок за п. 5, в якому четвертий поліпептид містить амінокислотні залишки 137-152 SEQ ID NO: 2.  
 8. Виділена полінуклеотидна молекула, що містить послідовність нуклеотидів, що кодують поліпептид за п. 1.

9. Виділена полінуклеотидна молекула за п. 8, в якій нуклеотиди вибрано з групи, що складається з:  
 (a) полінуклеотиду, який показано у SEQ ID NO: 1 від нуклеотиду 139 до нуклеотиду 483;  
 (b) полінуклеотиду, який показано у SEQ ID NO: 1 від нуклеотиду 106 до нуклеотиду 519;  
 (c) полінуклеотиду, який показано у SEQ ID NO: 1 від нуклеотиду 97 до нуклеотиду 519; та  
 (d) полінуклеотиду, який показано у SEQ ID NO: 1 від нуклеотиду 28 до нуклеотиду 519.  
 10. Виділена полінуклеотидна молекула, що містить послідовність нуклеотидів, яка кодує поліпептид за п. 4.  
 11. Вектор експресії, що містить такі операбельно зв'язані елементи:  
 (a) промотор транскрипції;  
 (b) сегмент ДНК, що кодує поліпептид, який містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи:  
 (a) амінокислотні залишки 38-52 SEQ ID NO: 2;  
 (b) амінокислотні залишки 83-98 SEQ ID NO: 2;  
 (c) амінокислотні залишки 104-117 SEQ ID NO: 2; та  
 (d) амінокислотні залишки 137-152 SEQ ID NO: 2;  
 та (c) термінатор транскрипції.  
 12. Вектор експресії, що містить такі операбельно зв'язані елементи:  
 (a) промотор транскрипції;  
 (b) сегмент ДНК, що кодує поліпептид, який містить послідовність амінокислотних залишків, що є принаймні на 90 % ідентичною залишкам 38 (Val)-152 (Leu), які показано у SEQ ID NO: 2;  
 та (c) термінатор транскрипції.  
 13. Вектор експресії за п. 12, в якому сегмент ДНК, що кодує поліпептид, містить амінокислотні залишки 38(Val)-152 (Leu) SEQ ID NO: 2.  
 14. Культивована клітина, що містить вектор експресії за п. 12.  
 15. Спосіб продукування білка, який включає: культивування клітин за п. 14 в умовах, в яких експресується сегмент ДНК, що кодує поліпептид за п. 1; та виділення білка, кодованого сегментом ДНК.  
 16. Спосіб продукування антитіла, що специфічно зв'язується з поліпептидом за п. 1, який включає інокуляцію тварин поліпептидом, що вибрано з групи, яка складається з:  
 (a) поліпептиду, що складається з 9-141 амінокислот, де поліпептид є ідентичним суміжній послідовності амінокислотних залишків у SEQ ID NO: 2 від амінокислоти під номером 24 (Ala) до амінокислоти під номером 164 (Thr);  
 (b) поліпептиду за п. 1;  
 (c) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 з амінокислот під номером 38-52;  
 (d) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 з амінокислот під номером 83-98;  
 (e) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 з амінокислот під номером 104-117;  
 (f) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 з амінокислот під номером 137-152;

(g) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 з амінокислот під номером 38-152;

(h) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO 2: з амінокислот під номером 24-164;

(c) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 з амінокислот під номером 38-52;

(d) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 з амінокислот під номером 85-98;

(e) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 з амінокислот під номером 104-118;

(f) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 з амінокислот під номером 141-157;

(g) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 з амінокислот під номером 38-157;

(h) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 з амінокислот під номером 24-163;

(i) поліпептиду, що містить амінокислотні залишки 54-59, 129-134, 53-58, 35-40 або 33-38 SEQ ID NO: 2 або амінокислотні залишки 34-39, 46-51, 131-136, 158-163 або 157-162 SEQ ID NO 11, причому сховані залишки G, S та T та відкриті залишки H, Y та W ігнорують; та

викликання поліпептидом імунної реакції у тварини для утворення антитіла; та

виділення антитіла з тварини.

17. Антитіло, продуковане способом за п. 16, яке зв'язується з поліпептидом SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 11.

18. Антитіло, яке специфічно зв'язується з поліпептидом за SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 11.

19. Спосіб стимулювання імунної реакції у ссавця, якого піддавали дії патогену або антигену, який включає етапи:

(1) визначення безпосередньо або не безпосередньо рівня патогену або антигену, наявних у ссавці;

(2) застосування композиції, що містить поліпептид за п. 1 у прийнятному фармацевтичному носії;

(3) визначення безпосередньо або опосередковано рівня патогену або антигену у ссавці; та

(4) порівняння рівня патогену або антигену на етапі 1 з рівнем патогену або антигену на етапі 3, причому зміна рівня є індикативною стосовно стимулювання імунної реакції.

20. Спосіб за п. 19, що крім того включає:

(5) повторне застосування композиції, що містить поліпептид за п. 1 у прийнятному фармацевтичному носії;

(6) визначення безпосередньо або опосередковано рівня патогену або антигену у ссавці; та

(7) порівняння рівня патогену або антигену на етапі 1 з рівнем антигену на етапі 6, причому зміна рівня є індикативною стосовно стимулювання імунної реакції.

21. Спосіб розвитку гематопоетичних клітин та попередників гематопоетичних клітин, який включає культивування кісткового мозку або периферійних клітин крові з композицією, що містить кількість поліпептиду за п. 1, достатню для утворення

збільшення числа лімфоїдних клітин у кістковому мозку або периферійних клітинах крові у порівнянні з кістковим мозком або периферійними клітинами крові, культивованими при відсутності поліпептиду за п. 1.

22. Спосіб за п. 21, в якому гематопоетичні клітини та попередники гематопоетичних клітин є лімфоїдними клітинами.

23. Спосіб за п. 22, в якому лімфоїдні клітини є клітинами моноцитів, макрофагів або Т-клітинами.

24. Спосіб стимулювання імунної реакції у ссавця, якого піддавали дії патогену або антигену, який включає етапи:

(1) визначення рівня антиген- або патогенспецифічного антитіла;

(2) застосування композиції, що містить поліпептид за п. 1 у прийнятному фармацевтичному носії;

(3) визначення рівня антиген- або патогенспецифічного антитіла після застосування;

(4) порівняння рівня антигену на етапі (1) з рівнем антигену на етапі (3), причому збільшення рівнів антитіла є індикативним стосовно стимулювання імунної реакції.

25. Спосіб визначення наявності РНК, що кодує поліпептид за п. 1, у біологічному зразку, який включає етапи:

(a) контактування зонду нуклеїнової кислоти в умовах гібридизації з (i) тест-молекулами РНК, виділеними з біологічного зразка, або (ii) молекулами нуклеїнової кислоти, синтезованими з виділених молекул РНК, причому зонд має нуклеотидну послідовність, що містить частину нуклеотидної послідовності молекули нуклеїнової кислоти за п. 9, або її комплемент, та

(b) визначення утворення гібридів зонда нуклеїнової кислоти та тест-молекул РНК або синтезованих молекул нуклеїнової кислоти, причому наявність у біологічному зразку гібридів показує наявність РНК, що кодує поліпептид за п. 1.

26. Спосіб визначення наявності поліпептиду за п. 1 у біологічному зразку, який включає етапи:

(a) контактування біологічного зразка з антитілом або фрагментом антитіла за п. 18, причому контактування здійснюють в умовах, що забезпечують зв'язування антитіла або фрагмента антитіла з біологічним зразком, та

(b) визначення зв'язаного антитіла або фрагмента антитіла.

27. Спосіб знищення ракових клітин, який включає: отримання ex vivo тканини або біологічного зразка, що містить ракові клітини від пацієнта, або ідентифікування ракових клітин in vivo;

отримання поліпептиду способом за п. 15;

виготовлення суміші поліпептиду з фармацевтично прийнятним наповнювачем; та застосування пацієнтом або піддавання ракових клітин дії поліпептиду.

28. Спосіб знищення ракових клітин за п. 27, в якому поліпептид додатково змішаний з токсином.

29. Антитіло за п. 18, вибране з групи:

(a) поліклональне антитіло,

(b) мишаче моноклональне антитіло,

(c) гуманізоване антитіло, похідне від (b),

(d) фрагмент антитіла, та

(e) моноклональне антитіло людини.

30. Антитіло або фрагмент антитіла, що специфічно зв'язується з поліпептидом, вибраним з групи поліпептидів, що містять такі послідовності амінокислотних залишків:

(a) поліпептид з залишками 38 (Val) до 152 (Leu) у SEQ ID NO: 2;

(b) поліпептид з залишками 27 (Leu) до 164 (Thr) у SEQ ID NO: 2;

(c) поліпептид з залишками 24 (Thr) до 164 (Thr) у SEQ ID NO: 2; та

(d) поліпептид з залишками 1 (Met) до 164 (Thr) у SEQ ID NO: 2.

31. Антитіло за п. 18, яке додатково містить радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, мітку пептиду, магнітну частинку, лікарський засіб або токсин.

32. Спосіб інгібування проліферації або диференціації гематопоетичних клітин та попередників гематопоетичних клітин, індукованих поліпептидом за п. 1, який включає культивування кісткового мозку або периферійних клітин крові з композицією, що містить кількість антитіла за п. 18, достатню для зменшення проліферації або диференціації гематопоетичних клітин у кістковому мозку або периферійних клітинах крові у порівнянні з кістковим мозком або периферійними клітинами крові, культивованими при відсутності розчинного рецептора цитокіну.

33. Спосіб за п. 32, в якому гематопоетичні клітини та попередники гематопоетичних клітин є лімфоїдними клітинами.

34. Спосіб за п. 33, в якому лімфоїдні клітини є макрофагами або Т-клітинами.

35. Спосіб зменшення запалення, індукованого поліпептидом за п. 1, який включає вживання ссавцем із запаленням достатньої для зменшення запалення композиції з антитілом за п. 18, достатньої для зменшення запалення.

36. Спосіб пригнічення запальної реакції у ссавця, який включає:

(1) визначення рівня запальної молекули;

(2) застосування композиції, що містить антитіло за п. 18, у прийнятному фармацевтичному наповнювачі;

(3) визначення рівня запальної молекули після застосування;

(4) порівняння рівня запальної молекули на етапі (1) з рівнем запальної молекули на етапі (3), причому відсутність збільшення або зменшення рівня запальної молекули є індикатором пригнічення запальної реакції.

37. Антитіло за п. 30, яке додатково містить радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, мітку пептиду, магнітну частинку, лікарський засіб або токсин.

38. Спосіб інгібування проліферації або диференціації гематопоетичних клітин та попередників гематопоетичних клітин, індукованої поліпептидом за п. 1, який включає культивування кісткового мозку або периферійних клітин крові з композицією, що містить кількість антитіла за п. 30, достатню для зменшення проліферації або диференціації гематопоетичних клітин у кістковому мозку або периферійних клітинах крові у порівнянні з кістко-

вим мозком або периферійними клітинами крові, культивованими при відсутності розчинного рецептора цитокіну.

39. Спосіб за п. 38, в якому гематопоетичні клітини та попередники гематопоетичних клітин є лімфоїдними клітинами.

40. Спосіб за п. 39, в якому лімфоїдні клітини є макрофагами або Т-клітинами.

41. Спосіб зменшення запалення, індукованого поліпептидом за п. 1, який включає вживання ссавцем з запаленням достатньої для зменшення запалення кількості композиції антитіла за п. 30.

42. Спосіб пригнічення запальної реакції у ссавця з запаленням, який включає:

(1) визначення рівня запальної молекули;

(2) застосування композиції, що містить антитіло за п. 30 у прийнятному фармацевтичному наповнювачі;

(3) визначення рівня запальної молекули після застосування;

(4) порівняння рівня запальної молекули на етапі (1) з рівнем запальної молекули на етапі (3), причому відсутність збільшення або зменшення рівня запальної молекули є індикатором пригнічення запальної реакції.

43. Спосіб лікування ссавця, потерпаючого від запальної хвороби, в якій відіграє роль поліпептид за п. 1, який включає:

застосування антагоніста поліпептиду за п. 1 до ссавця таким чином, щоб зменшити запалення, при якому антагоністом є антитіло, що специфічно зв'язується з поліпептидом за пп. 1-4, або антитіло чи фрагмент антитіла за п. 18.

44. Спосіб за п. 43, в якому хворобою є хронічна запальна хвороба.

45. Спосіб за п. 44, в якому хворобою є хронічна запальна хвороба з такої групи:

(a) запальна хвороба кишечника;

(b) виразковий коліт;

(c) хвороба Крона;

(d) atopічний дерматит;

(e) екзема; та

(f) псоріаз.

46. Спосіб за п. 43, в якому хворобою є гостра запальна хвороба.

47. Спосіб за п. 46, в якому хворобою є гостра запальна хвороба з такої групи:

(a) ендотоксемія;

(b) септицемія;

(c) синдром токсичного шоку; та

(d) інфекційна хвороба.

48. Спосіб за п. 43, в якому антитіло додатково містить радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, мітку пептиду, магнітну частинку, лікарський засіб або токсин.

49. Спосіб визначення запалення у пацієнта, який включає:

отримання тканини або біологічного зразка від пацієнта;

інкубування тканини або біологічного зразка антитілом за п. 18 в умовах, в яких антитіло зв'язується з комплементарним поліпептидом у тканині або біологічному зразку;

візуалізування зв'язку антитіла у тканині або біологічному зразку; та

порівняння рівнів зв'язку антитіла у тканині або біологічному зразку від пацієнта з нормальною контрольною тканиною або біологічним зразком, причому збільшення рівня зв'язку антитіла з тканиною або біологічним зразком пацієнта відносно нормальної контрольної тканини або біологічного зразка є індикатором запалення у пацієнта.

50. Спосіб визначення запалення у пацієнта, який включає:

отримання тканини або біологічного зразка від пацієнта;

мічення полінуклеотиду, що містить принаймні 14 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 1 або комплексу SEQ ID NO: 1;

інкубування тканини або біологічного зразка в умовах, в яких полінуклеотид гібридується з комплементарною полінуклеотидною послідовністю;

візуалізування міченого полінуклеотиду у тканині або біологічному зразку; та

порівняння рівня гібридизації міченого полінуклеотиду у тканині або біологічному зразку від пацієнта з нормальною контрольною тканиною або біологічним зразком,

причому збільшення гібридизації міченого полінуклеотиду з тканиною або біологічним зразком пацієнта відносно нормальної контрольної тканини або біологічного зразка є індикатором запалення у пацієнта.

Представлена заявка стосується [попередньої заявки США серійний №60/435, 315 зареєстровано 19 грудня, 2002, попередньої заявки США серійний №60/375 323, зареєстровано 25 квітня, 2002 та попередньої заявки США серійний №60/350 325, зареєстровано 18 січня, 2002]. Під 35 U. S. C. 119 (e) (1), ця заявка заявляє корисність вказаних попередніх заявок.

Проліферація та диференціація клітин багатоклітинних організмів регулюється гормонами та поліпептидними факторами росту. Ці здатні до дифузії молекули дозволяють клітинам спілкуватися одна з одною та діяти у згоді для утворення клітин, тканин та органів та для відновлення пошкоджених тканин. Приклади гормонів та факторів росту включають стероїдні гормони (наприклад естроген, тестостерон), паратиреоїдний гормон, гормон, що стимулює фолікули, інтерлейкіни, похідний від тромбоцитів фактор росту (PDGF), епідермічний фактор росту (EGF), фактор, що стимулює колонії гранулоцитів-макрофагів (GM-CSF), еритропоетин (EPO) та кальцитонін.

Гормони та фактори росту впливають на клітинний метаболізм приєднанням до рецепторів. Рецептори можуть бути інтегральними мембранними білками, що приєднані до провідних шляхів сигналізування у клітині, як-то другі месенджерні системи. Інші класи рецепторів є розчинними молекулами, як-то фактори транскрипції.

Цитокіни звичайно стимулюють проліферацію або диференціацію клітин гематопоетичної лінії диференціювання або приймають участь у механізмах імунних та запальних реакцій організму. Прикладами цитокінів, які впливають на гематопоезис, є еритропоетин (EPO), який стимулює розвиток червоних клітин крові; тромбопоетин (TPO), який стимулює розвиток клітин мегакаріоцитної лінії диференціювання; та фактор стимуляції колоній гранулоцитів (G-CSF), який стимулює розвиток нейтрофілів. Ці цитокіни є корисними при регенерації нормальних рівнів клітин крові у пацієнтів, що потерпають від анемії, тромбоцитопенії та нейтропенії, або отримують хемотерапію проти раку.

Інтерлейкіни є родиною цитокінів, що опосередковують імунологічні реакції, включаючи запалення. Інтерлейкіни опосередковують різні запальні

патології. Центральними стосовно імунної реакції є Т-клітини, які продукують багато цитокінів та адаптивний імунітет до антигенів. Цитокіни, що продукуються Т-клітинами, класифіковано як тип 1 та тип 2 [Kelso, A. Immun. Cell Biol. 76: 300-317, 1998]. Цитокіни типу 1 включають IL-2, IFN- $\gamma$ , LT- $\alpha$  та є включеними у запальні реакції, протівірусний імунітет, імунітет проти внутрішньоклітинних паразитів та відторгнення алотрансплантату. Цитокіни типу 2 включають IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 та IL-13 та є включеними у гуморальні реакції, протигельмінтний імунітет та алергічні реакції. Спільні між типами 1 та 2 цитокіни включають IL-3, GM-CSF та TNF- $\alpha$ . Є деякі свідчення, що продукуючі тип 1 та тип 2 популяції Т-клітин краще мігрують у різні типи запалених тканин.

Розвинені Т-клітини можуть бути активованими, тобто, антигеном або іншим стимулом для утворення, наприклад, цитокінів, молекул біохімічного сигналізування, або рецепторів, що далі впливають на долю популяції Т-клітин.

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

Моноцити/макрофаги, та Т-клітини можуть бути активованими рецепторами на поверхні їх клітин та грають центральну роль в імунній реакції представленням антигену для лімфоцитів, а також діють як допоміжні клітини для лімфоцитів секретуванням ряду цитокінів.

Природні кілерні клітини (NK) мають спільну клітину-попередник з Т-клітинами та В-клітинами та грають роль в імунному контролі. NK-клітини, які складають до 15% лімфоцитів крові, не експресують рецепторів антигенів, а тому не забезпечують розпізнавання МНС як вимоги для приєднання до цільової клітини. NK-клітини включені у розпізнавання та знищення деяких клітин пухлин та вірусно інфікованих клітин. In vivo NK-клітини, можна вважати, потребують активації, однак, in vitro NK-клітини, як показано, знищують деякі типи клітин пухлин із зовнішньою активацією.

Продемонстровані in vivo активності родини цитокінів ілюструють великий клінічний потенціал

та потребу в інших цитокінах, агоністах цитокінів та антагоністах цитокінів. Представлений винахід стосується цих потреб запропонованням нового цитокіну, що стимулює клітини лінії диференціювання гематопоетичних клітин, а також відповідні композиції та способи.

Згідно з представленим винаходом запропоновано такі поліпептиди для цих та інших застосувань, які слід розуміти фахівцям з наведеного тут.

Фіг.1 є ілюстрацією складного угруповання zcytor17lig людини (SEQ ID NO: 2) (hzcytor17lig), zcytor17lig миші (SEQ ID NO: 11) (mzcytor17lig), IL-3 миші (mIL-3) (SEQ ID NO: 100) та IL-3 людини (hIL-3) (SEQ ID NO: 102).

Фіг.2 є ілюстрацією складного угруповання zcytor17lig людини (SEQ ID NO: 2) (zcytor17lig) та zcytor17lig миші (SEQ ID NO: 11) (mzcytor17lig).

Фіг.3 є схемою гідрофільності Хоппа/Вудса zcytor17lig людини (SEQ ID NO: 2).

Перед детальнішим винаходу може бути корисним для розуміння їх визначити терміни:

Термін «афінний придатак» застосовують тут для позначення поліпептидного сегменту, що може бути приєднаним до другого поліпептиду для очистки або визначення другого поліпептиду, або забезпечувати сайти для приєднання другого поліпептиду до субстрату. В принципі, будь-який пептид або білок, для якого є доступними антитіло або інший специфічний засіб зв'язування, можна застосовувати як афінний придатак. Афінні придатки включають поліістидинову ділянку, білок A [Nilsson et al., EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilsson et al., Methods Enzymol. 198: 3, 1991], глутатіон-S-трансферазу [Smith та Johnson, Gene 67: 31, 1988], афінний придатак Glu-Glu [Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952- 4, 1985], субстанцію P, Flag-пептид [Hopp et al., Biotechnology 6: 1204-10, 1988], стрептавідин-приєднувальний пептид, або інші антигенні епітопи або приєднувальний домен. Дивись, загалом, [Ford et al., Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991]. ДНК, що кодує афінні придатки є доступною від комерційних постачальників (наприклад, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Термін «алельний варіант» застосовують тут для позначення будь-якого з двох або більше альтернативних форм гена, що займає такий же хромосомний локус. Алельний варіант з'являється природно через мутацію та може призводити до фенотипового поліморфізму у популяціях. Генні мутації можуть бути мовчазним (без змін у кодованому поліпептиді) або можуть кодувати поліпептиди, що мають змінені амінокислотні послідовності. Термін алельний варіант також застосовано тут для позначення білку, кодованого алельним варіантом гена.

Терміни «аміно-термінальний» та «карбокси-термінальний» застосовують тут для позначення позиції у поліпептидах. Коли контекст дозволяє, ці терміни застосовують з посиланням на особливі послідовності або частини поліпептиду для позначення близькості або відносності позиції. Наприклад, деякі послідовності розташовані карбокси-термінально стосовно базової послідовності у поліпептиді, локалізовані проксимально стосовно карбокси-закінчення базової послідовності, але не

необов'язково на карбокси-закінченні повного поліпептиду.

Термін «комплементарна/антикомплементарна пара» позначає неідентичні угруповання, що утворюють нековалентно асоційовану, стабільну пару в прийнятних умовах.

Наприклад, біотин та авідин (або стрептавідин) є прототиповими членами комплементарно/антикомплементарної пари. Інші типові комплементарно/антикомплементарні пари включають пари рецептор/ліганд, пари антитіло/антиген (або гаптен або епітоп), пари сенсо-во/антисенсовий полінуклеотид, тощо. Коли є бажаним наступне комплементарно/антикомплементарної пари, комплементарно/антикомплементарна пара переважно має афінність стосовно приєднання < 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>.

Термін «комплемента полінуклеотидної молекули» позначає полінуклеотидні молекули, що мають комплементарну базову послідовність та зворотну орієнтацію у порівнянні з базовою послідовністю. Наприклад, послідовність 5'-ATGCACGGG3' є комплементарною стосовно 5'-CCCGTGCAT3'.

Термін «континг» позначає полінуклеотид, що має суміжну ділянку ідентичної або комплементарної послідовності стосовно другого полінуклеотиду. Суміжні послідовності, як кажуть, «перекривають» дану ділянку полінуклеотидної послідовності у їх повноті або вздовж часткової ділянки полінуклеотиду. Наприклад, репрезентативні континги стосовно полінуклеотидної послідовності 5'-ATGGCTTAGCTT-3' є 5'-TAGCTTgagctt-3' та 3'-gtcgacTACCGA-5'.

Термін «вироджені нуклеотидні послідовності» позначає послідовності нуклеотидів, що включають один або більше вироджених кодонів (у порівнянні з базовою молекулою полінуклеотиду, що кодує поліпептид). Вироджені кодони містять відмінні триплети нуклеотидів, але кодують такий же амінокислотний залишок (тобто, триплети GAU та GAC, кожний, кодують Asp).

Термін «вектор експресії» застосовують для позначення молекули ДНК, лінійної або циклічної, що містить сегмент, який кодує досліджуваний поліпептид, операбельно приєднаний до додаткових сегментів, що забезпечує їх транскрипцію. Такі додаткові сегменти включають промоторні та термінаторні послідовності та можуть також включати один або більше початків реплікації, один або більше придатних для селекції маркерів, енхансер, сигнал поліаденілування, тощо. Вектори експресії є звичайно похідними від плазмідної або вірусної ДНК, або можуть містити елементи обох.

Термін «виділений», при застосуванні до полінуклеотиду, позначає, що полінуклеотид виділено з його природного генетичного середовища, а відтак він є позбавленим від інших чужинних або небажаних кодувальних послідовностей і має форму, підходящу для застосування у генетично сконструйованих системах продукування білку. Такі виділені молекули є молекулами, що виділено з їх природного середовища, вони включають ДНК та геномні клони. Виділені молекули ДНК представленого винаходу позбавлені від інших генів, з якими вони є звичайно асоційованими, але можуть включати

природно існуючі 5' та 3' нетрансльовані регіони, як-то промотори та термінатори. Ідентифікування асоційованих регіонів фахівцю повинно бути зрозумілим [дивись наприклад, Dupa и Tijan, Nature 316: 774-78, 1985].

"Виділений" поліпептид або білок" є поліпептидом або білком, що знайдено в умовах, інших ніж їх природне середовище, як-то окремо від крові та тканини тварин. У кращій формі, виділений поліпептид є по суті позбавленим від інших поліпептидів, особливо інших поліпептидів тваринного походження. Краще отримувати поліпептиди у високо очищеній формі, тобто, більше 95% чистоти, більш переважно більше 99% чистоти. При застосуванні у цьому контексті, термін «виділений» не виключає присутності того ж поліпептиду в альтеративній фізичній формі, як-то димери або альтернативно глікозиловані або дериватизовані форми.

Термін «неопластичний», при застосуванні до клітин, показує клітини, що піддаються новій та аномальній проліферації, особливо у тканині, де проліферація є неконтрольованою та прогресивною, що призводить до неоплазму. Неопластичні клітини можуть бути злоякісними, тобто, інвазивними та метастатичними, або доброякісними.

Термін «операбельно приєднаний», при застосуванні до сегментів ДНК, показує, що сегменти розташовані таким чином, щоб вони функціонували у згоді з їх призначенням, наприклад, транскрипція ініціюється промотором та продовжується через кодувальний сегмент до термінатору.

Термін «ортолог» позначає поліпептид або білок, що отримано з одного виду, який є функціональним двійником поліпептиду або білку від відмінного виду. Відмінності послідовностей серед ортологів є результатом видоутворення.

«Паралоги» є відмінними але структурно спорідненими білками, виробленими організмом. Паралоги, можна вважати, з'являються через дуплікацію гену. Наприклад,  $\alpha$ -глобін,  $\beta$ -глобін та міоглобін є паралогами кожного іншого.

«Полінуклеотид» є одинично- або подвійно-ланцюговим полімером дезоксирибонуклеотидних або рибонуклеотидних основ, зчитуванням від 5' до 3' кінця.

Полінуклеотиди включають РНК та ДНК, їх можна виділити з природних джерел, синтезувати *in vitro*, або отримати з комбінації природних та синтетичних молекул.

Розміри полінуклеотидів виражено як пари основ (скорочено «по»), нуклеотиди («нк»), або кіло основ («ко»). Коли контекст дозволяє, останні два терміни можуть описувати полінуклеотиди, що є одинично-ланцюговими або подвійно-ланцюговими. Коли термін застосовують до подвійно-ланцюгової молекули, його застосовують для позначення повної довжини, і слід розуміти як еквівалентний терміну «пари основ». Фахівці повинні розуміти, що два ланцюги подвійно-ланцюгового полінуклеотиду можуть слабко відрізнятися за довжиною, а їх кінці можуть бути розташованими уступами як результат розщеплення ферментами; відтак усі нуклеотиди з подвійно-ланцюговою полінуклеотидною молекулою можуть не бути спареними.

«Поліпептид» є полімером з амінокислотних залишків, з'єднаних пептидними зв'язками, утвореними природно або синтетично. Поліпептиди менше приблизно 10 амінокислотних залишків звичайно позначено як «пептиди».

Термін «промотор» застосовують тут в звичайному в його рівні техніки значенні для позначення частини гена, що містить послідовності ДНК, що забезпечують приєднання РНК полімерази та ініціацію транскрипції. Промоторні послідовності звичайно, але не завжди, знайдені у 5' некодувальних регіонах генів.

«Білок» є макромолекулою, що містить один або більше поліпептидних ланцюгів. Білок може також містити непептидні компоненти, як-то вуглеводні групи. Вуглеводи та інші непептидні замісники може додавати до білку клітина, в якій білок продукується, та змінюватиметься з типом клітин.

Білки визначено тут у термінах їх амінокислотної стрижневої структури; замісники, як-то вуглеводні групи звичайно не визначено, але однак можуть бути представленими.

Термін «рецептор» позначає білок, асоційований з клітиною, що приєднується до біоактивної молекули (тобто, ліганду) та опосередковує дію ліганду на клітину.

Рецептори приєднані до мембрани характеризуються мультипептидною структурою, що містить зовнішньоклітинний ліганд-приєднувальний домен та внутрішньоклітинний ефекторний домен, що є звичайно включеними у переніс сигналу. Приєднання ліганду до рецептору призводить до конформаційної зміни у рецепторі, що викликає взаємодію між ефекторним доменом та іншою молекулою у клітині. Ця взаємодія в свою чергу призводить до зміни у метаболізмі клітини. Метаболічні події, що пов'язані з взаємодіями рецептор-ліганд, включають транскрипцію гена, фосфорилування, дефосфорилування, збільшення продукування циклічного АМФ, мобілізацію клітинного кальцію, мобілізацію мембранних ліпідів, адгезію клітин, гідроліз інозитольних ліпідів та гідроліз фосфоліпідів. Загалом, рецептори можуть бути приєднаними до мембран, цитозольними або нуклеарними; мономерними (наприклад, тиреоїдним, що стимулює рецептор гормону, бета-адренергічним рецептором) або мультимерними (наприклад, рецептор PDGF, рецептор гормону росту, рецептор IL-3, рецептор GM-CSF, рецептор G-CSF, рецептор еритропоєтину та рецептор IL-6).

Термін «послідовності секреторного сигналу» позначає послідовності ДНК, що кодує поліпептид («секреторний пептид»), що як компонент більшого поліпептиду спрямовує більший поліпептид через секреторний провідний шлях клітини, в якій він синтезується. Більший поліпептид звичайно розщеплюється для видалення секреторного пептиду при транзиті через секреторний провідний шлях.

Термін «сплайсовий варіант» застосовують тут для позначення транскрибованої з гена альтеративної форми РНК. Сплайсовий варіант з'являється природно через альтеративні сплайсингові сайти у транскрибованій молекулі РНК, або менш звичайно, між окремо транскрибованими молекулами РНК, та може призводити до кількох мРНК,

транскрибованих з того ж гена. Сплайсові варіанти можуть кодувати поліпептиди, що мають змінені амінокислотні послідовності. Термін сплайсовий варіант також є застосовуваним тут для позначення білку, кодованого сплайсовим варіантом мРНК, транскрибованої з гена.

Молекулярні маси та довжини полімерів визначені неточними аналітичними способами (наприклад, гель-електрофорезом) і слід розуміти, є приблизними величинами. Коли такі величини виражені як «приблизно» X величину X слід розуміти з похибкою до 10%.

Усі цитовані посилання тут представлено як довідки у їх повноті.

Представлений винахід частково базується на відкритті нової послідовності ДНК, що кодує білок з чотирьох-спіральньо-упакованою структурою цитокіну. Через процеси клонування та дослідження проліферації, описані тут детальніше, поліпептидні послідовності, що кодують новий поліпептид ліганду, ідентифіковані як ліганд з високою специфічністю стосовно рецептору *zcytor17* (SEQ ID NO: 5) та щонайменше один додатковий суб-елемент, що містить рецептор бета-онкостатинМ (OSMRбета) (SEQ ID NO: 7) та WSX-1 (SEQ ID NO: 9). Цей поліпептид ліганду, позначений як *zcytor17lig*, був виділений з бібліотек кДНК, створених з активованих клітин периферійної крові людини (hPBC), які було CD3-селектовано. CD3 є маркером поверхні клітини, унікальним стосовно клітин лімфоїдного походження, особливо Т-клітин.

У нижченаведених прикладах, лінію клітин, що є залежною від OSMРбета та зв'язаного з рецептором *zcytor17*, провідного шляху або залежною від OSMРбета та WSX-1 та зв'язаного з рецептором *zcytor17* провідного шляху для виживання та росту при відсутності інших факторів росту, застосовували для скринінгу джерел кДНК, що кодують *zcytor17lig*. Кращою залежною від фактору росту лінією Т-клітин, що застосовували для трансфекції та експресії рецептору *zcytor17*, була BaF3 [Palacios та Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986].

Однак, підходящими для цього є інші залежні від фактору росту лінії Т-клітин, як-то FDC-P1 [Hapel et al., Blood 64: 786-790, 1984], та M07e [Kiss et al., Leukemia 7: 235-240, 1993].

Амінокислотні послідовності для OSMР, WSX-1 та рецепторів *zcytor17* показані як кодовані рецептори, що належать до класу I підроддини рецепторів цитокіну, що включає, але без обмеження, рецептори IL-2, IL-4, IL-7, Lf, IL-12, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF та G-CSF [для огляду дивись, Cosman, «The Hematopoietin Receptor Superfamily» у Cytokine 595-106, 1993]. Рецептор *zcytor17* повністю описано у загально признаній [патентній заявці PCT № USO 1/20484 (публікація WIPO № WO 02/00721)], а WSX-1 повністю описано у [патенті США №5925735]. Аналіз тканинного розподілу мРНК рецептору *zcytor17* виявив експресію в підкласах активованих Т-клітин CD4+ та CD8+, моноцитів CD14+ та слабшу експресію у В-клітинах CD19+. Більш того, мРНК було представлено у моноцитних лініях спочиваючих або активованих

клітин THP-1 (ATCC №TIB-202), U937 (ATCC №CRL-1593.2) та HL60 (ATCC №CCL-240).

Експресія WSX-1 є найсильнішою у тимусі, селезінці, PBL та лімфатичному вузлі, а також збільшену експресію спостерігали для активованих Т-клітин. Тканинний розподіл для OSMРбета описано як дуже широкий. Тканинний розподіл цих трьох рецепторів підказує, що метою для передбачуваного *zcytor17lig* є гематопоетична лінія диференціювання клітин, особливо Т-клітин, моноцитів/макрофагів та лімфоїдних клітин-попередників та лімфоїдних клітин. Інші відомі чотирьох-спіральньо-упаковані цитокіни, що діють на лімфоїдні клітини, включають IL-2, IL-4, IL-7 та IL-15. Для огляду чотирьох-спіральньо-упакованих цитокінів, дивись, [Nicola et al., Advances in Protein Chemistry 52: 1-65, 1999 та Kelso, A., Immunol. Cell Biol. 76: 300-317, 1998].

Стандартизовані середовища від (CC) CD3-селектованими, стимульованих PMA/іономіцином периферійних клітин крові людини, підтримували ріст клітин BaF3, що експресують рецептор *zcytor17*, OSMРбета та рецептор WSX-1, та були іншим чином залежними від IL-3. Стандартизовані середовища від клітин, що не були: 1) стимульованими PMA/іономіцином; або не були: 2) CD3-селектованими (із зовнішнім стимулюванням PMA/іономіцином або без нього) не підтримували ріст клітин BaF3, що експресують *zcytor17*, OSMРбета та експресуючих рецептор WSX-1 (BaF3/*zcytor17*/WSX-1/OSMRбета) клітин. Контрольні експерименти продемонстрували, що ця проліферативна активність не стосувалася інших відомих факторів росту; та що здатність таких стандартизованих середовищ стимулювати проліферацію експресуючих рецептор *zcytor17*/WSX-1/OSMRбета клітин можна було б нейтралізувати розчинною формою рецептору *zcytor17*.

Стандартизовані середовища від CD3+-селектованих клітин, активованих PMA/іономіцином також підтримували ріст клітин BaF3, що експресують рецептор *zcytor17* та рецептор OSMРбета (*zcytor17*/OSMRбета), в той час, як клітини BaF3, що експресують тільки рецептор *zcytor17* та рецептор WSX-1 (*zcytor17*/WSX-1), або, що містять тільки рецептор OSMРбета, не були стимульованими цими стандартизованими середовищами.

Проліферацію експресуючих рецептор *zcytor17*/WSX-1/OSMRбета клітин BaF3 піддавали CC від CD3+-селектованих, стимульованих PMA/іономіцином периферійних клітин крові людини, ідентифікували візуальним оглядом культур та/або дослідженням проліферації. Багато підходжих досліджень проліферації відомі у рівні техніки та включають дослідження відновлення барвнику, як-то Аламар блакитного [AccuMed International, Inc. Westlake, Ohio], 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл тетразолію броміду [Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983]; 3-(4,5 диметилтіазол-2-іл)-5-3-карбоксиметоксибеніл-2Н-тетразолію; 2,3-біс (2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-5-[(феніламіно)карбоніл]-2Н-тетразолію гідроксиду; та ціанодитоліл-тетразолію хлориду (які комерційно доступні від Polysciences, Inc., Warrington, PA); дослідження мітогенезу, як-то вимір інкорпорава-

ного 3Н-тимідину; ексклюзивне дослідження барвнику, використовуючи, наприклад, нафталін чорний або трипан блакитний; поглинання барвник, використовуючи діацетилфлуоресцеїн; та вивільнення хрому. Дивись, загалом, [Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3rd ed., Wiley-Liss, 1994], що уведено тут як посилання.

Бібліотеку кДНК отримували від CD3+-селектованих, стимульованих PMA та іономіцином первинних периферійних клітин крові людини. Бібліотеку кДНК від CD3+-селектованих, стимульованих PMA та іономіцином периферійних клітин крові людини поділяли на множини, що містять складні молекули кДНК та трансфектували у лінію клітин хазяїна, наприклад, клітин BHK 570 (ATCC Accession №10314). Трансфектовані клітини хазяїна культивували у середовищі, що не містило екзогенних факторів росту (наприклад, 5% FBS) та збирали стандартизоване середовище. Стандартизовані середовища аналізували на здатність стимулювати проліферацію клітин BaF3, трансфектованих zcytor17, рецептори WSX-1 та OSMRбета. Продукуюче множини кДНК стандартизоване середовище, що стимулює клітини з рецептором BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета, ідентифікували. Цю поєднану плазмідну кДНК електропорували у *E. coli*. кДНК виділяли з одиничних колоній та трансфектували окремо у клітини BHK 570. Позитивні клони ідентифікували позитивним результатом у проліфераційному дослідженні рецептору BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета та активність підтверджували нейтралізацією проліферації, використовуючи розчинний рецептор zcytor17.

Позитивний клон виділяли та аналіз послідовності виявив, що поліпептидна послідовність, що входила у плазмідну ДНК, була новою. Послідовність секреторного сигналу містить амінокислотні залишки від 1 (Met) до 23 (Ala), а розвинений поліпептид містить амінокислотні залишки від 24 (Ser) до 164 (Thr) (як показано у SEQ ID NO: 2). Наступний аналіз N-термінального секвенсування очищеного zcytor17lig з клітин 293T показав N-закінчення на залишку 27 (Leu), як показано у SEQ ID NO: 2, а розвинений поліпептид містить амінокислотні залишки від 27 (Leu) до 164 (Thr) (як показано у SEQ ID NO: 2).

Загалом, передбачувано, що цитокіни мають чотирьох-альфа-спіральною структуру зі спіралями A, C та D найважливішими у взаємодії ліганд-рецептор, та є більш високо збереженими серед членів родини. Посилаючись на амінокислотну послідовність zcytor17lig людини, показану у SEQ ID NO: 2, угруповання амінокислотних послідовностей zcytor17lig людини, IL-3 людини та цитокінів людини, передбачують, що спіраль A zcytor17lig визначено амінокислотними залишками 38-52; спіраль B - амінокислотними залишками 83-98; спіраль C - амінокислотними залишками 104-117; а спіраль D - амінокислотними залишками 137-152; як показано у SEQ ID NO: 2. Структурний аналіз підказує, що A/B петля є довгою, петля B/C є короткою, а петля C/D є довгою. Ця петельна структура призводить до спіральної організації уверх-униз-униз. На основі 4-спірально-вузлової структу-

ри, цистеїнові залишки у zcytor17lig, що є збереженими, відповідають за амінокислотні залишки 72, 133 та 147 SEQ ID NO: 2; та 74, 137 та 151 SEQ ID NO: 11, описаних тут. Послідовне розташування цистеїну є наступним підтвердженням чотирьох-спірально-вузлової структури. Також високо збереженими у zcytor17lig є залишок Glu, як показано у SEQ ID NO: 2 н залишку 43.

Більш того, передбачувана амінокислотна послідовність мишачого zcytor17lig показує 31% ідентичність з передбачуваним білком людини протягом повної довжини послідовностей (SEQ ID NO: 2 та SEQ ID NO: 11). На основі порівняння між послідовностями zcytor17lig людини та миші збережені залишки були знайдені у регіонах, що передбачувано кодують альфа-спіралі C та D. Відповідні поліпептиди, що кодують поліпептидні регіони, домени, функціональні послідовності, залишки та послідовність zcytor17lig людини, описану тут, яку показано у SEQ ID NO: 1.

В той час, як спіраль D є відносно збереженою між zcytor17lig людини та миші, спіраль C є найзбереженішою. В той час, як обидва види мають домінуючі кислотні амінокислоти у цьому регіоні, відмінності можна оцінювати стосовно специфічності виду при взаємодії між zcytor17lig та його рецептором, zcytor17, що містить мономерні, гетеродимерні (наприклад, zcytor17/OSMRбета, WSX-1/OSMRбета, zcytor17/WSX-1) або мультимерні (наприклад, zcytor17/OSMRбета/WSX-1) рецептори. Петля A/B та спіраль B zcytor17lig є мінімально збереженими, а спіраль C через петлю C/D у спіраль D є найзбереженішою між видами; збереження на цьому регіоні підказує, що він є функціонально значущим. D спіралі zcytor17lig людини та миші є також збереженими.

Антагоністи рецептору zcytor17 можна створювати мутаціями у спіралі D zcytor17lig. Це може включати усикання білку від залишків Thr 156 (SEQ ID NO: 2), або збереження залишків, що відповідають за приєднання ліганду до рецептору, але послаблюють активність сигналізування.

Чотирьох-спірально-вузлові цитокіни є також згрупованими за довжиною їх спіральних компонентів. «Довго-спіральна» форма цитокінів звичайно складається з 24-30 залишків спіралі та включає IL-6, циліарний нейтротропний фактор (CNTF), інгібіторний фактор лейкемії (LIF) та гормон росту людини (hGH). «Коротко-спіральна» форма цитокінів звичайно складається з 18-21 залишків спіралі та включає IL-2, IL-4 та GM-CSF. Zcytor17lig, можна вважати, є новим членом коротко-спіральної форми групи цитокінів. Дослідження, використовуючи CNTF та IL-6, продемонстрували, що спіраль CNTF може бути заміненою на еквівалентну спіраль в IL-6, надаючи CTNF властивості приєднання до химер. Відтак, цим виявлено, що функціональні домени чотирьох-спіральних цитокінів є визначеними на основі структурної гомології незалежно від ідентичності послідовності та можуть підтримувати функціональну цілісність химери [Kallen et al., J. Biol. Chem. 274: 11859-11867, 1999]. Тому, спіральні домени zcytor17lig повинні бути корисними для отримання химерних конденсованих молекул, особливо з іншими коротко-спіральними формами цитокінів для визначення та

модуляції специфічності приєднання до рецептору. Особливий інтерес представляють конденсовані білки, сконструйовані зі спіралі A та/або спіралі D, та конденсовані білки, що поєднують спіральні та петельні домени від інших короткоформних цитокінів, як-то IL-2, IL-4, IL-15, Lif, IL-12, IL-3 та GM-CSF.

Полінуклеотидну послідовність для IL-2 людини показано у SEQ ID NO: 161, а відповідну амінокислотну послідовність показано у SEQ ID NO: 162. Секреторна сигнальна послідовність складається з амінокислотних залишків від 1 (Met) до 20 (Ser) SEQ ID NO: 162; нуклеотидів від 48 до 107 SEQ ID NO: 161. Розвинений поліпептид складається з амінокислотних залишків від 21 (Ala) до 156 (Thr) SEQ ID NO: 162; нуклеотидів від 108 до 515 SEQ ID NO: 161. Спіраль A IL-2 людини складається з амінокислотних залишків від 27 (Thr) до 48 (Leu) SEQ ID NO: 162; нуклеотидів від 126 до 191 SEQ ID NO: 161. Спіраль B IL-2 людини містить спіраль B1 та спіраль B2. Спіраль B1 IL-2 людини складається з амінокислотних залишків від 73 (Ala) до 80 (Gln) SEQ ID NO: 162; нуклеотидів від 264 до 287 SEQ ID NO: 161. Спіраль B2 IL-2 людини складається з амінокислотних залишків від 83 (Glu) до 92 (Val) SEQ ID NO: 162; нуклеотидів від 294 до 323 SEQ ID NO: 161. Відтак, спіраль B (що містить спіралі B1 та B2) IL-2 репрезентовано амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 168 (нуклеотидна послідовність SEQ ID NO: 167) де амінокислотні залишки 9 та 10 можуть бути будь-якою амінокислотою. SEQ ID NO: 168 є ідентичною амінокислотам від 73 (Ala) до 92 (Val) SEQ ID NO: 162, де амінокислоти 81 та 82 є будь-якими амінокислотами. У кращій формі спіраль B IL-2 містить амінокислоти від 73 (Ala) до 92 (Val) SEQ ID NO: 162; нуклеотиди від 264 до 323 SEQ ID NO: 161. Спіраль C IL-2 людини складається з амінокислотних залишків від 102 (His) до 116 (Val) SEQ ID NO: 162; нуклеотидів від 351 до 395 SEQ ID NO: 161.

Спіраль D IL-2 людини складається з амінокислотних залишків від 134 (Thr) до 149 (Gln) SEQ ID NO: 162; нуклеотидів від 447 до 494 SEQ ID NO: 161.

Полінуклеотидну послідовність для IL-4 людини показано у SEQ ID NO: 163, а відповідну аміно-

кислотну послідовність показано у SEQ ID NO: 164. Секреторна сигнальна послідовність складається з амінокислотних залишків від 1 (Met) до 24 (Gly) SEQ ID NO: 164; нуклеотидів від 64 до 135 SEQ ID NO: 163. Розвинений поліпептид складається з амінокислотних залишків від 25 (His) до 153 (Ser) SEQ ID NO: 164; нуклеотидів від 136 до 522 SEQ ID NO: 163. Спіраль A IL-4 людини складається з амінокислотних залишків від 30 (Thr) до 42 (Thr) SEQ ID NO: 164; нуклеотидів від 151 до 189 SEQ ID NO: 163. Спіраль B IL-4 людини складається з амінокислотних залишків від 65 (Glu) до 83 (His) SEQ ID NO: 164; нуклеотидів від 256 до 312 SEQ ID NO: 163. Спіраль C IL-4 людини складається з амінокислотних залишків від 94 (Ala) до 118 (Ala) SEQ ID NO: 164; нуклеотидів від 343 до 417 SEQ ID NO: 163. Спіраль D IL-4 людини складається з амінокислотних залишків від 133 (Leu) до 151 (Cys) SEQ ID NO: 164; нуклеотидів від 460 до 516 SEQ ID NO: 163.

Полінуклеотидну послідовність для GM-CSF людини показано у SEQ ID NO: 165, а відповідну амінокислотну послідовність показано у SEQ ID NO: 166. Секреторна сигнальна послідовність складається з амінокислотних залишків від 1 (Met) до 17 (Ser) SEQ ID NO: 166; нуклеотидів від 9 до 59 SEQ ID NO: 165. Розвинений поліпептид складається з амінокислотних залишків від 18 (Ala) до 144 (Glu) SEQ ID NO: 166; нуклеотидів від 60 до 440 SEQ ID NO: 165. Спіраль A GM-CSF людини складається з амінокислотних залишків від 30 (Trp) до 44 (Asn) SEQ ID NO: 166; нуклеотидів від 96 до 140 SEQ ID NO: 165. Спіраль B GM-CSF людини складається з амінокислотних залишків від 72 (Leu) до 81 (Gln) SEQ ID NO: 166; нуклеотидів від 222 до 251 SEQ ID NO: 165.

Спіраль C GM-CSF людини складається з амінокислотних залишків від 85 (Gly) до 103 (Gln) SEQ ID NO: 166; нуклеотидів від 261 до 317 SEQ ID NO: 165. Спіраль D GM-CSF людини складається з амінокислотних залишків від 120 (Phe) до 131 (Leu) SEQ ID NO: 166; нуклеотидів від 366 до 401 SEQ ID NO: 165.

Амінокислотні залишки, які містять спіралі A, B, C та D, для zcytor17lig, IL-3, IL-2, IL-4 та GM-CSF людини показано у таблиці 1.

Таблиця 1

	Спіраль A	Спіраль B	Спіраль C	Спіраль D	
zcytor17lig	38-52	83-98	104-117	137-152	з SEQ ID NO: 2
IL-3	35-45	73-86	91-103	123-141	з SEQ ID NO: 102
IL-2	27-48	73-92	102-116	134-149	з SEQ ID NO: 162 або Спіраль B описано у SEQ ID NO: 168
IL-4	30-42	65-83	94-118	133-151	з SEQ ID NO: 164
GM-CSF	30-44	72-81	85-103	120-131	з SEQ ID NO: 166

Фахівець легко зрозуміє, що, приймаючи до уваги виродження генетичного коду, важливий варіант послідовності є можливим серед цих полінуклеотидних молекул. SEQ ID NO: 3 є виродженою послідовністю ДНК, що охоплює усі ДНК, які кодують поліпептид zcytor17lig та їх фрагменти, послідовності SEQ ID NO: 2.

Фахівець зрозуміє, що вироджена послідовність SEQ ID NO: 3 також забезпечує усі послідов-

ності РНК, що кодують SEQ ID NO: 2 заміщенням U на T.

Відтак, поліпептид zcytor17lig, кодований полінуклеотидами, що містять нуклеотиди від нуклеотиду 1 або 70 до нуклеотиду 492 SEQ ID NO: 3 та їх РНК-еквівалентами, є розглянутий представленим винаходом. Таблиця 2 визначає однолітерні коди, застосовувані у SEQ ID NO: 3 для позначення вироджених нуклеотидних позицій. «Розкла-

данними» є нуклеотиди, позначені літерним кодом. «Комплемент» показує код для комплементарного нуклеотиду.

Наприклад, код Y позначає C або T, а їх ком-

племент R позначає A або G, з A комплементарним стосовно T та G комплементарним стосовно C.

Таблиця 2

Нуклеотид	Розкладання	Комплемент	Розкладання
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

Вироджені ко дони, застосовувані у SEQ ID NO: 3, що охоплюють усі можливі ко дони для даної амінокислоти, визначено у таблиці 3.

Таблиця 3

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

Фахівець зрозуміє, що деяка невизначеність уведена у визначення виродженого ко-дону, прикладу усіх можливих кодонів, що кодує кожну амінокислоту. Наприклад, вироджений кодон для серину (WSN) може, у деяких випадках, кодувати аргінін (AGR), а вироджений кодон для аргініну (MGN) може, у деяких випадках, кодувати серин (AGY). Подібне співвідношення існує між кодонами, що кодує фенілаланін та лейцин. Відтак, деяких полінуклеотиди, охоплені виродженими послідовностями, можуть кодувати різні амінокислотні послідовності, але фахівець може легко іде-

нтифікувати такий варіант послідовності посиланням на амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. Варіативні послідовності можна легко тестувати стосовно функціональності, як описано тут.

Фахівець також зрозуміє, що відмінні види можуть виявляти "краще застосування кодону". Загалом, дивись, [Grantham, et al., J. Nuc. Acids Res. 8: 1893-912,1980; Haas, et al. Curr. Biol. 6: 315-24,1996; Wain-Hobson, et al., Gene 13: 355-64, 1981; Grosjean and Fiers, Gene 18:199-209, 1982; Holm, Nuc. Acids Res. 14: 3075-87,1986; Ikemura, J. Mol. Biol. 158: 573-97, 1982]. Як це застосовано

тут, термін "краще застосування кодону" або "кращі кодони" є терміном рівня техніки стосовно кодонів трансляції білку, що є найчастіше застосовуваними у клітинах деяких видів, відтак даючи один або кілька прикладів можливих кодонів, що кодують кожну амінокислоту (Дивись Таблицю 3). Наприклад, амінокислота Треонін (Thr) може бути кодованою ACA, ACC, ACG, або ACT, але у ссавців клітини найчастіше застосовують кодон ACC; у інших видах, наприклад, клітинах комах, дріжджів, вірусів або бактерій, відмінні кодони Thr можуть бути кращими. Кращі кодони для певного виду можуть бути уведеними у полінуклеотиди представленого винаходу різними способами, відомими у рівні техніки. Уведенням кращої послідовності кодону у рекомбінантну ДНК можна, наприклад, посилювати продукування білку, роблячи трансляцію білку більш ефективною у певних типах або видах клітин. Тому вироджена послідовність кодону, розкрита у SEQ ID NO: 3 слугує темплатом для оптимізації експресії полінуклеотидів у різних типах та видах клітин, звичайно застосовуваних у рівні техніки та розкритих тут. Послідовність, що містить кращі кодони, може бути тестованою та оптимізованою для експресії у різні види та тестованою стосовно функціональності як розкрито тут.

Як вищезазначено, виділені полінуклеотиди представленого винаходу включають ДНК та РНК. Способи отримання ДНК та РНК є добре відомі у рівні техніки. Загалом, РНК є виділеною з тканин або клітин, що продукують великі кількості РНК zcytor17lig. Такі тканини та клітини ідентифікують Норзерн-блотуванням [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201, 1980], або скринінгом стандартизованого середовища від різних типів клітин на активність на цільових клітинах або тканині. Одночасово активність або продукування РНК клітинами або тканинами ідентифікують, загальну РНК можна отримувати, використовуючи екстракцію гуанідиній ізотіоціанатом, а потім виділенням центрифугуванням у розчині з градієнтом CsCl [Chirgwin et al., Biochemistry 18: 52-94, 1979]. Полі(А)+РНК отримують із загальної РНК, використовуючи спосіб Aviv та Leder [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408-12, 1972]. Комплементарну ДНК (кДНК) отримують з полі(А)+РНК, використовуючи, відомі способи. Альтернативно, можна виділити геномну ДНК.

Полінуклеотиди, що кодують поліпептиди zcytor17lig, тоді ідентифікують та виділяють, наприклад, гібридизацією або PCR.

Клон повної довжини, що кодує zcytor17lig, може бути отриманим звичайними процедурами клонування. Комплементарні клони ДНК (кДНК) є кращими, хоча для деяких застосувань (наприклад, експресії у трансгенних тваринах) може бути кращим застосування геномного клону, або для модифікації клон кДНК включення принаймні одного геномного інтрон. Способи отримання кДНК та геномних клонів є добре відомими фахівцям та включають застосування послідовностей, що розкрито тут, або їх частин для зондування або праймування бібліотек. Експресійні бібліотеки можна зондувати антитілами до фрагментів zcytor17lig, що містять розчинні рецептори zcytor17, або інші партнери специфічного приєднання.

Полінуклеотидні послідовності zcytor17lig, що розкрито тут, можна також застосовувати як зонди або праймери для клонування 5'некодувальних регіонів гена zcytor17lig. Приймаючи до уваги тканино-специфічну експресію, що спостерігали для zcytor17lig, цей регіон гена, як очікують, забезпечуватиме гематопоетично- та лімфоїдно-специфічну експресію. Елементи промотору з гена zcytor17lig могли б відтак застосовуватися до безпосередньої тканино-специфічної експресії гетерологічних генів, наприклад, у трансгенних тваринах або пацієнтах, як лікують генною терапією. Клонування 5'фланкувальних послідовностей також сприяє продукуванню білків zcytor17lig «активацією гена», як розкрито у [Патенті США №5641670]. Коротше, експресія ендегенного гена zcytor17lig у клітині є зміненою введенням у локус zcytor17lig констракту ДНК, що містить принаймні цільову послідовність, регуляторну послідовність, екзон та неспарений сплайсовий донорний сайт. Цільовою послідовністю є 5'некодувальна послідовність zcytor17lig, що дозволяє гомологічну рекомбінацію констракту з ендегенним локусом zcytor17lig, за допомогою чого послідовності у констракті стають операбельно приєднаними до ендегенної кодувальної послідовності zcytor17lig. На цьому шляху ендегенний промотор zcytor17lig може бути заміщеним або доповненим іншими регуляторними послідовностями, отримуючи посилену тканино-специфічну або іншим чином регульовану експресію.

Згідно з представленим винаходом запропоновано також еквівалентні поліпептиди та полінуклеотиди від інших видів (ортологі). Ці види включають, але без обмеження, ссавців, птахів, земноводних, рептилій, риб, комах та інших хребетних та безхребетних видів. Особливий інтерес представляють поліпептиди zcytor17lig від інших видів ссавців, включаючи, наприклад, поліпептиди мишей, свиней, овець, корів, собак, кішок, коней та інших приматів. Ортологи zcytor17lig людини можна клонувати, використовуючи інформацію та композиції, запропоновані представленим винаходом, у комбінації зі способами звичайного клонування. Наприклад, кДНК можна клонувати, використовуючи мРНК, що отримано з тканин або клітин, що експресують zcytor17lig, який розкрито тут. Підхожі джерела мРНК можна ідентифікувати зондуванням Норзерн-блотів зондами, сконструйованими з послідовностей, що розкрито тут. Бібліотеку тоді отримують з мРНК позитивних ліній тканин або клітин. кДНК, що кодує zcytor17lig, можна тоді виділити різними способами, як-то зондуванням повною або частковою кДНК людини або з або більше наборами вироджених зондів на основі розкритих послідовностей. кДНК можна також клонувати, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію, або PCR [Mullis, U. S. Patent №4,683,202], використовуючи праймери, що сконструйовано з репрезентативної послідовності zcytor17lig людини, що розкрито тут. Додатковими способами бібліотеку кДНК можна застосовувати для трансформції або трансфекції клітин хазяїна, а експресія досліджуваної кДНК може бути визначеною антитілом до поліпептиду zcytor17lig, дослідженням приєднання або дослідженням активності. Подібні

способи можна також застосовувати для виділення геномних клонів.

Полінуклеотидну послідовність для ортологу *zcutor17lig* миші ідентифіковано та показано у SEQ ID NO: 10 та SEQ ID NO: 90, а відповідну амінокислотну послідовність, показану у SEQ ID NO: 11 та SEQ ID NO: 91. Вироджена полінуклеотидна послідовність, що кодує поліпептид SEQ ID NO: 11 є показаною у SEQ ID NO: 12. Для амінокислотної послідовності цитокіну *zcutor17lig* миші передбачено, що спіраль A визначено амінокислотними залишками 38-52; спіраль B амінокислотними залишками 85-98; спіраль C амінокислотними залишками 104-118; а спіраль D амінокислотними залишками 141-157; як показано у SEQ ID NO: 11 та SEQ ID NO: 91. Виявлено 31% ідентичності між послідовностями миші та людини протягом повної довжини амінокислотних послідовностей (SEQ ID NO: 2 та SEQ ID NO: 11) *zcutor17lig*. Розвинена послідовність для *zcutor17lig* миші припустимо починається з Met<sub>1</sub>, який показано у SEQ ID NO: 11, і відповідає Met<sub>1</sub>, який показано у SEQ ID NO: 2, у послідовності людини. Тканинний аналіз виявив, що експресію *zcutor17lig* миші знайдено у яечках, мозку, клітинах CD90+, клітинах простати, слинних залоз та шкіри. Наступне N-термінальне секвенсування очищеного *zcutor17lig* з клітин 293T показувало N-закінчення на залишку 31 (Ala), який показано у SEQ ID NO: 11 та SEQ ID NO: 91, з розвиненим поліпептидом, що містить амінокислотні залишки від 31 (Ala) до 163 (Cys) (як показано у SEQ ID NO: 11 та SEQ ID NO: 91).

Фахівці розуміють, що послідовність, що розкрито у SEQ ID NO: 1, репрезентує одиничний алель *zcutor17lig* людини, та що очікувано відбуваються алельний варіант та альтернативний сплайсинг. Алельні варіанти цієї послідовності можна клонувати зондуванням кДНК або геномних бібліотек від різних осіб відповідно стандартним процедурам. Алельні варіанти послідовності ДНК, що показано у SEQ ID NO: 1, включаючи ті, що містять мовчазні мутації та ті, в яких мутації призводять до зміни амінокислотної послідовності, включено в рамки представленого винаходу, оскільки є білки, які є алельними варіантами SEQ ID NO: 2. кДНК створені з альтернативно сплайсованої мРНК, які зберігають властивості поліпептиду *zcutor17lig*, включено в рамки представленого винаходу, оскільки є поліпептиди, кодовані такими кДНК та мРНК. Алельні варіанти та сплайсові варіанти цих послідовностей можна клонувати зондуванням кДНК або геномними бібліотеками від різних осіб або тканин відповідно стандартним процедурам, відомим у рівні техніки.

Згідно з представленим винаходом запропоновано також реагенти, які знайдуть застосування у діагностиці. Наприклад, ген *zcutor17lig*, зонд, що містить ДНК або РНК *zcutor17lig* або їх підпослідовність, можна застосовувати для визначення, чи є представленим ген *zcutor17lig* на хромосомі людини, як-то хромосома 12, або чи відбулася мутація гена. *zcutor17lig* локалізовано у регіоні 12q24,31 хромосоми 12 (Приклад 13). Виявлювані хромосомні аберації при локусі гена *zcutor17lig* включають, але без обмеження, анеупloidію, зміни числа генних копій, втрату гетерозиготності (LOH), трансло-

кації, вставки, делеції, зміни рестрикційних сайтів та перегрупування. Такі аберації можна визначати, використовуючи полінуклеотиди представленого винаходу застосуванням молекулярних генетичних способів, як-то рестрикційний аналіз поліморфізму довжини фрагментів (RFLP), аналіз коротких тандемних повторів (STR) із застосуванням способів PCR та інших способів аналізу генетичного зчеплення, відомих у рівні техніки [Sambrook et al., там же; Ausubel et. al., там же; Marian, Chest 108: 255-65, 1995].

Точне знання позиції гена може бути корисним для ряду цілей, включаючи: 1) визначення, чи є послідовність частиною існуючого контигу, та отримання додаткових оточуючих генетичних послідовностей у різних формах, як-то YAC, BAC або клони кДНК; 2) забезпечення можливого кандидата гена для неспадкової хвороби, який показує зчеплення з таким же хромосомним регіоном; та 3) перехресно зв'язані модельні організми, як-то миші, які можуть допомогти у визначення, яку функцію міг би мати конкретний ген.

Фахівець зрозуміє, що регіон 12q24 є часто включеним у великі геномні перегрупування, включаючи транслокації, делеції, інверсії та дуплікації, що є асоційованими з різними типами раку. [The Mitelman Database of Chromosomal Aberrations in Cancer, at the Cancer Genome Anatomy Project, National Institutes of Health, Bethesda, Md, що представлено в Інтернеті, лист 199], описує типи раку з геномними перегрупуваннями, включаючи 12q24. З них більшість є частиною комплексних каріотипів з іншими перегрупуваннями; однак, у деяких випадках перегрупування, що включають 12q24, є тільки геномною зміною. Приводячи експресію рецептору для *zcutor17lig* на клітинах лімфоїдних та мієлоїдних ліній диференціювання, слід особливо зазначити, що існує принаймні 4 випадки мієлоїдної лейкемії, про що повідомлено у літературі, в яких транслокація [2 випадки: Yamagata et al., Cancer Genet Cytogenet 97: 90-93, 1997; Dunphy and Batanian, Cancer Genet Cytogenet 114: 51-57, 1999] або дуплікація [2 випадки: Bonomi et al., Cancer Genet Cytogenet 108: 75-78, 1999] є одиничною геномною зміною. Це підказує, що ген або гени, що знаходяться у 12q24, могли б бути безпосередньо включеними у злочисну трансформацію цих клітин пацієнтів. Невідповідність при експресії *zcutor17lig* могла б сприяти злочисній трансформації сприянням абераційній проліферації породжуючих рецептор клітин, через аутокринний або паракринний механізми. Інгибування активності *zcutor17lig* могло б відтак інгибувати ріст таких клітин. Альтернативно, геномне перегрупування, що призводить до інактивації гена *zcutor17lig*, може сприяти злочисній трансформації та/або метастазу ліквідацією імунорегуляторних функцій *zcutor17lig*. Насправді, ген, що пригнічує метастаз у раку простати, картовано до 12q24-qter [Ichikawa et al., Asian J Androl 2: 167-171, 2000]. Якщо *zcutor17lig* є геном у цьому регіоні, відповідним за пригнічення метастазу, тоді *zcutor17lig* сам може мати терапевтичне значення у лікуванні раку.

Діагностика могла б допомагати лікарю у визначення типу хвороби та прийнятної асоційованої терапії, або допомагати у генетичній консультації.

По суті, анти-zcytor17lig антитіла, полінуклеотиди та поліпептиди винаходу можна застосовувати для визначення поліпептиду zcytor17lig, мРНК чи анти-zcytor17lig антитіл, відтак слугуючи маркерами, та безпосередньо застосовувати для визначення генетичних хвороб або типів раку, як описано тут, використовуючи способи, відомі у рівні техніки та описані тут. Далі, полінуклеотидні зонди zcytor17lig можна застосовувати для визначення аномальностей або генотипів, асоційованих з хромосомними делеціями та транслокаціями 12q24,3, асоційованими з хворобами людини, або інших транслокацій, включених у злоякісний розвиток пухлин або інші мутації 12q24,3, як очікують, включені у хромосомне перегрупування при злоякісності; або у інші типи раку. Подібно, полінуклеотидні зонди zcytor17lig можна застосовувати для визначення аномальності або генотипів асоційованих з трисомією хромосоми 12 та втратою хромосоми, асоційованою з хворобами людини або спонтанним недорозвитком. Відтак, полінуклеотидні зонди zcytor17lig можна застосовувати для визначення аномальності або генотипів, асоційованих з цими дефектами.

Фахівець зрозуміє, що полінуклеотидні зонди zcytor17lig є особливо корисними для діагнозу великих хромосомних аномальностей, асоційованих з втратою гетерогенності (LOH), приросту хромосоми (наприклад, трисомії), транслокації, ампліфікації ДНК, тощо. Транслокації у хромосомному локусі 12q24,3, де локалізовано ген zcytor17lig, відомі як асоційовані з хворобою людини. Наприклад, делеції та транслокації, дуплікації та трисомія 12q24 є асоційованими з типами раку, які обговорено вище. Відтак, оскільки ген zcytor17lig нанесено на карту цього критичного регіону, полінуклеотидні зонди zcytor17lig представленого винаходу можна застосовувати для визначення аномальності або генотипів, асоційованих з 12q24 транслокацією, делецією та трисомією, тощо, описаними вище.

Як обговорено вище, дефекти у гені zcytor17lig самі можуть призводити до спадкових хвороб людини. Молекули представленого винаходу, як-то поліпептиди, антагоністи, агоністи, полінуклеотиди та антитіла представленого винаходу могли б допомогти у визначенні, попередженні діагнозу та лікуванні асоційованого з геном zcytor17lig генетичного дефекту. На додаток, полінуклеотидні зонди zcytor17lig можна застосовувати для визначення алельних відмінностей між хворіючими або нехворіючими особами на хромосомному локусі zcytor17lig. По суті, послідовності zcytor17lig можна застосовувати як діагностичні у судово-медичному ДНК профілюванні.

Загалом, діагностичні способи, застосовувані у аналізі генетичного зчеплення для визначення генетичної аномальності або аберації у пацієнтів, відомі у рівні техніки. Аналітичні зонди будуть звичайно принаймні 20нк у довжину, хоча іноді можна застосовувати коротші зонди (наприклад, 14-17нк). Праймери PCR є принаймні 5нк у довжину, переважно 15 або більше, більш переважно 20-30нк. Для грубого аналізу генів, або хромосомної ДНК, полінуклеотидний зонд zcytor17lig може містити повний екзон або більше. Екзони є легко визначе-

ними фахівцем порівнянням послідовності zcytor17lig (SEQ ID NO: 1) з геномною ДНК zcytor17lig миші (SEQ ID NO: 76). Загалом, діагностичні способи, застосовувані у аналізі генетичного зчеплення для визначення генетичної аномальності або аберації у пацієнтів, відомі у рівні техніки. Більшість діагностичних способів включають етапи (а) отримання генетичного зразку від потенційно хворіючого пацієнта, хворіючого пацієнта або потенційного нехворіючого носія рецесивного алелі хвороби; (b) продукування першого продукту реакції інкубуванням генетичного зразку з полінуклеотидним зондом zcytor17lig де полінуклеотид гібридуватиметься з комплементарною полінуклеотидною послідовністю, як-то у RFLP-аналізі, або інкубуванням генетичного зразку з сенсовими та антисенсовими праймерами у PCR-реакції у прийнятних умовах PCR-реакції; (iii) візуалізування першого продукту реакції гелелектрофорезом та/або іншими відомими способами, як-то візуалізування першого продукту реакції полінуклеотидним зондом zcytor17lig, де полінуклеотид гібридуватиметься з комплементарною полінуклеотидною послідовністю з першою реакції; та (iv) порівняння візуалізованого першого продукту реакції з другим продуктом контрольної реакції генетичного зразку від дикого типу пацієнта, або нормальної чи контрольної особи. Відмінність між першим продуктом реакції та продуктом контрольної реакції є індикативною стосовно генетичної аномальності у хворіючого або потенційно хворіючого пацієнта, або наявності фенотипу гетерозиготного рецесивного носія нехворіючого пацієнта, або наявності генетичного дефекту у пухлині від хворіючого пацієнта, або наявності генетичної аномальності у плоді або попередньо імплантованого ембріону. Наприклад, відмінність у структурі рестрикційного фрагменту, довжині PCR-продуктів, довжин повторюваної послідовності при генетичному локусі гена zcytor17lig, тощо, є індикативною стосовно генетичної аномальності, генетичної аберації, або алельної відмінності у порівнянні з нормальним контролем дикого типу. Контролі можуть бути від неуражених членів родини, або неспоріднених осіб, залежно від тесту та придатності зразків.

Генетичні зразки для застосування у представленому винаході включають геномні ДНК, мРНК та кДНК, виділені з будь-якої тканини або іншого біологічного зразку від пацієнта, який включає, але без обмеження, кров, слину, сперму, клітини ембріону, навколоплідну рідину, тощо. Полінуклеотидні зонд або праймер можуть бути РНК або ДНК та міститимуть частину SEQ ID NO: 1, комплемент SEQ ID NO: 1, або еквівалентну їм РНК. Такі способи аналізу показників генетичного зчеплення з фенотипами хвороби людини є добре відомими у рівні техніки. Для посилання на способи діагностики на базі PCR дивись звичайно, [Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), White (ed.), *PCR Protocols: Current Methods and Applications* (Humana Press, Inc. 1993), Cotter (ed.), *Molecular Diagnosis of Cancer* (Humana Press, Inc. 1996), Hanausek and Walaszek (eds.), *Tumor Marker Protocols* (Humana Press, Inc. 1998), Lo (ed.), *Clinical Applications of*

PCR (Humana Press, Inc. 1998), and Meltzer (ed.), PCR in Bioanalysis (Humana Press, Inc. 1998)].

Мутації, асоційовані з локусом *zcutor17lig*, можна визначати, використовуючи молекули нуклеїнових кислот представленого винаходу застосуванням стандартних способів безпосереднього аналізу мутацій, як-то аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів, аналіз коротких tandemних повторів із застосуванням способів PCR, ампліфікаційно-рефракторний аналіз систем мутації, визначення одинично-ланцюгового конформаційного поліморфізму, способи розщеплення РНКаз, денатурувальний градієнтний гель-електрофорез, аналіз флуоресценції за допомогою невідповідності та інші способи генетичного аналізу, відомі у рівні техніки [дивись, наприклад, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), Marian, *Chest* 108: 255 (1995), Coleman and Tsongalis, *Molecular Diagnostics* (Humana Press, Inc. 1996), Elles (ed.) *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases* (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), *Laboratory Protocols for Mutation Detection* (Oxford University Press 1996), Birren et al. (eds.), *Genome Analysis, Vol.2: Detecting Genes* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998), Dracopoli et al. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics* (John Wiley & Sons 1998), and Richards and Ward, «*Molecular Diagnostic Testing, in Principles of Molecular Medicine*, стор.83-88 (Humana Press, Inc. 1998)]. Безпосередній аналіз гена *zcutor17lig* стосовно мутації можна проводити, використовуючи геномну ДНК суб'єкта. Способи ампліфікації геномної ДНК, отриманої наприклад, з лімфоцитів периферійної крові, є добре відомими фахівцю [дивись, наприклад, Dracopoli et al. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, стор.7.1.6-7.1.7 (John Wiley & Sons 1998)].

Позиції інтронів у гені *zcutor17lig* миші було визначено ідентифікуванням геномних клонів, а потім аналізом зчленувань інтрон/екзон. Геномну ДНК миші показано у SEQ ID NO: 76. З посиланням на SEQ ID NO: 76 три кодувальні екзони, розділені інтронами ясно: перший кодувальний екзон знаходиться між нуклеїновими кислотами під номерами 1104-1119 SEQ ID NO: 76, другий екзон між нуклеїновими кислотами під номерами 1300-1451 SEQ ID NO: 76, а третій екзон між нуклеїновими кислотами під номерами 2411-2998 SEQ ID NO: 76.

У втіленнях винаходу виділений *zcutor17lig*, що кодується молекулами нуклеїнової кислоти, може гібридизуватися в суворих умовах з молекулами нуклеїнової кислоти, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1, з молекулами нуклеїнової кислоти, що мають нуклеотидну послідовність нуклеотидів від 28 до 519 SEQ ID NO: 1, або з молекулами нуклеїнової кислоти, що мають нуклеотидну послідовність, комплементарну до SEQ ID NO: 1. Загалом, суворі умови вибирають такими: приблизно на 5°C нижче точки термічного плавлення ( $T_m$ ) для конкретної послідовності при визначеній іонній силі та pH.  $T_m$  є температурою (при визначеній іонній силі та pH), при якій 50% цільової послідовності гібридується з повністю підходящим зондом.

Пару молекул нуклеїнової кислоти, як-то ДНК-

ДНК, РНК-РНК та ДНК-РНК, можна гібридизувати, якщо нуклеотидні послідовності мають деякий ступінь комплементарності. Гібриди можуть не зовсім підходити за парами основ у подвійній спіралі, але стабільність гібриду залежить від ступеню невідповідності.  $T_m$  невідповідного гібриду зменшується на 1°C для кожного випадку невідповідності 1-1,5% пар основ. Зміна суворості умов гібридизації дозволяє контролювати ступінь невідповідності, що буде представленим у гібриді. Ступінь суворості збільшується при збільшенні температури гібридизації та зменшенні іонної сили гібридизаційного буферу.

Фахівцям добре відомо, як пристосувати ці умови для застосування з конкретним полінуклеотидним гібридом.  $T_m$  для специфічної цільової послідовності є температурою (при визначених умовах), при якій 50% цільової послідовності гібридуватиметься до повністю відповідної послідовності зонду. Умови, які впливають на  $T_m$ , включають розмір та вміст пар основ полінуклеотидного зонду, іонну силу гібридизаційного розчину та наявність дестабілізаторів у гібридизаційному розчині. Ряд рівнянь для розрахунку  $T_m$  відомі у рівні техніки та є специфічними для ДНК, РНК та ДНК-РНК гібридів і полінуклеотидних послідовностей зондів змінної довжини [дивись, наприклад, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger and Kimmel (eds.), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, (Academic Press, Inc. 1987); and Wetmur, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 227 (1990)]. Програма аналізу послідовності, як-то OLIGO 6,0 (LSR; Long Lake, MN) and Primer Premier 4.0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), а також сайти в Інтернеті, є доступними інструментами для аналізу даної послідовності та для розрахунку  $T_m$  на основі визначених споживачем критеріїв. Такою програмою можна також аналізувати дану послідовність при визначених умовах та ідентифікувати підхожі послідовності зондів. Звичайно, гібридизацію довшої полінуклеотидної послідовності, більше 50 пар основ, проводять при температурах приблизно 20-25°C нижче розрахованої  $T_m$ . Для менших зондів, менше 50 пар основ, гібридизацію звичайно здійснюють при  $T_m$  чи на 5-10°C нижче розрахованої  $T_m$ . Це дозволяє максимальну швидкість гібридизації для гібридів ДНК-ДНК та ДНК-РНК.

Після гібридизації молекули нуклеїнової кислоти можна промивати для видалення негібризованих молекул нуклеїнової кислоти в суворих умовах, або у високо суворих умовах. Типові суворі умови промивки включають промивку у 0,5x-2x розчині хлориду та цитрату натрію (SSC) з 0,1% натрій додецилсульфатом (SDS) при 55-65°C. Це включає гібридизацію молекул нуклеїнової кислоти, що кодує варіант поліпептиду *zcutor17lig*, з молекулою нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 (або її комплемент) в суворих умовах промивки, в яких суворість промивки еквівалентна 0,5x-2x SSC з 0,1% SDS при 55-65°C, включаючи 0,5x SSC з 0,1% SDS при 55°C, або 2x SSC з 0,1% SDS при 65°C. Фахівець

може легко визначити еквівалентні умови, наприклад, заміщенням SSC на SSPE у промивальному розчині.

Типові високо суворі умови промивки включають промивку у розчині 0,1x-0,2x SSC з 0,1% натрій додецилсульфатом (SDS) при 50-65°C. Іншими словами, молекули нуклеїнової кислоти, що кодують варіант поліпептиду zcytor17lig гібридизують з молекулою нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 (або її комплемент) у високо суворих умовах промивки, в яких суворість промивки еквівалентна 0,1x-0,2x SSC з 0,1% SDS при 50-65°C, включаючи 0,1x SSC з 0,1% SDS при 50°C, або 0,2x SSC з 0,1% SDS при 65°C.

Згідно з представленим винаходом запропоновано також виділені поліпептиди zcytor17lig, що мають по суті подібну ідентичність послідовності з поліпептидами SEQ ID NO: 2, або їх ортологами. Термін «по суті подібна ідентичність послідовності» застосовують тут для позначення поліпептидів, що мають принаймні 70%, принаймні 80%, принаймні 90%, принаймні 95%, принаймні 96%, принаймні 97%, принаймні 98%, принаймні 99%, або більше 99% ідентичність послідовності з послідовністю, показаною у SEQ ID NO: 2, або її ортологами. Представлений винахід також включає поліпептиди, що містять амінокислотні послідовності, що мають принаймні 70%, принаймні 80%, принаймні 90%, принаймні 95%, принаймні 96%, принаймні 97%, принаймні 98%, принаймні 99%, або більше 99% ідентичність послідовності з послідовністю амінокислотних залишків 1-162 або 33-162 SEQ ID NO: 2. Представлений винахід крім того включає молекули нуклеїнової кислоти, що кодують так поліпептиди. Способи визначення проценту ідентичності описано нижче.

Представлений винахід також розглядає варіант молекул нуклеїнової кислоти zcytor17lig, що можна ідентифікувати, використовуючи два критерії: визначення подібності між кодованим поліпептидом з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 2 та/або дослідженням гібридизації, яке описано вище. Такі варіанти zcytor17lig включають молекули нуклеїнової кислоти: (1), що гібридизують з молекулою нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1 (або її комплементом) в суворих умовах промивки, в яких суворість промивки еквівалентна 0,5x-2x SSC з 0,1% SDS при 50-65 C; або (2), що кодують поліпептид, що мають принаймні 70%, принаймні 80%, принаймні 90%, принаймні 95%, принаймні 96%, принаймні 97%, принаймні 98%, принаймні 99%, або більше 99% ідентичність послідовності з амінокис-

лотною послідовністю SEQ ID NO: 2.

Процент послідовності ідентичності визначають звичайними способами. [Дивись, наприклад, Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603 (1986) та Henikoff та Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1992)]. Коротше, дві амінокислотні послідовності встановлюють в ряд для оптимізації балів суміщення, використовуючи бал початку розриву 10, бал подовження розриву 1, а матрицю підрахунку балів "BLOSUM62" від Henikoff та Henikoff (там же) показано у таблиці 4 (амінокислоти показані стандартними однолітерними кодами).

Загальне число збігів ідентичності  $\times 100$

[довжина довшої послідовності разом з числом розривів, уведених у довшу послідовність для встановлення в ряд двох послідовностей]

Таблиця 4

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

Фахівці зрозуміють, що існує багато встановлених алгоритмів, доступних для встановлення в ряд двох амінокислотних послідовностей. Алгоритм пошуку подібності "FAST" Pearson та Lipman є підходящим способом суміщення білків для визначення рівня ідентичності амінокислотної послідовності, що розкрито тут, та амінокислотної послідовності припустимого варіанту zcytor17lig. Алгоритм FASTA описано [Pearson та Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988) та Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990)].

Коротше, FASTA спершу характеризує подібність послідовності ідентифікуванням регіонів спільних для з'ясованої послідовності (наприклад, SEQ ID NO: 2) та тестованої послідовності, що має найвищу густину ідентичностей (якщо змінна kтуп дорівнює 1) або пар ідентичностей (якщо kтуп=2), не враховуючи консервативні амінокислотні заміщення, вставки, або делеції. Десять регіонів з найвищою густиною ідентичностей тоді знов оцінюють порівнянням подібності усіх спарених амінокислот,

використовуючи матрицю амінокислотного заміщення та кінці регіонів "торцюють" для включення тільки тих залишків, що сприяють найвищому балу. Якщо існує кілька регіонів з балами більше "граничної" величини (розрахованої за попередню визначеною формули на базі довжини послідовності та величини  $ktup$ ), тоді торцовані початкові регіони досліджують для визначення, чи можуть регіони бути з'єднаними для утворення приблизного суміщення з розривами. Наприкінці, регіони з найвищим підрахунком балів двох амінокислотних послідовностей встановлюють в ряд, використовуючи модифікацію алгоритму Needleman-Wunsch-Sellers [Needleman та Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787 (1974)], який дозволяє амінокислотні вставки та делеції. Кращі параметри для аналізу FASTA є:  $ktup=1$ , бал відкриття розриву=10, бал поширення розриву=1 та матриця заміщення =BLOSUM62. Ці параметри можна вводити у програму FASTA модифікацією файлу підрахунку балів матриці («SMATRIX»), який пояснено у [доповненні 2 Pearson, Meth.Enzymol. 183: 63 (1990)].

FASTA можна також застосовувати для визначення ідентичності послідовності молекул нуклеїнової кислоти, використовуючи співвідношення, яке розкрито вище. Для порівнянь нуклеотидних послідовностей, величина  $ktup$  може бути від одного до шести, переважно від трьох до шести, найпереважніше три, з іншими параметрами, визначеними як дефолт.

Відмінні поліпептиди  $zcytor17lig$  або поліпептиди з по суті подібною ідентичністю послідовності характеризують як такі, що мають одне або більше амінокислотних заміщень, делецій або вставок. Ці зміни переважно мають другорядну природу, що є консервативними амінокислотними заміщеннями (як показано у таблиці 5 нижче) та іншими заміщеннями, що не суттєво впливають на упорядкування або активність поліпептиду; невеликими делеціями, звичайно від одної до приблизно 30 амінокислот; та аміно- або кар-бокситермінальними подовженнями, як-то аміно-термінальний метіоніновий залишок, невеликий лінкерний пептид приблизно з 20-25 залишків, або афінний придатак Представлений винахід відтак включає поліпептиди приблизно з 108-216 амінокислотними залишками, що містять послідовність, що має принаймні 70%, принаймні 80%, принаймні 90%, принаймні 95%, принаймні 96%, принаймні 97%, принаймні 98%, принаймні 99%, або більше 99% ідентичності з відповідним регіоном SEQ ID NO: 2. Поліпептиди, що містять афінні придатки, можуть крім того містити сайт протеолітичного розщеплення між поліпептидом  $zcytor17lig$  та афінним придатком.

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

Таблиця 5

## Консервативні амінокислотні заміщення

Основні:	аргінін
	лізін
	гістидин

Кислотні:	глутамінова кислота
	аспарагінова кислота
Полярні:	глутамін
	аспарагін
Гідрофобні:	лейцин
	ізолейцин
	валін
Ароматичні:	фенілаланін
	триптофан
	тирозин
Невеликі:	гліцин
	аланін
	серин
	треонін
	метіонін

Визначення амінокислотних залишків, що містять регіони або домени, що є критичними для підтримання структурної цілісності, можна визначати. У цих регіонах можна визначити специфічні залишки, що будуть більш або менше толерантними стосовно зміни та підтримуватимуть повну третинну структуру молекули. Способи аналізування структури послідовностей включають, але без обмеження, суміщення складних послідовностей з високою амінокислотою або нуклеотидною ідентичністю, схильність до вторинної структури, бінарні структури, комплементарну упаковку та внутрішні полярні взаємодії [Barton, Current Opin. Struct. Biol. 5: 372-376, 1995 та Cordes et al., Current Opin. Struct. Biol. 6: 3-10, 1996]. Загалом, при створенні модифікацій молекули або ідентифікуванні специфічних фрагментів визначення структури буде супроводжуватися оцінкою активності модифікованої молекули.

Зміни амінокислотної послідовності у поліпептидах  $zcytor17lig$  роблять таким чином, щоб мінімізувати руйнування структур вищого порядку, необхідних для біологічної активності. Наприклад, коли поліпептид  $zcytor17lig$  містить одну або більше спіралей, зміни у амінокислотних залишках будуть такими, щоб не руйнувати геометрію спіралі та інші компоненти молекули, де зміни конформації послаблюють деякі критичні функції, наприклад, приєднання молекули до її приєднувальних партнерів, наприклад, спіралі A та D, залишки 43 (Glu), 44 (Glu) та 136 (Phe) SEQ ID NO: 2. Дію зміни амінокислотних послідовностей можна передбачувати, наприклад, комп'ютерним моделюванням, як розкрито вище, або визначати аналізом кристалічної структури [дивись, наприклад, Lapthorn et al., Nat. Struct. Biol. 2: 266-268, 1995]. Інші способи, що є добре відомими у рівні техніки, порівнюють упорядкування відмінного білку стосовно стандартної молекули (наприклад, природного білку).

Наприклад, можна робити порівняння цистеїнової структури у відмінних та стандартних молекулах. Мас-спектрометрія та хімічна модифікація, використовуючи відновлення та алкілювання, забезпечують способи визначення цистеїнових залишків, оскільки є асоційованими з дисульфідними зв'язками або позбавлені від таких асоціацій [Bean et al., Anal. Biochem. 201: 216-226, 1992; Gray, Protein Sci. 2: 1732-1748, 1993; та Patterson et al.,

Anal. Chem. 66: 3727-3732, 1994]. Звичайно вважають, що якщо модифікована молекула не має так же цистеїнової структури, тоді стандартне упорядкування молекули може бути порушеним. Інший добре відомий та прийнятний спосіб вимірювання упорядкування є циклічним дихроїзмом (CD).

Вимірювання та порівняння спектрів CD, створених модифікованою молекулою та стандартною молекулою, є звичайним [Johnson, Protein 7: 205-214, 1990]. Кристалографія є іншим добре відомим способом аналізування упорядкування та структури. Ядерний магнітний резонанс (NMR), дигестивне картування пептиду та картування епітопу є також, відомими способами аналізування упорядкування та структурної подібності між білками та поліпептидами [Schaanan et al., Science 257: 961-964, 1992].

Профіль гідрофільності за Hopp/Woods білкової послідовності zcytor17lig, яку показано у SEQ ID NO: 2, може бути створеним [Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 3824-3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88: 1-18, 1986 та Triquier et al., Protein Engineering 11: 153-169, 1998]. Профіль має основою рухоме шести-залишкове вікно. Сховані залишки G, S та T та відкриті залишки H, Y та W ігнорували.

Наприклад, у zcytor17lig людини, гідрофільні регіони включають амінокислотні залишки 54-59 SEQ ID NO: 2, амінокислотні залишки 129-134 SEQ ID NO: 2, амінокислотні залишки 53-58 SEQ ID NO: 2, амінокислотні залишки 35-40 SEQ ID NO: 2 та амінокислотні залишки 33-38 SEQ ID NO: 2. Наприклад, у zcytor17lig миші, гідрофільні регіони включають амінокислотні залишки 34-39 SEQ ID NO: 11, амінокислотні залишки 46-51 SEQ ID NO: 11, амінокислотні залишки 131-136 SEQ ID NO: 11, амінокислотні залишки 158-163 SEQ ID NO: 11 та амінокислотні залишки 157-162 SEQ ID NO: 11.

Фахівці розуміють, що гідрофільність або гідрофобність треба брати до уваги при створенні модифікації у амінокислотній послідовності поліпептид zcytor17lig таким чином, щоб не руйнувати загальний структурний та біологічний профіль. Особливий інтерес для заміщення представляють гідрофобні залишки, що вибрано з групи, яка складається з Val, Leu та Ile або групи, що складається з Met, Gly, Ser, Ala, Tyr та Trp. Наприклад, толерантні стосовно заміщення залишки могли б включати Val, Leu та Ile або групу, що складається з залишків Met, Gly, Ser, Ala, Tyr та Trp, які показано у SEQ ID NO: 2. Збережені цистеїнові залишки у позиціях у SEQ ID NO: 2 та SEQ BD NO: 11, будуть відносно нетолерантними заміщеннями.

Ідентичності незамінних амінокислот можна також визначати аналізом подібності послідовностей між IL-3, Lif, IL-12, IL-15, IL-2, IL-4 та GM-CSF та zcytor17lig., використовуючи способи, як-то аналіз "FASTA", описаний раніше, регіони високої подібності ідентифікують у родині білків та застосовують для аналізу амінокислотної послідовності для збережених регіонів. Альтернативним підходом для ідентифікування відмінного полінуклеотиду zcytor17lig на базі структури є визначення, чи може молекула нуклеїнової кислоти, що кодує можливий варіант гена zcytor17lig гібридувати з

молекулою нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1, яку обговорено вище.

Інші способи ідентифікування незамінних амінокислот у поліпептидах представленого винаходу є процедурами, відомими у рівні техніки, як-то сайт-спрямований мутагенез або аланін-сканувальний мутагенез [Cunningham та Wells, Science 244: 1081 (1989), Bass et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 88: 4498 (1991), Coombs та Corey, «Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering, in Proteins: Analysis and Design", Angeletti (ed.), стор.259-311 (Academic Press, Inc. 1998)]. В останньому способі одиничні аланінові мутації уводять на кожному залишку у молекулі, а утворені мутантні молекули тестують на біологічну або біохімічну активність, як розкрито нижче, для ідентифікування амінокислотних залишків, що є критичними стосовно активності молекули. [Дивись також, Hilton et al., J. Biol. Chem. 271:4699(1996)].

Представлений винахід також включає функціональні фрагменти поліпептидів zcytor17lig та молекули нуклеїнової кислоти, що кодує такі функціональні фрагменти. "Функціональний" zcytor17lig або його фрагмент, як визначено тут, характеризуються своєю проліферативною або диференціювальною активністю за їх здатністю індукувати або інгібувати спеціалізовані функції клітин, або за їх здатністю специфічно приєднуватися до анти-zcytor17lig антитіла або антитіла до рецептору zcytor17 або рецептору або гетеродимерів zcytor17, WSX-1, або OSMRбета (наприклад, zcytor17/WSX-1 або zcytor17/OSMRбета) або мультимерів цих рецепторів (наприклад, zcytor17/WSX-1/OSMRбета) (розчинних або іммобілізованих). Як раніше описано тут, zcytor17lig характеризується чотирьох-спіралью-вузловою структурою, що містить спіраль A (амінокислотні залишки 38-52), спіраль B (амінокислотні залишки 83-98), спіраль C (амінокислотні залишки 104-117) та спіраль D (амінокислотні залишки 137-152), як показано у SEQ ID NO: 2. Відтак, згідно з представленим винаходом запропоновано також конденсовані білки, що охоплюють: (а) поліпептидні молекули, що містять одну або більше описаних вище спіралей; та (б) функціональні фрагменти, що містять одну або більше цих спіралей.

Інша поліпептидна частина конденсованого білку може бути обумовленою іншим чотирьох-спіралью-вузловим цитокином, як-то IL-15, IL-2, IL-4 та GM-CSF, або неприродним та/або неспорідненим секреторним сигнальним пептидом, що сприяє секреції конденсованого білку.

Відтак, згідно з представленим винаходом запропоновано конденсовані білки, що містять принаймні чотири поліпептиди, де порядок поліпептидів від N-закінчення до C-закінчення такий: перший поліпептид містить амінокислоти, що вибрано з групи, яка складається з: (а) спіраль A IL-2, амінокислотні залишки 27-48 SEQ ID NO: 162; (б) спіраль A IL-3, амінокислотні залишки 35-45 SEQ ID NO: 102; (с) спіраль A IL-4, амінокислотні залишки 30-42 SEQ ID NO: 164; (d) спіраль A GM-CSF, амінокислотні залишки 30-44 SEQ ID NO: 166; та (е) амінокислотні залишки 38-52 SEQ ID NO: 2; перший спейсер, амінокислоти 6-27; та другий поліпеп-

пептид, що містить амінокислотні залишки, які вибрано з групи, що складається з: (а) спіраль В ІЛ-2, амінокислотні залишки SEQ ID NO: 168; (b) спіраль В ІЛ-4, амінокислотні залишки 65-83 SEQ ID NO: 164; (c) спіраль В ІЛ-3, амінокислотні залишки 73-86 SEQ ID NO: 102; (d) спіраль В GM-CSF, амінокислотні залишки 72-81 SEQ ID NO: 166; та (e) амінокислотні залишки 83-98 SEQ ID NO: 2; другий спейсер, амінокислотні залишки 5-11; третій поліпептид, що містить послідовності амінокислотних залишків, які вибрано з групи, що складається з: (а) спіраль С ІЛ-2, залишки 102-116 SEQ ID NO: 162; (b) спіраль С ІЛ-4, залишки 94-118 SEQ ID NO: 164; (c) спіраль С ІЛ-3, залишки 91-103 SEQ ID NO: 102; (d) спіраль С GM-CSF, залишки 85-103 SEQ ID NO: 166; та (e) амінокислотні залишки 104-117 SEQ ID NO: 2; третій спейсер, амінокислотні залишки 3-29; та четвертий поліпептид, що містить амінокислотні залишки, які вибрано з групи, що складається з: (а) спіраль D ІЛ-2, амінокислотні залишки 134-149 SEQ ID NO: 162; (b) спіраль D ІЛ-3, амінокислотні залишки 123-141 SEQ ID NO: 102; (c) спіраль D ІЛ-4, амінокислотні залишки 133-151 SEQ ID NO: 164; (d) спіраль D GM-CSF, амінокислотні залишки 120-131 SEQ ID NO: 166; та (e) амінокислотні залишки 137-152 SEQ ID NO: 2; де принаймні один з чотирьох поліпептидів походить з zcytor17lig. В інших втіленнях спейсерні пептиди будуть вибраними з групи: петлі A/B, B/C та CfD zcytor17lig та ІЛ-3, як показано у таблиці 1.

Звичайні делеційні аналізи молекул нуклеїнової кислоти можна проводити, отримуючи функціональні фрагменти молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид zcytor17lig. Як ілюстрація, молекули ДНК, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1, або їх фрагменти можна розщеплювати нуклеазою Bal31, отримуючи серії гніздових делецій. Ці фрагменти ДНК тоді вставляють у вектори експресії у належній рамці читування та експресовані поліпептиди виділяють та тестують на активність zcytor17lig, або на здатність приєднувати анти-zcytor17lig антитіла або рецептор zcytor17. Одною альтернативою екзонуклеазному розщепленню є застосування олігонуклеотид-спрямованого мутагенезу для уведення делецій або стоп-кодонів для встановлення продуктування потрібного фрагменту zcytor17lig. Альтернативно, конкретні фрагменти гена zcytor17lig можна синтезувати, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію.

Стандартні способи ідентифікування функціональних доменів є добре відомими фахівцю. Наприклад, дослідження на усикання на будь-якому або обох закінченнях інтерферонів підсумовані [Horisberger та Di Marco, *Pharmac. Ther.* 66: 507 (1995)]. Більш того, стандартні способи функціонального аналізу білків описано, наприклад, [Treuter et al., *Molec. Gen. Genet.* 240: 113 (1993); Content et al., *Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa2-SA synthetase induced by human interferon*, in *Biological Interferon Systems*, *Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems*, Cantell (ed.), стор.65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, «The EGF Receptor, «in Control of Animal Cell Proliferation 1, Boynton et al., (eds.) стор.169-199 (Academic Press 1985); Coumilleau et

al., *J. Biol. Chem.* 270: 29270 (1995); Fukunaga et al., *J. Biol. Chem.* 270: 25291 (1995); Yamaguchi et al., *Biochem. Pharmacol.* 50: 1295 (1995); and Meisel et al., *Plant Molec. Biol.* 30: 1 (1996)].

Складні амінокислотні заміщення можна робити та тестувати, використовуючи відомі способи мутагенезу та скринінгу, як-то розкриті [Reidhaar-Olson та Sauer (*Science* 241: 53 (1988)) або Bowie та Sauer (*Proc.Natl Acad. Sci. USA* 86: 2152 (1989))]. Коротше, ці автори розкривають способи одночасної рандомізації двох або більше позицій у поліпептиді, селектування стосовно функціонального поліпептиду, а тоді секвенсування мутагенізованих поліпептидів для визначення спектру дозволених заміщень у кожній позиції. Інші способи, що можна застосовувати, включають виявлення фару [наприклад, Lowman et al., *Biochem.* 30: 10832 (1991), Ladner et al., U. S. Patent №5, 223, 409, Huse, міжнародна публікація № WO 92/06204) та періон-спрямований мутагенез (Derbyshire et al., *Gene* 46: 145 (1986) та Neretal., *DNA* 7: 127, (1988)].

Варіанти розкритих послідовностей нуклеотиду та поліпептиду zcytor17lig можуть також бути створеними через тасування ДНК, як розкрито [Stemmer, *Nature* 370: 389 (1994), Stemmer, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91: 10747 (1994) та міжнародній публікації № WO 97/20078]. Коротше, варіант молекули ДНК створюють гомологічною рекомбінацією, рандомізованим фрагментуванням вихідної ДНК *in vitro*, а потім повторним сполученням, використовуючи PCR, що призводить до рандомізованого уведеної точкової мутації. Цей спосіб може бути модифікованим використанням родини вихідних молекул ДНК, як-то алейних варіантів або молекул ДНК з відмінного виду, для уведення додаткової мінливості у процес. Селекція або скринінг стосовно потрібної активності, а потім додаткові ітерації мутагенезу та дослідження забезпечують швидку «еволюцію» послідовності селектуванням стосовно бажаної мутації в той же час одночасним селектуванням проти шкідливої зміни.

Способи мутагенезу, які розкрито тут, можна комбінувати з високопродуктивними, автоматизованими способами скринінгу для визначення активності клонуваних, мутагенізованих поліпептидів у клітинах хазяїна. Мутагенізовані молекули ДНК, що кодують біологічно активні поліпептиди, або поліпептиди, що приєднуються до антитіл анти-zcytor17lig або рецептору розчинного zcytor17, або розчинного WSX-1 або розчинного OSMR, або гетеродимерів чи мультимерів цих розчинних рецепторів, які описано тут, можуть бути відтворені з клітин хазяїна та швидко секвенсованими, використовуючи сучасне оснащення. Ці способи дозволяють швидкого визначення значимості конкретних амінокислотних залишків у досліджуваному поліпептиді та можуть бути застосовуваними до поліпептидів невідомої структури.

На додаток, білки представленого винаходу (або їх поліпептидні фрагменти) можуть бути приєднаними до інших біоактивних молекул, особливо інших цитокінів, отримуючи багатофункціональні молекули. Наприклад, одна або більше спіралей з zcytor17lig можуть бути приєднаними до інших ци-

токів для поліпшення їх біологічних властивостей або ефективності продукування.

Отже, згідно з представленим винаходом запропоновано також серії нових гібридних молекул, в яких сегмент, що містить одну або більше спіралей zcytor17lig є конденсованим з іншим поліпептидом. Конденсацію переважно виконують сплайсингом на рівні ДНК для дозволу експресії химерних молекул у системах рекомбінантного продукування. Утворені молекули тоді аналізують стосовно таких властивостей, як поліпшена розчинність, поліпшена стабільність, пролонгований час напівперетворення, поліпшена експресія та рівні секреції, і фармакодинаміки. Такі гібридні молекули можуть крім того містити додаткові амінокислотні залишки (наприклад, поліпептидний лінкер) між компонентами білків або поліпептидів.

Природно неіснуючі амінокислоти включають, без обмеження, транс-3-метилпролін, 2,4-метанопрлін, цис-4-гідроксипролін, транс-4-гідроксипролін, N-метилглїцин, алотreonін, метилтреонін, гідроксїетилцистеїн, гідроксїетилгомоцистеїн, нітроглутамін, гомоглутамін, піпеколінову кислоту, тіазоліденкарбонову кислоту, дегідропролін, 3- та 4-метилпролін, 3,3-диметилпролін, третлейцин, норвалін, 2-азафенїлаланін, 3-азафенїлаланін, 4-азафенїлаланін та 4-флуорфенїлаланін. Кілька способів відомі у рівні техніки для уведення неіснуючих природно амінокислотних залишків у білки. Наприклад, можна застосовувати систему *in vitro*, де несенсові мутації пригнічують, використовуючи хімічно аміноацильований супресор мРНК. Способи синтезу амінокислоти та аміноацїлювання мРНК відомі у рівні техніки. Транскрипцію та трансляцію плазмїди, що містить несенсові мутації, звичайно здійснюють у системі без клітин, що містить екстракт *E. coli* S30 та комерційно доступні ферменти та інші реагенти. Білки очищають хроматографією. [Дивись, наприклад, Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2722 (1991), Ellman et al., *Methods Enzymol.* 202: 301 (1991), Chung et al., *Science* 259: 806 (1993) та Chung et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90: 10145 (1993)].

За другим способом трансляцію здійснюють у ооцитах *Xenopus* мікроїн'єкцією мутантної мРНК та хімічно аміноацильованог супресорно мРНК [Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* 271: 19991 (1996)]. За третім способом клітини *E. coli* культивують при відсутності природної амінокислоти, яку треба замінити (наприклад, фенїлаланїну) та при наявності потрібної природно неіснуючої амінокислоти, (наприклад, 2-азафенїлаланїну, 3-азафенїлаланїну, 4-азафенїлаланїну, або 4-флуорфенїлаланїну). Неіснуючу природно амінокислоту уводять у білок замість її природного двїйнику. [Дивись, Koide et al., *Biochem.* 33:7470 (1994)].

Природно існуючі амінокислотні залишки можна перетворити у природно неіснуючі хімічною модифікацією *in vitro*. Хімічну модифікацію можна комбїнувати з сайт-спрямованим мутагенезом для наступного розширення межї заміщень [Wynn та Richards, *Protein Sci.* 2: 395 (1993)]. Може бути переважним для стабілізації zcytor17lig для подовження часу напівперетворення молекул, особ-

ливо для збільшення метаболїчної стїйкостї в активованому станї. Для досягнення збільшеного часу напівперетворення, молекули zcytor17lig можна хїмічно модифїкувати, використовуючи способи, описанї тут. ПЕГїлування є одним способом, застосовуваним звичайно, що демонструє збільшення часу напівперетворення у плазмї, збільшення розчинності та зменшення антигенності та їмуногенності [Nucci et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 6: 133-155, 1991 та Lu et al., *Int. J. Peptide Protein Res.* 43: 127-138, 1994].

Обмеженням числом неконсервативних аїнокислот, аїнокислот, що не кодованї генетичним кодом, природно неїснуючих аїнокислот та не-природних аїнокислот можна замїщати аїнокислотні залишки zcytor17lig.

Згідно з представленим винаходом запропоновано також поліпептидні фрагменти або пептиди, що містять породжуючу епітоп частину поліпептиду zcytor17lig, описаного тут.

Такї фрагменти або пептиди можуть містити "їмуногенний епітоп", який є частиною білку, що викликає реакцію антитїла при застосуванні повного білку як їмуногену. Породжуючі їмуногенний епітоп пептиди можна їдентифїкувати, використовуючи стандартні способи [дивись, наприклад, Geysen et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81: 3998 (1983)].

За контрастом, поліпептидні фрагменти або пептиди можуть містити "антигенний епітоп", який є регіоном молекули білку, до якого може специфічно приєднуватися антитїло. Деякі епітопи складаються з лїнійної або сумїжної ділянки аїнокислоти та антигенність такого епітопу не руйнується засобами денатурування. У рівні техніки відомо, що відносно короткі синтетичні пептиди, що можуть їмітувати епітопи білку, можна застосовувати, щоб стимулювати продукування антитїл проти білку [дивись, наприклад, Sutcliffe et al., *Science* 219: 660 (1983)]. Відповідно, породжуючі антигенний епітоп пептиди та поліпептиди представленого винаходу є корисними для вирощування антитїл (наприклад, нейтралїзуючих антитїл), що приєднуються до описаних тут поліпептидів.

Профїль гїдрофїльностї Horpp/Woods можна застосовувати для визначення регіонів, що мають найбільший антигенний потенціал [Horpp et al., 1981, там же та Horpp, 1986, там же]. Наприклад, у zcytor17lig людини гїдрофїльні регіони включають аїнокислотні залишки 54-59 SEQ ID NO: 2, аїнокислотні залишки 129-134 SEQ ID NO: 2, аїнокислотні залишки 53-58 SEQ ID NO: 2, аїнокислотні залишки 35-40 SEQ ID NO: 2 та аїнокислотні залишки 33-38 SEQ ID NO: 2. Наприклад, у zcytor17lig миші, гїдрофїльні регіони включають аїнокислотні залишки 34-39 SEQ ID NO: 11, аїнокислотні залишки 46-51 SEQ ID NO: 11, аїнокислотні залишки 131-136 SEQ ID NO: 11, аїнокислотні залишки 158-163 SEQ ID NO: 11 та аїнокислотні залишки 157-162 SEQ ID NO: 11.

Породжуючі антигенний епітоп пептиди та поліпептиди переважно містять принаймні чотири-десять аїнокислот, принаймні десять-чотирнадцять аїнокислот, або приблизно чотирнадцять - приблизно тридцять аїнокислот з SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 11. Такї породжуючі епі-

топ пептиди та поліпептиди можуть бути продукованими фрагментуванням поліпептиду zcytor17lig, хімічним синтезом пептидів, який описано тут. Більш того, епітопи можуть бути вибраними фаговим виявленням рандомізованих пептидних бібліотек [дивись, наприклад, Lane та Stephen, Curr. Opin. Immunol. 5: 268 (1993); та Cortese et al., Curr. Opin. Biotechnol. 7: 616 (1996)]. Стандартні способи ідентифікування епітопів та продукування антитіл проти невеликих пептидів, що містять епітоп, описано, наприклад, [Mole, Epitope Mapping", in Methods in Molecular Biology, Vol.10, Manson (ed.), стор.105-116 (Humana Press, Inc. 1992); Price, Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies», in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application, Ritter та Ladyman (eds.), стор.60-84 (Cambridge University Press 1995) та Coligan et al. (eds.), Current Protocols in Immunology, стор.9.3,1-9.3,5 та стор.9.4,1-9.4,11 (John Wiley & Sons 1997)].

Незважаючи на конкретні нуклеотидні послідовності відмінного полінуклеотиду zcytor17lig, полінуклеотид кодує поліпептид, що характеризується своєю проліферативною або диференціювальною активністю, своєю здатністю індукувати або інгібувати спеціалізовані функції клітин, або здатністю приєднуватися специфічно до антитіла анти-zcytor17lig або рецептору zcytor17. Більш конкретно, відмінні полінуклеотиди zcytor17lig кодуватимуть поліпептиди, як виявляють принаймні 50%, переважно, принаймні 70%, принаймні 80%, принаймні 90%, принаймні 95%, принаймні 96%, принаймні 97%, принаймні 98%, принаймні 99%, або більше 99% активності поліпептиду, який показано у SEQ ID NO: 2.

Для будь-якого поліпептиду zcytor17lig, включаючи варіанти та конденсовані білки, фахівець може легко створювати повністю вироджену полінуклеотидну послідовність, яку кодує такий варіант, використовуючи інформацію, визначену у таблицях 1 та 2 вище.

Згідно з представленим винаходом запропоновано також ряд інших поліпептидних конденсатів (та споріднених мультимерних білків, що містять один або більше поліпептидних конденсатів).

Наприклад, поліпептид zcytor17lig можна отримувати конденсованим з димеризованим білком, який розкрито у [патентах США №№ 5155027 та 5567584]. Кращі димеризовані білки з огляду на це включають домени незмінного регіону імуноглобуліну.

Імуноглобулін-поліпептидні конденсати zcytor17lig можна експресувати у генетично сконструйовані клітини (для утворення різних мультимерних аналогів zcytor17lig). Допоміжні домени можна конденсувати з поліпептидами zcytor17lig для їх спрямування у специфічні клітини, тканини, або макромолекули. Наприклад, поліпептид або білок zcytor17lig могли б бути цільовими стосовно попередньо визначеного типу клітин конденсацією поліпептиду zcytor17lig з лігандом, що специфічно приєднується до рецептору на поверхні такої цільової клітини. У цьому шляху, поліпептиди та білки можуть бути націленими на терапевтичні або діагностичні цілі. Поліпептид zcytor17lig можна конденсувати з двома або більше групами, як-то

афінний придатак для очистки та цільовий домен. Поліпептидні конденсати можуть також містити один або більше сайтів розщеплення, особливо між доменами. [Дивись, Tuan et al., Connective Tissue Research 34: 1-9, 1996].

Використовуючи обговорені тут способи, фахівець може ідентифікувати та/або виготовляти різні поліпептиди, що мають по суті подібну ідентичність послідовності для залишків 1-164 або 24-164 SEQ ID NO: 2, або їх функціональних фрагментів та конденсатів, як-то спіралі A-D (залишки 38-152 SEQ ID NO: 2), де такі поліпептиди або фрагменти чи конденсати зберігають властивості білку природного типу, як-то здатність стимулювати проліферацію, диференціацію, індукувати спеціалізовану функцію клітин або приєднувати рецептор zcytor17 або антитіла zcytor17lig.

Поліпептиди zcytor17lig представленого винаходу, включаючи поліпептиди повної довжини, функціональні фрагменти та конденсовані поліпептиди, можна продукувати у генетично сконструйованих клітинах хазяїна звичайними способами. Підходими клітинами хазяїна є типи клітин, що можна трансформувати або трансфектувати екзогенною ДНК та вирощувати у культурі, та включають бактерії, клітини грибів та культивовані клітини вищих еукаріотів. Клітини еукаріотів, особливо культивовані клітини багатоклітинних організмів, є кращими. Способи маніпуляції клонованими молекулами ДНК та уведення екзогенної ДНК у різні клітини хазяїна розкрито [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, та Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley та Sons, Inc., NY, 1987].

Загалом, послідовність ДНК, що кодує поліпептид zcytor17lig може бути операбельно приєднано до інших генетичних елементів, потрібних для її експресії, звичайно, включаючи промотор та термінатор транскрипції, у векторі експресії. Вектор також звичайно містить один або більше придатних для селекції маркерів та один або більше початків реплікації, хоча фахівці зрозуміють, що у деяких системах придатні для селекції маркери можуть бути представленими на різних векторах, а реплікація екзогенної ДНК може бути здійснена інтегруванням у геном клітин хазяїна. Селекція промоторів, термінаторів, придатних для селекції маркерів, векторів та інших елементів є предметом звичайного створення фахівцем. Багато таких елементів описано у літературі та є доступними від комерційних постачальників.

Для спрямування поліпептиду zcytor17lig у секреторний провідний шлях клітин хазяїна, секреторну сигнальну послідовність (також, відому як лідерну послідовність, або предпослідовність) запропоновано у векторі експресії. Секреторна сигнальна послідовність може бути послідовністю zcytor17lig, або може бути похідною від іншого секретованого білку (наприклад, t-PA) або синтезованою заново. Секреторна сигнальна послідовність є операбельно приєднаною до послідовності ДНК zcytor17lig, тобто, дві послідовності з'єднані у належній рамці зчитування та розташовані для спрямування заново синтезованого поліпептиду у

секреторний провідний шлях клітини хазяїна. Секреторна сигнальна послідовність є звичайно розташованою з боку 5' стосовно послідовності ДНК, що кодує досліджуваній поліпептид, хоча деякі секреторні сигнальні послідовності можуть бути розташованими в іншому місці у досліджуваній послідовності ДНК [дивись, наприклад, Welch et al., патент США №5037743; Holland et al., патент США №5143830].

Альтернативно, секреторну сигнальну послідовність у поліпептидах представленого винаходу застосовують для спрямування інших поліпептидів у секреторний провідний шлях. Згідно з представленим винаходом запропоновано такі конденсовані поліпептиди. Сигнальний конденсований поліпептид можна робити таким, де секреторна сигнальна послідовність, похідна від амінокислотних залишків 1-23 SEQ ID NO: 2 або залишків 1-23 SEQ ID NO: 11, є операбельно приєднаною до послідовності ДНК, що кодує інший поліпептид, використовуючи способи, відомі у рівні техніки та розкриті тут. Секреторна сигнальна послідовність у конденсованих поліпептидах представленого винаходу переважно є конденсованою аміно-термінально до додаткового пептиду для спрямування додаткового пептиду у секреторний провідний шлях. Такі контракти мають ряд застосувань, відомих у рівні техніки. Наприклад, ці нові конденсовані контракти секреторної сигнальної послідовності можуть спрямовувати секрецію активного компоненту нормально несекретованого білку. Такі конденсати можна застосовувати *in vivo* або *in vitro* для спрямування пептидів через секреторний провідний шлях.

Культивовані клітини ссавців є підходящими хазяїнами у представленому винаході. Способи введення екзогенної ДНК у клітини ссавців хазяїна включають опосередковану кальцій фосфатом трансфекцію [Wigler et al., Cells 14: 725, 1978; Corsaro та Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603,1981; Graham and Vander Eb, Virology 52: 456, 1973], електропорацію [Neumann et al., EMBO J. 1: 841-5, 1982], опосередковану DEAE-декстраном трансфекцію [Ausubel et al., там же] та опосередковану ліпосомами трансфекцію [Hawley-Nelson et al., Focus 15: 73, 1993; Ciccione et al., Focus 15: 80, 1993] та вірусні вектори [Miller та Rosman, BioTechniques 7: 980-90, 1989; Wang та Finer, Nature Med. 2: 714-6, 1996]. Продуктування рекомбінантних поліпептидів у культивованих клітинах ссавців розкрито, наприклад, [Levinson et al., патент США №4713339; Hagen et al., патент США №4784950; Palmiter et al., патент США №4579821; та Ringold, патент США №4656134]. Підході культивовані клітини ссавців включають лінії клітин COS-1 (ATCC № CRL 1650), COS-7 (ATCC № CRL 1651), BHK (ATCC № CRL 1632), BHK 570 (ATCC № CRL 10314), 293 (ATCC № CRL 1573; [Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977]) та яєчника китайського хом'яка (наприклад, CHO-K1; ATCC № CCL 61). Додаткові підходи лінії клітин відомі у рівні техніки та доступні від державних сховищ, як-то Американська колекція типових культур, Manassas, VA. Загалом, сильні промотори транскрипції є кращими, як-то промотори від SV-40 або цитомегаловірусу. Дивись, наприклад, [патент

США №4956288]. Інші підходи промотори включають промотори від металотіонеїнових генів [патент США №4579821 та 4601978] та аденовірусний головний пізній промотор.

Селекцію ліків звичайно застосовують для відбору стосовно культивованих клітин ссавців в які вставлено чужинну ДНК. Такі клітини звичайно позначено як «трансфектанти». Клітини, що культивовані при наявності засобу селекції і здатні пропускати досліджуваній ген до їх потомства, позначено як «стабільні трансфектанти». Кращим придатним для селекції маркером є ген, що кодує резистентність до антибіотику неоміцину. Селекцію здійснюють при наявності ліків типу неоміцину, як-то G-418 або подібних. Селекційні системи можна також застосовувати для збільшення рівня експресії досліджуваного гена, процес позначено як «ампліфікацію». Ампліфікацію здійснюють культивуванням трансфектантів при наявності низьких рівнів засобу селекції, а тоді збільшенням кількості засобу селекції для відбору клітини, що продукують високі рівні продуктів уведених генів. Кращим придатним для ампліфікації маркером є дигідрофолат-редуктаза, як надає резистентності до метотрексату. Інші гени резистентності до ліків (наприклад, резистентності до піроміцину, резистентності до багатьох ліків, пуроміцин-ацетилтрансферази) можна застосовувати також. Альтернативні маркери, що уводять змінений фенотип, як-то зелений флуоресцентний білок, або білки поверхні клітин, як-то CD4, CD8, MHC класу I, лужна фосфатаза плаценти, можна застосовувати для сортування трансфектованих клітин від нетрансфектованих клітин такими засобами як сортування FACS або сепарація технологією магнітних кульок.

Інші клітини вищих еукаріотів також можна застосовувати як хазяїв, включаючи клітини рослин, клітини комах та клітини птахів. Застосування *Agrobacterium rhizogenes* як вектору для експресії генів у клітинах рослин розглянуто [Sinkar et al., J. Biosci.(Bangalore) 11: 47-58, 1987]. Трансформацію клітин комах та продуктування чужинних поліпептидів в них розкрито [Guarino et al., патент США №5162222 та публікація WIPO № WO 94/06463]. Клітини комах можуть бути інфікованими рекомбінантним бакуловірусом, звичайно похідним від вірусу *Autographa californica nuclearpolyhedrosis* (AcNPV).

[Дивись, King, L. A. та Possee, R. D., The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, London, Chapman & Hall; O'Reilly, D. R. et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York, Oxford University Press., 1994; та Richardson, C. D., Ed., Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995]. Другий спосіб створення рекомбінантного бакуловірусу використовує транспозон на основі системи, описаної Luckow [Luckow, V. A. et al., J. Virol. 67: 4566-79, 1993]. Цю систему закуплено у комплекті Bac-to-Bac (Life Technologies, Rockville, MD). Ця система використовує вектор переносу, pFastBacIT (Life Technologies), що містить транспозон Tn7 для переносу ДНК, що кодує поліпептид *zcytor17lig*, у бакуловірусний геном, що існує в *E. coli* як велика

плазмід під назвою бакміда. Вектор переносу pFastBac1T використовує полієдриновий промотор AcNPV для проведення експресії досліджуваного гена, у цьому випадку *zcutor17lig*. Однак, pFastBac1™ може бути модифікованим до суттєвого ступеню. Полієдриновий промотор може бути видаленим та заміщеним промотором основного білку бакуловірусу (також, відомим як промотор Pcor, р6,9 або MP) оскільки експресується раніше у бакуловірусній інфекції та, як показано, є переважним для експресії секретованих білків. [Дивись, Hill-Perkins, M. S. та Possee, R. D., J. Gen. Virol., 71: 971-6, 1990; Bonning, B. C. et al., J. Gen. Virol. 75: 1551-6, 1994; та, Chazenbalk, G. D., & Rapoport, B., J. Biol. Chem. 270: 1543-9, 1995]. У таких конструктах вектору переносу можна застосовувати коротку або довгу версію промотору основного білку. Більш того, можна створювати вектори переносу, які заміщають природну *zcutor17lig* секреторну сигнальну послідовність секреторною сигнальною послідовністю, похідною від білків комах. Наприклад, секреторну сигнальну послідовність від Ecdysteroid Glucosyltransferase (EGT), бджіл Melittin (Invitrogen, Carlsbad, CA), або бакуловірус gp67 (PharMingen, San Diego, CA) можна застосовувати у конструктах для заміщення природної секреторної сигнальної послідовності *zcutor17lig*. На додаток, вектори переносу можуть бути включеними у конденсат з ДНК у рамці, що кодує епітопний придаток на C- або N-закінченнях експресованого поліпептиду *zcutor17lig*, наприклад, епітопний придаток Glu-Glu [Grussenmeyer, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7952-4, 1985].

Використовуючи способи, відомі у рівні техніки, вектор переносу, що містить *zcutor17lig* трансформують у *E. coli* та скринінгують на бакміди, які містять перерваний ген *1acZ* індикативний стосовно рекомбінантного бакуловірусу. Бакмідну ДНК, що містить рекомбінантний бакуловірусний геном, виділяють, використовуючи звичайні способи, та застосовують для трансфекції клітин *Spodopterafrugiperda*, наприклад, клітин Sf9. Рекомбінантний вірус, що експресує *zcutor17lig*, продукують далі. Рекомбінантні вірусні родини роблять способами, звичайно застосовуваними у рівні техніки. Рекомбінантний вірус застосовують для інфекції клітин хазяїна, звичайно лінії клітин, похідної від похідних хробаків, *Spodopterafrugiperda*. [Дивись, загалом, Glick та Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D. C., 1994]. Іншою підхожою лінією клітин є лінія Т-клітин HighFiveOT (Invitrogen), похідна від *Trichoplusia ni* [патент США №5300435].

Клітини грибів, включаючи клітини дріжджів, можна також застосовувати у представленому винаході. Вид дріжджів, що представляють особливий інтерес з огляду на це, включають *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* та *Pichia methanolica*. Способи трансформування клітин *S. cerevisiae* екзогенною ДНК та продукування рекомбінантних поліпептидів з них розкрито, наприклад, [Kawasaki, патент США №4599311; Kawasaki et al., патент США №4931373; Brake, патент США №4870008; Welch et al., патент США №5037743; та Murray et al., патент США №4845075].

Трансформовані клітини вибирають за фенотипом, що визначений придатним для селекції маркером, звичайно за резистентністю до ліків або здатністю рости при відсутності певної живильної речовини (наприклад, лейцину). Кращою векторною системою для застосування у *Saccharomyces cerevisiae* є векторна система POT7, яку розкрито [Kawasaki et al. (патент США №4931,373)], яка дозволяє трансформувати клітини для вибору вирощуванням у глюкозо-вмісних середовищах.

Підхожі промотори та термінатори для застосування у дріжджах включають промотори та термінатори від генів гліколітичних ферментів [дивись, наприклад, Kawasaki, патент США №4599311; Kingsman et al., U. S. Patent №4615974; та Bitter, патент США №4977092] та генів алкогольдегідрогенази. [Дивись також патенти США №4990446; 5063154; 5139936 та 4661454]. Трансформаційні системи для інших дріжджів, включаючи *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guillemondii* та *Candida maltosa*, відомі у рівні техніки. [Дивись, наприклад, Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132: 3459-65, 1986 та Cregg, патент США №4882279]. Клітини *Aspergillus* можна використовувати згідно зі способом [McKnight et al., патент США №4935349].

Способи трансформування *Acremonium chrysogenum* розкрито [Sumino et al., патент США №5162228]. Способи трансформування *Neurospora* розкрито Lambowitz, [патент США №4486533].

Застосування *Pichia methanolica* як хазяїна для продукування рекомбінантних білків є розкрито у [WIPO публікаціях №№ WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 та WO 98/02565]. молекули ДНК для застосування у трансформуванні *P. methanolica* звичайно отримуватимуть як подвійно-ланцюгові циклічні плазмиди, які переважно лінеаризують перед трансформацією. Для продукування поліпептиду у *P. methanolica* краще, щоб промотор та термінатор у плазміді були з гена *P. methanolica*, як-то гена утилізації спирту *P. methanolica* (AUG1 або AUG2). Інші корисні промотори включають промотори генів дигідроацетонсинтази (DHAS), форміат-дегідрогенази (FMD) та каталази (CAT). Для сприяння інтегруванню ДНК у хромосому хазяїна краще мати повний експресійний сегмент плазмиди, фланкований по обох кінцях послідовностями ДНК хазяїна. Кращим придатним для селекції маркером для застосування у *Pichia methanolica* є ген ADE2 *P. methanolica*, який кодує фосфорибозил-5-аміноімідазол-карбоксилазу (AIRC; EC 4,1,1,21), яка дозволяє клітинам *ade2* хазяїна рости при відсутності аденіну. Для великомасштабних виробничих процесів, де бажана мінімізація застосування метанолу, краще застосовувати клітини хазяїна, в яких видаляють обидва гени утилізації метанолу (AUG1 та AUG2). Для продукування секретованих білків, клітини хазяїна, що дефіцитні за генами вакуолярної протеази (PEP4 та PRO1), є кращими. Електропорацію застосовують для сприяння введенню плазмиди, яка містить ДНК, що кодує досліджуваний поліпептид у

клітинах *P. methanolic*. Краще трансформувати клітини *P. methanolic* електропорацією, використовуючи експоненціально згасаюче імпульсне електричне поле, що має напруженість від 2,5 до 4,5кВ/см, переважно приблизно 3,75кВ/см та постійну частоту (Q) від 1 до 40мс, найпреважніше приблизно 20мс.

Прокаріотні клітини хазяїна, включаючи штами бактерій *Escherichia coli*, *Bacillus* та інші види, є також корисними клітинами хазяїна у представленому винаході.

Способи трансформування цих хазяїв та тих, що експресують чужинні послідовності ДНК, клоновані у них, є добре відомими у рівні техніки [дивись, наприклад, Sambrook et al., там же]. При експресуванні поліпептиду zcytor17lig у бактеріях, як-то *E. coli*, поліпептид може бути збереженим у цитоплазмі, звичайно як нерозчинні гранули, або може бути спрямованим до периплазматичної зони бактеріальною секретійною послідовністю. У попередньому випадку клітини лізують та гранули збирають та денатують, використовуючи, наприклад, гуанідин ізотіоціанат або сечовину. Денатований поліпептид можна тоді знов упорядкувати та димеризувати розбавленням денатуранту, як-то діалізом проти розчину сечовини та комбінації відновленого та окисненого глутатіону, а потім діалізом проти буферованого фізіологічного розчину. В останньому випадку поліпептид може бути зібраним з периплазматичної зони у розчинній та функціональній формі руйнуванням клітин (наприклад, ультразвуком або осмотичним шоком) для вивільнення вмісту периплазматичної зони, позбавляючи зібраний білок таким чином від необхідності денатурації та нового упорядкування.

Трансформовані або трансфектовані клітини хазяїна культивують звичайними процедурами у культивативному середовищі, що містить живильні речовини та інші компоненти, потрібні для росту вибраних клітин хазяїна. Різні підходи середовища, включаючи визначені середовища та комплексні середовища, відомі у рівні техніки та звичайно включають джерело карбону, джерело нітрогену, джерело незамінних амінокислот, вітамінів та мінералів. Середовища можуть також містити такі компоненти, як фактори росту або сироватку, за потребою. Середовище для росту звичайно вибирають для клітин, що містять екзогенно додану ДНК, наприклад, селекцією ліків або дефіцитом необхідних живильних речовин, що доповнено придатним для селекції маркером, що знаходиться на векторі експресії або є котрансфектованим у клітину хазяїна. Клітини *P. methanolic* культивують у середовищі, що містить адекватні джерела карбону, нітрогену та мікроелементів при температурі приблизно 25°C-35°C. Рідинні культури забезпечують достатньою аерацією звичайними засобами, як-то струшування невеликих колб або барботажем ферментаторів. Кращим культивативним середовищем для *P. methanolic* є YEPD (2% D-глюкози, 2% пептон Bacto™ (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1% екстракту дріжджів Bacto™ (Difco Laboratories), 0,004% аденіну та 0,006% L-лейцину).

Краще очищати поліпептиди представленого винаходу до чистоти 80%, більш переважно біль-

ше 90%, навіть більш переважно 95%, а особливо кращим є фармацевтично чистий стан, тобто до чистоти більше 99,9% з огляду на забруднювальні макромолекули, особливо інші білки та нуклеїнові кислоти, та позбавляти від інфекційних та пірогенних агентів. Переважно, очищений поліпептид є по суті позбавленим від інших поліпептидів, особливо інших поліпептидів тваринного походження.

Експресовані рекомбінантні поліпептиди zcytor17lig (або химерні поліпептиди zcytor17lig) можна очищати, використовуючи фракціонування та/або звичайні способи та середовища очистки. Осадження амоній сульфатом та екстракцію кислотою або хаотропну екстракцію можна застосовувати для фракціонування зразків. Типові етапи очистки можуть включати гідроксіапатитний, ексклюзію за розміром, FPLC та обернено-фазову високоефективну рідинну хроматографію. Підходи хроматографічні середовища включають дериватизовані декстрини, агар, целюлозу, поліакриламід, спеціалізовані діоксиди силіцію, тощо.

Похідні PEI, DEAE, QAE та Q є кращими. Типові хроматографічні середовища включають середовища, дериватизовані фенол-, бутіл-, або октил-групами, як-то Феніл-сефароза FF (Pharmacia), Toyopearl бутіл 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Октил-сефароза (Pharmacia) тощо; або поліакрилові смоли, як-то Amberchrom CG 71 (Toso Haas) тощо. Підходжі тверді підкладки включають скляні кульки, смоли на основі силіцію, целюлозні смоли, агарові кульки, кульки з перехресно зв'язаного агару, кульки з полістиролу, перехресно зв'язані поліакриламідні смоли тощо, що є нерозчинними в умовах, в яких їх застосовують. Ці підкладки можна модифікувати реакційними групами, що дозволяють приєднувати білки аміногрупами, карбоксильними групами, сульфгідрильними, гідроксильними та/або вуглеводними групами. Приклади хімії сполучень включають активацію ціаногенбромідом, активацію N-гідроксисукцинімідом, активацію епоксидом, сульфгідрильну активацію, гідразидну активацію та карбокси- та аміно-похідні для хімії карбодіімідного сполучення. Ці та інші тверді середовища є добре відомими та широко, застосовуваними у рівні техніки та є доступними від комерційних поставальників.

Способи приєднання рецепторних поліпептидів до середовищ підкладки є добре відомими у рівні техніки.

Селекція конкретного способу є предметом звичайного виконання і її визначають зокрема за властивостями вибраної підкладки. [Дивись, наприклад, Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988].

Поліпептиди представленого винаходу можна виділити використанням їх фізичних або біохімічних властивостей. Наприклад, хроматографію з поглинанням іммобілізованим іоном металу (IMAC) можна застосовувати для очистки збагачених гістидином білків, включаючи ті, що містять полігістидинові придатки. Коротше, гелі спершу заряджають двовалентними іонами металу для утворення хелату [Sulkowski, Trends у Biochem. 3: 1-7, 1985]. Збагачені гістидином білки поглинають

муться цією матрицею з відмінними афінностями залежно від застосовуваного іону металу та елюватимуться конкурентним елюванням, зниженням рН, або застосуванням сильних хелатувальних засобів. Інші способи очистки включають очистку глікозилованих білків лектинною афінною хроматографією та іонообмінною хроматографією [Methods in Enzymol., Vol.182, «Guide to Protein Purification», M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp.529-39] та застосування розчинного рецептору *zcytor17*. У додатковому втіленні винаходу конденсат досліджуваного поліпептиду та афінний придатак (наприклад, білок приєднання мальтози, імуноглобуліновий домен) можна створювати для сприяння очистки.

Більш того, використовуючи способи, описані у рівні техніки, поліпептидні конденсати, або гібридні білки *zcytor17lig*, створюють, використовуючи регіони або домени *zcytor17lig* винаходу у комбінації з регіонами або доменами інших родин білків цитокінів людини (наприклад інтерлейкінів або GM-CSF), або гетерологічних білків [Sambrook et al., там же, Altschul et al., там же, Picard, Cur. Opin. Biology, 5: 511-5, 1994 та посилання там]. Ці способи дозволяють визначення біологічної значимості більших доменів або регіонів у досліджуваному поліпептиді. Такі гібриди можуть змінювати кінетику реакцій, приєднання, звужувати або розширювати субстратну специфічність, або змінювати тканинну та клітинну локалізацію поліпептиду, і їх можна застосовувати до поліпептидів невідомої структури. Конденсовані білки можна отримувати способами, відомими фахівцям отриманням кожного компоненту конденсованого білку та хімічно сполучаючи їх. Альтернативно, поліпептиди, що кодує обидва компоненти конденсованого білку у належній рамці зчитування, можна створювати, використовуючи, відомі способи та експресувати способами, описаними тут. Наприклад, частини або усі спіралі, що надають біологічної функції, можна обмінювати між *zcytor17lig* представленого винаходу та функціонально еквівалентами спіралями від інших членів родини, як-то IL-15, IL-2, IL-4 або GM-CSF. Такі компоненти включають, але без обмеження, секреторні сигнальні послідовності; спіралі A, B, C, D; петлі A/B, B/C, C/D; чотириох-спірално-упаковані цитокіни.

Такі конденсовані білки, як можна очікувати, мають біологічний функціональний профіль, що є таким же або подібним до поліпептидів представленого винаходу або інших відомих чотириох-спірално-вузлових родин білків цитокінів, залежно від створених конденсатів. Більш того так конденсовані білки можуть виявляти інші властивості, як розкрито тут.

Стандартні молекулярно-біологічні способи та способи клонування можна застосовувати для обміну еквівалентах доменів між поліпептидом *zcytor17lig* та поліпептидами, з якими вони конденсовані. Звичайно сегмент ДНК, що кодує досліджуваний домен, наприклад, спіралі A-D *zcytor17lig*, або інший описаний тут домен, є операбельно приєднаними у рамці до принаймні одного іншого сегменту ДНК, що кодує додатковий поліпептид (наприклад домен або регіон з іншого цитокіну, як-то IL-2 або подібний) та вставляють у прийнятний

вектор експресії, як описано тут. Звичайно констракти ДНК роблять такими, щоб кілька сегментів ДНК, що кодують відповідні регіони поліпептиду були операбельно приєднаними у рамці для вироблення одиничного констракту, що кодує повний конденсований білок, або його функціональну частину.

Наприклад, констракт ДНК можна було б кодувати від N-закінчення до C-закінчення конденсованого білку, що містить сигнальний поліпептид, а потім розвивати конденсований білок чотириох-спірално-вузлового цитокіну, що містить спіраль A, потім спіраль B, потім спіраль C, а потім спіраль D. Такі конденсовані білки можна експресувати, виділяти та аналізувати на активність, як описано тут.

Поліпептиди *zcytor17lig* або їх фрагменти можна також отримувати хімічним синтезом. Поліпептиди *zcytor17lig* можуть бути мономерами або мультимерами; глікозилованими або неглікозилованими; пегілованими або непегілованими; та можуть включати або не включати початковий метіоніновий амінокислотний залишок. Наприклад, поліпептиди можна отримувати твердо-фазним пептидним синтезом, наприклад, як описано [Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963].

Активність молекул представленого винаходу можна вимірювати, використовуючи різні дослідження, що вимірюють проліферацію клітин, що експресують рецептор *zcytor17* та/або приєднання до них. Особливий інтерес представляють зміни у *zcytor17lig*-залежних T-клітинах.

Підхожі лінії клітин, що сконструйовано як *zcytor17*-залежні, включають IL-3- залежну лінію клітин BaF3 [Palacios та Steinmetz, Cells 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cells. Biol. 6: 4133-4135, 1986], FDC-P1 [Hapel et al., Blood 64: 786-790, 1984] та MO7e [Kiss et al., Leukemia 7: 235-240, 1993]. Залежні від фактору росту лінії T-клітин можна встановити відповідно опублікованим способам [наприклад, Greenberger et al., Leukemia Res. 8: 363-375, 1984; Dexter et al., у Baum et al. Eds., Experimental Hematology Today, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hemato. 1979, 145-156, 1980].

Білки представленого винаходу є корисними для стимуляції проліферації, активації, диференціації та/або індукції або інгібування спеціалізованих клітинних функцій клітин з включених у гомеостаз гематопоезису та імунної функції. Зокрема, поліпептиди *zcytor17lig* є корисними для стимуляції проліферації, активації, диференціації, індукції або інгібування спеціалізованих клітинних функцій клітин гематопоетичної лінії диференціювання, включаючи, але без обмеження, T-клітини, B-клітини, моноцити/макрофаги, NK-клітини, нейтрофіли, ендотеліальні клітини, фібробласти, еозинофіли, хондроцити, тучні клітини, лангерханські (Langerhan) клітини, моноцити та макрофаги, а також епітеліальні клітини. Епітеліальні клітини включають, наприклад, амелобласти, головні клітини, хроматофори, ентерохромафінні клітини, ентерохромафіно-подібні клітини, бокаловидні клітини, зернисті клітини, кератиноцити, дендритні клітини, лабіринтні допоміжні клітини, меланоцити, (merkel) клітини, ацидофільні ентероцити, парієтальні клітини, суспензійні клітини, тощо. Проліфе-

рацію та/або диференціацію гематопоетичних клітин можна вимірювати *in vitro*, використовуючи культивовані клітини, або *in vivo* застосуванням молекули представленого винаходу до прийнятної тваринної моделі. Дослідження вимірювання проліферації або диференціації клітин є добре відомим у рівні техніки.

Наприклад, дослідження вимірювання проліферації включають такі дослідження, як хемочувливість до нейтрального червоного барвника [Cavanaugh et al., *Investigational New Drugs* 8: 347-354, 1990, що уведено тут як посилання], введення радіомічених нуклеотидів [Cook et al., *Analytical Biochem.* 179: 1-7, 1989, що уведено тут як посилання], введення 5-бром-2'-дезоксидуридину (BrdU) у ДНК проліферуючих клітин [Porstmann et al., *J. Immunol. Methods* 82: 169-179, 1985, що уведено тут як посилання] та застосування солей тетразолію [Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65: 55-63, 1983; Alley et al., *Cancer Res.* 48: 589-601, 1988; Marshall et al., *Growth Reg.* 5: 69-84, 1995; та Scudiero et al., *Cancer Res.* 48: 4827-4833, 1988; що уведені тут як посилання]. Дослідження вимірювання диференціації включають, наприклад, вимірювання маркерів поверхні клітин, асоційованих з фазоспецифічною експресією тканини, активністю ферментів, функціональною активністю або морфологічними змінами [Watt, *FASEB*, 5: 281-284, 1991; Francis, *Differentiation* 57: 63-75, 1994; Raes, *Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses*, 161-171, 1989; що уведені тут як посилання].

Молекули представленого винаходу можна аналізувати *in vivo*, використовуючи вірусні системи доставки. Типові віруси для цього включають аденовірус, вірус герпесу, ре-травіруси, вірус коров'ячої віспи та адено-асоційований вірус (AAV). Аденовірус, вірус з подвійно-ланцюговою ДНК, є в цей час найкращим дослідженим вектором переносу гена для доставки гетерологічної нуклеїнової кислоти [для огляду, дивись Т. С. Becker et al., *Meth. Cell Biol.* 43: 161-89, 1994; та J. T. Douglas та D. T. Curiel, *Science & Medicine* 4: 44-53, 1997].

Як ліганду, активність поліпептиду zcytor17lig можна вимірювати біосенсорним мікрофізіометром на основі силіцію, який вимірює швидкості зовнішньоклітинної ацидифікації або виділення протонів, асоційованих з приєднанням рецептору та наступною фізіологічною клітинною реакцією. Типовим пристроєм є цитосенсорний мікрофізіометр, вироблений Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Різні клітинні реакції, як-то проліферація клітин, іонний транспорт, продукування енергії, запальні реакції, регуляторна та рецепторна активація, тощо, можна вимірювати цим способом. [Дивись, наприклад, McConnell, H. M. et al., *Science* 257: 1906-1912, 1992; Pitchford, S. et al., *Meth. Enzymol.* 228: 84-108, 1997; Arimilli, S. et al., *J. Immunol. Meth.* 212: 49-59, 1998; Van Liefde, I. et al., *Eur. J. Pharmacol.* 346: 87-95, 1998].

Більш того, zcytor17lig можна застосовувати для ідентифікування клітин, тканин, або ліній клітин, які відповідні за стимульований zcytor17lig провідний шлях. Мікрофізіометр, описаний вище, можна застосовувати для швидкого ідентифікування чутливих до ліганду клітин, як-то клітин, чутливих до zcytor17lig представленого винаходу.

Клітини можна культивувати при наявності або відсутності поліпептиду zcytor17lig. Клітини як ви-кликають вимірні зміни у зовнішньоклітинній ацидифікації при наявності zcytor17lig, є чутливими до zcytor17lig.

Такі клітини або лінії клітин, можна застосовувати для ідентифікування антагоністів та агоністів поліпептиду zcytor17lig, який описано вище.

З точки зору тканинного розподілу, що спостерігали, агоністи (включаючи природні zcytor17lig/субстрат/кофактор/тощо) та/або антагоністи рецептору zcytor17 мають великий потенціал у застосуваннях *in vitro* та *in vivo*. Сполуки, ідентифіковані як агоністи zcytor17lig є корисними для розвитку, проліферації, активації, диференціації та/або індукції або інгібування спеціалізованих клітинних функцій клітин, включених у гомеостаз гематопоєзису та імунної функції. Наприклад, zcytor17lig та сполуки агоністів є корисними як компоненти визначених культиваційних середовищ клітин, і їх можна застосовувати поодиночі або у комбінації з іншими цитокінами та гормонами для заміщення сироватки, що звичайно застосовують при культивуванні клітин. Агоністи є відтак корисними у специфічному сприянні росту та/або розвитку Т-клітин, В-клітин, моноцитів/макрофагів, НК-клітин, цитотоксичних лімфоцитів та інших клітин лімфоїдної та мієлоїдної ліній диференціювання у культурі.

Антагоністи є також корисними як реагенти для дослідження характеристики сайтів взаємодії ліганд-рецептор. Антагоністи є корисними для інгібування розвитку, проліферації, активації та/або диференціації клітин, включених у регулювання гематопоєзису. Інгібітори активності zcytor17lig (антагоністи zcytor17lig) включають антитіла анти-zcytor17lig та розчинні рецептори zcytor17lig, а також інші пептидні та непептидні засоби (включаючи рибозферменти).

Zcytor17lig можна також застосовувати для ідентифікування інгібіторів (антагоністів) його активності. Тест-сполуки додають для розкритого тут дослідження для ідентифікування сполук, що інгібують активність zcytor17lig. На додаток до розкритого тут дослідження зразки можна тестувати стосовно інгібування активності zcytor17lig у різних дослідженнях, призначених для виміру приєднання рецептору, стимулювання/інгібування залежних від zcytor17lig-Т-клітинних реакцій або проліферації експресуючих рецептор zcytor17 клітин.

Поліпептид zcytor17lig можна експресувати, як конденсат з незмінним регіоном важкого ланцюга імуноглобуліну, звичайно фрагментом Fc, який містить два домени незмінного регіону та втрачає змінний регіон. Способи отримання таких конденсатів розкрито у [патентах США №№ 5155027 та 5567584]. Такі конденсати є звичайно секретованими як мультимерні молекули, де Fc-частина є дисульфідно приєднаною до кожної іншої, а два не-Ig-поліпептиди розташовані близько один до одного.

Конденсати цього типу можна застосовувати наприклад, для димеризації, збільшуючи стабільність та час напівперетворення *in vivo*, для афінної очистки ліганду, як інструмент дослідження *in vitro* або антагоніст. Для застосування у дослідженнях,

химери приєднують до підкладки через Fc-регіон та застосовують у форматі ELISA.

Приєднуючий zcytor17lig поліпептид можна також застосовувати для іммобілізації ліганду. Поліпептид іммобілізують на твердій підкладці, як-то кульки з агару, перехресно зв'язаного агару, скла, целюлозних смол, смол на основі силіцію, полістиролу, попередньо зшитого поліакриламідом, або подібних матеріалів, що є стабільними в умовах застосування.

Способи сполучення поліпептидів з твердими підкладками відомі у рівні техніки та включають хімію амінів, активацію ціаногенбромідом, активацію N-гідроксисукцинімідом, епоксидну активацію, сульфгідрильну активацію та гідразидну активацію. Утворене середовище повинно звичайно бути у формі колонки, а рідину, що містить ліганд пропускають через колонку один раз або більше разів для дозволу ліганду приєднуватися до поліпептиду рецептору. Ліганд тоді елюють, використовуючи зміни концентрації солі, хаотропні засоби (гуанідин-HCl), або pH для руйнування зв'язку ліганд-рецептор.

Досліджувальну систему, що використовує ліганд-приєднувальний рецептор (або антитіло, один член пари комплемент/антикомплемент) або їх приєднувальний фрагмент та комерційно доступний біосенсорний прилад (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) можна застосовувати переважно. Такі рецептор, антитіло, член або фрагмент пари комплемент/антикомплемент є іммобілізованими на поверхні рецепторної мікросхеми. Застосування цього приладу розкрито [Karlsson, J. Immunol. Methods 145: 229-40, 1991 та Cunningham та Wells, J. Mol. Biol. 234: 554-63, 1993]. Рецептор, антитіло, член або фрагмент є ковалентно приєднаними, використовуючи амінну або сульфгідрильну хімію, до декстранових волокон, що приєднано до золотої плівки у комірці. Тест-зразок пропускають через комірку. Якщо ліганд, епітоп, або протилежний член пари комплемент/антикомплемент є представленим у зразку, вони приєднуються до іммобілізованого рецептору, антитіла або члена, що відповідно, викликає зміну показнику заломлення середовища, як визначають як зміну резонансу у поверхні плазмону золотої плівки. Ця система дозволяє визначення базових та небазових величин, з яких можна розраховувати афінність стосовно приєднання, та оцінку стехіометрії приєднання. Альтернативно, зв'язок ліганд/рецептор можна аналізувати, використовуючи технологію SELDI (TM) (Ciphergen, Inc., Palo Alto, CA).

Поліпептиди ліганд-приєднуючого рецептору можна також застосовувати в інших системах дослідження, відомих у рівні техніки. Такі системи включають аналіз Scatchard для визначення афінності стосовно приєднання [дивись Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-72, 1949] та калориметричне дослідження [Cunningham et al., Science 253: 545-48, 1991; Cunningham et al., Science 245: 821-25, 1991].

Поліпептиди zcytor17lig можна також застосовувати, отримуючи антитіла, що приєднуються до епітопів, пептидів або поліпептидів zcytor17lig. Поліпептид zcytor17lig або його фрагмент корисні як

антиген (імуноген) для щеплення тварин та викликають імунну реакцію. Такі антитіла можна застосовувати для блокування біологічної дії прозапального zcytor17lig та є корисними як анти-запальшотерапевтичні засоби при різних хворобах, які описано тут. Фахівець зрозуміє, що антигенні, породжуючі епітопи поліпептиди містять послідовність принаймні з 6. переважно принаймні 9, а більш переважно принаймні 15 - приблизно 30 суміжних амінокислотних залишків поліпептиду zcytor17lig (наприклад, SEQ ID NO: 2). Поліпептиди, що містять більшу частину поліпептиду zcytor17lig, тобто, від 30 до 100 залишків до амінокислотних послідовностей повної довжини включено також. Антигени або імуногенні епітопи можуть також включати приєднані додатки, ад'юванти, наповнювачі та носії, які описано тут. Підхожі антигени включають поліпептид zcytor17lig, кодований SEQ ID NO: 2 від амінокислоти під номером 24 до амінокислоти під номером 164, або суміжним її фрагментом з 9 до 141 амінокислот.

Інші підхожі антигени включають повної довжини та розвинений zcytor17lig, спіралі A-D та окремі або складні спіралі A, B, C та D, чотирьох-спіраль-вузлову структуру zcytor17lig, які описано тут. Кращими пептидами до застосування як антигенів є гідрофільні пептиди, як-то передбачувані фахівцем за графіком гідрофобності, який описано тут, наприклад, амінокислотні залишки 114-119, 101-105, 126-131, 113-118 та 158-162 SEQ ID NO: 2; та амінокислотні залишки 34-39, 46-51, 131-136, 158-163 та 157-162 SEQ ID NO: 11. Більш того, антигенні епітопи zcytor17lig як передбачено графіком Jameson-Wolf, наприклад, використовуючи програму DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madison, WI), корисні як кращі антигени та є легко визначеними фахівцем.

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

Як зрозуміло фахівцю, поліклональні антитіла можна створювати щепленням різних теплокровних тварин, як-то коні, корови, кози, вівці, собаки, кури, кролі, миші та щури, поліпептидом zcytor17lig або його фрагментом. Імуногенність поліпептиду zcytor17lig може бути збільшеною застосуванням ад'юванту, як-то алюм (алюміній гідроксид) або повний або неповний ад'ювант Фрейнда. Поліпептиди, корисні для імунізації, також включають конденсовані поліпептиди, як-то конденсати zcytor17lig або його частин з поліпептидом імуноглобуліну або з приєднуючим мальтозу білком. Поліпептидний імуноген може бути молекулою повної довжини або її частиною. Якщо поліпептидна частина є гап-тено-подібною, така частина може бути переважно з'єднаною або приєднаною до

макро-молекулярного носія (як-то гемоціанін рифового блюдечка (KLN), альбумін коров'ячої сироватки (BCA) або токсод стовбняку) для імунізації.

При застосовуванні тут термін «антитіла» включає поліклональні антитіла, афінно-очищені поліклональні антитіла, моноклональні антитіла та фрагменти приєднання до антигену, як-то протеолітичні фрагменти F(ab')<sub>2</sub> та Fab. Генетично сконструйовані інтактні антитіла або фрагменти, як-то химерні антитіла, фрагменти Fv, одинично-ланцюгові антитіла тощо, а також синтетичні антиген-приєднувальні пептиди та поліпептиди, включено також. Нелюдські антитіла можна олюднювати трансплантацією нелюдських CDR у рамку людини та незмінні регіони, або введенням повних нелюдських змінних доменів (як варіант, маскуванням їх людини-подібною поверхнею заміщення відкритих залишків, де результатом є «веніроване» антитіло). У деяких випадках олюднені антитіла можуть зберігати нелюдські залишки у людини доменах змінного регіону рамки для посилення специфічних характеристик приєднання. Через олюднені антитіла, час біологічного напівперетворення може бути збільшеним, а потенціал стосовно несприятливої імунної реакції при застосуванні до людини зменшеним. Більш того, антитіла людини можна продукувати у трансгенних, нелюдських тваринах, що сконструйовано таким чином, щоб містити гени імуноглобуліну людини, як це розкрито у [публікації WIPO № WO 98/24893]. Краще, щоб ендегенні гени імуноглобуліну у цих тварини були інактивованими або видаленими, як-то гомологічною рекомбінацією.

Антитіла вважають специфічно приєднаними якщо: 1) вони виявляють пороговий рівень активності стосовно приєднання та 2) вони не значно переверсно реагують з спорідненими поліпептидними молекулами. Пороговий рівень приєднання визначають якщо анти-zcytor17lig антитіла приєднуються до поліпептиду, пептиду або епітопу zcytor17lig, з афінністю принаймні у 10-раз більшою, ніж афінність приєднання до контролю (поліпептид не-zcytor17lig). Краще, щоб антитіла виявляли афінність стосовно приєднання ( $K_a$ )  $106M^{-1}$  або більше, переважно  $107M^{-1}$  або більше, більш переважно  $108M^{-1}$  або більше та найпереважніше  $10 M^{-1}$  або більше. Афінність стосовно приєднання антитіл можуть легко визначати фахівці, наприклад, аналізом Скатчарда [Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949].

Чи антитіла анти-zcytor17lig не значно переверсно реагують зі спорідненими поліпептидними молекулами показано, наприклад, визначенням антитілом поліпептиду zcytor17lig, а невідомі споріднені поліпептиди, використовуючи стандартний аналіз Вестерн-блотуванням [Ausubel et al., там же]. Прикладами відомих споріднених поліпептидів є розкриті у попередньому рівні техніки, як-то, відомі ортологи та паралоги та подібні відомі члени родин білку. Скринінг можна також здійснити, використовуючи поліпептиди zcytor17lig нелюдини та мутанту zcytor17lig. Більш того, антитіла можуть бути «скринінг-гованими проти» відомих споріднених поліпептидів для виділення популяції, що специфічно приєднується до поліпептидів zcytor17lig. Наприклад, антитіла, вирощені проти zcytor17lig

приєднуються до споріднених поліпептидів, зшитих з нерозчинною матрицею; антитіла, специфічні стосовно zcytor17lig проходять через матрицю у специфічних буферних умовах. Скринінг дозволяє виділяти поліклональні та моноклональні антитіла, що не є переверсно реактивними стосовно відомих тісно споріднених поліпептидів [Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow та Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, et al. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley та Sons, Inc., 1995]. Скринінг та виділення специфічних антитіл є добре відомим у рівні техніки. [Дивись, Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff et al., Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J. W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin et al., Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984]. Специфічно приєднання антитіл анти-zcytor17lig можна визначати рядом способів у рівні техніки та розкритих нижче.

Різні дослідження, відомі фахівцям, можна використовувати для визначення антитіл які приєднуються до білків або поліпептидів zcytor17lig. Типові дослідження описано детальніше у [Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow та Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988]. Репрезентативні приклади таких досліджень включають: конкурентний імуноелектрофорез, радіоімунаналіз, радіоімуносащення, ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA), дослідження дотблотуванням або Вестерн-блотуванням, дослідження інгібування або конкуренції та сандвічове дослідження. На додаток, антитіла можна скринінгувати стосовно приєднання до білку або поліпептиду zcytor17lig природного типу проти мутанту.

Антитіла до zcytor17lig можна застосовувати для мічення клітин, що експресують zcytor17lig; для виділення zcytor17lig афінною очисткою; для діагностичного дослідження для визначення рівнів циркуляції поліпептидів zcytor17lig; для визначення або виміру розчинного zcytor17lig як маркеру патології або хвороби; у аналітичних способах із застосуванням FACS; для скринінгу експресійних бібліотек; для створення анти-ідіотипових антитіл; та як нейтралізуючі антитіла або як антагоністи для блокування активності zcytor17lig in vitro та in vivo. Підходжі спрямовальні придатки або мітки включають радіонукліди, ферменти, субстрати, кофактори, інгібітори, флуоресцентні маркери, хемілюмінісцентні маркери, магнітні частинки тощо; неспрямовальні придатки або мітки можна характеризувати застосуванням біотин-авідину або інших пар комплемент/антикомплемента як інтермедіатів. Антитіла тут можуть також бути безпосередньо або безпосередньо сполученими з ліками, токсинами, радіонуклідами тощо, та ці кон'югати застосовують для діагностики in vivo або терапевтичних застосувань заявки. Більш того, антитіла до zcytor17lig або їх фрагменти можна застосовувати in vitro для визначення денатурованого zcytor17lig або його фрагментів у дослідженнях, наприклад, Вестерн-блотуванням або іншими дослідженнями, відомими у рівні техніки.

Підходжі виявлювані молекули можуть бути безпосередньо або безпосередньо приєднани-

ми до поліпептиду або антитіла та включати радіонукліди, ферменти, субстрати, кофактори, інгібітори, флуоресцентні маркери, хемілюмінесцентні маркери, магнітні частинки тощо. Підходжі цитотоксичні молекули можуть бути безпосередньо або не безпосередньо приєднаними до поліпептиду або антитіла і включають бактеріальні або рослинні токсини (наприклад, дифтерія, токсин, сапорин, екзотоксин *Pseudomonas*, рицин, абрин тощо), а також терапевтичні радіонуклідом, як-то йод-131, реній-188 або ітрій-90 (безпосередньо приєднані до поліпептиду або антитіла, або не безпосередньо приєднані через хелатні групи, наприклад). Поліпептиди або антитіла можуть також бути сполученими з цитотоксичними ліками, як-то адриаміцин. Для не безпосереднього приєднання виявленої або цитотоксичної молекули, ця молекула може бути сполученою з членом пари комплемент/антикомплемент, де інший член приєднаний до частини поліпептиду або антитіла. Для цих цілей біотин/стрептавідин є типовою парою комплемент/антикомплемент.

Зв'язувальні поліпептиди можуть діяти також як антагоністи *zcytor17lig* для блокування приєднання *zcytor17lig* та переносу сигналу *in vitro* та *in vivo*. Ці анти-*zcytor17lig*-зв'язувальні поліпептиди могли б бути корисними для інгібування активності *zcytor17lig* або приєднання білку.

Конденсовані білки поліпептид-токсин або конденсовані білки антитіло-токсин можна застосовувати для цільового інгібування або видалення клітин або тканин (наприклад, для лікування ракових клітин або тканин). Альтернативно, якщо поліпептид має складні функціональні домени (тобто, активаційний домен або домен зв'язування рецептору разом з цільовим доменом), конденсований білок, що включає тільки цільовий домен, може бути підходящим для спрямування виявлюваних молекул, цитотоксичних молекул або комплементарних молекул до досліджуваного типу клітин або тканин. У випадках, де домен тільки конденсованого білку включає комплементарну молекулу, антикомплементарна молекула може бути сполученою з виявлюваною або цитотоксичною молекулою. Такі конденсовані білки з домен-комплементарними молекулами відтак репрезентують родові цільові носії або наповнювачі для клітино/тканино-специфічної доставки родових антикомплементарно-виявлюваних/цитотоксичних кон'югатів молекул.

В іншому втіленні конденсовані білки цитокіну *zcytor17lig* або конденсовані білки антитіло-цитокін можна застосовувати для знищення *in vivo* цільової тканини (наприклад, лейкемії, лімфоми, раку легень, раку ободової кишки, меланоми, раку підшлункової залози, раку яєчників, типів раку шкіри, крові та кісткового мозку, або інших типів раку, де експресуються рецептори *zcytor17lig*) [Дивись, звичайно, Homick et al., Blood 89: 4437-47, 1997]. Описані конденсовані білки дають можливість спрямувати цитокін до потрібної ділянки дії, забезпечуючи таким чином підвищену локальну концентрацію цитокіну. Підходжі поліпептиди *zcytor17lig* чи антитіла анти-*zcytor17lig* націлені на небажані клітини або тканини (тобто, пухлину або лейкемію), а конденсований цитокін опосередковували поліп-

шений лізис цільових клітин ефекторними клітинами. Підходжі для цього цитокіни включають інтерлейкін 2 та фактор стимуляції колоній гранулоцити-макрофаги (GM-CSF), наприклад.

У ще одному іншому втіленні, якщо поліпептид *zcytor17lig* або антитіло анти-*zcytor17lig* націлено на васкулярні клітини або тканини, такий поліпептид або антитіло може бути сполученим з радіонуклідом, а особливо з бета-випромінюючим радіонуклідом, для зменшення рестенозу. Такі терапевтичні підходи представляють меншу небезпеку для клініцистів, які застосовують радіоактивну терапію. Наприклад, насичені іридієм-192 стрічки, що розміщали у стентованих судинах пацієнтів для піддавання потрібній радіаційній дозі, показували зменшення росту тканин у судинах та більший діаметр просвіту, ніж контрольна група, в якій застосовували плацебо. Далі, ревазуляризація та тромбоз стенту були значно нижчими у групі лікування. Подібні результати є передбачуваними при націлюванні біоактивного кон'югату, що містить радіонуклід, який описано тут.

Біоактивні кон'югати поліпептиду або антитіла, описані тут можна вводити внутрішньовенно, інтраартеріально або інтрадуктально, або можна вводити локально на призначену ділянку дії.

Більш того, запалення є захисною реакцією організму на проникаючий агент. Запалення є каскадним явищем, що включає багато медіаторів клітинних та гуморальних. З одного боку, пригнічення запальних реакцій може залишити хазяїна імунопорушеним; однак, залишаючися нестриманим, запалення може призводити до серйозних ускладнень, включаючи хронічні запальні хвороби (наприклад, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, запальна хвороба кишечника тощо), септичний шок та пошкодження багатьох органів. Важливо, що ці різні хворобливі стани об'єднані звичайними медіаторами запалення. Сукупні хвороби, що характеризуються запаленням, мають великий вплив на захворюваність та смертність людини. Тому ясно, що анти-запальні антитіла та зв'язувальні поліпептиди, як-то антитіла анти-*zcytor17lig* та зв'язувальні поліпептиди, описані тут, могли б мати ключовий терапевтичний потенціал для широкого кола хвороб людини та тварин, від астми та алергії до авто імунітету та септичного шоку. По суті, застосування анти-запальних антитіл анти-*zcytor17lig* та зв'язувальних поліпептидів, описаних тут, можна використовувати терапевтично як антагоністи *zcytor17lig*, описані тут, особливо при хворобах, як-то артрит, ендотоксемія, запальна хвороба кишечника, псоріаз, споріднена хвороба тощо.

#### 1. Артрит

Артрит, включаючи остеоартрит, ревматоїдний артрит, артритичні суглоби як результат поранення, тощо, є звичайними запальними станами, як могли б мати користь від терапевтичного застосування анти-запальних антитіл та зв'язувальних поліпептидів, як-то антитіл анти-*zcytor17lig* та зв'язувальних поліпептидів представленого винаходу. Наприклад, ревматоїдний артрит (RA) є системною хворобою, що впливає на все тіло та є одною з найзвичайніших форм артриту. Вона характеризується запаленням мембрани, що вистилає суг-

лоб, це викликає біль, ригідність, гарячку, почервоніння та набрякання. Запальні клітини вивільняють ферменти, що можуть розщеплювати кістки та хрящі. Як результат, ревматоїдний артрит, запалення вистилаючого шару суглобу, синовіт, можуть окупувати та пошкоджувати кістки та хрящі, призводячи до пошкодження суглобів та суворого болю серед інших фізіологічних ефектів. Залучений суглоб може втрачати свою форму та орієнтацію, що призводить до болю та втрати рухливості.

Ревматоїдний артрит (RA) є імунно-опосередкованою хворобою, що зокрема характеризується запаленням та наступним пошкодженням тканин, призводячи до суворой безпомічності та збільшеної смертності. Різні цитокіни продукуються локально у ревматоїдних суглобах. Ряд досліджень продемонстрував, що IL-1 та TNF-альфа, два прототипові прозапальні цитокіни, грають важливу роль у механізмах, включених у синовіальне запалення та у прогресивну деструкцію суглоба. Насправді, застосування інгібіторів TNF-альфа та IL-1 у пацієнтів з RA, має призводити до суттєвого поліпшення клінічних та біологічних ознак запалення та відновлення радіологічних ознак ерозії кісток та деструкції хрящів. Однак, незважаючи на ці підбадьорюючі результати, значний процент пацієнтів не реагує на ці засоби, підказуючи, що інші медіатори є також залученими у патофізіологію артриту [Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther, 2 (2): 135-149, 2002]. Одним з цих медіаторів міг би бути zcytor17lig, та по суті, молекула, що приєднується або інгібує zcytor17lig, як-то антитіла анти-zcytor17lig або зв'язувальні партнери, могли б бути корисними як цінні терапевтичні засоби для зменшення запалення при ревматоїдному артриті та інших артритичних хворобах.

Існує кілька тваринних моделей ревматоїдного артриту, відомих у рівні техніки. Наприклад, у моделі індукованого колагеном артриту (CIA) миші виявляють хронічний запальний артрит, що сильно походить на ревматоїдний артрит людини. Оскільки CIA приймає участь у подібних імунологічних та патологічних особливостях з RA, це робить його ідеальною моделлю для скринінгу потенційних анти-запальних сполук людини. Модель CIA є добре відомою моделлю у мишах, що залежить як від імунної реакції, так і запальної реакції, у порядку відбуття. Імунна реакція включає взаємодію В-клітин та Т-клітин CD4+ у реакції на колаген, який є даним як антиген, та призводить до продукування анти-колагенових антитіл. Запальна фаза є результатом тканинних реакцій від медіаторів запалення, як наслідок перехресного реагування деяких з цих антитіл з природним колагеном мишей та активування комплементного каскаду. Перевагою використання моделі CIA є те, що відомі основні механізми патогенезу. Релевантні епітопи Т-клітин та В-клітин на колаген типу II ідентифіковано, та різні імунологічні (наприклад, гіперчутливість уповільненого типу та анти-колагенове антитіло) та запальні (наприклад, цитокіни, хемокини та розкладаючі матрицю ферменти) параметри, що стосуються імунно-опосередкованого артриту, визначені, а відтак можуть застосовуватися для оцінки ефективності тест-сполук у моделі CIA [Wooley, Curr. Opin.

Rheum. 3: 407-20, 1999; Williams et al., Immunol. 89: 9784-788, 1992; Myers et al., Life Sci. 61: 1861-78, 1997; та Wang et al., Immunol. 92: 8955-959, 1995].

Застосування розчинного zcytor17, що містить поліпептиди (включаючи описані тут гетеродимерні та мультимерні рецептори), як-то zcytor17-Fc4 або інші розчинні та конденсовані білки zcytor17 до цієї моделі CIA миші використовували для оцінки застосування zcytor17 для полегшення симптомів та зміни протікання хвороби. Оскільки молекула zcytor17lig, що модулює імунну та запальну реакцію, може індукувати продукування SAA, оскільки є залученою у патогенез ревматоїдного артриту, антагоністи zcytor17lig можуть зменшувати активність SAA in vitro та in vivo, системне або локальне застосування антагоністів zcytor17lig, як-то антитіл або зв'язувальних партнерів анти-zcytor17lig, zcytor17, що містять поліпептиди (включаючи гетеродимерні та мультимерні описані тут рецептори), як-то розчинні та конденсовані білки zcytor17-Fc4 або інших zcytor17, може потенційно пригнічувати запальну реакцію при RA. Інші потенційні терапевтичні засоби включають поліпептиди zcytor17, розчинні гетеродимерні та мультимерні поліпептиди рецепторів, антитіла анти-zcytor17lig або зв'язувальні партнери представленого винаходу, тощо.

## 2. Ендотоксемія

Ендотоксемія є суворим станом, що звичайно є результатом інфекційних агентів, як-то бактерії та інші агенти інфекційних хвороб, сепсису, синдрому токсичного шоку, або у пацієнтів з порушенням імунітету, підданих умовно-патогенним інфекціям, тощо. Терапевтична корисність анти-запальних антитіл та зв'язувальних поліпептидів, як-то антитіла анти-zcytor17lig та зв'язувальні поліпептиди представленого винаходу, могла б допомогти при попередженні та лікуванні ендотоксемії у людини та тварин. Інші потенційні терапевтичні засоби включають поліпептиди zcytor17, розчинні гетеродимерні та мультимерні рецепторні поліпептиди, або антитіла анти-zcytor17lig чи зв'язувальні партнери представленого винаходу, тощо, могли б бути корисними як цінні терапевтичні засоби для зменшення запалення та патологічних ефектів при ендотоксемії.

Індукована ліпополісахаридом (LPS) ендотоксемія зчіплюється з багатьма прозапальними медіаторами, що продукують патологічні ефекти при інфекційних хворобах, а індукована LPS ендотоксемія у гризунів є широко застосовуваною та прийнятною моделлю для дослідження фармакологічної дії потенційних прозапальних чи імуномодулюючих засобів. LPS, продукований у грам-негативних бактеріях, є головним чинником у патогенезі септичного шоку [Glausner et al., Lancet 338: 732, 1991]. Шокоподібний стан може насправді бути індукованим експериментально однією ін'єкцією LPS у тварину. Молекули, продуковані клітинами, відповідними за LPS можуть націлювати патогени безпосередньо або безпосередньо. Хоча ці біологічні реакції захищають хазяїна проти вторгнених патогенів, вони можуть також викликати шкоду. Відтак, широке стимулювання природженого імунітету, як результату суворой грам-негативної бактеріальної інфекції, призводить до

надлишкового продукування цитокінів та інших молекул та розвитку фатального синдрому, синдрому септичного шоку, який характеризується лихоманкою, гіпотензією, розсіяною внутрішньосудинною коагуляцією та пошкодженням багатьох органів [Dumitru et al. *Cells* 103: 1071-1083, 2000].

Ці токсичні ефекти LPS є головним чином сподієними з активацією макрофагів, призводячи до вивільнення різноманітних запальних медіаторів. Серед цих медіаторів TNF виявлений як граючий ключову роль, як показано попередженням LPS токсичності застосуванням нейтралізуючих антитіл анти-TNF [Beutler et al., *Science* 229: 869, 1985]. Добре встановлено, що ін'єкція 1мкг *E. coli* LPS у C57Bl/6 мишей призводить до значного збільшення циркуляції IL-6, TNF-альфа, IL-1 та гострофазних білків (наприклад, SAA) приблизно 2 години після ін'єкції. Токсичність LPS, як виявлено, опосередкована цими цито-кінами, оскільки пасивна імунізація проти цих медіаторів може призводити до зменшення смертності [Beutler et al., *Science* 229: 869, 1985]. Потенційні імунотерапевтичні стратегії для попередження та/або лікування септичного шоку включають анти-TNF mAb, антагоніст рецептору IL-1, LIF, IL-10 та G-CSF. Оскільки LPS індукуює продукування і прозапальних факторів, що можливо сприяють патології ендотоксемії, нейтралізацію активності *zcytor17lig*, SAA або інших прозапальних факторів антагонізують поліпептиду *zcytor17lig* можна застосовувати для зменшення симптомів ендотоксемії, як-то спостережених при ендотоксичному шоку. Інші потенційні терапевтичні засоби включають поліпептиди *zcytor17*, розчинні гетеродимерні та мультимерні рецепторні поліпептиди, чи антитіла анти-*zcytor17lig* або зв'язувальні партнери представленого винаходу, тощо.

### 3. Запальна хвороба кишечника. IBD

У Сполучених штатах приблизно 500000 осіб страждають від запальної хвороби кишечника (IBD), яка може впливати на ободову кишку та пряму кишку (виразковий коліт) або обидва, тонкий та товстий кишечник (хвороба Крона). Патогенез цих хвороб є неясним, але вони включають хронічне запалення пошкоджених тканин. Потенційні терапевтичні засоби включають поліпептиди *zcytor17*, розчинні гетеродимерні та мультимерні рецепторні поліпептиди, чи антитіла анти-*zcytor17lig* або зв'язувальні партнери представленого винаходу, тощо, могли б бути корисними як цінні терапевтичні засоби для зменшення запалення та патологічної дії при IBD та споріднених хворобах.

Виразковий коліт (UC) є запальною хворобою товстого кишечника, звичайно під назвою ободова кишка, що характеризується запаленням та появою виразок слизової або внутрішньої оболонки, що вистилають ободову кишку. Це запалення спонукає ободову кишку до частого випорожнення, що призводить до діареї. Симптоми включають послаблення стулу та асоційовані брюшні схватки, лихоманку та втрату ваги. Хоча точна причина UC є невідомою, нещодавні дослідження підказують, що природний захист організму є бореться проти білків у тілі, які організм вважає чужинними (автоімунна реакція). Можливо внаслідок того, що вони

мають схожість з бактеріальними білками у травному каналі, ці білки можуть спонукати або стимулювати запальний процес, що призводить до руйнування вистілки ободової кишки. Оскільки вистілка ободової кишки руйнується, утворюються виразки, що виділяють слиз, гній та кров. Хвороба звичайно починається у ректальній зоні та може поширюватися через увесь товстий кишечник. Повторні епізоди запалення призводять до потовщення стінок кишечника та прямої кишки рубцевою тканиною. Загибель тканини ободової кишки або сепсис може відбуватися при суворій хворобі. Симптоми виразкового коліту варіюють за суворістю та їх початок може бути поступовим або раптовим. Приступи можуть бути провоковані багатьма факторами, включаючи респіраторні інфекції або стрес.

Хоча для UC не існує в цей час доступного лікування, лікування фокусують на пригніченні анормального запального процесу у вистілці ободової кишки. Лікування, що включає кортикостероїдні імуносупресанти (наприклад, азатіоприн, меркаптопурин та метот-рексат) та аміносаліцилати є доступними для лікування хвороби. Однак, довготермінове застосування імуносупресантів, як-то кортикостероїдів та азатіоприну, може призводити до серйозних побічних ефектів, включаючи стоншення кісток, катаракту, інфекції та дію на печінку та кістковий мозок. У пацієнтів, для яких сучасна терапія не є успішною, варіантом є хірургія. Хірургія включає видалення усієї ободової кишки та прямої кишки.

Існує кілька тваринних моделей, що можуть частково імітувати хронічний виразковий коліт. Найширше застосовуваною моделлю є індукована 2,4,6-тринітробенсульфоною кислотою/етанолом (TNBS) модель коліту, яка індукуює хронічне запалення та утворення виразок у ободовій кишці. Коли TNBS уведено в ободову кишку вразливої миші інтраректальною інстиляцією, це індукуює опосередковану Т-клітинами імунну реакцію у слизовій оболонці ободової кишки, призводячи у цьому випадку до широкого запалення слизової, що характеризується частим інфільтруванням Т-клітин та макрофагів повсюди в суцільній стінці товстого кишечника. Більш того, ця гістопатологічна картина супроводжується клінічною картиною прогресивної втрати ваги (виснаженість), кров'янистої діареї, ректального пролапсу та потовщення стінок товстого кишечника [Neurath et al. *Intern. Rev. Immunol.* 19: 51-62, 2000].

Інша модель коліту використовує декстрансульфат натрій (DSS), який індукуює гострий коліт, що викликає кров'янисту діарею, втрату ваги, скорочення ободової кишки та утворення виразок слизової з інфільтруванням нейтрофілів. DSS-індукований коліт характеризують гістологічно інфільтруванням запальних клітин у власний тонкий шар кісткової тканини, лімфоїдною гіперплазією, фокальним криптовим пошкодженням та утворенням епітеліальних виразок. Ці зміни, вважають, виявляються внаслідок токсичної дії DSS на епітелій та фагоцитозу клітин власного тонкого шару кісткової тканини та продукування TNF-альфа та IFN-гама. Незважаючи на його звичайну застосування, кілька наслідків, що стосуються механізмів

DSS, які стосуються хвороб людини, залишаються нерозв'язаними. DSS розглядають як незалежну від Т-клітин модель внаслідок того, що її спостерігають у дефіцитних за Т-клітинами тваринах, як-то миші SCID.

Застосування антитіл анти-zcytor17lig або зв'язувальних партнерів, розчинного zcytor17, що містять поліпептиди (включаючи гетеродимерні та мультимерні рецептори), як-то zcytor17-Fc4 або інші розчинні та конденсовані білки zcytor17, до цих моделей TNBS або DSS, можна використовувати для оцінки застосування антагоністів zcytor17lig для полегшення симптомів та змін протікання шлунково-кишкових хвороб. Zcytor1 7Ng може грати роль у запальній реакції при коліті, а нейтралізація активності zcytor17lig застосуванням антагоністів zcytor17lig є потенційним терапевтичним підходом для IBD. Інші потенційні терапевтичні засоби включають поліпептиди zcytor17, розчинні гетеродимерні та мультимерні рецепторні поліпептиди, чи антитіла анти-zcytor17lig або зв'язувальні партнери представленого винаходу, тощо.

#### 4. Псоріаз

Псоріаз є хронічним станом шкіри, що впливає на більш ніж сім мільйонів американців. Псоріаз відбувається, коли нові клітини шкіри ростуть аномально, що призводить до запалення, опухання та лускатих ділянок шкіри, де стара шкіра не скидається достатньо швидко. Плямистий псоріаз, найзвичайніша форма, характеризується запаленням ділянок шкіри (ураження), покритих сріблясто-білою лускою. Псоріаз може бути обмеженим кількома плямами або включати зони шкіри від помірних до екстенсивних, що виявляються найчастіше на шкірі голови, колінах, ліктях та тулубі. Хоча він є добре видимим, псоріаз не є заразною хворобою. Патогенез хвороби включає хронічне запалення пошкоджених тканин. Поліпептиди zcytor17, розчинні гетеродимерні та мультимерні рецепторні поліпептиди, чи антитіла анти-zcytor17lig або зв'язувальні партнери представленого винаходу, тощо, могли б бути корисними як цінні терапевтичні засоби для зменшення запалення та патологічних ефектів при псоріазі, інших запальних хворобах шкіри, алергії шкіри та слизової та споріднених хворобах.

Псоріаз є опосередкованим Т-клітинами запальним розладом шкіри, що може викликати важливий дискомфорт. Він є хворобою для якої не існує лікування, та впливає на людей будь-якого віку. Псоріаз впливає на приблизно два проценти популяції Європи та Північної Америки. Хоча особи з помірним псоріазом можуть часто контролювати свою хворобу місцевими засобами, більше одного мільйону пацієнтів у всьому світі потребують ультрафіолетової або системної імуносупресорної терапії. На жаль, незручність та ризики ультрафіолетової радіації та токсичності багатьох терапій обмежують їх довготермінове застосування. Більш того, пацієнти звичайно мають повернення псоріазу, а у деяких випадках різке посилення одразу після припинення імуносупресорної терапії.

Диференціація є прогресивним та динамічним процесом, що починається з плюрипотентних стовбурних клітин та закінчується термінально

диференційованими клітинами. Плюрипотентні стовбурні клітини, що можуть регенеруватися без комітування до ряду генерацій, що експресують ряд маркерів диференціації, що втрачаються, коли комітування до ряду генерацій клітини вироблено.

Клітини-попередники експресують ряд маркерів диференціації, що можуть або ні продовжувати бути експресованими, коли клітини розвиваються у провідному шляху ряду генерацій клітин до визрівання.

Маркери диференціації, що експресуються виключно розвиненими клітинами, звичайно визначають функціональні властивості, як-то клітинні продукти, ферменти для утворення клітинних продуктів та рецептори. Етап диференціації популяцій клітин від-стежують ідентифікуванням маркерів, представлених у популяції клітин.

Є свідчення, що фактори, що стимулюють специфічні типи клітин у провідному шляху до кінцевої диференціації або дедиференціації, впливають на суцільну популяцію клітин, що походить від звичайного попередника або стовбурної клітини. Відтак, представлений винахід включає стимулювання або інгібування проліферації лімфоїдних клітин, гематопоетичних клітин та епітеліальних клітин.

Zcytor17lig виділяли від тканин, які відомі як такі, що мають важливу імунологічну функцію та які містять клітини, що грають роль в імунній системі.

Zcytor17lig експресується у CD3+-селектованих, активованих периферійних клітинах крові, та показано, що експресія zcytor17lig збільшується після активації Т-клітин. Більш того, результати експериментів, описаних у тут прикладах підказують, що поліпептиди представленого винаходу можуть впливати на ріст/розвиток моноцитів/макрофагів, Т-клітин, В-клітин, NK-клітин та/або стан диференціації моноцитів/макрофагів, Т-клітин, В-клітин, NK-клітин або попередників цих клітин. Фактори, що стимулюють проліферацію гематопоетичних попередників та активують розвинені клітини є звичайно відомим, однак, проліферація та активація можуть також потребувати додаткових факторів росту. Наприклад, показано, що IL-7 та фактор Стилла (с-комплектний ліганд) були потрібними для утворення колоній попередників NK-клітин. IL-15+IL-2 у комбінації з IL-7 та фактором Стилла були більш ефективними [Mrozek et al., Blood 87: 2632-2640, 1996]. Однак, неідентифіковані цитокіни можуть бути обов'язковими для проліферації специфічних підкласів NK-клітин та/або попередників NK-клітин [Robertson et al., Blood 76: 2451-2438, 1990]. Подібно, zcytor17lig може діяти поодиноко або у союзі або синергічно з іншими цитокінами для посилення росту, проліферації, розвитку та модифікації диференціації моноцитів/макрофагів, Т-клітин, В-клітин або NK-клітин.

Дослідження вимірювання диференціації включають, наприклад, вимірювання клітинних маркерів, асоційованих з фазо-специфічною експресією тканини, активністю ферментів, функціональною активністю або морфологічними змінами [Watt, FASEB, 5: 281-284, 1991; Francis, Differentiation 57: 63-75, 1994; Raes, Adv. Anim.

Cells Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989; які уведено тут як посилання]. Альтернативно, поліпептид zcytor17lig сам може бути корисним як додатковий маркер клітинної поверхні або секретований маркер, асоційований з фазо-специфічною експресією тканини. По суті, безпосередній вимір поліпептиду zcytor17lig, або втрати ним експресії у тканині, яку він диференціює, може бути корисним як маркер для диференціації тканин.

Подібно, безпосередній вимір поліпептиду zcytor17lig, або втрати ним експресії у тканині можна визначати у тканині або у клітинах, коли вони піддаються розвитку пухлин. Збільшення інвазивності та рухомості клітин, або приріст або втрата експресії zcytor17lig у предракових або ракових станах, у порівнянні з нормальною тканиною, може бути корисним як діагностичне стосовно трансформації, інвазії та метастазу у розвитку пухлин. По суті, знання фаз розвитку або метастазування пухлин допомагатиме лікарю у виборі найкращої терапії, або агресивності лікування для даного конкретного ракового пацієнта. Способи вимірювання приросту та втрати експресії (чи мРНК або білку) є добре відомими у рівні техніки та описані тут, і їх можна застосовувати до експресії zcytor17lig. Наприклад, поява або зникнення поліпептидів, що регулюють клітинну рухомість, можна застосовувати для допомоги діагнозу та прогнозу раку простати [Banyard, J. та Zetter, B. R., Cancer та Metast. Rev. 17: 449-458, 1999]. Як ефектор рухомості клітин, приріст або втрата експресії zcytor17lig можуть бути корисними як діагностичні для лімфоїдного, В-клітинного, епітеліального, гематопоетичного та інших типів раку.

Більш того, активність та вплив zcytor17lig на розвиток пухлин та метастази можна вимірювати *in vivo*. Кілька сингенних мишачих моделей розроблено для дослідження, як впливають поліпептиди, сполуки або інші засоби лікування на розвиток пухлин. У цих моделях клітини пухлин, пропущені через культивування, імплантують у мишей такої ж породи, як донор пухлин. Клітини розвиваються у пухлини, що мають подібні характеристики у реципієнтних мишах та метастази також відбуваються у деяких з моделей. Прийнятні пухлинні моделі для нашого дослідження включають карциному легенів Льюїса (ATCC №CRL-1642) та меланому B16 (ATCC №CRL-6323), серед інших. Це є звичайно застосовуваними лініями пухлин, сингенними до мишей C57BL6/J, що легко культивуються та обробляються *in vitro*. Пухлини, що є результатом імплантації будь-якої з цих ліній клітин, здатні метастазувати до легенів у мишах C57BL6/J. Модель карциноми легенів Льюїса нещодавно застосовували на мишах для ідентифікування інгібітору ангиогенезу [O'Reilly MC, et al. Cells 79: 315-328, 1994].

Мишей C57BL6/J лікують експериментальним засобом добовими ін'єкціями рекомбінантного білку, агоністу або антагоністу або одноразовою ін'єкцією рекомбінантного аденовірусу. Три доби після цієї обробки, 105-106 клітин імплантують під шкіру спини. Альтернативно, клітини самі можуть бути інфікованими рекомбінантним аденовірусом, як-то тим, що експресує zcytor17lig, перед імплантацією таким чином, щоб блок синтезувався на пухлинній

ділянці або внутрішньоклітинно краще, ніж системно. Миші нормально розвивали видимі пухлини протягом 5 діб. Пухлини вирощували протягом періоду до 3 тижнів, при цьому вони можуть досягати розміру 1500-1800мм<sup>3</sup> у контрольній групі. Розмір пухлин та масу тіла обережно відстежують повсюди в експерименті. Підчас вбивання пухлину видаляють та видаляють разом з легенями та печінкою. Легені, як показано, добре корелюють з вагою метастатичних пухлин. Як додатковий вимір, підраховують метастази поверхні легенів. Резектовані пухлини, легені та печінку отримують для гістопатологічного дослідження, імуногістохімії та гібридизації *in situ*, використовуючи способи, відомі у рівні техніки та описані тут. Вплив досліджуваного експресованого поліпептиду, наприклад, zcytor17lig, на здатність пухлини до утворення судинної системи та до утворення метастазів можна оцінювати таким чином. На додаток, відступаючи від теми, використовуючи аденовірус, імплантовані клітини можуть бути тимчасово трансфектованими zcytor17lig. Застосування стабільних трансфектантів zcytor17lig а також застосування придатних для індукування промоторів для активації експресії zcytor17lig *in vivo*, відоме у рівні техніки і це можна застосовувати у цій системі для оцінки індукції метастазу zcytor17lig. Більш того, очищений zcytor17lig або стандартизовані середовища zcytor17lig можна безпосередньо ін'єктувати у цій мишачій моделі, а відтак, застосовувати у цій системі. [Для загальної довідки дивись O'Reilly MC, et al. Cells 79: 315-328, 1994; та Rusciano D, et al. Murine Models of Liver Metastasis. Invasion Metastasis 14: 349- 361, 1995].

Zcytor17lig або антитіла до того ж будуть корисними у лікуванні онкогенезу, а тому могли б бути корисними у лікуванні раку. Zcytor17lig експресується в активованих Т-клітинах, моноцитах та макрофагах та приєднується до регіону хромосоми людini, де транслокації є звичайними при лейкомії. Більш того, zcytor17lig, як показано, діє через рецептор цитокіну zcytor17, оскільки також експресується в активованих Т-клітинах, моноцитах та макрофагах. Зверхстимулювання активованих Т-клітин, моноцитів та макрофагів zcytor17lig могло б призводити до хворобливого стану людини, як-то, наприклад, раку імунних клітин або інших типів раку. По суті, ідентифікуючи експресію zcytor17lig, поліпептиди (наприклад, антитілами анти-zcytor17lig, розчинними рецепторами zcytor17 (наприклад, рецептор zcytor17, гетеродимери (наприклад, zcytor17/OSMRбета, zcytor17/WSX-1), мультимерами (наприклад, zcytor17/OSMRбета/WSX-1)), або іншими зв'язувальними партнерами zcytor17lig) можуть бути корисними як діагностичні та можуть бути корисними як антагоністи проліферативної активності zcytor17lig. Ліганд можна було б застосовувати у комбінації з іншими засобами вже при застосуванні, включаючи звичайні хемотерапевтичні засоби, а також імунні модулятори, як-то інтерферон-альфа.

Альфа/бета інтерферони показані як ефективні у лікуванні деяких лейкоїй та тваринних моделей хвороб, та ріст інгібіторної дії інтерферону-альфа та zcytor17lig може бути адитивним.

NK-клітини, вважають, грають головну роль у

ліквідації метастатичних клітин пухлин, і пацієнти з метастазами та твердими пухлинами мають зменшені рівні активності NK-клітин. [Whiteside et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 230: 221-244, 1998].

Засоби, що стимулюють NK-клітини могли б бути корисними у ліквідації пухлин.

Згідно з представленим винаходом запропоновано спосіб зменшення проліферації неопластичних моноцитів/макрофагів, що полягає у вживанні ссавцем з моноцитним/макрофаговим новоутворенням кількості композиції zcytor17lig або анти-zcytor17lig, достатньої для зменшення проліферації неопластичних моноцитів/макрофагів.

В інших втіленнях композиція може містити принаймні один інший цитокін. Другий цитокін можна вибрати з групи, що складається з IL-2, IL-3, IL-12, IL-21, IL-22, IL-15, IL-4, GM-CSF, ліганду Flt3 або фактору стовбурних клітин.

Згідно з представленим винаходом запропоновано спосіб інгібування активації або диференціації моноцитів/макрофагів. Моноцити є неповністю диференційованими клітинами, що мігрують до різних тканин, де вони розвиваються та стають макрофагами.

Макрофаги грають центральну роль в імунній реакції представленням антигену для лімфоцитів та грають підтримувальну роль як допоміжні клітини для лімфоцитів секретуванням ряду цитокінів. Макрофаги можуть засвоювати зовнішньоклітинні молекули та при активації мають збільшену здатність знищувати внутрішньоклітинні мікроорганізми та клітини пухлин.

Активовані макрофаги є також включеними у стимуляцію гострого або локального запалення.

За іншим аспектом згідно з представленим винаходом запропоновано спосіб зменшення проліферації новоутворених В або Т-клітин, що полягає у вживанні ссавцем з В або Т-клітинним новоутворенням кількості композиції антагоністу zcytor17lig, достатньої для зменшення проліферації новоутворених моноцитів/макрофагів. В інших втіленнях композиція може містити принаймні один інший цитокін, де цитокін може бути вибраним з групи, що складається з IL-2, IL-3, IL-12, IL-21, IL-22, IL-15, IL-4, GM-CSF, ліганду FU3 або фактору стовбурних клітин. Крім того, антагоніст zcytor17lig може бути конденсованим білком ліганд/токсин.

Конденсований токсин zcytor niig-сапорин можна застосовувати проти подібної множини лейкоємій та лімфом, поширення меж лейкоємій, що можна лікувати zcytor17lig. Наприклад лейкоємії можуть бути такими, що зверхекспресують рецептори zcytor17 (наприклад, рецептор zcytor17, гетеродимери (наприклад, zcytor17/OSMRбета, zcytor17/WSX-1), мультимери (наприклад, zcytor17/OSMRбета/WSX)). Опосередкована конденсованим токсином активація рецептору zcytor17, гетеродимерів або мультимерів рецептору zcytor17 (наприклад, zcytor19/OSMRбета, zcytor17/WSX-1 або zcytor19/WSX-1/OSMR) забезпечує два незалежних засоби для інгібування росту цільових клітин, перш є ідентичним стосовно ефектів, спостережених від ліганду поодиноці, а другий внаслідок доставки токсину через інтерналізацію рецептору. Обмежена лімфоїдами та моноцитами

експресій-на картина рецептору zcytor17 підказує, що кон'югат ліганд-сапорин може бути толерантним для пацієнтів.

Коли лікування злоякісностей включає аллогенний кістковий мозок або трансплантацію стовбурних клітин, zcytor17lig може бути цінним у поліпшенні дії трансплантат проти пухлини. Zcytor17lig може стимулювати створення літичних NK-клітин від попередників з кісткового мозку та може стимулювати проліферацію моноцитів та макрофагів після активації рецепторів антигену. Тому коли пацієнти отримують аллогенні трансплантати кісткового мозку, zcytor17lig посилюватиме створення анти-пухлинної реакції, з інфузією до-норних лімфоцитів або без неї.

Тканинний розподіл рецепторів для даного цитокіну припускає сильну індикацію потенційних ділянок дії такого цитокіну. Експресія zcytor17 була спостережена у моноцитах та В-клітинах, з сильним збільшенням експресії при активації Т-клітин CD3+, CD4+ та CD8+. На додаток, дві моноцитні лінії клітин, THP-1 [Tsuchiya et al., *Int. J. Cancer* 26: 171-176, 1980] та U937 [Sundstrom et al., *Int. J. Cancer* 17: 565-577, 1976], були також позитивними стосовно експресії zcytor17.

Норзерн-аналіз рецептору WSX-1 виявив транскрипти в усіх досліджених тканинах зі збільшеними рівнями експресії у тимусі, селезінці, лімфатичному вузлі, кістковому мозку та лейкоцитах периферійної крові людини. Також рівні експресії WSX-1 збільшені при активації Т-клітин.

Експресія OSMR, як повідомлено, є дуже широкою [Mosley et al., *JBC* 271: 32635-32643, 1996]. Цей розподіл рецепторів zcytor17, WSX-1 та OSM підтримує роль zcytor17lig в імунних реакціях, особливо розвиток Т-клітин при активації або роль у відгалуженні моноцити/макрофаги імунної системи.

Відтак, особливе втілення представленого винаходу є спрямованим до застосування розчинних гетеродимерів zcytor17/WSX-1/OSMR та zcytor17/OSMR як антагоністів при запальних та імунних хворобах або станах, як-то панкреатит, діабет типу I (IDDM), рак підшлункової залози, панкреатит, хвороба Грейвса, запальна хвороба кишечника (IBD), хвороба Крона, рак ободової кишки та кишковий, дивертикулез, автоімунна хвороба, сепсис, трансплантація органу або кісткового мозку, запалення внаслідок травми, хірургії або інфекції; амілоїдоз; спленомегалія; хвороба трансплантат проти хазяїна; та при інгібуванні запалення, імунносупресії, відновленні проліферації гематопоетичних, імунних, запальних або лімфоїдних клітин, макрофагів, Т-клітин (включаючи клітини Th1 та Th2, клітини CD4+ та CD8+), пригніченні імунної реакції стосовно патогену або антигену. Більш того, наявність експресії zcytor17 в активованих імунних клітинах, як-то активовані клітини CD4+ та CD19+ показувала, що рецептор zcytor17 може бути включеним у захисні імунні реакції організму проти чужинних загарбників, як-то мікроорганізми та обривки клітин та міг би грати роль в імунних реакціях при запаленні та утворенні раку. По суті, антитіла та зв'язувальні партнери представленого винаходу, що є агоністичними або антагоністичними стосовно функції рецептору

zcytor17, як-то zcytor17lig, можна застосовувати для модифікації імунної реакції та запалення.

Структура та тканнна експресія zcytor17lig свідчить про роль у ранньому гематопоетичному або тимоцитному розвитку та регуляції імунної реакції або запалення. Ці процеси включають стимулювання проліферації та диференціації клітин у реакції на приєднання одного або більше цитокінів до їх родових рецепторів. З точки зору тканинного розподілу, спостереженого для цього zcytor17lig, агоністи (включаючи природні рецептори) та антагоністи мають великий потенціал у застосуваннях *in vitro* та *in vivo*. Сполуки, ідентифіковані як агоністи zcytor17lig, є корисними для стимулювання проліферації та розвитку цільових клітин *in vitro* та *in vivo*. Наприклад, сполуки агоністів, zcytor17lig, чи антитіла анти-zcytor17lig, є корисними як компоненти визначених культивацийних середовищ клітин, і їх можна застосовувати поодиноко або у комбінації з іншими цитокінами та гормонами для заміщення сироватки, яку звичайно застосовують при культивуванні клітин. Агоністи є відтак корисними при специфічному сприянні росту та/або розвитку або активації моноцитів, Т-клітин, В-клітин та інших клітин лімфоїдної та мієлоїдної ліній диференціювання та гематопоетичних клітин у культурі.

Zcytor17lig може бути корисним тим, що стимулює опосередкований клітинами імунітет та стимулює проліферацію лімфоцитів, як-то у лікуванні інфекцій, включаючи іму-носупресію, включаючи деякі вірусні інфекції. Додаткові застосування включають пригнічення пухлин, де злаякісна трансформація призводить до клітин пухлин, що є антигенними. Zcytor17lig можна було б застосовувати для індукування цитотоксичності, яка може бути опосередкованою активацією ефекторних клітин, як-то Т-клітини, NK-клітини (природний кілер), або LAK-клітини (лімфоїдний активований кілер), або індукування безпосередньо через апоптотичні провідні шляхи. Zcytor17lig може також бути корисним у лікуванні лейкопеній збільшенням рівнів типу пошкоджених клітин та для поліпшенні регенерації складу Т-клітин після трансплантації кісткового мозку; або для поліпшенні проліферації або активації моноцитів та для діагностичних та інших описаних тут застосувань.

Zcytor17lig може знайти використання у пригніченні імунної системи, як-то у лікуванні автоімунних хвороб, включаючи ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, цукровий діабет, запальну хворобу кишечника, хворобу Крона, тощо.

Імуносупресію можна також застосовувати для зменшення відторгнення тканини або трансплантатів органів та для лікування Т-клітинно-, В-клітинно- або моноцити-специфічних лейкоемій чи лімфом та інших типів раку інгібуванням проліферації типу пошкоджених клітин. Більш того zcytor17lig можна застосовувати для визначення моноцитів, макрофагів та активованих Т-клітин та для допомоги у діагнозі такої автоімунної хвороби, особливо при хворобі, де моноцити є підвищеними або активованими.

Поліпептиди, пептиди, антитіла, тощо zcytor17lig можна також застосовувати у діагностичних системах для визначення циркуляційних рівнів zcytor17lig.

У спорідненому втіленні антитіла або інші агенти, що специфічно приєднуються до поліпептидів zcytor17lig, можна застосовувати для визначення циркуляції поліпептидів zcytor17lig.

Підвищені або знижені рівні поліпептидів ліганду можуть бути індикативними стосовно станів, включаючи рак. Поліпептиди zcytor17lig можуть сприяти патологічним процесам та можуть бути непрямим маркером лежачої в основі хвороби.

Також, zcytor17lig можна застосовувати для визначення або націлювання його рецепторів при деяких станах хвороб. Наприклад, підвищені рівні розчинного рецептору IL-2 у сироватці людини асоційовані з широким колом різних запальних та неопластичних станів, як-то інфаркт міокарду, астма, важка міастенія, ревматоїдний артрит, гостра Т-клітинна лейкокемія, В-клітинні лімфоми, хронічна лімфоцитна лейкокемія, рак ободової кишки, рак молочних залоз та рак яєчника [Heaney et al., Blood 87: 847-857, 1996]. Подібно, рецептор zcytor17 є підвищеним в активованих моноцитах, а відтак, рецептор zcytor17 та/або його розчинні рецептори можуть бути асоційованими з маркером або корисними як маркер для запальних та неопластичних станів, асоційованих з цим. Zcytor17lig, включаючи цитотоксичні кон'югати, можна відтак застосовувати для визначення або мети таких тканини та станів хвороби.

Молекули представленого винаходу мають особливе застосування у відгалуженні моноцити/макрофаги імунної системи. Відомі способи для оцінки такої активності. Наприклад, інтерферон гама (IFN $\gamma$ ) є потужним активатором мононуклеарних фагоцитів. Наприклад, збільшення експресії zcytor17 при активації клітин THP-1 (ATCC №TIB-202) з гама-інтерфероном могло б підказати, що цей рецептор є включеним в активацію моноцитів. Моноцити є неповністю диференційованими клітинами, що мігрують до різних тканин, де вони розвиваються та стають макрофагами. Макрофаги грають центральну роль в імунній реакції представленням антигену для лімфоцитів та грають підтримувальну роль як допоміжні клітини для лімфоцитів секретуванням ряду цитокінів. Макрофаги можуть засвоювати зовнішньоклітинні молекули та при активації мають збільшену здатність знищувати внутрішньоклітинні мікроорганізми та клітини пухлин. Активовані макрофаги є також включеними у стимулювання гострого або локального запалення. Більш того, функція моноцитів-макрофагів, як показано, є аномальною у різних станах хвороби. [Наприклад дивись, Johnston, RB, New Eng. J. Med. 318: 747-752, 1998].

Фахівець зрозуміє, що агоністи рецептору zcytor17, як-то zcytor17lig, є корисними. Наприклад, знижену міграцію моноцитів показано у популяціях зі схильністю до інфекції, як-то новонароджені діти, пацієнти, отримуючі кортикостероїд або іншу імуносупресорну терапію та пацієнти з цукровим діабетом, опіками, або СНІД. Агоністи для zcytor17, як-то zcytor17lig, могли б призводити до збільшення здатності моноцитів мігрувати та можливого попередження інфекції у цих популяціях. Існує також сильний дефект фагоцитного знищення мононуклеарними фагоцитами від пацієнтів з хронічною грануломатозною хворобою. Це при-

зводить до утворення підшкірних абсцесів, а також абсцесів у печінці, легенях, селезінці та лімфатичних вузлах. Агоністи рецептору *zcytor17*, як-то *zcytor17lig*, могли б коректувати або поліпшувати цей фагоцитний дефект. На додаток, дефектні цитоток-сичності моноцитів показано у пацієнтів з раком та синдромом Віскотта-Алдрича (екзема, тромбоцитопенія та рецидивні інфекції).

Активация моноцитів агоністами рецептору *zcytor17*, як-то *zcytor17lig*, могла б допомогти у лікуванні цих станів. Моноцитно-макрофагова система є помітною включеною у кілька ліпідозберігаючих хвороб (сфінголіпidoзи), як-то хвороба Гаучера.

Резистентність до інфекції може бути порушеною внаслідок дефекту у функції макрофагів, яку можна було б лікувати агоністами рецептору *zcytor17*, як-то *zcytor17lig*.

Більш того, фахівець зрозуміє, що антагоністи *zcytor17lig* є корисними. Наприклад, при атеросклеротичних ураженнях, одною з перших аномальностей є локалізація моноцитів/макрофагів до ендотеліальних клітин. Ці ураження можна було б попереджати застосуванням антагоністів *zcytor17lig*. Антитіла анти-*zcytor17lig* (наприклад, нейтралізуюче антитіло *zcytor17lig*), розчинні рецептори *zcytor17*, гетеродимери та мультимери та зв'язувальні партнери *zcytor17lig* можна також застосовувати як антагоністи *zcytor17lig*. Більш того, монобластична лейкемія є асоційованою з різними клінічними аномальностями, що відображують вивільнення біологічних продуктів макрофагів, приклади включають високі рівні лізоциму у сироватці та сечі та сильну лихоманку. Більш того, такі лейкемії виявляють аномальне збільшення моноцитних клітин.

Ці ефекти можливо можна було б попереджати антагоністами *zcytor17lig*, як-то описаними тут. Більш того, анти-*zcytor17lig* може бути сполученим з молекулами, як-то токсичні групи та цитокіни, які описано тут, для безпосереднього знищення лейкемічних моноцитних клітин.

Використовуючи способи, відомі у рівні техніки та розкриті тут, фахівець міг би легко оцінювати активність агоністів та антагоністів *zcytor17lig* при станах хвороби, що розкрито тут, запаленнях, імунних (наприклад, автоімунних), раку, або інфекції а також інших станах хвороби, що включають моноцитні клітини. На додаток, оскільки *zcytor17lig* експресується Т-клітинно-, макрофагово- та моноцит-специфічним чином і ці хвороби включають аномальності у моноцитних клітинах, як-то проліферацію клітин, функцію, локалізацію та активацію, поліпептиди, поліпептиди та антитіла представленого винаходу можна застосовувати для діагностики для визначення аномальності таких моноцитних клітин та для індикації наявності хвороби. Такі способи включають отримання біологічного зразку від пацієнта, як-то кров, слина, або біопсія та порівняння його з нормальним контрольним зразком. Гістологічні, цитологічні, цитометричні у потоці, біохімічні та інші способи можна застосовувати для визначення відносних рівнів або локалізації *zcytor17lig*, або клітин, що експресують *zcytor17lig*, тобто, моноцитів, у зразку пацієнта порівняно з нормальним контролем. Зміна рівня

(збільшення або зменшення) експресії *zcytor17lig*, або зміна числа або локалізації моноцитів (наприклад, збільшення або інфільтрування моноцитних клітин у тканини, де вони нормально не є представленими) порівняно з контролем могли б бути індикативними стосовно хвороби. Такі діагностичні способи можуть також включати, використання радіометричних, флуоресцентних та колориметричних додатків, приєднаних до поліпептидів, поліпептидів або антитіл представленого винаходу. Такі способи добре відомі у рівні техніки та розкриті тут.

Амінокислотні послідовності, що мають активність *zcytor17lig*, можна застосовувати для модуляції імунної системи приєднанням рецептору *zcytor17*, а відтак, попередженням приєднання *zcytor17lig* до ендогенного рецептору *zcytor17lig*. Антагоністи *zcytor17lig*, як-то антитіла анти-*zcytor17lig*, можна також застосовувати для модуляції імунної системи інгібуванням приєднання *zcytor17lig* до ендогенного рецептору *zcytor17lig*.

Відповідно, представлений винахід включає застосування білків, поліпептидів та пептидів, що мають активність *zcytor17lig* (як-то поліпептиди *zcytor17lig*, аналоги *zcytor17lig* (наприклад, анти-ідіотипові антитіла анти-*zcytor17lig*) та конденсовані білки *zcytor17lig*) до суб'єкту, якому не вистачає адекватної кількості цього поліпептиду, або який продукує надлишок *zcytor17*, що включає рецептори. Антагоністи *zcytor17* (наприклад, антитіла анти-*zcytor17*) можуть бути також застосовуваними для лікування суб'єкта, який продукує надлишок *zcytor17lig* або *zcytor17*, що включає рецептори. Підхожі суб'єкти включають ссавців, як-то людину.

*Zcytor17lig*, як показано, експресується в активованих мононуклеарних клітинах та може бути включеним при регулюванні запалення. По суті, поліпептиди представленого винаходу можна аналізувати та застосовувати за їх здатністю модифікації запалення, або можна застосовувати як маркер запалення. Способи визначення прозапальних та антизапальних якостей *zcytor17lig* відомі у рівні техніки та обговорені тут. Більш того, він може бути включеним у зверхрегульоване продукування гостро-фазних реагентів, як-то амیلлоїд А сироватки (SAA),  $\alpha 1$ -антихімотрипсин та гаптоглобін, а експресія ліганду рецептору *zcytor17* може бути збільшеною ін'єкцією ліпополісахариду (LPS) *in vivo*, що є включеним у запальну реакцію [Dumoutier, L. et al., Proc.Natl. Acad. Sci. 97: 10144-10149, 2000]. Продукування гостро-фазних білків, як-то SAA, вважають короткотерміновим механізмом виживання, де запалення є цілющим; однак, збереження гостро-фазних білків протягом довгих періодів сприяє хронічному запаленню та може бути шкідливим для здоров'я людини.

[Для огляду, дивись Uhlar, CC та Whitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265: 501-523, 1999 та Baumann H. та Gauldie, J. Immunology Today 15: 74-80, 1994]. Більш того, SAA гострофазних білків є залученим у патогенез кількох хронічних запальних хвороб, залученим у атеросклероз та ревматоїдний артрит та є попередником білку амیلлоїду А, осаджуваного при амیلлоїдозі (Uhlar, CC та Whitehead, вище.). Відтак, де ліганд, як-то *zcytor17lig*, що діє як прозапальна молекула та

індукує продукування SAA, антагоністи можливо будуть корисними у лікуванні запальних хвороб та інших хвороб, асоційованих з гостро-фазними білками індукованими реакцією ліганду. Такі антагоністи запропоновано представленим винаходом.

Наприклад, спосіб зменшення запалення полягає у вживанні ссавцем із запаленням кількості композиції zcytor17lig, чи антитіла анти-zcytor17lig (наприклад, нейтралізуючого антитіла), що є достатнім для зменшення запалення.

Більш того, спосіб пригнічення запальної реакції у ссавця з запаленням може містити: (1) визначення рівня сироваточного білку амілоїду A; (2) вживання композиції, що містить поліпептид zcytor17lig чи антитіло анти-zcytor17lig, які описано тут, у прийнятному фармацевтичному носії; (3) визначення після застосування рівня сироваточного білку амілоїду A; (4) порівняння рівня сироваточного білку амілоїду A на етапі (1) з рівнем сироваточного білку амілоїду A на етапі (3), де відсутність збільшення або зменшення рівнів сироваточного білку амілоїду A є індикативною стосовно пригнічення запальної реакції.

Рецептори, що приєднують zcytor17lig представленого винаходу включають принаймні один субелемент рецептору zcytor17. Другий рецепторний поліпептид, включений у гетеродимерний розчинний рецептор належить до підродини рецепторів, що включає субелементи рецептору цитокіну класу I, а більш конкретно OSMR $\beta$  та WSX-1. Згідно з представленим винаходом, на додаток до мономерного або гомодимерного рецепторного поліпептиду zcytor17lig, гетеродимерний розчинний рецептор zcytor17, який представлено втіленням, що містить розчинний рецептор zcytor17+розчинний компонент гетеродимерного рецептору класу I, як-то OSMR $\beta$  або WSX-1, може діяти як антагоніст zcytor17lig. Інші втілення включають розчинні мультимерні рецептори, що містять zcytor17, як-то рецептор zcytor17+розчинний компонент мультимерного рецептору класу I, як-то OSMR $\beta$  та WSX-1.

Подібно zcytor17lig, аналіз тканинного розподілу мРНК, що відповідає кДНК його рецептору zcytor17, показав, що рівні мРНК були найвищими у клітинах моноцитів та простати та є підвищеними в активованих моноцитах та активованих клітинах CD4+, активованих клітинах CD8+ та активованих клітинах CD3+. Звідси, рецептор zcytor17 є також залученим при індуванні запальних та імунних реакцій. Відтак, особливе втілення представленого винаходу спрямовано на застосування zcytor17lig-антитіла та zcytor17lig, а також гетеродимерів розчинного рецептору zcytor17, як антагоністів у запальних та імунних хворобах або станах, як-то, панкреатит, діабет типу I (IDDM), рак підшлункової залози, панкреатит, хвороба Грейвса, запальна хвороба кишечника (IBD), хвороба Крона, рак ободової кишки та кишковий рак, дивертикулез, аутоімунна хвороба, сепсис, трансплантація органу або кісткового мозку; запалення внаслідок травми, хірургії або інфекції; амілоїдоз; спленомегалія; хвороба трансплантат проти хазяїна; та де інгібування запалення, імуносупресія, відновлення проліферації гематопоетичних, імунних, запальних або лімфоїдних клітин, макрофагів, Т-клітин

(включаючи клітини Th1 та Th2, клітини CD4+ та CD8+), пригнічення імунної реакції до патогену або антигену. Більш того, наявність експресії zcytor17 в активованих імунних клітинах, як-то активовані клітини CD3+, моноцити, клітини CD4+ та CD19+ показала, що рецептор zcytor17 може бути включеним у захисні імунні реакції організму проти чужинних загарбників, як-то мікроорганізми та обривки клітин, та міг би грати роль в імунних реакціях при запаленні та утворенні раку. По суті, zcytor17lig та zcytor17lig-антитіла представленого винаходу, що є агоністичними або антагоністичними стосовно функції рецептору zcytor17, можна застосовувати для модифікації імунної реакції та запалення.

Більш того, поліпептиди zcytor17lig, що приєднують рецепторні поліпептиди zcytor17lig та антитіла до них є корисними для:

1) Антагонізування або блокування сигналізування через рецептори, що містять zcytor17, у лікуванні гострого запалення, запалення як результату травми, поранення тканин, хірургії, сепсису або інфекції, та хронічної запальної хвороби, як-то астма, запальна хвороба кишечника (IBD); хронічний коліт, спленомегалія, ревматоїдний артрит, рецидивні гострі запальні епізоди (наприклад, туберкульоз), та лікуванні амілоїдозу та атеросклерозу, хвороби Гастлемана, астми та інших хвороб, асоційованих з індуцією гостро-фазової реакції.

2) Антагонізування або блокування сигналізування через рецептори рецептору zcytor17 у лікуванні аутоімунних хвороб, як-то IDDM, розсіяний склероз (MC), системний червоний вовчак (SLE), важка міастенія, ревматоїдний артрит та IBD для попередження або інгібування сигналізування у імунних клітинах (наприклад лімфоцити, моноцити, лейкоцити) через рецептор zcytor17 [Hughes C et al., J. Immunol 153: 3319-3325, 1994].

Альтернативно, антитіла, як-то моноклональні антитіла (MAb) до zcytor17lig, можна також застосовувати як антагоністи для зменшення небажаних імунних клітин для лікування аутоімунної хвороби.

Астму, алергію та інші atopічні хвороби можна лікувати MAb проти, наприклад, антитіл анти-zcytor17lig, розчинних рецепторів розчинного рецептору zcytor17 або гетеродимерів zcytor17/CRF2-4, для інгібування імунної реакції або для зменшення подразнювальних клітин. Блокування або інгібування сигналізування через zcytor17, використовуючи поліпептиди та антитіла представленого винаходу, може також бути корисним при хворобах підшлункової залози, нирок, гіпофізу та нейронних клітин. IDDM, NIDDM, панкреатит та карцинома підшлункової залози можуть бути корисними. Zcytor17 може бути корисним як мета для Mab-терапії раку, де антагонізувальний MAb інгібує ріст раку та націлює імунно-опосередковане знищення. [Holliger P та Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016, 1998]. Mab до розчинних мономерів, гомодимерів, гетеродимерів та мультимерів рецептору zcytor17 можуть також бути корисними для лікування нефропатій, як-то гломерулосклероз, мембранна нефропатія, амілоїдоз (який також впливає на нирки серед інших тканин), ренальний артеріосклероз,

гломерулонефрит різних походжень, фібропроліферативні хвороби нирок, а також ниркова дисфункція, асоційована з SLE, IDDM, діабетом типу II (NIDDM), нирковими пухлинами та іншими хворобами.

3) Агонізування або ініціювання сигналізування через рецептори *zcytor17* у лікуванні автоімунних хвороб, як-то IDDM, MC, SLE, важка міастенія, ревматоїдний артрит та IBD. *Zcytor17lig* може передавати сигнал лімфоцитам або іншим імунним клітинами до диференціації, зміни проліферації, або зміни продукування цитокінів або білків поверхні клітин, що полегшують автоімунітет. Конкретно, модулювання реакції Т-хелперних клітин для зміни характеристик секреції цитокіну може відхиляти автоімунну реакцію для полегшення хвороби [Smith JA et al., J. Immunol. 160: 4841-4849, 1998].

Подібно, *zcytor17lig* можна застосовувати для сигналізування, зменшення та відхилення імунних клітин, включених при астмі, алергії та atopічній хворобі. Сигналізування через рецептор *zcytor17* може також бути корисним при хворобах підшлункової залози, нирок; гіпофізу та нейронних клітин. IDDM, NIDDM, панкреатит та карцинома підшлункової залози можуть бути корисними. *Zcytor17* може бути корисним як мета для MAb-терапії раку підшлункової залози, де сигналізування MAb інгібує ріст раку та націлює імунно-опосередковане знищення [Tutt, AL et al., J. Immunol. 161: 3175-3185, 1998].

Подібно Т-клітинно-специфічній лейкемії, лімфоми, дискразію плазмових клітин (наприклад, множинна мієлома) та карциному можна лікувати моноклональними антитілами (наприклад, нейтралізуючим антитілом) до розчинних рецепторів, що містять *zcytor17* представленого винаходу.

Антитіла анти-*zcytor17lig*, мономерні, гомодимерні, гетеродимерні та мультимерні поліпептиди розчинного рецептору *zcytor17*, описані тут, можна застосовувати для нейтралізації/блокування активності ліганду рецептору *zcytor17* у лікуванні автоімунної хвороби, atopічної хвороби, NIDDM, панкреатиту та дисфункції нирок, як описано вище. Розчинну форму рецептору *zcytor17* можна застосовувати для сприяння реакції антитіла, опосередкованої Т-клітинами, та/або для сприяння продукуванню IL-4 або інших цитокінів лімфоцитами або іншими імунними клітинами.

Антитіла анти-*zcytor17lig* та розчинні рецептори, що містять *zcytor17*, є корисними як антагоністи *zcytor17lig*. Такої антагоністичної дії можна досягти безпосередньою нейтралізацією або приєднанням його природного ліганду. На додаток до антагоністичних застосувань, розчинні рецептори можуть приєднувати *zcytor17lig* та діяти як носії або білки носіїв, для транспорту *zcytor17lig* до різних тканин, органів та клітин у тілі. По суті, розчинні рецептори можуть бути конденсованими або сполученими з молекулами, поліпептидами або хімічними групами, що спрямовують комплекс розчинний-рецептор-ліганд до конкретної ділянки, як-то тканин, специфічних імунних клітин, моноцитів, або пухлин. Наприклад, при гострій інфекції або деяких типах раку, корисність може бути результатом індукції запалення та локальної гостро-фазної реакції білків. Відтак, описані тут розчинні рецеп-

тори або антитіла представленого винаходу можна застосовувати для специфічного спрямування дії прозапального ліганду *zcytor17lig*. [Дивись, Cosman, D. Cytokine 5: 95-106, 1993; та Fernandez-Botran, R. Exp. Opin. Invest. Drugs 9: 497-513, 2000].

Більш того, розчинні рецептори можна застосовувати для стабілізації *zcytor17lig*, для збільшення біозасвоюваності, терапевтичної довговічності та/або ефективності ліганду стабілізацією ліганду від розкладання або виведення, або націлюванням ліганду до ділянки дії у тілі. Наприклад природно існуючий комплекс IL-6/розчинний IL-6R стабілізує IL-6 та може передавати сигнал через рецептор gp130. [Дивись, Cosman, D. вище, та Fernandez-Botran, R. вище]. Більш того, *zcytor17* можна комбінувати з родовим лігандом, як-то його ліганд для включення комплексу ліганд/розчинний рецептор. Такі комплекси можна застосовувати для стимулювання реакцій від клітин, що представляють субелемент доповнювального рецептору. Клітина специфічність комплексів *zcytor17*рецептор/*zcytor17lig* може відрізнятися від спостереженої для застосованого поодиноці ліганду. Крім того, комплекси можуть мати відмінні фармакокінетичні властивості, як-то вплив на час напівперетворення, дозу/реакцію та специфічність органу або тканини. Комплекси *Zcytor17*/ліганд відтак можуть мати агоністичну активність для посилення імунної реакції, стимулювання мезангіальних клітин або стимулювання гепатичних клітин. Альтернативно, тільки тканини, що експресують субелемент сигналізування гетеродимерів з комплексом можуть впливати аналогічно на реакцію до комплексів IL6/IL6R [Hirota H. et al., Proc.Natl. Acad. Sci, 92: 4862-4866, 1995; Hirano, T. у Thomason, A. (Ed.) Cytokine Handbook, 3rd Ed., p.208-209]. Розчинні комплекси рецептор/цитокін для IL12 та CNTF виявляють подібну активність.

*Zcytor17lig* можна також застосовувати у діагностичних системах для визначення рівнів циркуляції ліганду та при визначенні гостро-фазної запальної реакції. У спорідненому втіленні антитіла або інші агенти, що специфічно приєднуються до *zcytor17lig*, можна застосовувати для визначення циркуляції поліпептидів *zcytor17lig*; і навпаки, *zcytor17lig* сам можна застосовувати для визначення циркуляції або локально-діючих рецепторних поліпептидів. Підвищені або знижені рівні ліганду або рецепторних поліпептидів можуть бути індикативними стосовно патологічних станів, включаючи запалення або рак. Більш того, визначення гостро-фазних білків або молекул, як-то *zcytor17lig*, може бути індикативним стосовно хронічних запальних станів при деяких хворобах (наприклад, ревматоїдний артрит).

Визначення таких станів корисне для допомоги при діагностуванні хвороби а також допомагає лікарю у виборі належної терапії.

Поліпептиди та білки представленого винаходу можна також застосовувати *ex vivo*, як-то у автologічній кістково-мозковій культурі. Коротше, кістковий мозок видаляють від пацієнта перед хемотерапією або трансплантацією органу та обробляють *zcytor17lig*, як варіант, у комбінації з одним

або більше іншими цитокинами. Оброблений кістковий мозок тоді повертають пацієнту після хемотерапії для прискорення відновлення кісткового мозку або після трансплантації для пригнічення хвороби від дії трансплантату проти, хазяїна. На додаток, білки представленого винаходу можна також застосовувати для *ex vivo* розвитку моноцитів/макрофагів кісткового мозку або клітин попередників периферійної крові (PBPC). Перед обробкою кістковий мозок можна стимулювати фактором стовбурних клітин (SCF) для вивільнення ранішніх клітин-попередників у периферійну циркуляцію. Ці попередники можна збирати та концентрувати з периферійної крові периферійної крові, а тоді обробляти у культурі *zcytor17lig*, як варіант, у комбінації з одним або більше іншими цитокинами, включаючи але без обмеження SCF, IL-2, IL-4, IL-7, Lf, IL-3, IL-12, IL-21, чи IL-15, для диференціації та проліферації у лімфоїдних культурах високої густини, які можна тоді повернути пацієнту після хемотерапії та трансплантації.

Згідно з представленим винаходом запропоновано спосіб розвитку гематопоетичних клітин та попередники гематопоетичних клітин, що містять культивований кістковий мозок або клітини периферійної крові, з композицією, що містить кількості *zcytor17lig*, достатні для утворення збільшеного числа лімфоїдних клітин у кістковому мозку або периферійних клітин крові у порівнянні з кістковим мозком або периферійними клітинами крові, культивованими при відсутності *zcytor17lig*. В інших втіленнях гематопоетичні клітини та гематопоетичні клітини-попередники є лімфоїдними клітинами. В іншому втіленні лімфоїдні клітини є NK-клітинами або цитотоксичними Т-клітинами. Крім того, композиція може також містити принаймні один інший цитокін, що вибрано з групи, яка складається з IL-2, IL-15, IL-4, Lf, IL-3, IL-12, IL-21, GM-CSF, ліганду Flt3 та фактору стовбурних клітин.

Альтернативно, *zcytor17lig* може активувати імунну систему, що могло б бути важливим при підтримці імунітету до інфекційних хвороб, лікуванні пацієнтів з порушенням імунітету, як-то ВІЛ+ пацієнтів, пацієнтів з раком, або при поліпшенні вакцин. Зокрема, стимулювання *zcytor17lig* або розвитку моноцитів/макрофагів, Т-клітин, В-клітин, NK-клітин, або їх попередників, можливо матиме терапевтичне значення у лікуванні таких інфекцій інгібуванням росту таких інфекційних агентів.

Подібно, стимулювання *zcytor17lig* імунної реакції проти вірусних та невірусних патогенних агентів (включаючи бактерії, найпростіші та гриби) можливо матиме терапевтичне значення у лікуванні таких інфекцій інгібуванням росту таких інфекційних агентів.

Визначення безпосередньо або безпосередньо рівнів патогену або антигену, як-то клітин пухлин, представлених у тілі, можна досягти рядом способів, відомих у рівні техніки та описаних тут.

Представлений винахід включає спосіб стимулювання імунної реакції у ссавця, якого піддавали дії патогену або антигену, спосіб включає етапи: (1) визначення безпосередньо або безпосередньо рівнів патогену або антигену, наявних у вказаному ссавці; (2) вживання композиції, що містить

поліпептид *zcytor17lig* у прийнятному фармацевтичному носії; (3) визначення безпосередньо або безпосередньо рівнів патогену або антигену у вказаному ссавці; та (4) порівняння рівнів патогену або антигену на етапі 1 з рівнями патогену або антигену на етапі 3, де зміна рівнів є індикативною стосовно стимулювання імунної реакції. В іншому втіленні композиція *zcytor17lig* є застосовуваною повторно. В інших втіленнях антиген є В-клітиною пухлин; вірусом; паразитом або бактерією.

За іншим аспектом згідно з представленим винаходом запропоновано спосіб стимулювання імунної реакції у ссавця, якого піддавали дії патогену або антигену, спосіб включає: (1) визначення рівнів антиген- або патоген-специфічного антитіла; (2) вживання композиції, що містить поліпептид *zcytor17lig* у прийнятному фармацевтичному носії; (3) визначення рівнів антиген- або патоген-специфічного антитіла після застосування; (4) порівняння рівнів патогену або антигену на етапі (1) з рівнями патогену або антигену на етапі (3), де збільшення рівнів антитіла є індикативним стосовно стимулювання імунної реакції.

Полінуклеотиди, що кодуєть поліпептиди *zcytor17lig* є корисними у застосуваннях у генній терапії, де є потрібним збільшення або інгібування активності *zcytor17lig*.

Якщо ссавець має мутований або відсутній ген *zcytor17lig*, ген *zcytor17lig* можна вводити у клітини ссавця. В одному втіленні ген, що кодує поліпептид *zcytor17lig*, є уведеним *in vivo* у вірусному векторі. Такі вектори включають послаблений або дефектний ДНК-вірусу, як-то, але без обмеження, вірус герпесу (HSV), вірус папіломи, вірус Епштейна-Барра (EBV), аденовірус, адено-асоційований вірус (AAV), тощо. Дефектні віруси, які повністю або майже повністю втратили вірусні гени, є кращими. Дефектний вірус не є інфекційним після введення у клітину.

Застосування дефектних вірусних векторів дозволяє застосування до клітин у специфічній локалізованій зоні, без остраху, що вектор може інфікувати інші клітини. Приклади конкретних векторів включають, але без обмеження, вектор дефектного вірусу герпесу 1 (HSV1) [Kaplit et al., *Molec. Cells. Neurosci.* 2: 320-30, 1991]; вектор послабленого аденовірусу, як-то вектор, описаний [Stratford-Perricaudet et al., *J. Clin. Invest.* 90: 626-30, 1992]; та вектор дефектного адено-асоційованого вірусу [Samulski et al., *J. Virol.* 61: 3096-101, 1987; Samulski et al., *J. Virol.* 63: 3822-8, 1989].

Ген *zcytor17lig* можна вводити у ретровірусний вектор, наприклад, як описано у [Anderson et al., патент США №5399346; Mann et al. *Cells* 33: 153, 1983; Temin et al., патент США №4650764; Temin et al., патент США №4980289; Markowitz et al., *J. Virol.* 62: 1120, 1988; Temin et al., патент США №5124263; Міжнародна патентна публікація № WO 95/07358, опублікована 16 березня, 1995, Dougherty et al.; та Kuo et al., *Blood* 82: 845, 1993]. Альтернативно, вектор можна вводити ліпофекцією *in vivo*, використовуючи ліпосоми. Синтетичні катіоногенні ліпіди можна застосовувати, отримуючи ліпосоми для трансфекції гена, що кодує маркер, *in vivo* [Feigner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7, 1987; Mackey et al., *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 85: 8027-31, 1988]. Застосування ліпофекції для введення екзогенних генів у конкретні органи *in vivo* має деякі практичні переваги. Молекулярне націлювання ліпосом до конкретних клітин репрезентує одну сферу корисності. Більш конкретно, спрямування трансфекції до конкретних клітин репрезентує одну сферу корисності. Наприклад, спрямування трансфекції до конкретних типів клітин могло б бути особливо переважним у тканині з клітинною гетерогенністю, як-то імунної системи, підшлункової залози, печінки, нирок та мозку.

Ліпіди можуть бути хімічно сполученими з іншими молекулами для цього спрямування.

Спрямовувані пептиди (наприклад, гормони або нейротрансмітери), білки, як-то антитіла, або непептидні молекули можуть бути сполученими з ліпосомами хімічно.

Можливо видаляти цільові клітини з тіла; увести вектор як голу ДНК-плазмиду; та тоді повторно імплантувати трансформовані клітини у тіло. Голі ДНК-вектори для генної терапії можна вводити у потрібні клітини хазяїна способами, відомими у рівні техніки, наприклад, трансфекцією, електропорацією, мікроін'єкцією, трансдукцією, конденсацією клітин, DEAE-декстраном, осадженням кальцій фосфату, застосуванням генної рушниці або застосування транспортеру ДНК-вектору. [Дивись, наприклад, Wu et al., J. Biol. Chem. 267: 963-7, 1992; Wu et al., J. Biol. Chem. 263: 14621-4, 1988].

Антисенсову методологію можна застосовувати для інгібування транскрипції гена *zcytor17lig*, як-то для інгібування проліферації Т-клітин *in vivo*. Полінуклеотиди, що є комплементарними до сегменту *zcytor17lig*, що кодується полінуклеотидом (наприклад, полінуклеотидом, який визначено у SEQ ID NO: 1), сконструйовані таким чином, щоб приєднуватися до мРНК, що кодує *zcytor17lig*, та інгібувати трансляцію такої мРНК. Такі антисенсові полінуклеотиди застосовують для інгібування експресії кодуючих поліпептид *zcytor17lig* генів при культивуванні клітин або у суб'єкті.

Миші, сконструйовані таким чином, щоб експресувати ген *zcytor17lig*, позначені як "трансгенні миші", а миші, що виявляють повну відсутність функції гена *zcytor17lig*, позначені як "нокаутні миші", можуть бути створеними також [Snouwaert et al., Science 257: 1083, 1992; Lowell et al., Nature 366: 740-42, 1993; Capecchi, M. R., Science 244: 1288-1292, 1989; Palmiter, R. D. et al. Annu Rev Genet. 20: 465-499, 1986]. Наприклад, трансгенних мишей, що зверх-експресують *zcytor17lig*, всюди або під впливом тканино-специфічного чи тканино-обмежувального промотору, можна застосовувати для запитання, чи викликає зверх-експресія фенотип. Наприклад, зверх-експресія поліпептиду *zcytor17lig* природного типу, його поліпептидного фрагменту або мутанту може змінювати нормальні клітинні процеси, що призводить до фенотипу, що ідентифікує тканину, в якій експресія *zcytor17lig* є функціонально важливою та може вказувати терапевтичну мету для *zcytor17lig*, його агоністів або антагоністів. Наприклад, кращі трансгенні миші для конструювання є тими, що зверх-експресують *zcytor17lig* (амінокислотні залишки 23-164 SEQ ID NO: 2; або 24-163 SEQ ID NO: 11). Більш того, така зверх-експресія може призводити до фенотипу, що

показує подібність з хворобами людини. Подібно, нокаутних за *zcytor17lig* мишей можна застосовувати для визначення, де *zcytor17lig* є абсолютно потрібним *in vivo*. Фенотип нокаутних мишей є передбачувальним стосовно дії *in vivo* антагоністу *zcytor17lig*, як-то описаного тут, яку він може мати. кДНК *zcytor17lig* людини або миші, описану тут, можна застосовувати для створення нокаутних мишей. Цих мишей можна застосовувати для дослідження гена *zcytor17lig* та білку, кодованого таким чином у системі *in vivo*, та можна застосовувати як моделі *in vivo* для відповідних хвороб людини.

Більш того, експресія трансгенними мишами *zcytor17lig* антисенсових полінуклеотидів або рибозимів, спрямованих проти *zcytor17lig*, описаних тут, можна застосовувати аналогічно трансгенним мишам, описаним вище. Дослідження можна також здійснювати застосуванням очищеного білку *zcytor17lig*.

Експериментальні свідчення підказують роль *zcytor17lig* у розвитку хвороб, в які залучено шкіру або епітелій внутрішніх поверхонь, як-то, наприклад, товстого кишечника, тонкого кишечника, підшлункової залози, легенів, простати, матки, тощо. Спершу, як розкрито тут, рецептори *zcytor17*, включаючи рецептори OSM-бета та *zcytor17*, експресуються у кількох типах клітин, локалізованих у епітеліальній поверхні, включаючи лінії клітин, похідні від легенів епітелію, фібробласту легенів, простати, ободової кишки, молочних залоз, епітелію печінки, епітелію кісток та шкіри, фібробласту кісток, тощо. Більш того, як розкрито тут, приклади від кожного з цих типів клітин також відповідні за активацію *zcytor17lig* репортерного констракту STAT. На додаток, кілька ліній клітин, відповідних за стимулювання *zcytor17lig* продукуванням збільшених рівнів IL-6, IL-8, MCP-1 (хемотактичний фактор), як описано тут. В цілому, ці дані підказують роль *zcytor17lig* при хворобах, в яких залучено епітелій, як-то, наприклад, atopічний дерматит; дерматит; псоріаз; псоріатичний артрит; екзема; гінгівіт; періодонтальна хвороба; запальні хвороби кишечника (IBD) (наприклад, виразковий коліт, хвороба Крона); репродуктивні розлади, як-то, наприклад, дисплазія шийки матки, рак шийки матки; інші хвороби шкіри, подібних типів раку: саркоми; карциноми; меланома, тощо, тобто, не безпосередньо запальні хвороби, оскільки імунну систему включено в активування/лікування типів раку; хвороби, що включають бар'єрну дисфункцію, як-то, наприклад, хвороба трансплантат-проти-хазяїна (GVHD) та синдром подразненого кишечника (IBS); та хвороби, в яких залучено епітелій легенів, як-то астма, емфізема, тощо. На додаток, вивільнення цитокінів IL-6, IL-8 та MCP-1 клітинами, які піддавали дії *zcytor17lig*, підказує, що *zcytor17lig* є включеним у запалення. Тому регуляція *zcytor17lig* може бути корисною у лікуванні автоімунних, запальних, або ракових хвороб, асоційованих з тканинами, що експресують рецептор. Ці хвороби включають, наприклад, простатит, гепатит, остеоартрит, тощо. *Zcytor17lig* може позитивно або негативно безпосередньо або безпосередньо регулювати ці хвороби. Тому застосування *zcytor17lig* можна використовувати

для лікування хвороб, які описано тут безпосередньо або молекулами, що інгібують активність zcytor17lig, включаючи, наприклад, моноклональні антитіла до zcytor17lig, моноклональні антитіла до zcytor17, або моноклональні антитіла, що розпізнають комплекс zcytor17 та рецептору OSM бета.

Дані також підказують, що zcytor17lig може бути включеним у регуляцію опосередкованих Т-клітинами TH2 хвороб. Спершу, zcytor17lig виробляється підкласом TH2 активованих Т-клітин. TH2-клітини експресують більш zcytor17lig у порівнянні з TH1-клітинами. На додаток, принаймні дві епітеліальні лінії клітин легенів (SK-LU-1, A549) було стимульовано для збільшення альфа-2 мРНК рецептору IL13 у реакції на стимулювання ліганду zcytor17, як описано тут. Існує зв'язок ланцюга альфа2 рецептору IL-13 та онкогенезу пухлин молочних залоз та підшлункової залози людини. Це підказує, що zcytor17lig може грати роль при регулюванні онкогенезу цих типів раку, а також інших типів раку. Тому застосування антагоністу zcytor17lig або безпосереднє застосування zcytor17lig може бути корисним у лікуванні цих типів раку, доброякісних або злоякісних та на різних стадіях (стадії I-IV) та фазах (наприклад, виконання способів TNM або AJC) розвитку пухлини, у ссавців, переважно людини.

Добре відомо у рівні техніки, що IL13 залучено у створення активованих TH2-клітин та в опосередкованих TH2 хворобах, як-то астма, atopічний дерматит, тощо. Zcytor17lig або антагоністи zcytor17lig можуть бути корисними у лікуванні хвороб, в які залучено Т-клітини TH2. Це могло б включати хвороби, як-то, наприклад, atopічний дерматит, астму, а також інші хвороби, що загострюються активованими TH2-клітинами. Залучення zcytor17lig при хворобах, як-то, наприклад, atopічний дерматит, є також підтвердженням фенотипом трансгенних мишей, що зверх-експресують zcytor17lig та дають симптоми atopічного дерматиту, як описано тут.

Незважаючи на переважну експресію zcytor17lig TH2-клітинами, існує ще деяка експресія zcytor17lig у TH1-клітинах та у Т-клітинах CD8+. Тому zcytor17lig або його антагоністи можуть бути корисними у лікуванні хвороби, що включають імунomodулювання активованих Т-клітин, включаючи, наприклад, вірусну інфекцію, типи раку, відторгнення трансплантату, тощо.

Zcytor17lig може також бути залученим у розвиток раку. Існує експресія zcytor17 та рецепторів рецептору OSM бета у фібробластах кісток людини при остеосаркомах, фібробластах шкіри людини при меланомі, епітеліальній карциномі ободової кишки, аденокарциномі, епітеліальній аденокарциномі молочних залоз, епітеліальній аденокарциномі простати та епітеліальній аденокарциномі та карциномі легенів. Тому може бути корисним лікувати zcytor17lig, його фрагментами, або антагоністами zcytor17lig пухлини епітеліального походження, які включають, але без обмеження, карциному, аденокарциному та меланому. Однак, zcytor17lig або антагоніст zcytor17lig можна застосовувати для лікування раку, або зменшувати один або більше симптомів раку, раку, включаючи але без обмеження сквамозно-клітинний рак або епідермоїдну

карциному, базально-клітинну карциному, аденокарциному, папілярну карциному, цистаденокарциному, бронхогенну карциному, бронхіальну аденому, меланому, ренально-клітинну карциному, гепатоклітинну карциному, перехідно-клітинну карциному, хоріокарциному, семіному, ембріональну карциному, злоякісну пухлину змішаного походження від слинних залоз, пухлину Вілмса, нерозвинену тератому, тератокарциному та інші пухлини, що містять принаймні деякі клітини епітеліального походження.

Звичайно, дозування застосованого поліпептиду zcytor17lig (або аналогу чи конденсованого білку zcytor17) змінюватиметься залежно від таких факторів як пацієнтів віку, маси, росту, статі, загального медичного стану та попередньої медичної історії.

Звичайно бажано забезпечувати реципієнта дозуванням поліпептиду zcytor17lig у межах приблизно від 1пг/кг до 10мг/кг (кількість засобу/маса тіла пацієнта), хоча нижче або вище дозування також можна застосовувати, за необхідністю. Фахівець може легко визначити таке дозування та встановити його, використовуючи способи, відомі у рівні техніки.

Застосування поліпептиду zcytor17lig до суб'єкту може бути місцевим, інгаляційним, внутрішньовенним, інтраартеріальним, інтраперитональним, внутрішньом'язовим, підшкірним, інтраплевральним, інтратекальним, впливанням через регіональний катетер, або безпосередньою ін'єкцією в ураження. При вживанні терапевтичних білків ін'єкцією застосування може бути постійною інфузією або одиничним або багаторазовими болюсами.

Додаткові шляхи застосування включають пероральний, слизово-мембранний, легеневий, та підшкірний. Пероральне введення є підходящим для поліестерних мікросфер, зеїнових мікросфер, протеїноїдних мікросфер, поліціаноакрилатних мікросфер та систем на основі ліпідів [дивись, наприклад, DiBase та Morrei, «Oral Delivery of Microencapsulated Proteins», in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders & Hendren (eds.), стор.255-288 (Plenum Press 1997)]. реальність інтраназальної доставки представлено таким режимом застосування інсуліну [дивись, наприклад, Hinchcliffe та Ilium, Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 199 (1999)]. Сухі або рідкі частинки, що містять zcytor17lig можна отримувати та вдихати за допомогою сухого диспергаторів порошку, генераторів рідких аерозолів, або розапилювачів [наприклад, Pettit та Gombotz, TIBTECH16: 343 (1998); Patton et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 235 (1999)]. Цей підхід ілюстровано системою лікування діабету AERX, оскільки є ручний електронний інгалятор, що доставляє аерозольний інсулін у легені. Дослідження показали, що білки, величиною 48000кДа проходять через шкіру при терапевтичній концентрації за допомогою низько-частотного ультразвуку, що ілюструє реальність кризьшкірного застосування [Mitragotri et al., Science 269: 850 (1995)].

Кризьшкірна доставка, використовуючи електропорацию, забезпечує інші засоби застосування молекул, що мають активність стосовно приєднання zcytor17lig [Potts et al., Pharm. Biotechnol. 10:

213(1997)].

Фармацевтичну композицію, що містить білок, поліпептид, або пептид, що мають активність стосовно приєднання *zcytor17lig*, можна утворювати згідно з відомими способами, отримуючи фармацевтично корисні композиції, для чого терапевтичні білки комбінують у суміші з фармацевтично прийнятним носієм. Композиція має «фармацевтично прийнятний носій» якщо її застосування може бути толерантним для пацієнта. Стерильний буферований фосфатом сольовий розчин є одним прикладом фармацевтично прийнятного носія. Інші підхожі носії є добре відомі у рівні техніки. [Дивись, наприклад, Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995)].

Для цілей терапії молекули, що мають активність стосовно приєднання *zcytor17lig* та фармацевтично прийнятний носій застосовують до пацієнта у терапевтично ефективній кількості. Комбінацію білку, поліпептиду або пептиду, що мають активність стосовно приєднання та фармацевтично прийнятного носія, призначають для застосування у «терапевтично ефективній кількості» якщо застосовані кількості є фізіологічно значущими. Засіб є фізіологічно значущим якщо його наявність призводить до виявлюваних змін у фізіології пацієнта. Наприклад, засіб, застосовуваний для лікування запалення, є фізіологічно значущим, якщо його наявність полегшує принаймні частину запальної реакції.

Фармацевтична композиція, що містить *zcytor17lig* (або аналог чи конденсований білок *zcytor17lig*) може бути отриманою у рідкій формі, у аерозолі, або у твердій формі. Рідкі форми ілюстровано розчинами для ін'єкцій, аерозолями, краплями, топологічними розчинами та пероральними суспензіями. Типові тверді форми включають капсули, таблетки та форми з контрольованим вивільненням. Останню форму ілюстровано мініосмотичними насосами та імплантатами [Bremer et al., *Pharm. Biotechnol.* 10: 239-(1997); Ranade, «Implants in Drug Delivery, у «Drug Delivery Systems, Ranade & Hollinger (eds.), стор.95-123 (CRC Press 1995); Bremer et al., Protein Delivery with Infusion Pumps, у «Protein Delivery: Physical Systems, Sanders та Hendren (eds.), стор.239-254 (Plenum Press 1997); Yewey et al., «Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant, у «Protein Delivery: Physical Systems, Sanders та Hendren (eds.), стор.93-117 (Plenum Press 1997)]. Інші тверді форми включають креми, пасту, інші топологічні засоби, тощо.

Ліпосоми забезпечують один засіб доставки терапевтичних поліпептидів до суб'єкту внутрішньовенно, інтраперитонально, інтратекально, внутрішньом'язово, підшкірно, або пероральним застосуванням, інгаляцією, або інтраназальним застосуванням. Ліпосоми є мікроскопічними везикулами, що складаються з одного або більше ліпідних бішарів оточуючих водні частини [дивись, звичайно, Bakker-Woudenberg et al., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suppl. 1): S61 (1993), Kim, *Drug* 46: 618 (1993) та Ranade, Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers, у «Drug Delivery Systems, Ranade & Hollinger (eds.), стор.3-

24 (CRC Press 1995)]. Ліпосоми у композиції є подібними до клітинних мембран та як результат, ліпосоми можна застосовувати безпечно і вони здатні до біорозкладання. Залежно від способу отримання ліпосоми можуть бути моношаруватими чи багатошаруватими і можуть змінюватися у розмірі за діаметром в межах від 0,02м до більше 10мкм. Різні засоби можуть бути інкапсульованими у ліпосоми: гідрофобні засоби розподіляють у бішарах, а гідрофільні засоби розподіляють у внутрішній водній порожнині [дивись, наприклад, Machy et al., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987) та Ostro et al., *American J. Hosp. Pharm.* 46: 1576 (1989)]. Більш того, можливо контролювати терапевтичну придатність інкапсульованого засобу зміною розміру ліпосом, числа бішарів, композиції ліпиду, а також заряду та характеристик поверхні ліпосом.

Ліпосоми можуть поглинатися практично будь-яким типом клітин, а тоді повільно вивільняти інкапсульований засіб. Альтернативно, поглинута ліпосома може бути ендцитозованою клітинами, що є фагоцитними. Ендцитоз супроводжується інтралізосомальним розкладанням ліпосоміальних ліпідів та вивільненням інкапсульованих засобів [Scherphof et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 446: 368 (1985)]. Після внутрішньовенного застосування невеликі ліпосоми (0,1-1,0мкм) звичайно поглинаються клітинами ретикулоендотеліальної системи, локалізованої головним чином у печінці та селезінці, приймаючи до уваги, що ліпосоми більші за 3,0мкм осідають у легенях. Це краще поглинання менших ліпосом клітинами ретикулоендотеліальної системи застосовують для доставки хемотерапевтичних засобів до макрофагів та пухлин печінки.

Ретикулоендотеліальну систему можна обв'язати кількома способами, включаючи насичення великими дозами ліпосомних частинок, або селективною інактивацією макрофагів фармакологічними засобами [Claassen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 802: 428 (1984)]. На додаток, інкорпорація гліколіпідів або поліетиленгліколь-дериватизованих фосфоліпідів ліпосомні мембрани, як показано, призводить до значного зменшення поглинання ретикулоендотеліальною системою [Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1068: 133 (1991); Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1150: 9 (1993)].

Ліпосоми можна також отримувати для досягнення конкретних клітин або органів змінною фосфоліпідною композицією або вставкою рецепторів або лігандів у ліпосоми. Наприклад, ліпосоми, отримані з високим вмістом неіоногенного сурфактанту, застосовані для досягнення печінки [Hayakawa et al., *Japanese Patent* 04- 244, 018; Kato et al., *Biol. Pharm. Bull.* 16: 960 (1993)]. Ці композиції отримували змішуванням фосфатидилхоліну сої, токоферолу та етоксифікованої гідрованої рицинової олії (HCO-60) у метанолі, концентрацією суміші у вакуумі, а тоді перерозчиненням суміші водою. Ліпосомальну композицію дипальмітоїлфосфатидилхоліну (DPPC) з похідною від сої стерилглюкозидною сумішшю (SG) та холестеринном (Ch) також запропоновано для досягнення печінки [Shimizu et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20: 881 (1997)].

Альтернативно, до поверхні ліпосом можуть

бути приєднаними різні цільові ліганди, як-то анти-тіла, фрагменти антитіл, вуглеводи, вітаміни та транспортні білки. Наприклад, ліпосоми можна модифікувати розгалуженими типами галактозил-ліпідних похідних для досягнення рецепторів азіало-глікобілку (галактоза), які є виключно експресованими на поверхні клітин печінки [Kato та Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14: 287 (1997); Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20: 259 (1997)].

Подібно, [Wu et al., *Hepatology* 27: 772 (1998)], показали, що мічені ліпосоми з азіало-фетуїном дають скорочений час напівперетворення ліпосом у плазмі та дуже посилюватимуть поглинання мічених азіалофетуїном ліпосом гепатоцитами. З іншого боку, гепатичну акумуляцію ліпосом, що містять галактозилліпідні похідні розгалуженого типу, можна інгібувати попередньою ін'єкцією азіалофетуїну [Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20: 259 (1997)]. Поліаконітизовані сироваточним альбуміном людини ліпосоми забезпечують інший підхід для доставки ліпосом до клітин печінки [Kamps et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11681 (1997)]. Більш того, [Geho, et al. патент США №4603044], описують гепатоцит-спрямовану систему доставки ліпосомних везикул, яка має специфічність стосовно гепатобілярних рецепторів, асоційованих зі спеціалізованими метаболічними клітинами печінки.

У більш загальному підході для тканинного націлювання, цільові клітин попередньо мітять біотинілованими антитілами, специфічними для ліганду, експресованого цільовою клітиною [Harasym et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32: 99 (1998)]. Після видалення з плазми вільного антитіла, застосовують стрептавідин-сполучені ліпосоми. У іншому підході цільові антитіла є безпосередньо приєднаними до ліпосом [Harasym et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32: 99 (1998)].

Поліпептиди, що мають активність стосовно приєднання, можуть бути інкапсульованими у ліпосоми, використовуючи стандартні способи мікрокапсуляції білку [дивись, наприклад, Anderson et al., *Infect. Immun.* 31: 1099 (1981), Anderson et al., *Cancer Res.* 50: 1853 (1990) та Cohen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1063: 95 (1991), Alving et al. *Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies*, у *Liposome Technology*, 2nd Edition, Vol III, Gregoriadis (ed.), стор.317 (CRC Press 1993), Wassef et al., *Meth. Enzymol.* 149: 124 (1987)]. Як вищезазначено, терапевтично корисні ліпосоми можуть містити різні компоненти. Наприклад, ліпосоми можуть містити ліпідні похідні поліетиленгліколю [Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1150: 9 (1993)].

Здатні до розкладання полімерні мікросфери створено для підтримки високих системних рівнів терапевтичних білків. Мікросфери отримують з здатних до розкладання полімерів, як-то полі(лактид-ко-гліколід) (PLG), поліангідридів, поліортоестерів, нездатних до біорозкладання етилвінілацетатних полімерів, в яких білки є оточеними полімером [Gombotz та Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6: 332 (1995); Ranade, *Role of Polymers in Drug Delivery*, у *Drug Delivery Systems*, Ranade та Hollinger (eds.), стор.51-93 (CRC Press 1995);

Roskos та Maskiewicz, *Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery*, у *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders та Henden (eds.), стор.45-92 (Plenum Press 1997); Bartus et al., *Science* 281: 1161 (1998); Putney та Burke, *Nature Biotechnology* 16: 153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 548 (1998)]. Покриті поліетиленгліколем (ПЕГ) наносфери можуть також забезпечувати носії для внутрішньовенного застосування терапевтичних білків [дивись, наприклад, Gref et al., *Pharm. Biotechnol.* 10: 167 (1997)].

Представлений винахід також розглядає хімічно модифіковані поліпептиди, що мають активність зcytor17lig, як-то поліпептид зcytor17lig, агоністи зcytor17lig та антагоністи зcytor17lig, наприклад, антитіла анти-zcytor17lig, де поліпептид з'єднано з полімером, як обговорено вище.

Інші форми дозування можуть бути розроблені фахівцем, як показано, наприклад, [Ansel та Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995) та Ranade та Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996)].

Як ілюстрація, фармацевтичні композиції можуть бути доставленими як комплект, що містить контейнер, який містить поліпептид зcytor17lig або антагоніст зcytor17lig (наприклад, антитіло або фрагмент антитіла, що приєднано до поліпептиду зcytor17lig).

Терапевтичні поліпептиди можуть бути запропонованими у формі розчину для ін'єкції одиничних або багатократних доз, або як стерильний порошок, що слід відтворювати перед ін'єкцією. Альтернативно, такий комплект може включати диспергатор сухого порошку, генератор рідкого аерозолу, або розпилювач для застосування терапевтичного поліпептиду. Такий комплект може крім того містити письмову інформацію на показання та використання фармацевтичної композиції. Більш того, така інформація може включати зауваження, що композиція зcytor17lig є протипоказаною у пацієнтів з відомою гіперчутливістю до зcytor17lig.

За одним аспектом згідно з представленим винаходом запропоновано виділений поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, що є принаймні на 90% ідентична послідовності амінокислотних залишків, які вибрано з групи, що складається з: (a) поліпептиду, показаного від залишку 38 (Val) до 152 (Leu), як показано у SEQ ID NO: 2; (b) поліпептиду, показаного від залишку 27 (Leu) до 164 (Thr), як показано у SEQ ID NO: 2; (c) поліпептиду, показаного від залишку 24 (Thr) до 164 (Thr), як показано у SEQ ID NO: 2; та (d) поліпептиду, показаного від залишку 1 (Met) до 164 (Thr), як показано у SEQ ID NO: 2. В одному втіленні виділений поліпептид, розкритий вище, а амінокислотні залишки 73, 133 та 147 є цистеїном. В іншому втіленні виділений поліпептид, розкритий вище, приєднує рецептор зcytor17, як показано у SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 71. В іншому втіленні виділений поліпептид містить принаймні 14 суміжних амінокислотних залишків SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 11. В іншому втіленні виділений полі-

пептид розкрито вище, а амінокислотні залишки вибирають з групи, що складається з: (а) амінокислотних залишків 38-52 SEQ ID NO: 2; (b) амінокислотних залишків 83-98 SEQ ID NO: 2; (c) амінокислотних залишків 104-117 SEQ ID NO: 2; та (d) амінокислотних залишків 137-152 SEQ ID NO: 2.

За другим аспектом згідно з представленим винаходом запропоновано конденсований білок, що містить принаймні чотири поліпептиди, де порядок поліпептидів від N-закінчення до C-закінчення такий: перший поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків 38-52 SEQ ID NO: 2; перший спейсер з 6-27 амінокислотних залишків; другий поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи, що складається з: (а) Амінокислотних залишків спіралі В IL-2 SEQ ID NO: 168; (b) Амінокислотних залишків спіралі В IL-4 65-83 SEQ ID NO: 164; (c) Амінокислотних залишків спіралі В IL-3 73-86 SEQ ID NO: 102; (d) Амінокислотних залишків спіралі В GM-CSF 72-81 SEQ ID NO: 166; та (e) амінокислотних залишків 83-98 SEQ ID NO: 2; другий спейсер з 5-11 амінокислотних залишків; третій поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи, що складається з: (а) Амінокислотних залишків спіралі С IL-2 102-116 SEQ ID NO: 162; (b) Амінокислотних залишків спіралі CIL-4 94-118 SEQ ID NO: 164; (c) Амінокислотних залишків спіралі С IL-3 91-103 SEQ ID NO: 102; (d) Амінокислотних залишків спіралі С GM-CSF 85-103 SEQ ID NO: 166; та (e) амінокислотних залишків 104-117 SEQ ID NO: 2; третій спейсер з 3-29 амінокислотних залишків; та четвертий поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи, що складається з: (а) Амінокислотних залишків спіралі D IL-2 134-149 SEQ ID NO: 162; (b) Амінокислотних залишків спіралі D IL-3 123-141 SEQ ID NO: 102; (c) Амінокислотних залишків спіралі D IL-4 133-151 SEQ ID NO: 164; (d) Амінокислотних залишків спіралі D GM-CSF 120-131 SEQ ID NO: 166; та (e) амінокислотних залишків 137-152 SEQ ID NO: 2.

За третім аспектом згідно з представленим винаходом запропоновано конденсований білок, що містить принаймні чотири поліпептиди, де порядок поліпептидів від N-закінчення до C-закінчення такий: перший поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи, що складається з: (а) Амінокислотних залишків спіралі А IL-2 27-48 SEQ ID NO: 162; (b) Амінокислотних залишків спіралі А IL-4 30-42 SEQ ID NO: 164; (c) Амінокислотних залишків спіралі А IL-3 35-45 SEQ ID NO: 102; (d) Амінокислотних залишків спіралі А GM-CSF 30-44 SEQ ID NO: 166; та (e) амінокислотних залишків 38-52 SEQ ID NO: 2; перший спейсер з 6-27 амінокислотних залишків; другий поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи, що складається з: (а) Амінокислотних залишків спіралі В IL-2 SEQ ID NO: 168; (b) Амінокислотних залишків спіралі В IL-4 65-83 SEQ ID NO: 164; (c) Амінокислотних залишків спіралі В IL-3 73-86 SEQ ID NO: 102; (d) Амінокислотних залишків спіралі В GM-CSF 72-81 SEQ ID NO: 166; та (e) амінокислотних залишків 83-98 SEQ ID NO: 2; другий спейсер з 5-11 амінокислотних залишків; третій поліпептид,

що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи, що складається з: (а) Амінокислотних залишків спіралі С IL-2 102-116 SEQ ID NO: 162; (b) Амінокислотних залишків спіралі С IL-4 94-118 SEQ ID NO: 164; (c) Амінокислотних залишків спіралі С IL-3 91-103 SEQ ID NO: 102; (d) Амінокислотних залишків спіралі С GM-CSF 85-103 SEQ ID NO: 166; та (e) амінокислотних залишків 104-117 SEQ ID NO: 2; третій спейсер з 3-29 амінокислотних залишків; та четвертий поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи, що складається з амінокислотних залишків 137-152 SEQ ID NO: 2. В іншому втіленні конденсований білок, що розкрито вище, має четвертий поліпептид, що містить амінокислотні залишки 137-152 SEQ ID NO: 2.

За іншим аспектом згідно з представленим винаходом запропоновано виділену полінуклеотидну молекулу, що містить послідовність нуклеотидів, що кодують поліпептид, який розкрито вище. В одному втіленні виділений полінуклеотид розкрито вище, причому нуклеотиди вибирають з групи, що складається з: (а) полінуклеотиду, який показано у SEQ ID NO: 1 від нуклеотиду 139 до нуклеотиду 483; (b) полінуклеотиду, який показано у SEQ ID NO: 1 від нуклеотиду 106 до нуклеотиду 519; (c) полінуклеотиду, який показано у SEQ ID NO: 1 від нуклеотиду 97 до нуклеотиду 519; та (d) полінуклеотиду, який показано у SEQ ID NO: 1 від нуклеотиду 28 до нуклеотиду 519.

За іншим аспектом згідно з представленим винаходом запропоновано виділену полінуклеотидну молекулу, що містить послідовність нуклеотидів, що кодують поліпептид, який розкрито тут.

За іншим аспектом згідно з представленим винаходом запропоновано вектор експресії, що містить такі операбельно приєднані елементи: (а) промотор транскрипції; (b) сегмент ДНК, що кодує поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи, що складається з: (i) амінокислотних залишків 38-52 SEQ ID NO: 2; (ii) амінокислотних залишків 83-98 SEQ ID NO: 2; (iii) амінокислотних залишків 104-117 SEQ ID NO: 2; (iv) амінокислотних залишків 137-152 SEQ ID NO: 2; та (v) їх комбінацій; та (c) термінатору транскрипції.

За іншим аспектом згідно з представленим винаходом запропоновано вектор експресії, що містить такі операбельно приєднані елементи: (а) промотор транскрипції; (b) сегмент ДНК, що кодує поліпептид, що містить послідовність амінокислотних залишків, яка принаймні на 90% ідентична залишкам 38 (Val) - 152 (Leu), які показано у SEQ ID NO: 2; та (c) термінатору транскрипції. В одному втіленні вектор експресії, що розкрито вище, містить такі операбельно приєднані елементи: (а) промотор транскрипції; (b) сегмент ДНК, що кодує поліпептид, що містить амінокислотні залишки 38 (Val) - 152 (Leu) SEQ ID NO: 2; та (c) термінатору транскрипції.

За іншим аспектом згідно з представленим винаходом запропоновано культивовану клітину, що містить вектор експресії, який розкрито вище.

За іншим аспектом згідно з представленим винаходом запропоновано спосіб продукування білку, що полягає у культивуванні клітини, яку розкрито

вище, в умовах, де експресується сегмент ДНК; а виділений білок кодовано сегментом ДНК.

За іншим аспектом згідно з представленим ви-находом запропоновано спосіб продукування антитіла до поліпептиду zcytor17lig, що полягає в інокуляції тварини поліпептидом, вибраним з групи, що складається з: (а) поліпептиду, що складається з 9-141 амінокислот, де поліпептид є ідентичним суміжній послідовності амінокислотних залишків у SEQ ID NO: 2 з амінокислот під номером 24 (Ser) до амінокислоти під номером 164 (Thr); поліпептиду, який розкрито вище; (с) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 з амінокислот під номером 38-52; (d) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 з амінокислот під номером 83-98; (е) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 з амінокислот під номером 104-117; (f) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 з амінокислот під номером 137-152; (g) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 з амінокислот під номером 38-152; (h) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 з амінокислот під номером 24-164; (с) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 з амінокислот під номером 38-52; (d) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 з амінокислот під номером 85-98; (е) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 з амінокислот під номером 104-118; (f) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 з амінокислот під номером 141-157; (g) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 з амінокислот під номером 38-157; (h) поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11 з амінокислот під номером 24-163; (i) поліпептиду, що містить антигенний епітоп згідно з профілем гідрофільності Хоппа/Вудса SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO 11, причому профіль базується на ковзному шести-залишковому вікні. Сховані залишки G, S та T та відкриті залишки H, Y та W ігнорували; а поліпептид викликає імунну реакцію у тварини для утворення антитіла; та виділення антитіла з тварини.

За іншим аспектом згідно з представленим ви-находом запропоновано антитіло (наприклад, нейтралізуюче антитіло), продуковане способом, який розкрито вище, причому антитіло приєднується до поліпептиду SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 11. В одному втіленні антитіло, розкрито вище, специфічно приєднується до поліпептиду, показаного у SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 11.

За іншим аспектом згідно з представленим ви-находом запропоновано спосіб стимулювання імунної реакції у ссавця, якого піддавали дії патогену або антигену, спосіб включає етапи: (1) визначення безпосередньо або не безпосередньо рівнів патогену або антигену, наявних у вказаному ссавці; (2) вживання композиції, що містить поліпептид zcytor17lig у прийнятному фармацевтичному носії; (3) визначення безпосередньо або не безпосередньо рівнів патогену або антигену у вказаному ссавці; та (4) порівняння рівнів патогену або антигену на етапі 1 з рівнями патогену або антигену на етапі

3, де зміна рівнів є індикативною стосовно стимулювання імунної реакції.

В одному втіленні спосіб стимулювання імунної реакції у ссавця, що розкрито вище, крім того включає: (5) повторне вживання композиції, що містить поліпептид zcytor17lig у прийнятному фармацевтичному носії; (6) визначення безпосередньо або не безпосередньо рівнів патогену або антигену у вказаному ссавці; та (7) порівняння рівнів патогену або антигену на етапі 1 з рівнями антигену етапі 6, де зміна рівнів є індикативною стосовно стимулювання імунної реакції.

За іншим аспектом згідно з представленим ви-находом запропоновано спосіб розвитку гематопоетичних клітин та попередників гематопоетичних клітин, який полягає у культивуванні кісткового мозку або периферійних клітин крові з композицією, що містить кількість zcytor17lig, достатню для збільшення числа лімфоїдних клітин у кістковому мозку або периферійних клітинах крові у порівнянні з кістковим мозком або периферійними клітинами крові, культивованими при відсутності zcytor17lig. В одному втіленні спосіб розвитку гематопоетичних клітин та попередників гематопоетичних клітин розкрито вище, причому гематопоетичні клітини та гематопоетичні клітини-попередники є лімфоїдними клітинами. В іншому втіленні спосіб розвитку гематопоетичних клітин та попередників гематопоетичних клітин розкрито вище, причому лімфоїдні клітини є клітинами моноцитів, макрофагів або Т-клітинами.

За іншим аспектом згідно з представленим ви-находом запропоновано спосіб стимулювання імунної реакції у ссавця, якого піддавали дії патогену або антигену, спосіб включає: (1) визначення рівня антиген- або патоген-специфічного антитіла; (2) вживання композиції, що містить поліпептид zcytor17lig у прийнятному фармацевтичному носії; (3) визначення рівнів антиген- або патоген-специфічного антитіла після застосування; (4) порівняння рівнів патогену або антигену на етапі (1) з рівнями патогену або антигену на етапі (3), де збільшення рівнів антитіла є індикативним стосовно стимулювання імунної реакції.

За іншим аспектом згідно з представленим ви-находом запропоновано спосіб визначення наявності РНК zcytor17lig у біологічному зразку, що включає етапи: (а) контактування зонду нуклеїнової кислоти zcytor17lig в умовах гібридизації з (i) тест-молекулами РНК, виділеними з біологічного зразку, або (ii) молекулами нуклеїнової кислоти, синтезованими з виділених молекул РНК, де зонд має нуклеотидну послідовність, що містить частину нуклеотидної послідовності молекули нуклеїнової кислоти, яку розкрито вище, або її компонент та (b) визначення утворення гібридів зонду нуклеїнової кислоти та тест-молекул РНК або синтезованих молекул нуклеїнової кислоти, де наявність гібридів показує наявність РНК zcytor17lig у біологічному зразку.

За іншим аспектом згідно з представленим ви-находом запропоновано спосіб визначення наявності zcytor17lig у біологічному зразку, що включає етапи: (а) контактування біологічного зразку з антитілом або фрагментом антитіла, яке розкрито вище, де контактування проводять в умовах, що

дозволяють приєднання антитіла або фрагменту антитіла до біологічного зразку та (b) визначення будь-чого з приєднаного антитіла або приєднаного фрагменту антитіла.

Згідно з іншим аспектом винаходу запропоновано спосіб знищення ракових клітин, що полягає в отриманні *ex vivo* тканини або біологічного зразку, що містять ракові клітини від пацієнта, або ідентифікуванні ракових клітин *in vivo*; продукуванні поліпептиду способом, який розкрито тут; формуванні поліпептиду у фармацевтично прийнятному наповнювачі; та вживанні пацієнтом або піддаванні ракових клітин дії поліпептиду; причому поліпептид знищує клітини. В одному втіленні спосіб знищення ракових клітин, який розкрито вище, є способом, де поліпептид є крім того сполученим з токсином. В одному втіленні антитіло, що розкрито вище, є антитілом, яке вибирають з групи, яка складається з: (a) поліклонального антитіла, (b) мишачого моноклонального антитіла, (c) олюдненого антитіла, похідного від (b), (d) фрагменту антитіла та (e) моноклонального антитіла людини.

Згідно з іншим аспектом винаходу запропоновано антитіло або фрагмент антитіла, що специфічно приєднується до поліпептиду, що містить послідовність амінокислотних залишків, які вибрано з групи, що складається з: (a) поліпептиду, показаного від залишку 38 (Val) до 152 (Leu), як показано у SEQ ID NO: 2; (b) поліпептиду, показаного від залишку 27 (Leu) до 164 (Thr), як показано у SEQ ID NO: 2; (c) поліпептиду, показаного від залишку 24 (Thr) до 164 (Thr), як показано у SEQ ID NO: 2; та (d) поліпептиду, показаного від залишку 1 (Met) до 164 (Thr), як показано у SEQ ID NO: 2. В іншому втіленні антитіло розкрито вище, причому антитіло крім того містить радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінісцентний маркер, пептидний придатак, магнітну частинку, ліки або токсин.

Згідно з іншим аспектом винаходу запропоновано спосіб інгібування індукованої *zcytor17lig* проліферації або диференціації гематопоетичних клітин та попередників гематопоетичних клітин, який полягає у культивуванні кісткового мозку або периферійних клітин крові з композицією, що містить кількість антитіла, яке розкрито тут, достатню для зменшення проліферації або диференціації гематопоетичних клітин у кістковому мозку або периферійних клітинах крові у порівнянні з кістковим мозком або периферійними клітинами крові, культивованими при відсутності розчинного рецептору цитокіну. В одному втіленні спосіб інгібування індукованої *zcytor17lig* проліферації або диференціації гематопоетичних клітин та попередників гематопоетичних клітин розкрито вище, причому гематопоетичні клітини та гематопоетичні клітини-попередники є лімфоїдними клітинами. В іншому втіленні спосіб інгібування індукованої *zcytor17lig* проліферації або диференціації гематопоетичних клітин та попередників гематопоетичних клітин розкрито вище, причому лімфоїдні клітини є макрофагами або Т-клітинами.

Згідно з іншим аспектом винаходу, запропоновано спосіб зменшення індукованого *zcytor17Ug* запалення, що полягає у вживанні ссавцем із запаленням кількості композиції антитіла як розкрито

тут, достатньої для зменшення запалення.

Згідно з іншим аспектом винаходу запропоновано спосіб пригнічення запальної реакції у ссавця з запалення, що включає: (1) визначення рівня запальної молекули; (2) вживання композиції, що містить антитіло, яке розкрито тут, у прийнятному фармацевтичному наповнювачі; (3) визначення рівня запальної молекули після застосування; (4) порівняння рівня запальної молекули на етапі (1) з рівнем запальної молекули на етапі (3), причому відсутність збільшення або зменшення рівня запальної молекули є індикативним стосовно пригнічення запальної реакції. В одному втіленні антитіло розкрито вище, причому антитіло крім того містить радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінісцентний маркер, пептидний придатак, магнітну частинку, ліки або токсин.

Згідно з іншим аспектом винаходу запропоновано спосіб інгібування індукованої *zcytor17lig* проліферації або диференціації гематопоетичних клітин та попередників гематопоетичних клітин, який полягає у культивуванні кісткового мозку або периферійних клітин крові з композицією, що містить кількість антитіла, яке розкрито тут, достатню для зменшення проліферації або диференціації гематопоетичних клітин у кістковому мозку або периферійних клітинах крові у порівнянні з кістковим мозком або периферійними клітинами крові, культивованими при відсутності розчинного рецептору цитокіну. В одному втіленні спосіб інгібування індукованої *zcytor17lig* проліферації або диференціації гематопоетичних клітин та попередників гематопоетичних клітин розкрито вище, причому гематопоетичні клітини та гематопоетичні клітини-попередники є лімфоїдними клітинами. В іншому втіленні спосіб інгібування індукованої *zcytor17lig* проліферації або диференціації гематопоетичних клітин та попередників гематопоетичних клітин розкрито вище, причому лімфоїдні клітини є макрофагами або Т-клітинами.

Згідно з іншим аспектом винаходу запропоновано спосіб зменшення індукованого *zcytor17lig* запалення, що полягає у вживанні ссавцем із запаленням кількості композиції антитіла, яке розкрито тут, достатньої для зменшення запалення.

Згідно з іншим аспектом винаходу запропоновано спосіб пригнічення запальної реакції у ссавця із запаленням, що містить: (1) визначення рівня запальної молекули; (2) вживання композиції, що містить антитіло, яке розкрито тут, у прийнятному фармацевтичному наповнювачі; (3) визначення рівня запальної молекули після застосування; (4) порівняння рівня запальної молекули на етапі (1) з рівнем запальної молекули на етапі (3), причому відсутність збільшення або зменшення рівня запальної молекули є індикативним стосовно запальної реакції.

Згідно з іншим аспектом винаходу запропоновано спосіб лікування ссавця, потерпаючого від запальної хвороби, в як *zcytor17lig* грає роль, що включає: застосування антагоністу *zcytor17lig* до ссавця таким чином, щоб зменшити запалення, де антагоніст вибирають з групи, що складається з антитіла або зв'язувального поліпептиду, що специфічно приєднує поліпептид або поліпептидний

фрагмент zcytor17lig (SEQ ID NO: 2). В одному втіленні спосіб лікування ссавця, потерпаючого від запальної хвороби, розкрито вище, причому хворобою є хронічна запальна хвороба. В іншому втіленні спосіб лікування ссавця, потерпаючого від запальної хвороби, розкрито вище, причому хворобою є хронічна запальна хвороба, яку вибрано з групи: запальна хвороба кишечника; виразковий коліт; хвороба Крона; атопічний дерматит; екзема; та псоріаз. У наступному втіленні спосіб лікування ссавця, потерпаючого від запальної хвороби, розкрито вище, причому хворобою є гостра запальна хвороба вибрано з групи, що складається з: ендотоксемія; септицемії; синдром токсичного шоку; та інфекційних хвороб. В іншому втіленні спосіб лікування ссавця, потерпаючого від запальної хвороби, розкрито вище, причому антитіло крім того містить радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, пептидний придатак, магнітну частинку, ліки, або токсин.

Згідно з іншим аспектом винаходу запропоновано спосіб визначення запалення у пацієнта, що включає: отримання тканини або біологічного зразку від пацієнта; інкубування тканини або біологічного зразку з антитілом, яке розкрито тут, в умовах, де антитіло приєднується до комплементарного йому поліпептиду у тканині або біологічному зразку; візуалізування приєднання антитіла у тканині або біологічному зразку; та порівняння рівня приєднання антитіла у тканині або біологічному зразку від пацієнта з нормальними контрольною тканиною або біологічним зразком, де збільшення рівня приєднання антитіла до тканини або біологічного зразку пацієнта відносно нормальної контрольної тканини або біологічного зразку, є індикативним стосовно запалення у пацієнта.

Згідно з іншим аспектом винаходу запропоновано спосіб визначення запалення у пацієнта, що включає: отримання тканини або біологічного зразку від пацієнта; мічення по-лінуклеотиду, що містить принаймні 14 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 1 або комплементу SEQ ID NO: 1; інкубування тканини або біологічного зразку в умовах, де полінуклеотид гібридизуватиметься з комплементарною полінуклеотидною послідовністю; візуалізування міченого полінуклеотиду у тканині або біологічному зразку; та порівняння рівня гібридизації міченого полінуклеотиду у тканині або біологічному зразку від пацієнта з нормальними контрольною тканиною або біологічним зразком, де збільшення гібридизації міченого полінуклеотиду з тканиною або біологічним зразком пацієнта відносно нормальної контрольної тканини або біологічного зразку, є індикативним стосовно запалення у пацієнта.

Винахід далі ілюстровано наступними необмежувальними прикладами.

Приклади

Приклад 1

Створення химери MPL-поліпептиду zcytor17lig: зовнішньоклітинний MPL та ТМ домен,

конденсований з внутрішньоклітинним сигнальним доменом zcytor17 5'зовнішньоклітинний домен мишачого рецептору MPL виділяли з плазміди, що містить мишачий рецептор MPL (плазміда PHZ1/MPL) розщепленням EcoRI та BamHI, створюючи фрагмент розміром 1164 по. Розщеплення провадили на 1% агаровому гелі та фрагмент виділяли, використовуючи комплект гель-екстракції Qiaquick (Qiagen) за інструкціями виробника. Залишок зовнішньоклітинного домену MPL та трансмембранний домен створювали, використовуючи PCR з праймерами ZC6, 673 (SEQ ID NO: 13) та ZC29, 082 (SEQ ID NO: 14). Умови реакції були такими: 15 циклів при 94°C протягом 1 хвилини, 55°C протягом 1 хвилини, 72°C протягом 2 хвилин, а потім 72°C протягом 7 хвилин; тоді вимочування при 4°C. PCR-продукт пропускали через 1% агаровий гель та приблизно 400 по MPL рецептор фрагмент виділяли, використовуючи комплект гель-екстракції Qiaquick (Qiagen) за інструкціями виробника.

Внутрішньоклітинний домен zcytor17 людини виділяли з плазміди, що містить рецептор zcytor17 кДНК #23/pCAP), використовуючи PCR з праймерами ZC29, 083 (SEQ ID NO: 15) та ZC29, 145 (SEQ ID NO: 16). Полінуклеотидну послідовність, що відповідає кодувальній послідовності рецептору zcytor17, показано у SEQ ID NO: 5. Реакційні умови були як вищезазначено. PCR-продукт пропускали через 1% агаровий гель та виділяли фрагмент zcytor17 розміром приблизно 320 по, використовуючи комплект гель-екстракції Qiaquick за інструкціями виробника.

Кожний з виділених PCR-фрагментів, описаних вище, змішували при 1:1 волюметричному співвідношенні та, застосовували у PCR-реакції, використовуючи ZC6673 (SEQ ID NO: 13) та ZC29145 (SEQ ID NO: 16) для створення усіх, але 5'MPL частин химер MPL-zcytor17. Умови реакції були такими 15 циклів при 94°C протягом 1 хвилини, 55°C протягом 1 хвилини, 72°C протягом 2 хвилин, а потім 72°C протягом 7 хвилин; тоді вимочування при 4°C. PCR-продукт пропускали через 1% агаровий гель та виділяли фрагмент химери MPL- zcytor17 розміром приблизно 700 по, використовуючи комплект гель-екстракції Qiaquick (Qiagen) за інструкціями виробника. Фрагмент химери MPL- zcytor17 розщеплювали BamHI (BRL) та XbaI (Boehringer Mannheim) за інструкціями виробника.

Повне розщеплення провадили на 1% агаровому гелі та розщеплену химеру MPL-zcytor17 виділяли, використовуючи комплект гель-екстракції Qiaquick (Qiagen) за інструкціями виробника. Утворену розщеплену химеру MPL-zcytor17 разом з фрагментом 5'MPEcoRI/BamHI, описаним вище, вставляли у вектор експресії для створення повного химерного рецептору MPL-zcytor17, як описано нижче.

Реципієнтний вектор експресії pZP-7 розщеплювали EcoRI (BRL) та XbaI (BRL) за інструкціями виробника та очищали на гелі, як описано вище.

Цей фрагмент вектору комбінували з розщепленою EcoRI та XbaI PCR-химерою MPL-zcytor17, виділеною вище, та EcoRI та BamHI фрагментом 51MPL, виділеним вище, у реакції лігування. Лігу-

вання провадили, використовуючи лігазу T4 (Epicentre Technologies), при кімнатній температурі протягом 1 години за інструкціями виробника. Зразок з лігування електропорували в електрокомплентні клітини *E. coli* DH10B ElectroMAX (25мкФ, 200ом, 1,8V). Трансформанти розміщали на планшетах LB+ампіцилін та одиничні колонії скринінгували за допомогою мініпрепарату (Qiagen) та розщепленням *EcoRI* для перевірки химери MPL-zcytor17. *EcoRI*-розщеплення відповідних клонів дало фрагмент розміром приблизно 2 ко. Підтвердження послідовності химери MPL-zcytor17 було зроблено аналізом послідовності. Вставка була розміром приблизно 3,1 ко та мала повну довжину.

#### Приклад 2

Химера MPL-zcytor17 на основі проліферації у дослідженні BAF3, використовуючи Аламар блакитний

А. Створення клітин BaF3, що експресують химеру MPL-zcytor17

Прелімфоїдну лінію клітин BaF3, залежну від інтерлейкіну-3 (IL-3), похідну від мишачого кісткового мозку [Palacios та Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cells. Biol. 6: 4133-4135, 1986], підтримували у повному середовищі (середовищі RPMI, JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS), доповненому 10% інактивованої нагрівання сироватки зародка теляти, 1-2нг/мл мишачого IL-3 (mIL-3) (R & D, Minneapolis, MN), 2мМ L-glutaMax-1™ (Gibco BRL), 1мМ натрій шрувату (Gibco BRL) та антибіотиків PSN (GIBCO BRL)). Перед електропорацією отримували та очищали плазмідну ДНК pZP-7/MPL-zcytor17 (Приклад 1), використовуючи комплект Qiagen Maxi Prep (Qiagen) за інструкціями виробника. Клітини BaF3 для електропорації промивали двічі у середовищі RPMI та тоді знов суспендували у середовищі RPMI при густині клітин 107клітин/мл.

Один мл знов суспендованих клітин BaF3 змішували з 30мкг pZP-7/MPL-zcytor17 плазмідної ДНК та переносили до окремих разових електропораційних камер (GIBCO BRL). При кімнатній температурі клітини піддавали шоку 5х, 1мс при 800В, а потім шоку 5х2мс при 600В електропораційним апаратом (Cyto-Pulse).

Альтернативно, клітини електропорували двома серійними імпульсами (800мкФ/300 V; а потім 1180мкФ/300V) електропораційним апаратом Cell-Porator (GibcoBRL). Електропоровані клітини переносили у 50мл повного середовища та розміщали в інкубаторі протягом 15-24 годин (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Тоді селекційний Geneticin™ (Gibco) (1мг/мл G418) додавали до клітин у колбі T-162 для виділення G418-резистентної множини. Множини трансфектованих клітин BaF3, далі під назвою клітини BaF3/MPL-zcytor17, аналізували на здатність до передачі сигналу, як описано нижче.

В. Тестування здатності до передачі сигналу клітин BaF3/MPL-zcytor17, використовуючи Аламар блакитний

#### Дослідження проліферації

Клітини BaF3/MPL-zcytor17 центрифугували та промивали у повному середовищі, описаному вище, але без mIL-3 (далі позначено як «вільне від mIL-3 середовище»). Клітини центрифугували та промивали 3 рази для забезпечення видалення з

них IL-3.

Клітини тоді підраховували у гемацитометрії. Клітини засівали у 96-комірковому форматі при 5000 клітин на комірку в об'ємі 100мкл на комірку, використовуючи вільне від mIL-3 середовище.

Проліферацію клітин BaF3/MPL-zcytor17 оцінювали, використовуючи мишачий тромбопоетин (mTPO) розбавлений вільним від mIL-3 середовищем до концентрації 200нг/мл, 100нг/мл, 50нг/мл, 25нг/мл, 12,5нг/мл, 6,25нг/мл, 3,1нг/мл, 1,5нг/мл. Одну сотню мікролітрів розбавленого mTPO додавали до клітин BaF3/MPL-zcytor17.

Загальний об'єм дослідження був 200мкл. Негативні контролю провадили паралельно, використовуючи тільки вільне mIL-3 середовище, без додавання mTPO. Досліджені планшети інкубували при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> протягом 3 діб, при цьому Аламар блакитний (Accumed, Chicago, IL) додавали при 20111/комірку. Аламар блакитний піддається флуориметричному зчитуванню на основі метаболічної активності клітин та дає відтак безпосередній вимір проліферації клітин у порівнянні з негативним контролем. Планшети знов інкубували при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> протягом 24 годин. Планшети зчитували на планшетному зчитувачі Fmax™ (Molecular Devices Sunnyvale, CA), використовуючи програму SoftMax™ Pro, при довжині хвиль 544 (збудження) та 590 (емісія), або планшетному зчитувачі Wallac Victor 2 (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA).

Результати підтверджували здатність до передачі сигналу внутрішньоклітинної частини рецептору zcytor17, як індуковану тромбопоетином проліферацію при приблизно 9-13 разів вищого фону при концентрації mTPO 50нг/мл та більше.

#### Приклад 3

Створення вектору експресії, що експресує повної довжини zcytor17: pZp7pX/zcytor17

А. Клонування повної довжини zcytor17 кДНК для експресії:

Для отримання повної довжини zcytor17кДНК, 5' та 3'PCR-продукти виділяли та з'єднували, використовуючи внутрішній сайт PstI. Праймери PCR створювали, використовуючи нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 4 та включали BatHI та Xho I рестрикційні сайти для клонування.

5'PCR-продукт створювали, використовуючи бібліотеку кДНК WI-38 як темплат та олігонуклеотиди ZC29, 359 (SEQ ID NO: 18) та ZC27, 899 (SEQ ID NO: 19) як праймери. WI-38 є власною бібліотекою кДНК, створеною з лінії клітин легенів ембріону людини (ATCC CRL-2221). Цю реакцію 5'PCR провадили таким чином: 30 циклів при 94°C протягом 1 хвилини, 65°C протягом 1 хвилини, 72°C протягом 2 хвилин, тоді 72°C протягом 7 хвилин; вимочування при 10°C. PCR-реакція застосовувала приблизно 3мкг плазмід. отриманої від бібліотеки кДНК, 20пмолей кожного олігонуклеотиду та 5 одиниць ДНК-полімерази PWO (Roche). Приблизно 90% 5'PCR-продукту, що осаджували етанолом, розщеплювали BatHI та PstI та очищали на 1,0% агаровому гелі. Смугу приблизно 600 по вирізали та, застосовували для лігування для клонування вектору pUC18, розщепленого BatHI та PstI. Утворені трансформанти секвенсували для підтвердження послідовності кДНК zcytor17. Для одного з цих трансформантів, отримували плазмідну ДНК

та розщеплювали *Bat*HI та *Pst*II. Утворену смугу приблизно 600 по очищали на гелі та, застосовували для лігування для утворення кДНК повної довжини.

3'PCR-продукт створювали, використовуючи власну бібліотеку кДНК людини як темплат та олігонуклеотиди ZC27, 895 (SEQ ID NO: 20) та ZC29, 122 (SEQ ID NO: 21) як праймери. Цю 3'PCR-реакцію провадили таким чином: 30 циклів при 94°C протягом 45с, 65°C протягом 45с, 72°C протягом 2 хвилин, тоді 72°C протягом 7 хвилин; вимочування при 10°C. Повний продукт 3'PCR-реакції очищали на 1,0% агаровому гелі та вирізали головну смугу 1500 по. Цю смугу клонували у PCR-вектор *Blunt* II TOPO, використовуючи комплект *Zeroblunt* TOPO (*Invitrogen*). Утворені трансформанти секвенсували для підтвердження послідовності *zc*ytor17 кДНК. Для одного з цих трансформантів плазмідну ДНК отримували та розщеплювали *Pst*II та *Xho*I. Утворену смугу приблизно 1500 по очищали на гелі. Три-частинне лігування було проведене з фрагментом від 5'*Bat*HI до *Pst*II, фрагментом від 3'*Pst*II до *Xho*I та вектором експресії *pZp7pX*, розщепленим *Bat*HI та *Xho*I. Ця створена плазміда *pZp7pX* містить кДНК повної довжини для *zc*ytor17 (SEQ ID NO: 4), позначена як *pZp7p/zc*ytor17. Повної довжини кДНК *zc*ytor17 у *pZp7p/zc*ytor17 має мовчазну мутацію, що змінює T на G у позиції 1888 SEQ ID NO: 4 (кодований Gly залишок при залишку 464 SEQ ID NO: 5). Оскільки ця мутація була мовчазною, кДНК *zc*ytor17 у *pZp7p/zc*ytor17 кодує поліпептид, який показано у SEQ ID NO: 5. Плазміда *pZp7pX* представляє вектор експресії ссавців, що містить касету експресії, що має промотор CMV, інтрон A, складні рестрикційні сайти для вставки кодувальної послідовності та термінатор гормону росту людини. Плазміда також має початок реплікації *E. coli*, придатний для селекції елемент маркеру експресії ссавців, що має промотор SV40, енхансер та початок реплікації, ген резистентності до пуроміцину та термінатор SV40.

В. Створення вектору експресії, що експресує *WSX*-1 повної довжини

Повний рецептор *WSX*-1 (SEQ ID NO: 9) виділяли з плазміди, що містить кДНК рецептору *WSX*-1 (SEQ ID NO: 8) [патент США №5925735]. Плазмідну ДНК *hWSX*-1/*pBluescript* SK (+) (*Stratagene*, La Jolla, CA) розщеплювали *Eco*RI та *Xho*I для створення фрагменту 1075 по та також розщеплювали *Xho*I та *Xba*I для створення фрагменту 900 по. Обидва розщеплення провадили на 1% агаровому гелі та розщеплені фрагменти *WSX*-1 виділяли.

Реципієнтний вектор експресії *pZp7Z* розщеплювали *Eco*RI та *Xba*I та очищали на гелі, як описано вище. Цей фрагмент вектору комбінували з двома розщепленими фрагментами *zc*ytor17, виділеними вище, у реакції лігування, використовуючи лігазу T4 (*BRL*).

Лігування інкубували при кімнатній температурі протягом ночі. Зразок лігування електропорували у електрокомпетентні клітини *E. coli* DH10BelectroMAX (25мкФ, 200ом, 2,3V). Шість колоній вирощували у культурі та мініпрепаровану ДНК отримували та розщеплювали для підтвердження відповідності вставки *WSX*-1 повної дов-

жини 2,0 ко. Утворено плазмідну *pZP7Z/WSX*-1.

#### Приклад 4

Проліферація на основі *Zc*ytor17 у дослідженні *BaF3*, використовуючи Аламар блакитний

А. Створення клітин *BaF3*, що експресують рецептор *zc*ytor17, рецептор *WSX*-1 та *OSMR*

Клітини *BaF3*, що експресують рецептор *zc*ytor17 повної довжини, створювали як у Прикладі 2А вище, використовуючи вектор експресії *zc*ytor1730Fg, описаний у прикладі 3А. Одним винятком є те, що замість селекції *Geneticin*, 2мкг/мл пуроміцину (*ClonTech*) додавали до трансфектованих клітин у колбі T-162 для виділення пуроміцин-резистентної множини. Клітини *BaF3*, що експресують рецептор *zc*ytor17 мРНК були позначені як *BaF3/zc*ytor17. Для отримання клонів, клітини *BaO/zc*ytor17 підраховували у гемоцитометрі та засівали при 1клітин/комірку, 0,5клітин/комірку, 0,1клітин/комірку та 0,01клітин/комірку у 96-коміркових планшетах. 15 клонів переносили до колби T75 та 5 клонів аналізували на експресію *zc*ytor17. Загальну РНК виділяли з гранул клітин, використовуючи комплект *S.N.A.P.*™ для виділення загальної РНК (*Invitrogen*). Першо-ланцюгову кДНК було синтезовано, використовуючи *proSTAR*™ першо-ланцюговий комплект RT-PCR та тоді PCR з *zc*ytor17-специфічними праймерами ZC29, 180 (SEQ ID NO: 22) та ZC29, 122 (SEQ ID NO: 23) провадили для скринінгу клонів для експресії *zc*ytor17. Один клон, *BaF3/zc*ytor17#15 було вибрано для розвитку та трансфекції з вектором експресії *WSX*-1.

Клітини *BaF3*, що експресують *zc*ytor17 та повної довжини *WSX*-1, створювали як у прикладі 2А вище, використовуючи 30мкг вектору експресії *WSX*-1 *WSX*-1/*pZp7Z* (Приклад 3В) для електропорації *BaF3/zc*ytor17#15 клітини. Одним винятком є те, що замість селекції *Geneticin*, 200мкг/мл зеоцину (*Invitrogen*) додавали до трансфектованих клітин у колбі T-162 для виділення зеоцин-резистентної множини. Клітини *BaF3*, що експресують *zc*ytor17 та *WSX*-1, було позначено *BaF3/zc*ytor17/*hWSX*-1. Для отримання клонів, множини клітин *BaF3/zc*ytor17/*hWSX*-1 засівали при обмежувальних розбавленнях у 96-коміркові планшети. Утворені клони розвивали та загальну РНК виділяли, використовуючи комплект *S.N.A.P.*™ для виділення загальної РНК (*Invitrogen*). Першо-ланцюгову кДНК було синтезовано, використовуючи першо-ланцюговий комплект RT-PCR *proSTAR*, а тоді PCR з *WSX*-1-специфічними праймерами ZC9791 (SEQ ID NO: 24) та ZC9793 (SEQ ID NO: 25) застосовували для скринінгу клонів для експресії *WSX*-1. Один клон, *BaF3/zc*ytor17/*hWSX*-1#5 було вибрано для розвитку та трансфекції з вектором експресії *OSMR*бета.

Клітини *BaF3*, що експресують *zc*ytor17, *WSX*-1 та повної довжини *OSMR*бета, створювали як у прикладі 2А вище, використовуючи 30мкг вектору експресії *OSMR*бета *OSMR/pZp7NX*, як описано у прикладі 29, для електропорації *BaF3/zc*ytor17/*hWSX*-1#5 клітин. Клітини *BaF3*, що експресують мРНК *zc*ytor17, *WSX*-1 та *OSMR*бета було позначено *BaF3/zc*ytor17/*WSX*-1/*OSMR*. Для отримання клонів, множини клітин

BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета засівали при обмежувальних розбавленнях у 96-коміркові планшети. Окремі клони розвивали та загальну РНК виділяли, використовуючи комплект S.N.A.P.<sup>™</sup> для виділення загальної РНК (InVitrogen). Першо-ланцюгову кДНК було синтезовано, використовуючи першо-ланцюговий комплект RT-PCR proSTAR<sup>™</sup>, а тоді застосовували PCR з OSMРбета-специфічними праймерами ZC40109 (SEQ ID NO: 26) та ZC40112 (SEQ ID NO: 27) для скринінгу клонів на експресію zcytor17. WSX-1 та OSMR. Один клон, BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR#5 було вибрано та ці клітини застосовували для скринінгу на zcytor17lig, як описано нижче у прикладах 5 та 6.

В. Створення клітин BaF3, що експресують рецептор zcytor17 та OSMR

Клітини BaF3, що експресують повної довжини рецептор zcytor17 створювали як у прикладі 2А вище, використовуючи 30мкг вектору експресії zcytor17, описаного у прикладі 3А. Одним винятком є те, що замість селекції Geneticin, 2мкг/мл пуроміцину (ClonTech) додавали до трансфектованих клітин у колбі Т-162 для виділення пуроміцин-резистентної множини. Клітини BaF3, що експресують рецептор zcytor17 мРНК було позначено як BaF3/zcytor17. Для отримання клонів, множини клітин BaF3/zcytor17 засівали при обмежувальних розбавленнях у 96-коміркові планшети. Ці клони нарощували у культурі та загальну РНК виділяли, використовуючи комплект S.N.A.P.<sup>™</sup> для виділення загальної РНК (InVitrogen). Першо-ланцюгову кДНК було синтезовано, використовуючи першо-ланцюговий комплект RT-PCR proSTAR, а тоді PCR застосовували для скринінгу клонів для експресії zcytor17. Один клон, BaF3/zcytor17#15 було вибрано для розвитку та трансфекції з вектором експресії OSMРбета.

Клітини BaF3, що експресують zcytor17 та повної довжини OSMР-бета, створювали як у прикладі 2А вище, використовуючи 30мкг вектору експресії OSMРбета OSMР/pZp7NX (Приклад 29) для електропорації клітин BaF3/zcytor17#15. Клітини BaF3, що експресують мРНК zcytor17 та OSMРбета, було позначено BaF3/zcytor17/OSMR. Ці клітини застосовували для скринінгу на zcytor17lig, як описано нижче у прикладі 5.

#### Приклад 5

Скринінг на zcytor17lig, використовуючи клітини BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета, використовуючи дослідження проліферації з аламар блакитним

А. Активація клітин CCRF-CEM та CCRF-HSB2 для тестування наявності zcytor17lig

Клітини CCRF-CEM та CCRF-HSB2 було отримано з АТСС та стимульовано у культурі для утворення стандартизованого середовища для тестування наявності активності zcytor17lig, як описано нижче. Суспензію клітини засівали при  $2 \times 10^5$  клітини/мл або  $5 \times 10^5$  клітини/мл у середовищі RPMI-1640, доповненому 10% FBS, 2мМ L-глутаміну (GibcoBRL), IX PSN (GibcoBRL) та активованому 10нг/мл Форбол-12-міристат-13-ацетатом (PMA) (Calbiochem, San Diego, CA) та 0,5мкг/мл іономіцину (Calbiochem) протягом 24 або 48 годин. Супернатант від стимульованих клітин

застосовували для дослідження проліферації клітин BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета чи клітин BaF3/zcytor17/OSMRбета, як описано нижче.

В. Скринінг на zcytor17lig, використовуючи клітини BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета або клітини BaF3/zcytor17/OSMRбета, використовуючи аналіз проліферації клітин BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета або клітин BaF3/zcytor17/OSMRбета з аламар блакитним

Клітини центрифугували та промивали у вільному від mIL-3 середовищі. Клітини центрифугували та промивали 3 рази для забезпечення видалення mIL-3. Клітини тоді підраховували у гематиметрі. Клітини засівали у 96-комірковий планшет при 5000 клітин на комірку в об'ємі 100мкл на комірку, використовуючи вільне від mIL-3 середовище.

Проліферацію клітин BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета чи клітин BaF3/zcytor17/OSMRбета оцінювали, використовуючи стандартизоване середовища від активованих клітин CCRFCEM та CCRF-HSB2 (дивись Приклад 5А). Стандартизоване середовища розбавляли вільним від mIL-3 середовищем до концентрації 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% та 0,375%. Одну сотню мікролітрів розбавленого стандартизованого середовища додавали до клітин BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета або клітин BaF3/zcytor17/OSMRбета. Загальний об'єм дослідження був 200мкл. Досліджені планшети інкубували при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> протягом 3-5 діб, в цей час Аламар блакитний (Accumed, Chicago, IL) додавали при 20мкл/комірку. Планшети знов інкубували при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> протягом 24 годин. Планшети зчитували на планшетному зчитувачі Fmax<sup>™</sup> (Molecular devices), як описано вище (Приклад 2).

Результати підтверджували проліферативну реакцію клітин BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета клітин чи клітин BaF3/zcytor17/OSMRбета стосовно фактору, представленого в активованих стандартизованих середовищах CCRF-CEM та CCRF-HSB2. Реакція, яку вимірювали, була приблизно у 10-разів вище фону при концентрації 25%. Нетрансфектовані клітини BaF3 не проліферували у реакції на цей фактор, як і клітини BaF3, трансфектовані zcytor17 та WSX-1 (BaF3/zcytor17/WSX-1), показуючи, що цей фактор був специфічним стосовно рецепторів zcytor17/OSMRбета або zcytor17/OSMRбета/WSX-1. Більш того, розчинний рецептор zcytor17 послаблював цю проліферативну активність zcytor17lig у клітинах BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета (дивись, Приклад 11). Подібний результати очікують у клітинах BaF3/zcytor17/OSMRбета.

С. Первинне джерело людини, застосовуване для виділення zcytor17lig

Одну сотню мілілітрів крові брали від кожного з шести донорів. Кров брали, використовуючи туби 10X10мл, що містять гепарин. Кров поєднували від шести донорів (600мл), розбавляли 1:1 у PBS та виділяли, використовуючи Ficoll-Paque PLUS (Pharmacia Biotech). Виділено первинні клітини людини після сепарації у кількості  $1.2 \times 10^9$  клітин.

Клітини суспендували у 9,6мл буферу MACS (PBS, 0,5% EDTA, 2мМ EDTA). 1,6мл суспензії клітин видаляли та 0,4мл мікрокульок CD3 (Miltenyi

Biotec, Auburn, CA) додавали. Суміш інкубували протягом 15 хвилин при 4°C. Ці клітини, мічені CD3 кульками, промивали 30мл буферу MACS та тоді знов суспендували у 2мл буферу MACS.

Колонку VS+ (Miltenyi) отримували відповідно інструкціям виробника. Колонку VS+ тоді розміщали у магнітному полі VarioMACSTM (Miltenyi). Колонку урівноважували 5мл буферу MACS. Виділені первинні клітини людини тоді вводили у колонку. CD3-негативні клітини пропускали через колонку. Колонку промивали 9мл (3X3мл) буферу MACS. Колонку тоді видаляли від магніту та розміщали поверх фалконових туб 15мл.

CD3+клітини елювали додаванням 5мл буферу MACS до колонки та приєднані клітини проганяли, використовуючи плунжер, запропонований виробником. Інкубування клітин з CD3-магнітними кульками, промивання та етапи на VS+колонці (інкубування через елювання) повторювали більше 5 разів. Утворені CD3+-фракції від шести сепараційних колонок поєднували. Вихід CD3+-селектованих клітин людини 3X10 клітин.

Зразок поєднаних CD3+-селектованих клітин людини видаляли для виявлення і сортування на флуоресцентному антитільному сортувачі клітин (FACS) для оцінки їх чистоти.

CD3+-селектовані клітини людини були на 91% CD3+-клітинами.

CD3+-селектовані клітини людини активували інкубуванням у RPMI+5% FBS+PMA 10нг/мл та іономіцині 0,5мкг/мл (Calbiochem) протягом 13 годин при 37°C.

Супернатант від цих активованих CD3+-селектованих клітин людини тестували стосовно активності zcytor17lig як описано нижче. Більш того, активовані CD3+-селектовані клітини людини застосовували для отримання бібліотеки кДНК, як описано у прикладі 6, нижче.

D. Тестування супернатанту від активованих forzcytor17lig CD3+-селектованих клітин людини, використовуючи клітини BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета та дослідження проліферації з аламар блакитним

Клітини BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета або клітини BaF3/zcytor17/OSMRбета центрифугували та промивали у вільному від mIL-3 середовищі. Клітини центрифугували та промивали 3 рази для забезпечення видалення з них IL-3. Клітини тоді підраховували у гематометрі. Клітини засівали у 96-комірковий планшет при 5000 клітин на комірку в об'ємі 100мкл на комірку, використовуючи вільне від IL-3 середовища.

Проліферацію клітин BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета чи клітин BaF3/zcytor17/OSMRбета оцінювали, використовуючи стандартизовані середовища від активованих CD3+-селектованих клітин людини (дивись Приклад 5C) розбавлені вільним від mIL-3 середовищем до концентрації 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75%, 0,375% та 0,187%. Одну сотню мікролітрів розбавленого стандартизованого середовища додавали до клітини BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета або клітини BaF3/zcytor17/OSMRбета. Загальний об'єм дослідження був 200мкл. Досліджені планшети інкубували та аналізували як описано у прикладі 5B.

Результати підтверджували проліферативну

реакцію клітин BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета клітин чи клітин BaF3/zcytor17/OSMRбета стосовно фактору, представленого в стандартизованих середовищах активованих CD3+-селектованих клітин людини. Реакція за виміром була приблизно у 15-разів вищою за фон при концентрації 25%.

Нетрансфектовані клітини BaF3 не проліферували у реакції на цей фактор, як і клітини BaF3, трансфектовані zcytor17, та клітини WSX-1(BaF3/zcytor17/WSX-1), показуючи, що цей фактор був специфічним для рецепторів zcytor17/OSMRбета або zcytor17/OSMRбета/ WSX-1.

#### Приклад 6

Клонування zcytor17lig людини з бібліотеки CD3+-селектованих клітин людини

Скринінг бібліотеки кДНК первинних активованих CD3+-селектованих клітин людини виявив виділену кДНК, що є новим членом чотирьох-спірально-вузлової родини цитокінів. Ця кДНК кодує zcytor17lig. кДНК ідентифікували скринінгом на активність zcytor17lig, рецептори використовуючи zcytor17/WSX-1/OSM.

A. Вектор, для створення CD3+-селектованої бібліотеки

Вектором для створення CD3+-селектованої бібліотеки був pZP7NX. Вектор pZP7NX створювали таким чином: Кодувальний регіон для селективного маркера DHFR у векторі pZP7 видаляли розщепленням ДНК рестрикційними ферментами NcoI та PstI (Boehringer Mannheim). Розщеплену ДНК пропускали через 1% агарові гелі, вирізували та очищали на гелі, використовуючи комплект гелекстракції Qiagen (Qiagen) за інструкціями виробника. Фрагмент ДНК, що репрезентує кодувальний регіон селективного маркера стосовно зеоцину, ампліфікували PCR з праймерами ZC13, 946 (SEQ ID NO: 28) та ZC13, 945 (SEQ ID NO: 29) та pZeoSV2 (+) як темплатами. Існують додаткові рестрикційні сайти PstI та BclI у праймері ZC13 946 (SEQ ID NO: 28) та додаткові сайти NcoI та SfuI у праймері ZC13 945 (SEQ ID NO: 29). PCR-фрагмент розрізали рестрикційними ферментами PstI та NcoI та клонували у вектор pZP7, отриманий розщепленням такими же двома ферментами, та далі очищали на гелі. Цей вектор мав назву pZP7Z.

Тоді зеоциновий кодувальний регіон видаляли розщепленням вектору ДНК pZP7Z рестрикційними ферментами Bell та SfuI. Розщеплену ДНК пропускали на 1% агаровому гелі, вирізували та очищали на гелі такими же рестрикційними ферментами, а тоді зшивали з фрагментом ДНК неоміцин-кодуючого регіону, вирізаного з вектору pZem228 від ATCC, Manassas, VA; ATCC № 69446) такими же рестрикційними ферментами (Bell та SfuI).

Цей новий вектор мав назву pZP7N, в ньому кодувальний регіон DHFR-селективного маркера було замінено кодувальним регіоном неоміцин-селективного маркера від вектору pZem228. Фрагмент заповнювачу, включаючи сайт XhoI, додавали до pZP7N для утворення вектору, підходящого для високої ефективності спрямованого клонування кДНК; цей новий вектор мав назву pZP7NX. Для отримання вектору для кДНК, 20мкг pZP7NX роз-

щеплювали 20 одиницями EcoRI (Life Technologies Gaithersburg, MD) та 20 одиницями XhoI (Boehringer Mannheim Indianapolis, IN) протягом 5 годин при 37°C, тоді 68°C протягом 15 хвилин. Розщеплення тоді провадили на 0,8% низькоплавкому агарі IXТАЕ для відокремлення заповнювачу від вектору. Векторну смугу вирізали та розщеплювали бета-агаразою (New England Biolabs, Beverly, MA) за рекомендаціями виробника. Після преципітації етанолом розщеплений вектор знов суспендували у воді до 45нг/мл при отриманні для лігування CD3+-селектованої бібліотеки кДНК, описаної нижче.

В. Отримання бібліотеки кДНК первинних активних CD3+-селектованих клітин людини

Приблизно  $1,5 \times 10^8$  первинних CD3+-селектованих клітин людини, стимульованих у іономіцині/PMA, виділяли центрифугуванням після культивування при 37°C протягом 13 годин (Приклад 5C). Загальну РНК відділяли від гранул клітин, використовуючи комплект RNeasy Midi від Qiagen, Inc. (Valencia, CA). мРНК виділяли з 225 мікрограм загальної РНК, використовуючи комплект очистки мРНК MPG від CPG Inc. (Lincoln Park, NJ). 3,4 мікрограм виділяли та перетворювали у подвійно-ланцюгову кДНК, використовуючи таку процедуру.

Перший ланцюг кДНК від стимульованих CD3+-селектованих клітин людини було синтезовано таким чином. 9мкл Oligo d (T)-вибраної полі (A) CD3+-РНК при концентрації 0,34мкг/мкл та 1,01мкг/мкл праймеру першого ланцюга ZC18, 698 (SEQ ID NO: 30), що містить рестрикційний сайт XhoI, змішували та нагрівали при 65°C протягом 4 хвилин та охолоджували на льоді. Синтез першого ланцюга кДНК ініціювали додаванням 9мкл буферу для першого ланцюга (буфер 5xSUPERScript; (Life Technologies), 4мкл 100мМ дитіотреїтолу та 2мкл розчину дезоксинуклеотид-трифосфату, що містить 10мМ кожного з dATP, dGTP, dTTP та 5-метил-dCTP (Pharmacia Biotech Inc.), до суміші РНК-праймеру. Реакційну суміш інкубували при 45°C протягом 4 хвилин, а потім додавали 8мкл 200од/мкл Н-зворотної транскриптази РНКазі SuperscriptII, (Life Technologies). Реакцію інкубували при 45°C протягом 45 хвилин, а потім знижували інкубування на 1°C кожні 2 хвилини до 50°C, де реакцію тримали протягом 10 хвилин. Для денатурації будь-якої вторинної структури та надання змоги для додаткового подовження кДНК реакцію тоді нагрівали до 70°C протягом 2 хвилин, тоді зменшували до 55°C протягом 4 хвилин, після чого додавали 2мкл SuperscriptII RT та інкубували додатково 15 хвилин, а потім збільшували до 70°C зі швидкістю 1 хвилин/1°C. Неуведені нуклеотиди видаляли з кДНК осадженням двічі при наявності 2мкг глікогенового носія, 2,0М амоній ацетат та 2,5 об'єм етанол, а потім 100мкг промивали 70% етанолом. кДНК знов суспендували у 98мкл води для застосування у синтез другого ланцюга.

Синтез другого ланцюга провадили на першому ланцюгу кДНК в умовах, що активували праймуванням першим ланцюгом синтезу другого ланцюга, що призводило до утворення шпильки ДНК. Реакція другого ланцюга містила 98мкл першого ланцюга кДНК, 30мкл буферу 5x полімерази I (100мМ Трис: HCl, pH 7,5, 500мМ KCl, 25мМ

MgCl<sub>2</sub>, 50мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 2мкл 100мМ дитіотреїтолу, 6мкл розчину, що містить 10мМ кожного дезоксинуклеотид-трифосфату, 5мкл 5мМ b-NAD, 1мкл 3од/мкл ДНК-лігази E. coli (New England Biolabs Inc.) та 4мкл 10од/мкл ДНК-полімерази E. coli I (New England Biolabs Inc.). Реакцію провадили при кімнатній температурі та інкубували при кімнатній температурі протягом 2 хвилин, а потім додавали 4мкл 3,8од/мкл РНКазі H (Life Technologies). Реакцію інкубували при 15°C протягом двох годин, а потім 15 хвилин інкубували при кімнатній температурі. 10 мікролітрів 1М ТРИС з pH 7,4 додавали до реакції та екстрагували двічі фенол/хлороформом та одноразово хлороформом, органічні фази тоді знов екстрагували 50мкл ТЕ (10мМ ТРИС pH 7,4, 1мМ EDTA), поєднували з іншою водою та осаджували етанолом при наявності 0,3М натрій ацетату. Гранулу промивали 100мкл 70% етанолу, сушили на повітрі та знов суспендували у 40мкл води.

Одинично-ланцюгову ДНК шпилькової структури розщеплювали, використовуючи нуклеазу бобів квасолі. Реакційну суміш з вмістом 40мкл кДНК другого ланцюга, 5мкл 10х буферу нуклеази бобів квасолі (Life Technologies), 5мкл нуклеази бобів квасолі (Pharmacia Biotech Corp.), розбавленої до 1од/мкл у IX буфері нуклеази бобів квасолі. Реакцію інкубували при 37°C протягом 45 хвилин. Реакцію зупиняли додаванням 10мкл 1М Трис: HCl, pH 7,4, а потім послідовними екстракціями фенол/хлороформом та хлороформом, як описано вище. Після екстракцій кДНК осаджували етанолом при наявності 0,3М натрій ацетату. Гранулу промивали 100мкл 70% етанолу, сушили на повітрі та ресуспендували у 38мкл води.

Ресуспендовану кДНК затуплювали ДНК-полімеразою T4. кДНК, яку ресуспендували у 38мкл води, змішували з 12мкл буферу 5x ДНК-полімерази T4 (250мМ Трис: HCl, pH 8,0, 250мМ KCl, 25мМ MgCl<sub>2</sub>), 2мкл 0,1М дитіотреїтолу, 6мкл розчину, що містить 10мМ кожного дезоксинуклеотид-трифосфату та 2мкл 1од/мкл ДНК-полімераз T4 (Boehringer Mannheim Corp.).

Після інкубування 45 хвилин при 15°C, реакцію зупиняли додаванням 30мкл ТЕ, а потім послідовними екстракціями фенол/хлороформом та хлороформом і знов екстрагували 20мкл ТЕ, як описано вище. ДНК осаджували етанолом при наявності 2мкл носія Pellet Paint (Novagen) та 0,3М натрій ацетату та ресуспендували у 11мкл води.

Адаптери Eco RI вшивали у 5' кінці кДНК, описаної вище для можливості клонування у вектор експресії, 11мкл кДНК та 4мкл 65 пмолей/мкл геміфосфорилаційного адаптеру Eco RI (Pharmacia Biotech Corp) змішували з 5мкл 5х лігазного буферу (Life Technologies), 2мкл 10мМ АТФ та 3мкл 1од/мкл ДНК-лігази T4 (Life Technologies), 1мкл 10X буферу для лігування (Promega Corp), 9мкл вод. Екстрарозбавлення 1X буфером було для попередження Pellet Paint від осадження. Реакцію інкубували 9 годин у водяній бані, температуру збільшували з 10°C до 22°C протягом 9 годин, а потім 45 хвилин при 25°C. Реакцію зупиняли інкубуванням при 68°C протягом 15 хвилин.

Для сприяння спрямованому клонуванню кДНК у вектор експресії, кДНК розщеплювали XhoI, що

дає кДНК, що має липкий кінець 5'Eco RI та липкий кінець 3'XhoI. Рестрикційний сайт XhoI на 3' кінці кДНК уведено раніше, використовуючи праймер ZC18698 (SEQ ID NO: 30).

Рестрикційне ферментне розщеплення здійснювали у реакційній суміші, що містить 35мкл суміші для лігування, описаної вище, 6мкл 10x Н буферу (Boehringer Mannheim Corp.), 1мкл 2мг/мл BCA (Biolabs Corp.), 17мкл води та 1,0мкл 40од/мкл XhoI (Boehringer Mannheim). Розщеплення здійснювали при 37°C протягом 1 години. Реакцію зупиняли інкубуванням при 68°C протягом 15 хвилин, а потім осадженням етанолом, промивкою, сушкою, як описано вище, та ресуспендуванням у 30мкл води.

Ресуспендовану кДНК нагрівали до 65°C протягом 5 хвилин та охолоджували на льоді, додавали 4мкл 5X барвнику для завантаження гелю (Research Genetics Corp.), кДНК завантажували на 0,8% низько-плавкий агаровий гель 1X TAE (низько-плавкий агар SEA PLAQUE GTG™; FMC Corp.) та електрофорезували. Забруднювальні адаптери та кДНК нижче 0,6 ко у довжину вирізали з гелю. Електроди реверсували, плавкий агар додавали до заповнення у комірки, буфер заміняли та кДНК електрофорезували доки не концентрували поблизу лінії. Зону гелю, що містить концентровану кДНК, вирізали та розміщали у тубі мікроцентрифуги та агар плавили нагріванням до 65°C протягом 15 хвилин. Після урівноваження зразку до 45°C, додавали 2мкл 1од/мкл Бета-агарози I (Biolabs, Inc.) та суміш інкубували протягом 90 хвилин при 45°C для розщеплення агару. Після інкубування, 1 десяту об'єму 3М Na ацетату додавали до зразку та суміш інкубували на льоді протягом 15 хвилин. Зразок центрифугували при 14000хg протягом 15 хвилин при кімнатній температурі для видалення нерозщепленого агару, кДНК осаджували етанолом, промивали у 70% етанолі, сушили на повітрі та ресуспендували у 40мкл води.

Для визначення оптимального співвідношення кДНК до вектору здійснювали кілька лігувань та електропорували. Коротше, 2мкл 5X буферу лігази T4 (Life Technologies), 1мкл 10мМ АТФ, 1мкл рZP7NX розщеплювали EcoRI-XhoI, 1мкл ДНК-лігази T4 розбавленої до 0,25од/мкл (Life Technologies) водою до 10мкл та 0,5, 1, 2 або 3мкл кДНК змішували у 4 відокремлених лігуваннях, інкубували при 22°C протягом 4 годин, 68°C протягом 20 хвилин, осаджували натрій ацетатом-етанолом, промивали, сушили та ресуспендували у 10мкл. Один мікролітр кожного з лігувань електропорували у 40мкл електрокомпетентних бактерій DH10b ElectroMax™ (Life Technologies), використовуючи 0,1см ковету (Biorad) та імпульсів контролер Genepulser, (Biorad) при 2,5кВ, 25мкФ, 200ом. Ці клітини негайно ресуспендували у 1мл. бульйону SOC (Manniat et al. вище), а потім 500мкл 50% гліцерину-SOC як консерванті. Ці гліцеринові вихідні розчини заморожували у кількох аліквотах при -70°C. Аліквоту кожного з них розморожували та серійно засівали на LB-агарові планшети, доповнені ампіциліном при 100, мкг/мл. Номери колоній показують, що оптимальне співвідношення CD3+-кДНК до рZP7NX вектор було

1мкл - 45нг; таке лігування, дало 4,5 мільйонів первинних клонів.

Для скринінгу бібліотек, використовуючи BaF3, на основі дослідження проліферації (Приклад 5) гліцеринові вихідні розчини розбавляли рідкими культурами, 100 або 250 клонів на множину, у глибоко-коміркових мікротитрувальних планшетах, вирощували 24 години при 37°C зі струшуванням та плазмиду виділяли, використовуючи комплект Qiagen за інструкціями виробника. Таку ДНК потім трансфектували у клітини BHK, середовища кондиціювали протягом 72 годин, збирали та зберігали при -80°C та потім розміщали на клітинах 5K BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета або клітинах BaF3/zcytor17/OSMRбета протягом 72 годин, після чого проліферацію оцінювали, використовуючи дослідження флуоресценції з аламар блакитним (Приклад 5 В та Приклад 2В).

#### Приклад 7

##### Експресійне клонування zcytor17lig людини

Гліцеринові вихідні розчини з бібліотеки активованих CD3+-селектованих клітин людини (Приклад 6) додавали до бульйону Super BrothIP (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) + 0,1мг/мл ампіциліну (amp) при концентрації 250 клітини на 800 мікролітрів. E. coli давали урівноважитися протягом 24 годин при кімнатній температурі. При час інокуляції 400 мікролітрів засівали на планшети LB+агар для визначення фактичного титру інокуляції. Після 24 годин планшети підраховували та тоді кінцеву концентрацію SuperBrothII+E. coli доводили таким чином, щоб кінцева концентрація була 250 клітини на 1,2мл. З рази по 2 літри вводили до 6 літрів усього. Середовища тоді засівали у 96-коміркових глибоко-коміркових блоків (Qiagen). засівання робили на 8-канальному розподільнику Q-Fill2 (Genetix, Christchurch, Dorset, UK). E. coli вирощували протягом ночі при 37°C, струшуючи при 250 обертів/хвилину на багаторядному середовищному струшувальному пристрої New Brunswick Scientific Innova 4900. E. coli центрифугували з розчину при 3000об/хвил, використовуючи центрифугу Beckman GS-6KR. Ці гранули E. coli заморожували при -20°C або застосовували свіжими перед мініпрепаруванням плазмідної ДНК. Кожна гранула містила приблизно 250 клонів кДНК з бібліотеки CD3+-селектованих клітин людини.

Ці множини 250 клонів кДНК тоді мініпрепарували, використовуючи комплект QIAprep™ 96 Turbo Miniprep (Qiagen). Плазмідну ДНК елювали, використовуючи 125мкл TE (10мМ Трис pH 8,1мМ EDTA). Цю плазмідну ДНК тоді застосовували для трансфекції клітини BHK.

##### Трансфекція BHK

Клітини BHK засівали у 96-коміркові планшети тканинних культур при густині 12000 клітин на комірку в об'ємі 100мкл на комірку. Культивативними середовищами були DMEM (GibcoBRL), 5% інактивованої нагріванням сироватки зародка теляти, 2мМ L-глутамін (GibcoBRL), 1X PSN (GibcoBRL), 1мМ Na-піруват (GibcoBRL).

Наступної доби клітини BHK промивали одноразово 100мкл SFA. SFA є позбавленим сироватки середовища як-то DMEM/F12 або DMEM (Gibco/BRL), 2мМ GlutaMax™ (Gibco/BRL), 1мМ

NaПіруват, 10мкг/мл трансферину, 5мкг/мл інсуліну, 10мкг/мл фетуїну, 2мкг/мл селену, 25мМ ГЕ-ПЕС (Gibco/BRL), 100мкМ заміні амінокислоти (Gibco/BRL)

Суміш ADNA/ Lipofectamin™ було вироблено таким чином: 2,21 Ліпофектаміновий реагент (Gibco/BRL) комбінували з 102,8мкл SFA при кімнатній температурі; приблизно 5мкл плазмід ДНК (200нг/Р1) тоді додавали до Lipofectamin™/SFA для утворення суміші ДНК/Lipofectamin™, як інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. SFA видаляли від клітини ВНК та клітини інкубували з 50мкл суміші ДНК/Lipofectamin™ протягом 5 годин при 37°C з 5% CO<sub>2</sub>. 50мкл суміші ДНК/Lipofectamin додавали до кожної з двох комірок клітин ВНК, таким чином, щоб трансфекції були дублікатними.

Потім клітини ВНК інкубували з сумішшю ДНК/Ліпофектамін протягом 5 годин, суміш ДНК/Lipofectamin™ видаляли та додавали 100мкл культивативного середовища. Клітини інкубували протягом ночі, середовище видаляли та заміщали 100мкл культивативного середовища. Після культивування клітин протягом 48-72 годин, стандартизоване середовище видаляли, заморожували при -80°C протягом мінімум 20 хвилин, розморожували та тоді 50мкл аналізували у дослідженні проліферації Baf3, описаному у прикладі 5, для ідентифікування множини 250 клонів з лігандною активністю.

20 96-коміркових планшетів скринінгували в одиничному дослідженні. Це репрезентувало приблизно 250кДНКкомірку або 480000 кДНК усього. Ці стандартизовані середовища від приблизно 60 комірок (що репрезентує 250 кДНК на комірку) тестовані позитивними у дослідженні проліферації. Одну з цих позитивних множин було вибрано для поділу та виділення одиничної кДНК, що могла б кодувати zcytor17lig. Це була множина 62A12.

Для множини 62A12 11 ДНК застосовували для трансформації клітин DH10B ElectroMax™ (Gibco/BRL) електропорацією. Трансформанти засівали на планшети LB+amp(100мкг/мл), отримуючи одиничні колонії. Від електропорованої множини 672 окремі колонії ділили частинами у сім 96-коміркових планшетів, що містять 1,2мл SuperBrothII м на комірку. Ці планшети мали номери 62,1-62,7.

Це культивували протягом ночі та плазмідну ДНК мініпрепарували як вищезазначено. Для усіх семи планшетів плазмідну ДНК від розщеплення планшети трансфектували у клітини ВНК та аналізували проліферацією як вище, за винятком того, що трансфекції не робили дублікатно.

Два позитивні клони 62,6C7 та 62,6E9 ідентифікували за активністю від загальних 672 клонів. Плазмідну ДНК мініпрепарували з клону 62,6E9, секвенсували та отримували експериментальне ідентифікування, але з цих позитивних клонів отримували змішані послідовності. Для наступного виділення кДНК zcytor17lig до одиничного клону, 1мкл ДНК від множини 62,6E9 застосовували до електропорованих клітин DH10B та трансформанти засівали на планшети LB+amp (100мкг/мл), отримуючи одиничні колонії. Плазмідну ДНК, мініпрепаровану від кількох колоній секвенсували,

отримуючи точні послідовності ДНК.

Полінуклеотидна послідовність zcytor17lig була повної довжини (SEQ ID NO: 1) та її відповідна амінокислотна послідовність показано (SEQ ID NO: 2).

#### Приклад 8

Створення векторів експресії ссавців, що експресують розчинні рецептори zcytor17: zcytor17CEE, zcytor17CFLG, zcytor17CHIS та zcytor17-Fc4

А. Створення вектору експресії ссавців zcytor17, що містить zcytor17CEE, zcytor17CFLG та zcytor17CHIS

Вектор експресії отримували для експресії розчинного, зовнішньоклітинного домену поліпептид zcytor17lig, pZp9zcytor17CEE, де констракт створювали для експресії поліпептиду zcytor17lig з вмістом передбачуваного ініціюючого метіоніну та усиченого сусіднього для передбачуваного трансмембранного домену та з С-термінальним придатком Glu-Glu (SEQ IDNO: 32).

PCR-продукт приблизно 1500 по створювали, використовуючи ZC29,451 (SEQ ID NO: 33) та ZC29,124 (SEQ ID NO: 34) як праймери PCR для додання рестрикційних сайтів EcoRI та BstHI. Власну бібліотеку кДНК людини HPVS застосовували як темплат та PCR-ампліфікацію провадили таким чином: 30 циклів при 94°C протягом 1 хвилини, 65°C протягом 1 хвилини, 72°C протягом 1,5 хвилин, тоді 72°C протягом 7 хвилин; вимочування при 10°C.

PCR-реакцію осаджували етанолом та розщеплювали рестрикційними ферментами EcoRI та BstHI. Розщеплений PCR-продукт очищали на 1,0% агаровому гелі та вирізали смугу приблизно 1500 по. Цю смугу тоді знов ампліфікували, використовуючи ідентичні праймери з наступним циклюванням: 30 циклів при 94°C протягом 1 хвилини, 65°C протягом 1 хвилини, 72°C протягом 3 хвилин, тоді 72°C протягом 7 хвилин; вимочування при 10°C. PCR-реакцію осаджували етанолом та розщеплювали рестрикційними ферментами EcoRI та BstHI. Розщеплений PCR-продукт очищали на 1,0% агаровому гелі та приблизно 1500 по смуг вирізали. Вирізану ДНК субклонували у плазміду CEEpZp9, що розрізано EcoRI та XbaI, для створення плазмід з GLU-GLU С-термінально міченим розчинним рецептором для zcytor17, zcytor17CEEpZp9. Зовнішньоклітинний домен у кДНК zcytor17CEE у zcytor17CEEpZp9 має мовчазну мутацію, що змінює Т до С у позиції 1705 SEQ ID NO: 4 (кодуючий залишок Pro при залишку 403 SEQ ID NO: 5). Оскільки ця мутація була мовчазною, кДНК zcytor17 у zcytor17CEEpZp9 кодує поліпептид, який показано у SEQ ID NO: 5. Більш того, внаслідок застосовуваного констракту пару залишків Gly-Ser вставляли С-термінально до кінця розчинного, зовнішньоклітинного домену zcytor17 та перед С-термінальним Glu-Glu Придаток (SEQ ID NO: 32). По суті, придаток при С-закінченні зовнішньоклітинного домену zcytor17, був придатком Glu-Glu як показано у (SEQ ID NO: 17). Плазмід CEEpZp9 є вектором експресії ссавців, що містить касету експресії, що має промотор миші металотіонеїн-1, складні рестрикційні сайти для вставки кодувальної послідовності та термінатор гормону

росту людини. Плазмідна також має початок реплікації *E. coli*, елемент придатного для селекції маркеру експресії ссавців, що має промотор SV40, енхансер та початок реплікації, ген DHFR та термінатор SV40, використовуючи стандартні молекулярно-біологічні способи *zcutor17CEEpZp9* електропорували у компетентні клітини DH10B (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) за інструкціями виробника та засівали на планшети LB, що містили 100мкг/мл ампіциліну, та інкубували протягом ночі. Колонії скринінгували рестрикційним аналізом, або PCR від ДНК, отриманої з окремих колоній. Вставку послідовності позитивних клонів перевіряли аналізом послідовності. Великомасштабний препарат плазмід робили, використовуючи комплект Maxi Prep QIAGEN (Qiagen) відповідно інструкціям виробника.

Такий же процес застосовували для отримання розчинних рецепторів *zcutor17* з С-термінальним придатком His, що складається з залишків 6 His у лінії; та С-термінального придатку FLAG; (SEQ ID NO: 36), *zcutor17CFLAG*. Для створення цих констрактів вище-зазначений вектор має придаток HIS або FLAG; \ замість придатку *glu-glu* (наприклад. SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 32 або SEQ ID NO: 35).

В. Експресія у ссавцях Створення розчинного рецептору людини *zcutor17*: *zcutor17-Fc4*

Вектор експресії *pEZE-2 hzcutor17/Fc4*, отримували для експресії С-термінально міченого Fc4 розчинного варіанту *hzcutor17* (*zcutor17-Fc4* людини) у клітинах PF CHO. Клітини PF CHO є власною лінією клітин CHO, пристосованою для росту у вільному від білку середовищі (середовище ExCell 325 PF; JRH Biosciences). Власна лінія клітин CHO є похідною від клітин CHO DG44 [G. Urlaub, J. Mitchell, E. Kas, L. A. Chasin, V. L. Funanage, T. T. Myoda та J. L. Hamlin, The Effect Of Gamma Rays at the Dihydrofolate Reductase Locus: Deletions and Inversions, *Somatic Cell and Molec. Genet.*, 12: 555-566 (1986)]. Фрагмент «ДНК *zcutor17*, що включає полінуклеотидну послідовність від зовнішньоклітинного домену рецептору *zcutor17* конденсували у рамці до полінуклеотидної послідовності Fc4 (SEQ ID NO: 37) для створення конденсату *zcutor17-Fc4* (SEQ ID NO: 38 та SEQ ID NO: 39). Вектор *PEZE-2* є вектором експресії ссавців, що містить полінуклеотидну послідовність Fc4 та сайт клонування, що дозволяє швидке створення С-термінальних конденсатів Fc4, використовуючи стандартні способи молекулярної біології.

Фрагмент з 1566 пар основ, що створювали PCR, містить зовнішньоклітинний домен *zcutor 17* людини та перші дві амінокислоти з Fc4 (Glu та Pro) з сайтами FseI та BglII, кодованими на 5' та 3' кінцях, відповідно. Цей PCR-фрагмент створювали, використовуючи праймери ZC29, 157 (SEQ ID NO: 40) та ZC29, 150 (SEQ ID NO: 41) ампліфікацією з плазмідами, що містять зовнішньоклітинний домен *zcutor17* людини (*pZp9 zcutor 17CEE*) (Приклад 8A). Умови PCR-реакції були такими: 25 циклів 94°C протягом 1 хвилини, 60°C протягом 1 хвилини, та 72°C протягом 2 хвилини; 1 цикл при 72°C протягом 10 хвилин, а потім вимочування при 4°C. Фрагмент розщеплювали рестрикційними ендонуклеазами FseI та BglII, а потім очищали 1%

гель-еклектрофорезом та смугу очищали, використовуючи комплект гель-екстракції Qiaquick (Qiagen).

Утворену очищену ДНК вшивали протягом 5 годин при кімнатній температурі у вектор *pEZE-2*, раніше розщеплений FseI та BglII, що містить Fc4 3' сайтів FseI та BglII.

Два мкл суміші для лігування електропорували у 37мкл електрокомпетентних *E. coli* DH10B (Gibco) за інструкціями виробника. Трансформовані клітини розбавляли у 400мкл середовища LB та засівали на планшети LB, що містять 100мкг/мл ампіциліну. Клоні аналізували рестрикційним розщепленням та позитивні клони використовували для ДНК секвенсування для підтвердження послідовності конденсованого констракту. Один мікро-літр позитивного клону трансформували у 37мкл електрокомпетентних *E. coli* DH10B та переносили на планшет LB/amp. Одиначну колонію відбирали з цього планшету для початку 250мл культури LB/amp, що тоді вирощували протягом ночі при 37°C зі струшуванням при 250об/хвил. Цю культуру застосовували для створення 750мкг очищеної ДНК, використовуючи комплект Qiagen plasmid Maxi (Qiagen).

Приклад 9

Трансфекція та експресія поліпептидів розчинного рецептору *zcutor17lig*

Клітини ВНК 570 (ATCC №CRL-10314), DG-44 CHO, або інші клітини ссавців засівали при приблизно  $1,2 \times 10^6$  клітин/комірчу (6-комірковий планшет) у 800мкл прийнятного вільного від сироватки середовища (SF) (наприклад, DMEM, Gibco/BRL Висока Глюкоза) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Клітини трансфектували експресійними плазмідами, що містили *zcutor17CEE*, *zcutor17CFLG*, *zcutor17CHIS* або *zcutor17-Fc4* (Приклад 8), використовуючи Lipofectin™ (Gibco BRL), у вільному від сироватки середовищі (SF) за інструкцією виробника. Одиначні клони, що експресують розчинні рецептори, виділяють, скринінгують та вирощують у культивуванні середовищах клітин та очищають, використовуючи стандартні способи.

А. Експресія у ссавцях розчинного рецептору *zcutor17CEE* людини

Клітини ВНК 570 (ATCC NO: CRL-10314) засівали у колби культивування тканин T-75 та давали рости до приблизно 50-70% конфлюентності при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, у середовищі DMEM/FBS (DMEM, Gibco/BRL Висока Глюкоза, (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 5% сироватки зародка теляти, 1мМ L-глутаміну (JRH Biosciences, Leneas, KS), 1мМ натрій пірувату (Gibco BRL)). Клітини тоді трансфектували плазмідною, що містить *zcutor17CEE* (Приклад 8A), використовуючи Lipofectamin™ (Gibco BRL), у вільному від сироватки середовищі (SF), (композиція DMEM, 10мг/мл трансферину, 5мг/мл інсуліну, 2мг/мл фетюїну, 1% L-глутаміну та 1% натрій пірувату). Десять мікрограм плазмід ДНК *pZp9 zcutor17CEE* (Приклад 8A) розбавляли у тубі 15мл до загального кінцевого об'єму 500мкл середовищем SF. П'ятдесят мікролітрів ліпофектаміну змішували з 450мкл середовища SF, суміш ліпофектаміну додавали до суміші ДНК та інкубували приблизно 30 хвилин при кімнатній температурі. Чотири мл середовища SF додавали до суміші ДНК:ліпофектамін. Клітини

промивали одноразово 5мл середовища SF, видаляли рідину та додавали суміш ДНК:ліпоектамін. Клітини інкубували при 37°C протягом 5 годин, а тоді додавали 5мл середовища DMEM/10% FBS. Колбу інкубували при 37°C протягом ночі, після чого клітини ділили частинами у селекційні середовища (вищезазначене середовище DMEM/FBS з додаванням 1мкМ метотрексату чи 10мкМ Метотрексату (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) у 150мм планшети при 1:2, 1:10 та 1:50. Приблизно 10 діб після трансфекції один 150мм планшет резистентних стосовно 1мкМ метотрексату колоній трипсинізували, клітини поєднували та половину клітин перезасівали у 10мкМ метотрексат для наступної ампліфікації експресії білку zcytor17CEE. Зразок стандартизованого середовища від цієї множини ампліфікованих клітин тестували стосовно рівнів експресії, використовуючи аналіз SDS-PAGE та Вестерн-аналіз.

В. Експресія у ссавцях розчинного людини рецептору zcytor17-Fc4

П'ять реплікатів по 200мкг плазмідної ДНК pEZE-2h zcytor17Fc4 (Приклад 8В) лінеаризували рестрикційним розщепленням FspI, рестрикційним ферментом, що розрізає одноразово у векторі та не порушує гени, обов'язкові для експресії. 200мкг геномної ДНК клітин CHO додавали до кожного реплікату, як носія ДНК, а тоді ДНК осаджували додаванням 0,1 об'ємі 3М Натрій Ацетату з рН 5,2 та 2,2 об'ємі етанолу, а потім 15 хвилин інкубували на льоді та мікроцентрифугували при 4°C. Утворені гранули ДНК промивали у 70% етанолі та сушили на повітрі перед новим суспендуванням у 100мкл вільного від білку неселекційного середовища CHO (PF) для росту (21г/л PF клітин CHO Ex 325/200мМ L-глутаміну (Gibco)/100мМ натрій пірувату (Gibco)/1x HT Supplement (Gibco). Десять мільйонів клітин PF CHO додавали до ДНК у 600мкл неселекційного середовища PF CHO для росту, а тоді електропорували в електропораційній системі Gene PulserII (BioRad), використовуючи ємність 950мкФ та 300кВ, використовуючи електропораційну кювету з розривом 0,4см Gene Pulser (BioRad). Усі п'ять реплікатів електропорованих клітин поєднували та безпосередньо селектували у середовищі HT (21г/л PF CHO Ex клітин 325/200мМ L-глутаміну (Gibco)/100мМ натрій пірувату (Gibco). Клітини селектували протягом 15 діб у середовищі HT перед пропусканням при 4x10<sup>5</sup>мл у 50нм селекції MTX. Через 8 діб клітини засівали при 3,5x10<sup>5</sup>клітин/мл у 200мМ селекції MTX. Через один тиждень клітини засівали при 4x10<sup>5</sup>клітин/мл у селекції IZM MTX. Після двох тижнів ц 1мкМ MTX, клітини засівали при 1x10<sup>6</sup>клітин/мл у 50мл для створення стандартизованого середовища. Утворені 72 годинні стандартизовані середовища аналізували зондуванням Вестерн-блотуванням з антитілом, створеним проти Ig людини. Клітини продукували білок hzcytor17/Fc4 при приблизно 1мг/л.

С. Великомасштабна експресія розчинного рецептору людини zcytor17-Fc4 у ссавцях 200мкг плазмідної ДНК pEZE-2hzcytor17Fc4 (Приклад 8В) лінеаризували рестрикційним розщепленням FspI, рестрикційним ферментом, що розрізає одноразово вектор pEZE-2 та не порушує гени, обов'язкові

для експресії. Дві сотні мікрограм геномної ДНК CHO (власно отриманої) додавали як носій ДНК та тоді ДНК осаджували додаванням 0,1 об'ємі 3М Натрій Ацетат рН 5,2 та 2,5 об'ємі етанолу, а потім мікроцентрифугували при кімнатній температурі. П'ять реплікатів гранул ДНК було вироблено та трансформовано. Утворені гранули ДНК промивали у 70% етанолі та сушили на повітрі перед новим суспендуванням у 100мкл неселекційного середовища для росту PF CHO (21г/л PF CHO Ex клітин 325/200мМ L-глутаміну (Gibco)/100мМ натрій пірувату (Gibco)/1x HT Supplement (Gibco). Десять мільйонів клітин PF CHO додавали до ДНК у 600мкл неселекційного середовища для росту PF CHO, а тоді електропорували в електропораційній системі Gene PulserII (BioRad), використовуючи ємність 950мкФ та 300В, використовуючи електропораційну кювету з розривом 0,4см Gene Pulser (BioRad). Електропоровані клітини поєднували та вводили безпосередньо у селекційне середовище HT (21г/л PF CHO Ex клітин 325/200мМ L-глутаміну (Gibco)/100мМ натрій пірувату (Gibco). Клітини селектували протягом 14 діб у середовищі HT перед пропусканням при 4x10<sup>5</sup>мл у 50нм селекції MTX. Клітини ампліфікували до 200нМ MTX, а тоді до 1мкМ MTX. HT, 50нМ та 1мкМ множини засівали при 1x10<sup>6</sup>кл/мл протягом 48 годин та, утворені стандартизовані середовища аналізували зондуванням Вестерн-блотуванням з антитілом, створеним проти Ig людини.

Приклад 10

Очистка розчинних рецепторів zcytor17 від клітини BHK 570 та CHO A

Тимчасова експресія у ссавцях та очистка розчинного рецептору людини zcytor17-Fc4

Плазмідну ДНК pEZE-2hzcytor17Fc4 (Приклад 8В) вводили у 40 максипланшетів клітин BHK, використовуючи Lipofectamin (Gibco BRL), як описано тут та в інструкціях виробника. Клітинам давали відновлюватися протягом ночі, тоді промивали позбавленим сироватки середовищем (SL7V4, вироблено власно). Після 72 годин середовища збирали та фільтрували та клітини промивали позбавленим сироватки середовищем. Після 72 годин середовища знов збирали та фільтрували.

Позбавлені сироватки стандартизовані середовища (партії по 2x1,5л) від тимчасово трансфектованих клітин BHK прокачували через 1,5мл білкову A-агарову колонку у 20мМ Трис, рН 7,5, 0,5М NaCl. Колонку промивали екстенсивно цим буфером, а тоді приєднаний білок елювали 1мл 0,2М гліцину, рН 2,5, 0,5М NaCl.

Елюований білок збирали у 0,1мл 2М Трис, рН 8,5. Аліквоти збирали для гель-ектрофорезу SDS-поліакриламід та zcytor17-Fc діалізували протягом ночі проти PBS. Розчинний рецептор стерильно фільтрували та розміщали у аліквотах при -80°C.

В. Очистка zcytor17-Fc4

Рекомбінантний карбоксильно-термінально мічений Fc4 zcytor17 (Приклад 8 та Приклад 9) отримували з трансфектованих клітин CHO. CHO-трансфекцію провадили, використовуючи способи, відомі у рівні техніки. Приблизно по 5 літрів стандартизованих середовищ збирали та стерильно фільтрували, використовуючи фільтри Nalgene 0,2мкМ.

Білок очищали від фільтрованого середовища комбінацією афінної хроматографії Poros 50 protein A (PerSeptive Biosystems, 1-5559-01, Framingham, MA) та Superdex 200 гел-ексклюзійної хроматографічної колонки (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Культиватійне середовище було безпосередньо завантажено у афінну колонку 10x70мм (об'єм 5,5мл) при швидкості приблизно 3-10мл/хвилини.

Після промивки колонки десятьма об'ємами колонки PBS, приєднаний білок елювали п'ятьма об'ємами колонки 0,1М гліцину, pH 3,0 при 10мл/хвилини). Фракції по 2мл кожна збирали у туби, що містили 100мкл 2,0М Трис, pH 8,0, для нейтралізації ельованих білків. Зразки афінної колонки аналізували SDS-PAGE з виявлення кумассі та Вестерн-блотуванням стосовно наявності zcytor17-Fc4, використовуючи Ig-HRP людини. Zcytor17-Fc4-вмісні фракції поєднували та концентрували до 1-2мл, використовуючи концентратор Biomax-30 (Millipore) та завантажували на гел-фільтрувальну колонку 20x580мм Superdex 200. Фракції, що містили очищений zcytor17-Fc4, поєднували, фільтрували через фільтр 0,2мкм, аліквотували по 100мкл кожна та заморожували при -80°C. Концентрацію кінцевого очищеного білку було визначено дослідженням BCA (Pierce, Rockford, IL).

Аналіз zcytor17/Fc4C SDS-PAGE та Вестерн-блотуванням

Рекомбінантний zcytor17-Fc4 аналізували SDS-PAGE (Nupage 4-12%, Invitrogen, Carlsbad, CA) способом виявлення з кумассі та Вестерн-блотуванням, використовуючи Ig-HRP людини. Стандартизоване середовище або очищений білок електрофорезували, використовуючи міні-комірку InvitrogenNovex's Xcell II та переносили до нітроцелюлози (0,2мм; Invitrogen, Carlsbad, CA) при кімнатній температурі, використовуючи блот-модуль Novex's Xcell II, перемішуючи відповідно вказівкам, запропонованим в інструкції до приладу. Переніс провадили при 500mA протягом години у буфері, що містив 25мМ Трис-основи, 200мМ гліцину, та 20% метанолу. Фільтри тоді блокували 10% нежирним сухим молоком у PBS протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Нітроцелюлозу швидко промивали, тоді антитіло Ig-HRP людини (1:2000) додавали у PBS, що містить 2,5% нежирного сухого молока. Блоти інкубували протягом двох годин при кімнатній температурі, або протягом ночі при 4°C з обережним струшуванням. Після інкубування блоти промивали 3 рази протягом 10 хвилин кожний у PBS, тоді швидко промивали водою.

Блоти виявляли, використовуючи комерційно доступні хемілюмінесцентні субстратні реагенти (Super Signal<sup>®</sup>; ULTRA реагенти 1 та 2 змішані 1:1; реагенти отримано від Pierce, Rockford, IL) та сигнал реєстрували, використовуючи програму Lumi-Imager's Lumi Analyst 3,0 (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) для часу експозиції в межах від 10с до 5 хвилин, або як треба.

Очищений zcytor17-Fc4 виявлено як одиничну смугу з виявленням кумассі або сріблом при приблизно 220кДа у невідновних умовах та при при-

близно 120кДа у відновних умовах, підказуючи димерну форму zcytor17-Fc4 у невідновних умовах, як очікувану.

#### Приклад 11

Дослідження, використовуючи розчинний рецептор zcytor17 zcytor17-Fc4

Розчинний рецептор в аналізі конкурентним інгібуванням

Клітини BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRбета та клітини BaF3/zcytor17/OSMRбета центрифугували та промивали у вільному від mIL-3 середовищі. Клітини центрифугували та промивали 3 рази для забезпечення видалення mIL-3. Клітини тоді підраховували у гематометрі. Клітини засівали у 96-комірковий планшет при 5000 клітин на комірку в об'ємі 100мкл на комірку, використовуючи вільне від mIL-3 середовище.

Обидва стандартизованих середовища від активації клітин CCRF-CEM та CCRF-HSB2 та CD3+-селектованих клітин людини, описані у прикладі 5, додавали у окремих експериментах при концентрації 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75%, 0,375% та 0,187%, без розчинних рецепторів zcytor17 (zcytor17-Fc4; Дивись, Приклад 9 та Приклад 10) при 1-10г/мл або без них. Загальний об'єм дослідження був 200мкл.

Досліджені планшети інкубували при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> протягом 3-5 діб, в цей час Аламар блакитний (Accumed) додавали при 20мкл/комірку. Планшети знов інкубували при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> протягом 16-24 годин. Планшети читували на планшетному зчитувачі Fmax<sup>™</sup> (Molecular Devices), як описано у прикладі 2. Результати продемонстрували часткове інгібування росту клітин розчинним рецептором zcytor17-Fc4 при 10мкг/мл, підтверджуючи, що фактор у кожному зразку був специфічним стосовно рецептору zcytor17.

Криві титрування, розбавленого розчинного рецептору, або гетеродимерів розчинного рецептору, що містили zcytor17/OSMR та zcytor17/WSX-1 провадили також, використовуючи вищевказане дослідження для визначення, чи є рецептори zcytor17 здатними повністю інгібувати ріст, наприклад, при низьких або фізіологічних концентраціях.

Подібне дослідження конкурентним інгібуванням здійснювали, використовуючи очищений zcytor17lig людини (Приклад 35) та розчинні рецептори у дослідженні з люци-феразою (Приклад 20). Результати показують, що гомодимерний zcytor17 та гетеродимерний zcytor17/OSMR здатні до інгібування активності zcytor17lig.

#### Приклад 12

Дослідження шляхом уловлення секретії

Дослідження шляхом уловлення секретії застосовували для тестування приєднання zcytor17lig до рецепторів, що містять рецептор zcytor17, як-то рецептор zcytor17, або гетеродимерів рецепторів, що містять zcytor17/OSMR та zcytor17/WSX-1. Плазмідну ДНК Zcytor17lig трансфектували у клітини COS та застосовували для оцінки приєднання zcytor17lig до рецепторів, що містять рецептор zcytor17 шляхом уловлення секретії, як описано нижче.

#### А. Трансфекції клітин COS

Трансфекцію клітин COS провадили таким чином: 800нг кДНК zcytor17lig та 4мкл ліпофектаміну

змішували у 80мкл вільного від сироватки DMEM-середовища (55мг натрій пірувату, 146мг L-глутаміну, 5мг трансферину, 2,5мг інсуліну, мг селену та 5мг фетюїну у 500мкл DMEM) та інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Тоді додавали 320мкл вільного від сироватки DMEM-середовища. Ці 500мкл суміші додавали до 2x10<sup>5</sup> клітин COS/комірку, засівали на 12-комірковий планшет культивування тканин та інкубували протягом 5 годин при 37°C. Тоді 500мкл DMEM-середовища з 20% FBS (100мкл FBS, 55мг натрій пірувату та 146мг L-глутаміну у 500мкл DMEM) додавали та клітини інкубували протягом ночі.

В. Дослідження шляхом уловлення секреції

Дослідження шляхом уловлення секреції проводили таким чином: Середовище вимивали від клітин з PBS, тоді клітини фіксували протягом 15 хвилин 1,8% формальдегідом у PBS. Клітини тоді промивали PBS/0,1% BCA та просочували 0,1% Тритон-Х у PBS протягом 15 хвилин та знов промивали PBS/0,1% BCA. Клітини блокували протягом 1 години PBS/0,1% BCA. Залежно від того, який розчинний рецептор застосовували, клітини інкубували протягом 1 години у TNB з: (А) 1-3мкг/мл конденсованого білку розчинного рецептору zcytor17 zcytor17-Fc4 (Приклад 10); або (В) 1-3г/мл білку розчинного рецептору zcytor17/OSMRбета. Клітини тоді промивали TNT. Залежно від того, який розчинний рецептор застосовували (наприклад, якщо мічений придатком Fc4 (SEQ ID NO: 37), С-термінальним придатком FLAG (SEQ ID NO: 26), або придатком CEE (SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 35)), клітини інкубували протягом ще години з: (А) 1:200 розбавленим козячим Ig-HRP проти людини (Fc специфічним); (В) 1:1000 розбавленим M2-HRP; (С) 1:1000 розбавленим анти-GluGlu антитілом-HRP; або (D) 1:300 розбавленим стрептавідином-HRP (комплект NEN) у TNB, наприклад. Знов клітини промивали TNT.

Для визначення позитивного приєднання флуоресцеїн тиамідний реагент розбавляли 1:50 у буфері для розбавлення (комплект NEN) та інкубували протягом 4-6 хвилин і промивали TNT.

Клітини консервували середовищем Vectashield Mounting (Vector Labs Burlingame, CA) розбавленим 1:5 TNT. Клітини візуалізували, використовуючи фільтр FITC на флуоресцентному мікроскопі. Результати цього дослідження показували, що zcytor17lig людини не приєднується до жодного з розчинних рецепторів. Ці дані підказують, що структура zcytor17lig була чутливою до фіксації у цьому протоколі, оскільки була ясною здатність до приєднання до поверхневих рецепторів клітин (дивись, наприклад, дані цитометрії у потоці, представлені нижче у прикладі 39).

Приклад 13 Хромосомне дослідження та розташування послідовності, гена zcytor17li

Послідовність гена zcytor17lig картували до хромосоми 12 людини, використовуючи комерційно доступний варіант панелі Stanford G3 Radiation Hybrid Mapping Panel (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). Панель Stanford G3 RH містить ДНК від кожного з 83 радіаційних гібридних клонів суцільного геному людини разом з двома контрольними ДНК (донор RM та реципієнт A3). Загальнодо-

ступний WWW-сервер, локалізований в Інтернеті при [www.stanford.edu](http://www.stanford.edu), дозволяє хромосомну локалізацію маркерів та генів.

Для картування послідовності гена zcytor17lig з панеллю Stanford G3 RH 20мкл реакції проводили у 96-коміркових мікротитрувальних планшетах, сумісних з PCR (Stratagene, La Jolla, CA) та застосовували у термічному циклері RoboCycler Gradient 96 (Stratagene). Кожна з 95 PCR-реакцій складалася з 2мкл 10X PCR-реакційного буферу (Qiagen, Inc., Valencia, CA), 1,6мкл суміші dNTP (2,5мМ кожного, PERKIN-ELMER, Foster City, CA), 1мкл сенсового праймеру, ZC41, 458 (SEQ ID NO: 42), 1мкл антисенсового праймеру, ZC41, 457 (SEQ ID NO: 43), 2мкл RediLoad (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL), 0,1мкл ДНК-полімерази Qiagen HotStarTaq (50диниці/мкл), 25нг ДНК від конкретного гібридного клону або контролю та дистильованої води до загального об'єму 20мкл. Реакції покривали рівною кількістю мінерального масла та герметизували. Умови PCR-циклів були такими: початковий 1 цикл 15 хвилин денатурації при 95°C, 35 циклів 45с денатурації при 95°C, 1 хвилина гібридизації при 53°C та 1 хвилин та 15с подовження при 72°C, а потім кінцевий 1 цикл подовження 7 хвилин при 72°C.

Реакції сепарували електрофорезом на 2% агаровому гелі (EM Science, Gibbstown, NJ) та візуалізували виявленням етидіум бромідом.

Результати показували зчеплення послідовності гена zcytor17lig з маркером SHGC-83339 хромосоми 12 з балом LOD більше 11 та на відстані 17 cR\_10000 від маркеру. Цей маркер позиції гена zcytor17lig у хромосомному регіоні 12q24,31.

Приклад 14

Ідентифікування та клонування мишачого zcytor17lig

А. Ідентифікування zcytor17lig миші повної довжини

Використовуючи пептидну послідовність zcytor17lig людини (SEQ ID NO: 2) для запитання у власній базі даних ДНК, мишачу кДНК, Genbank Accession №AK005939, ідентифікували, як потенційно часткову послідовність zcytor17lig миші. Послідовність кДНК AK005939 застосовували для запитання у базі даних, що містить мишачі геномні фрагменти. Геномний континг мишачого zcytor17lig було складено (SEQ ID NO: 76). Передбачення кодувального потенціалу на цей геномний фрагмент програмою Genscan виявив можливу послідовність кДНК, з такою ж генною структурою, як zcytor17lig людини. Послідовність мишачої кДНК є репрезентованою SEQ ID NO: 10, а відповідну поліпептидну послідовність показано у SEQ ID NO: 11.

В. Клонування zcytor17lig миші з бібліотеки кДНК яєчок миші шляхом PCR.

На основі геномної послідовності (SEQ ID NO: 76), створювали два праймери PCR та застосовували для ідентифікування джерела кДНК zcytor17lig миші шляхом PCR.

Ці праймери ZC41498 (SEQ ID NO: 86) та ZC41496 (SEQ ID NO: 87) створювали до припущених 5' та 3'нетрансльованих регіонів послідовності миші (SEQ ID NO: 76 та SEQ ID NO: 10). Кілька джерел кДНК скринінгували шляхом PCR,

включаючи наявну мара-фон-кДНК (Clontech) та аліквоти локально виробленої бібліотеки кДНК.

Продукти візуалізували на 1% агаровому гелі. Смуги очікуваного розміру спостерігали у реакції, використовуючи кДНК-темплат бібліотеки яєчок миші. Ці PCR-реакції успішно провадили у об'ємах приблизно 50мкл з або без 10% ДМСО, використовуючи полімеразу pfu turbo (Stratagene) відповідно рекомендаціям виробника; з додатковим нанесенням гарячого воску протягом початкових 50с (Molecular Bioproducts, Inc. San Diego, CA). PCR-термоцикування провадили з одиничним циклом 94°C протягом 4 хвилин, а потім 40 циклів 94°C: 30с, 48°C: 30с, 72°C: 50с; з додатковим кінцевим подовженням при 72°C протягом 7 хвилин. Дві PCR-реакції поєднували та очищали, використовуючи низько-плавкий агар та фермент розщеплення агару гелазу (Epicenter, Inc. Madison, WI) відповідно рекомендаціям виробника.

Визначення ДНК-послідовності цих PCR-продуктів виявило кДНК-послідовність мишачого zcytor17 (SEQ ID NO: 90), який містить ORF, ідентичну SEQ ID NO: 10, підтверджуючи, що SEQ ID NO:10 кодувала поліпептид zcytor17lig миші.

Праймери PCR, ZC41583 (SEQ ID NO: 88) та ZC41584 (SEQ ID NO: 89), тоді застосовували для додавання рестрикційних сайтів FseI та AseI та часткової послідовності Kozak до відкритої рамки зчитування mzcyc17lig та термінаційного коду (SEQ ID NO: 92). Термоциклер Robocycler 40 (Stratagene) застосовували для прогону температурного градієнту температури гібридизації та циклювання таким чином. Полімеразу Pfu turbo (Stratagene) застосовували, як описано вище, але тільки у 10% ДМСО. Циклювання провадили з одиничним циклом 94°C протягом 4 хвилин; а потім 20 циклів 94°C: 30с, градієнт 65°C до 51°C: 30с, 72°C: 1 хвилина; та одиничне подовження 72°C протягом 7 хвилин.

Темплат для другої реакції термоцикування був 1мкл початкового гелю-очищеного вищезазначеного PCR-продукту mzcyc17lig. Утворений PCR-продукт від трьох найнижчих температур реакції поєднували та очищали на гелі, використовуючи описаний вище спосіб з гелазою (Epicenter). Цей очищений mzcyc17lig розщеплювали FseI та AseI та вшивали у вектор pZP7X, модифікований для вмісту сайтів FseI та AseI у його сайт клонування.

Плазмідна pZP7X представляє вектор експресії ссавців, що містить касету експресії, що має металотіонеїновий промотор 1(МТ-1) миші, складні рестрикційні сайти для вставки кодувальної послідовності та термінації гормон росту людини. Плазмідна також має початок реплікації E. coli, експресійний елемент селективного маркера ссавців, що має промотор SV40, енхансер та початок реплікації, ген DHFR та термінатор SV40. Клоновані мишачі кДНК-послідовності репрезентовані SEQ ID NO: 90 та відповідною поліпептидною послідовністю, показаною у SEQ ID NO: 91 (яка є ідентичною SEQ ID NO: 11).

#### Приклад 15

Виділення клону кДНК zcytor17lig миші з активованої бібліотеки селезінки миші

А. Первинне мишаче джерело, застосовуване

для виділення zcytor17lig миші

Селезінки миші від мишей Balb/C збирали та пульпували між замороженими покривними стеклами для утворення суспензії клітин. Вихід виділених первинних клітин миші очікують приблизно як  $6,4 \times 10^5$  клітини перед описаною нижче селекцією.

Клітини селезінки суспендують у 9,6мл буферу MACS (PBS, 0,5% ЕДТА, 2мМ ЕДТА). 1,6мл суспензії клітин видаляють та 0,4мл CD90(Thy1. 2) мікрокульки (Miltenyi Biotec) додавали. Суміш інкубують протягом 15 хвилин при 4°C.

Ці клітини, мічені кульками CD90 промивали 30мл буферу MACS та тоді ресуспендували у 2мл буферу MACS.

VS+mnoHKy (Miltenyi) отримували відповідно інструкціям виробника. VS+колонку тоді розміщали у магнітному полі VarioMACS™ (Miltenyi). Колонку урівноважували 5мл буферу MACS. Виділені первинні клітини миші тоді вводили у колонку. CD90-негативні клітини проходили через колонку. Колонку промивали 9 мл (3X3мл) буферу MACS. Колонку тоді відділяли від магніту та розміщали зверху 15мл фалконової туби. CD90+клітини елювали додаванням 5мл буферу MACS до колонки та приєднані клітини проганяли, використовуючи плунжер, запропонований виробником. Інкубування клітин з магнітними кульками CD90, промивки та етапи VS+колонки (інкубування через елювання) повторювали ще раз. Утворені CD90+-фракції від 2 сепараційних колонок поєднували. Вихід CD90+-селектованих клітин селезінки миші очікують як приблизно  $1 \times 10^5$  загальних клітин.

Зразок поєднаних CD90+-селектованих клітин миші видаляли для виявлення та сортування на флуоресцентному сортувачі клітин антитіл (FACS) для оцінки їх чистоти.

РЕ-сполучене хом'якове антитіло анти-миші CD3E (PharMingen) застосовують для виявлення та сортування CD90+-селектованих клітин. Мишачі CD90+-селектованих клітин повинно бути приблизно 93% CD3+-клітин, підказуючи, що клітини є на 93% Т-клітинами.

Мишачі CD90+-селектовані клітини активували інкубуванням  $3 \times 10^5$ клітин/мл у RPMI+5% FBS+PMA 10нг/мл та йоніміцині 0,5Аг/мл (Calbiochem) протягом ночі при 37°C. Супернатант від цих активованих CD90+-селектованих клітин миші тестували на активність zcytor17lig, як описано нижче. Більш того, активовані CD90+-селектовані клітини миші застосовують, отримуючи бібліотеку кДНК, як описано у прикладі 16, нижче.

#### Приклад 16

Клонування zcytor17lig миші від бібліотеки CD90+-селектованих клітин миші Скринінгом бібліотеки кДНК первинних активованих CD90+-селектованих клітин миші можна виявити виділену кДНК, що є новим членом чотирьох-спіральновузлової родини цитокінів, що могли б кодувати мишачий ортолог zcytor17lig людини. КДНК ідентифікують гібридизаційним скринінгом.

А. Вектор для створення CD90+-селектованої бібліотеки

Вектор pZP7N застосовують для створення CD90+-селектованої бібліотеки (Дивись Приклад 6А).

В. Отримання бібліотеки кДНК первинних активованих CD90+-селектованих клітин миші

Приблизно 1,5X10<sup>6</sup> первинних CD90+-селектованих клітин миші, стимульованих у іономіцині/PMA (Приклад 15) виділяють центрифугуванням. Загальну РНК виділяють з гранул клітин та перетворюють у подвійно-ланцюгову кДНК, як описано у прикладі 6В. Цю кДНК потім трансфектують у клітини ВНК, як описано у прикладі 6В, та проліферацію оцінюють, використовуючи дослідження флуоресценції з аламар блакитним (Приклад 2В).

Для скринінгу бібліотеки шляхом уловлення секретії клонування, комплекс, ампліфікована форма бібліотеки, є необхідним для трансфекції клітин COS-7. 4,8 мільйони клонів засівали на 110 LB-агарових планшетів 15см, доповнених 100мкг/мл ампіциліну, 10мкг/мл метициліну. Після вирощування протягом ночі при 37°C бактерії збирали вискоблюванням та гранулювали. Плазмідну кДНК екстрагували з пелетованих бактерій, використовуючи Nucleobond-giga (Clontech) за інструкціями виробника. Цю плазмідну кДНК застосовували для трансфекції клітин COS-7 на слайдах та скринінгували, використовуючи спосіб уловлення секретії, описаний нижче (Приклад 17).

С. Скринінг активованої бібліотеки кДНК миші

Приблизно 5X10<sup>5</sup> клонів засівали на максипланшети 10 LB/Amp.

Колонії знімали, денатурували, нейтралізували та перехресно зв'язували, використовуючи стандартну процедуру [Sambrook, J. et al. вище]. 50 нанограм PCR-фрагменту 5'RACE 300 по (Приклад 14) мітили 32р, використовуючи комплект мічення рандомізованих праймерів Prime-Itr RmT (Stratagene). 10 фільтрів гібридизували з цим міченим зондом при 65°C протягом ночі, використовуючи розчин ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech). Фільтри тоді промивали послідовно при 60°C протягом 1 години 3 рази з 0,2хSSC (30mM NaCl, 3mM натрій цитрат, pH 7,0), 0,1% SDS; та тоді при 65°C протягом 1 години Фільтри тримали при -80°C протягом ночі та рентгеноплівка експонувалася. Агарові пробки, що містили позитивні колонії, виймали та клони засівали на 10-см планшети LB/Amp. Колонії тоді знімали з фільтрів та гібридизували знов після такої ж процедури, описаної вище. Одиничні клони кДНК виділяли та секвенсували, використовуючи стандартні способи ідентифікування кДНК миші.

Приклад 17

Мишачий zcytor17lig не приєднується до розчинного рецептору zcytor17 людини у дослідженні шляхом уловлення секретії

кДНК клону mzcyc17lig/pZP7 миші трансфектували у клітини COS та тестували приєднання zcytor17, що містить розчинні рецептори (розчинний рецептор zcytor17 людини zcytor17-Fc4 (Приклад 10), або гетеродимери розчинного рецептору (zcytor17/WSX-1 або BaF3/zcytor17/OSMRбета), для трансфектованих клітин COS дослідженням шляхом уловлення секретії (Приклад 12). Дослідження підтверджувало, що zcytor17lig миші не приєднується до розчинного рецептору zcytor17 людини.

Трансфекцію клітин COS провадили, як у при-

кладі 12, використовуючи приблизно 0,7мкг кДНК zcytor17lig миші (Приклад 16) у 31.

Дослідження шляхом уловлення секретії провадили, як у прикладі 12, використовуючи, наприклад, для виявлення 1мкг/мл конденсованого з білком Fc4 розчинного рецептору zcytor17 (Приклад 10) (або zcytor17, що містить гетеродимери розчинного рецептору, як описано тут) у TNB та 1:200 розбавлений козяче антитіло Ig-HRP антилюдини (Fc-специфічне) у TNB.

Позитивне приєднання розчинного рецептору zcytor17 людини до отриманих фіксованих клітин не визначали з флуоресцеїновим тирамідним реагентом, як у прикладі 12. Клітини консервували та візуалізували згідно з Прикладом 12.

Результати показали, що zcytor17lig миші не приєднується до розчинного рецептору людини zcytor17 (або zcytor17, що містить гетеродимери розчинного рецептору, як описано тут).

Приклад 18

Експресія мишачого zcytor17lig у клітинах ссавців

Експресія у ссавцях мишачого zcytor17lig

Клітини ВНК 570 (ATCC No: CRL-10314) засівали у 10см чашки культивування тканин та давали рости до приблизно 20% конфлюентності протягом ночі при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, у середовищі DMEM/FBS (DMEM, Gibco/BRL високо-глюкозне середовище; Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 5% сироватки зародка теляти (Hyclone, Logan, UT), 1mM L-глютаміну (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 1mM натрій пірувату (Gibco BRL). Клітини тоді трансфектували плазмідною mzcyc17lig/pZP7X (Приклад 14), використовуючи стабільний трансфекційний комплект ссавців ліпофектамін (GibcoBRL) відповідно інструкціям виробника.

Одну добу після трансфекції клітини ділили частинами 1:10 та 1:20 у селекційне середовище (середовище DMEM/FBS з додаванням 1мкМ метотрексату (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)) у 150мМ планшетах. Середовища на клітинах заміщали свіжим селекційним середовищем на добу 5 після трансфекції. Приблизно 10 діб після трансфекції резистентні до метотрексату колонії трипсинізували та клітини поєднували та засівали у колби великомасштабної культури. Одноразово клітини вирощували до приблизно 90% конфлюентності, їх промивали PBS 3 рази та культивували з позбавленим сироватки середовищем ESTEP2 (DMEM (Gibco BRL), 0,11г/л Na-Пірувату, 3,7г/л натрій гідрокарбонату, 2,5мг/мкл інсуліну, 5мг/л трансферину, pH7,0) стандартизованим середовищем. Стандартизоване середовище збирали через 3 доби та запускали у дослідженні проліферації BaF3, використовуючи Аламар блакитний, як описано у прикладі 19 нижче.

Приклад 19

Zcytor17lig миші не активує рецептор людини zcytor17 у дослідженні BaF3, використовуючи Аламар блакитний

Проліферацію BaF3/zcytor17, BaF3/zcytor17/OSMRбета та BaF3/zcytor17/WSX-1 клітини (Приклад 4 та 5В) оцінювали, використовуючи позбавлене сироватки стандартизоване середовище від клітини ВНК, що експресували zcytor17lig миші (Приклад 18).

Клітини BaF3/zcytor17, BaF3/zcytor17/OSMRбета та BaF3/zcytor17/WSX-1 центрифугували, промивали та засівали у вільне від mIL-3 середовище, як описано у прикладі 5В. Стандартизоване середовище від клітини ВНК, що експресувало zcytor17lig миші (Приклад 18) розбавляли вільним від mIL-3 середовищем до концентрації 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% та 0,375%. Дослідження проліферації проводили, як у прикладі 5В.

Результати цього дослідження були негативними, показуючи, що zcytor17lig миші не активує рецепторні комплекси людини zcytor17, zcytor17/OSMRбета, або zcytor17/WSX-1.

#### Приклад 20

Людини zcytor17lig активує рецептор людини, zcytor17/OSMRбета, у дослідженні з люциферазою А. Створення лінії клітин BaF3/KZ134/zcytor17

Плазмиду KZ134 створювали з комплементарних олігонуклеотидів ZCl<sub>2</sub>, 749 (SEQ ID NO: 44) та ZCb, 748 (SEQ ID NO: 45), що містять елементи фактору транскрипції приєднання STAT від 4 генів, які включають модифікований індукбельний елемент c-fos Sis (m67SIE, orhSIE) [Sadowski, H. et al., Science 261: 1739-1744, 1993], p21SEI від p21WAF1 ген [Chin, Y. et al., Science 272: 719-722, 1996], реакційний елемент молочних залоз від β-казеїнового гена [Schmitt-Ney, M. et al., Mol. Cells. Biol. 11: 3745-3755, 1991] та індукбельний елемент STAT від гена Fcg RI, [Seidel, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3041-3045, 1995]. Ці олігонуклеотиди містили сумісні з Asp718-XhoI кінці та їх вшивали, використовуючи стандартні способи, у реціпієнтний репортерний вектор люцифери світляка з промотором c-fos [Poulsen, L. K. et al., J. Biol. Chem. 273: 6229-6232, 1998], розщеплений такими ж ферментами, і що містить придатний для селекції неоміцином маркер. Плазмиду KZ134 застосовували до стабільно трансфектованих клітин BaF3, використовуючи стандартні способи трансфекції та селекції для вироблення лінії клітин BaF3/KZ134.

Стабільну індикаторну лінію клітин BaF3/KZ134, що експресували повної довжини рецептор zcytor17 або рецептор zcytor17/OSMRбета створювали, як у прикладі 4.

Клони розбавляли, засівали та вибирали, використовуючи стандартні способи. Клони скринінгували дослідженням з люциферазою (дивись Приклад 20В, нижче), використовуючи стандартизоване середовище zcytor17lig людини або очищений білок zcytor17lig (дивись Приклад 35, нижче), як індуктор. Клони з найвищою люциферазною реакцією (через люциферазу STAT) та найнижчим фоном було вибрано. Стабільні лінії трансфектованих клітин селектували. Лінії клітин мали назву BaF3/KZ134/zcytor17 або BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRбета, залежно від рецепторів, трансфектованих у лінію клітин.

Подібно, лінії клітин ВНК також створювали, використовуючи спосіб, описаний тут, та застосовували у дослідженні з люциферазою, що описано тут. Лінії клітин мали назву ВНК/KZ134/zcytor17 або ВНК/KZ134/zcytor17/OSMRбета, залежно від рецепторів, трансфектованих у лінію клітин.

В. Zcytor17lig людини активує рецептор люди-

ни zcytor17 у дослідженні з люциферазою BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRбета або ВНК/KZ134/zcytor17/OSMRбета

BaF3/KZ134/zcytor17

та BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRбета клітини центрифугували та промивали у вільному від mIL-3 середовищі. Клітини центрифугували та промивали 3 рази для забезпечення видалення mIL-3. Клітини тоді підраховували у гематиметрі. Клітини засівали у 96-комірковий планшет при приблизно 30000 клітин на комірку в об'ємі 100мкл на комірку, використовуючи вільне від mIL-3 середовище. Таку ж процедуру застосовували для нетрансфектованих клітин BaF3/KZ134 для застосування, як контрольних у наступному дослідженні. ВНК/KZ134/zcytor17 або

ВНК/KZ134/zcytor17/OSMRбета клітини засівали у 96-комірковий планшет при 15,000 клітин на комірку у 100мкл середовища. Вихідні клітини ВНК/KZ134 застосовували, як контроль.

STAT-активацію клітин BaF3/KZ134/zcytor17, BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRбета,

ВНК/KZ134/zcytor17, або

ВНК/KZ134/zcytor17/OSMRбета оцінювали, використовуючи (1) стандартизоване середовище від клітин ВНК570, трансфектованих zcytor17lig людини (Приклад 7), (2) стандартизоване середовище від клітин ВНК570, трансфектованих zcytor17lig миші (Приклад 18), (3) очищений zcytor17lig людини (Приклад 35), або (4) вільне від mIL-3 середовище для виміру тільки контрольної реакції. Стандартизоване середовище розбавляли вільним від mIL-3 середовищем RPMI до концентрації 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% та 0,375%. Очищений zcytor17lig людини розбавляли до концентрації 1200, 600, 300, 150, 75, 37,5, 18,75, або 9,4пМ. Одну сотню мікролітрів розбавленого стандартизованого середовища або білку додавали до клітин BaF3/KZ134/zcytor17, BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRбета, ВНК/KZ134/zcytor17, або

ВНК/KZ134/zcytor17/OSMRбета. Дослідження, використовуючи стандартизоване середовище, робили паралельно на нетрансфектованих клітинах BaF3/KZ134 чи ВНК/KZ134, як контрольне. Загальний об'єм дослідження був 200мкл. Досліджені планшети інкубували при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> протягом 24 годин, в цей час клітини BaF3 гранулювали центрифугуванням при 2000об/хвил протягом 10 хвилин та з середовища видаляли рідину та додавали 25мкл лізисного буферу (Promega). Для лінії клітин ВНК етап центрифугування не був обов'язковим, оскільки клітини склеювалися. Через 10 хвилин при кімнатній температурі, планшети вимірювали на активацію STAT-репортерного конструкту його зчитуванням на люмінометрі (Labsystems Luminoskan, модель RS), до якого додавали 40мкл субстрату для дослідження з люциферазою (Promega) при 5с інтегрування.

Результати цього дослідження підтверджували, що STAT-репортерна реакція клітин BaF3/KZ134/zcytor17/OSMRбета та ВНК/KZ134/zcytor17/OSMRбета з zcytor17hg людини у порівнянні з клітинами BaF3/KZ134/zcytor17, клітинами ВНК/KZ134/zcytor17 або нетрансфектованими контрольними клітинами BaF3/KZ134 чи

ВНК/KZ134, показувала, що реакція була опосередкованою рецепторами *zcytor17/OSMR* бета. Результати також показували, що *zcytor17lig* миші не активує STAT-репортерне дослідження рецепторним комплексом людини.

#### Приклад 21

Мишачий *zcytor17lig* є активним у дослідженні кісткового мозку миші А. Виділення неліпких клітин кісткового мозку низької густини:

Свіжий аспірат стегна миші (кісткового мозку) отримували з самців мишей Balb/C чи C57BL/6 віком 6-10 тижнів, кісткового мозку Мозок тоді промивали RPMI+10% FBS (JRH, Lenexa KS; Hyclone, Logan UT) та суспендували у RPMI+10% FBS, як суцільну суспензію клітин кісткового мозку. Усю суспензію клітин кісткового мозку тоді піддавали градієнту густини (Нусоргер, 1,077, Animal; Gibco BRL) для збагачення для низької густини головним чином мононуклеарними клітинами: Усю суспензію клітин кісткового мозку (приблизно 8мл) обережно наносили піпеткою на верхівку приблизно 5мл градієнтного розчину Нусоргер у 15мл конічній туб, а тоді центрифугували при 600X g протягом 20 хвилин. Поверхневий шар розділу, що містить мононуклеарні клітини низької густини, тоді видаляли, промивали надлишок RPMI+10% FBS та гранулювали центрифугуванням при 400X g протягом 5-10 хвилин. Цю гранулу ресуспендували у RPMI +10% FBS та засівали у колбу T-75 при приблизно 106клітин/мл та інкубували при 37°C 5% CO<sub>2</sub> протягом приблизно 2 годин. Утвореними клітинами у суспензії є неліпкі клітини кісткового мозку низької густини (NALD).

#### В, 96-коміркове дослідження

Клітини NA LD кісткового мозку миші засівали при 25000-45000 клітин/комірку у 96-коміркові планшети тканинних культур у RPMI+0% FBS+1нг/мл фактору стовбурних клітин миші (mSCF) (R & D Systems, Minneapolis, MN), разом з 5% стандартизованого середовища від одного з наступного: (1) клітини ВНК 570, що експресували *zcytor17lig* миші (Приклад 18), (2) клітини ВНК 570, що експресували *zcytor17lig* людини (Приклад 7), або (3) контрольні клітини ВНК 570, що містили вектор та не експресували будь-який ліганд. Ці клітини тоді піддавали обробці різними цитокінами для тестування розвитку або диференціації гематопоетичних клітин кісткового мозку. Для тестування засіяні клітини кісткового мозку NA LD миші піддавали дії Інтерлейкіну-15 людини (hIL-15) (R & D Systems), або одному з панелі інших цитокінів (R & D Systems). Серійні розбавлення hIL-15, або інших цитокінів тестували з 2-разовим серійним розбавленням від концентрації приблизно 50нг/мл до приблизно 0,5нг/мл. Після 8-12 діб 96-коміркові дослідження враховували стосовно проліферації клітин дослідженням з аламар блакитним, як описано у прикладі 5В.

С. Результати 96-коміркового NA LD дослідження кісткового мозку миші

Стандартизоване середовище від клітин ВНК, що експресували *zcytor17lig* миші та людини, може сприяти розвитку популяції гематопоетичних клітин, поодинокі або синергічно з іншими цитокінами у кістковому мозку миші NA LD у порівнянні з контрольним стандартизованим середовищем ВНК.

Популяцію гематопоетичних клітин, що розвивали зі *zcytor17lig* миші з іншими цитокінами або без них, та гематопоетичних клітин, що розвивали зі *zcytor17lig* людини з іншими цитокінами або без них, далі розмножували при культивуванні клітин. Ці гематопоетичні клітини виявляли міченим Phycoerythrin антитілом анти-Pan NK-клітин (PharMingen) та піддавали аналізу цитометрією у потоці, який продемонстрував, що розвинені клітини виявлялися позитивно стосовно маркера клітин цього природного кілеру (NK). Подібно, інші специфічні маркери гематопоетичних клітин можна застосовувати для визначення розвитку, наприклад, Т-клітин CD4+ або CD8+, інших Т-популяцій клітин, В-клітин, та інших маркерів імунних клітин.

Такі ж 96-коміркові дослідження провадять, використовуючи клітини свіжого кісткового мозку людини від Poietic Technologies, Gaithersburg, MD. Знов, позитивний результат показує, що *zcytor17lig* поодинокі або синергічно з іншими цитокінами, миші та *zcytor17lig* людини можуть поширювати гематопоетичну популяцію клітин, що виявляються позитивно стосовно специфічних маркерів клітин, як розкрито вище.

#### Приклад 22

Констракти для створення *zcytor17lig*-трансгенних мишей

А. Констракт для експресії *zcytor17lig* людини від промотору MT-1

Олігонуклеотиди було призначено для створення PCR-фрагменту, що містить консенсову послідовність Kozak та кодувальний регіон *zcytor17lig* людини. Ці олігонуклеотиди створювали з сайтом FseI на 5' кінці та сайтом Ascl на 3' кінці для сприяння клонуванню у (а) pMT12-8, стандартний трансгенний вектор, або (б) pKF051, лімфоїдно-специфічний трансгенний вектор (Приклад 22В).

PCR-реакції здійснюють приблизно з 200нг темплату *zcytor17lig* людини (SEQ ID NO: 1) та олігонуклеотиди, створювали для ампліфікації *zcytor17lig* повної довжини або активної частини. Умови PCR-реакції визначали, використовуючи способи, відомі у рівні техніки. PCR-продукти відділено електрофорезом на агаровому гелі та очищено, використовуючи комплект гель-екстракції QiaQuick (Qiagen). Виділений, відповідного розміру фрагмент ДНК розщеплювали FseI та Ascl (Boehringer-Mannheim), осаджували етанолом та вшивали у pMT12-8, що раніше розщеплювали FseI та Ascl. Плазмідна pMT12-8, призначена для експресії досліджуваного гена у печінці та інших тканинах у трансгенних мишей, містила касету експресії, фланковану 10 ко 5'ДНК MT-1 та 7 ко 3'ДНК MT-1. Касета експресії містить MT-1 промотор, інтрон інсуліну II щурів, полілінкер для вставки потрібного клону та полі А послідовність гормону росту людини (hGH).

Приблизно один мікролітр кожної з реакцій лігування електропорували у компетентні клітини DH10B ElectroMax (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) за інструкціями виробника та засівали на планшети LB, що містили 100мкг/мл ампіциліну, та інкубували протягом ночі. Колонії збирали та вирощували у середовищі LB, що містить 100мкг/мл ампіциліну. Мініпрепарат ДНК отримували із зі-

браних клонів та скринінгували на вставку zcytor17lig людини рестрикційним розщепленням EcoRI поодиночі, або комбінованим розщепленням FseI та Ascl та наступним гель-ектрофорезом на агарі. Отримують максипрепарат відповідного pMT-zcytor17lig людини. Фрагмент Sail, що складається з 5' та 3' фланкувальних послідовностей, MT-1 промотор, шур інсулін II інтрон, zcytor17lig людини кДНК та hGH полі A послідовностей отримували, щоб застосовувати для мікроін'єкції у фертилізовані мишачі ооцити. Мікроін'єкцію та продукування трансгенної миші проводять, як описано у [Hogan, B. et al. Manipulating Mouse Embryo, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1994].

В. Констракт для експресії zcytor17lig людини з лімфоїдно-специфічним EwLCK промотором

Олігонуклеотиди призначено для створення PCR-фрагменту, що містить консенсову послідовність Kozak та кодувальний регіон zcytor17lig людини. Ці олігонуклеотиди сконструйовані з сайту FseI на 5' кінці та сайту Ascl на 3' кінці для сприяння клонуванню у pKF051, лімфоїдно-специфічний трансгенний вектор.

PCR-реакції здійснюють приблизно з 200нг темплату zcytor17lig людини (SEQ ID NO: 1) та олігонуклеотидами, створеними для ампліфікації повної довжини zcytor17lig або його активної частини. PCR-реакцію проводять, використовуючи способи, відомі у рівні техніки. Виділений відповідного розміру фрагмент ДНК розщеплювали FseI та Ascl (Boehringer-Mannheim), осаджували етанолом та вшивали у pKF051, що раніше розщеплювали FseI та Ascl. Трансгенний вектор pKF051 є похідним від p1026X [Iritani, B. M., et al., EMBO J. 16: 7019-31, 1997] та містить Т-клітино-специфічний проксимальний промотор Ick, В/Т-клітино-специфічний енхансер важкого ланцюга імуноглобуліну  $\mu$ , полілінкер для вставки потрібного клону та мутованого гена hGH, що кодує білок інактивного гормону росту (що забезпечує 3'інтрони та сигнал поліаденілування).

Приблизно один мікролітр кожної з реакцій лігування електропорували, засівали, клони збирали та скринінгували на вставку zcytor17lig людини рестрикційним розщепленням, як описано вище. Відповідний клон pKF051-zcytor17lig перевіряли секвенсуванням та отримували максипрепарат цього клону. Фрагмент NotI, що містить проксимальний промотор Ick та енхансер імуноглобуліну  $\mu$  (EuLCK), zcytor17lig кДНК та мутований ген hGH, отримували для застосування у мікроін'єкції у фертилізовані мишачі ооцити.

С. Констракт для експресії zcytor17lig миші з промотором EPlальфа

Праймери ZC41, 498 (SEQ ID NO: 86) та ZC41, 496 (SEQ ID NO: 87) застосовували до PCR-бібліотеки темплатів кДНК яєчка миші. Ці PCR-реакції успішно провадили у об'ємах приблизно 50мкл з 10% ДМСО або без нього, використовуючи полімеразу pfu turbo (Stratagene) відповідно рекомендаціям виробника; з додатковим застосуванням гарячого воску протягом вихідних 50с (Molecular Bioproducts, Inc. San Diego, CA). PCR-термоциклювання провадили з одиничним циклом 94°C протягом 4 хвилин, а потім 40 циклів 94: 30с, 48: 30с, 72°C: 50с; з додатковим кінцевим подов-

женням 72°C протягом 7 хвилин. Дві PCR-реакції поєднували та очищали, використовуючи низькоплавкий агар та фермент розщеплення агару гелазу (Epicenter, Inc. Madison, WI) відповідно рекомендаціям виробника.

PCR-продукти з секвенсованою ДНК, що виявляли мишачу кДНК-послідовність zcytor17 (SEQ ID NO: 90), яка містить ORF, ідентичну SEQ ID NO: 10, підтверджуючи, що SEQ ID NO: 10 кодує поліпептид zcytor17lig миші. Праймери PCR, ZC41583 (SEQ ID NO: 88) та ZC41584 (SEQ ID NO: 89), тоді застосовували для додавання рестрикційних сайтів FseI та Ascl та часткової послідовності Kozak до відкритої рамки зчитування mzytor17lig та термінаційного кодону (SEQ ID NO: 92). Термоциклер Robocycler 40 (Stratagene) застосовували для прогону температурного градієнту температури гібридизації та таким чином циклювання. Полімеразу pfu turbo (Stratagene) наносили, як описано вище, але тільки у 10% ДМСО. Циклювання провадили з одиничним циклом 94°C протягом 4 хвилин, а потім 20 циклів 94°C: 30с, градієнт 65°C-51°C: 30с, 72°C: 1 хвилина; та одиничне подовження 72°C протягом 7 хвилин. Темплат для цієї другої реакції термоциклювання був 1мкл спочатку гелеочищеного вищезазначеного PCR-продукту mzytor17lig. Утворений PCR-продукт від трьох найнижчих температур реакції поєднували та очищали на гелі, використовуючи спосіб з гелазою (Epicenter), описаний вище.

Цей очищений фрагмент тоді розщеплювали FseI та Ascl та вшивали у вектор pZP7X модифікований, щоб мати сайти FseI та Ascl у його сайті клонування. Це подавали на секвенсування для підтвердження відповідної послідовності. Клонована мишача кДНК-послідовність репрезентована у SEQ ID NO: 90, а відповідну послідовність поліпептиду показано у SEQ ID NO: 91 (яка є ідентичною SEQ ID NO: 11).

Виділений відповідного розміру фрагмент ДНК, що розщеплювали FseI та Ascl (Boehringer-Mannheim), субклонували у плазмиду, що містить промотор Ейальфа, що раніше розщеплювали FseI та Ascl. Отримували максипрепарати відповідного EPlальфа zcytor17lig миші. Касета експресії містила промотор EPlальфа (з видаленого сайту FseI), інтрон EPlальфа, подібний SUR IRES сайт для сприяння експресії, полілінкер, фланкований сайтами інсуліну II шурів на 5' кінці, який додає сайти FseI PmeI Ascl для вставки потрібного клону та полі A послідовність гормону росту людини (hGH). Фрагмент 7,5 ко NotI, що містить промоторну касету експресії EPlальфа та zcytor17lig миші, отримували для застосування у мікроін'єкції у фертилізовані мишачі ооцити. Плазмиду EPlальфа отримували з Louis-Marie Laboratoire de Differentiation Cellulaire, як описано у [Taboît-Dameron et al., 1999, Transgenic Research 8: 223-235].

Д. Констракт для експресії zcytor17lig миші з лімфоїдно-специфічним промотором EpLCK

Олігонуклеотиди призначено для створення PCR-фрагменту, що містить консенсову послідовність Kozak та кодувальний регіон zcytor17lig миші. Ці олігонуклеотиди створювали з сайту FseI на 5' кінці та сайту Ascl на 3' кінці для сприяння клону-

ванню у рKF051 (дивись Приклад 22В, вище).

Виділений відповідного розміру фрагмент *zcutor17lig* ДНК, застосовуваний у констрактах EPIальфа, розщеплювали *FseI* та *AscI* (Boehringer-Mannheim), субклонували у плазмиду, що містить рKF051, лімфоїдно-специфічний трансгенний вектор. Трансгенний вектор рKF051 є похідним від р1026X [Intani, B. M., et al., EMBO J. 16: 7019-31, 1997] та містить Т-клітино-специфічний проксимальний промотор *Ick*, В/Т-клітино-специфічний енхансер важкого ланцюга імуноглобуліну  $\mu$ , полілінкер для вставки потрібного клону та мутований ген *hGH*, що кодує білок інактивного гормону росту (що забезпечує 3'інтрони та сигнал поліаденілювання). Фрагмент *NotI* 6,5 ко, що містить проксимальний промотор *Ick* та енхансер імуноглобуліну  $\mu$  (EpLCK), кДНК *zcutor17lig* миші та мутований ген *hGH* отримували для застосування у мікроін'єкції у фертилізовані мишачі ооцити (Приклад 41).

#### Приклад 23

Створення векторів експресії ссавців, що експресують *zcutor17lig*-CEE

##### А. Створення *zcutor17lig*-CEE/pZMP21

Експресійну плазмиду, що містить увесь або частину полінуклеотиду, що кодує *zcutor17lig* людини, створювали гомологічної рекомбінацією. Плазмida має назву *zcutor17lig*-CEE/pZMP21.

Створення *zcutor17lig*-CEE/pZMP21 супроводжували створенням фрагменту *zcutor17lig*-CEE (SEQ ID NO: 95) (його відповідну амінокислотну послідовність показано у SEQ ID NO: 96), використовуючи ДНК-темплат. ДНК-темплат, застосовуваний для продукування *zcutor17lig*-CEE фрагмент був *zcutor17lig*/pZP7nx. Праймери, застосовувані для продукування *zcutor17lig*-CEE фрагменту були: (1) ZC41607 (SEQ ID NO: 97) (сенсова послідовність), який включає від 5' до 3' кінця: 28 по фланкувальній послідовності вектору (5' вставки) та 21 по відповідних 5'послідовності *zcutor17lig*; та (2) ZC41605 (SEQ ID NO: 98) (анти-сенсова послідовність), який включає від 5' до 3' кінця: 37 по фланкувальній послідовності вектору (3' вставки), 3 по стоп-кодону, 21 по, що кодує С-термінальний придаток EE та 21 по, відповідних 3' кінцевій послідовності *zcutor17lig*. Фрагмент, що є результатом вищезазначеної PCR-ампліфікації був копією темплату *zcutor17lig* з додаванням С-термінального придатку EE, утворюючи кінцевий продукт *zcutor17lig*-CEE.

PCR-реакції провадили таким чином: До 100мкл кінцевого об'єму додавали: 10мкл буферу полімеразної реакції 10x Taq з 15мМ MgCl<sub>2</sub> (Gibco), 1мкл ДНК-полімерази Taq (50диниць/мкл, Gibco), 3мкл 10мМ dNTP, 78мкл дистильованої води, 3мкл 20пмоль/мкл резервного розчину праймеру ZC41, 607 (SEQ ID NO: 97), 3мкл 20пмоль/мкл резервного розчину праймеру ZC41, 605 (SEQ ID NO: 98), та 2мкл 0,13мкг/мкл резервного розчину *zcutor17lig* темплат ДНК. Об'єм мінерального масла 50мкл додавали у суміш. Реакцію нагрівали до 94°C протягом 5 хвилин, а потім 35 циклів при 94°C протягом 1 хвилини; 55°C протягом 2 хвилин; 72°C протягом 3 хвилин, а потім 10 хвилин подовження при 72°C та тримали при 4°C, а потім реакцію збирали.

Плазмиду рZMP21 рестрикційно розщеплюва-

ли ферментом *BglII*, очищали PCR-комплексом очистки *QiaQuick* (Qiagen), використовуючи мікроцентрифугу, та застосовували для рекомбінації з PCR-фрагментом. Плазмиду рZMP21 створювали з рZMP20, яку створювали з рZP9 (зберігається у ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 та позначена №98668) з генетичними елементами дріжджів від рRS316 (зберігається у ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 та позначена №77145), елементу IRES від поліовірусу та зовнішньоклітинного домену CD8, усиченого на карбоксил-термінальному кінці трансмембранного домену. PZMP21 є вектором експресії ссавців, що містить касету експресії, що має промотор MPSV, інтрон імуноглобулінового сигнального пептиду, складні рестрикційні сайти для вставки кодувальної послідовності, стоп-кодон та термінатор гормону росту людини. Плазмida також має початок реплікації *E. coli*, елемент придатного для селекції маркеру експресії ссавців, що має промотор SV40, енхансер та початок реплікації, ген DHFR, термінатор SV40, а також послідовності URA3 та CEN-ARS, потрібні для селекції та реплікації у *S. cerevisiae*.

П'ятдесят мікролітрів компетентних клітин дріжджів (*S. cerevisiae*) незалежно комбінували з 100нг розрізаної плазмиди, 5мкл описаної раніше PCR-суміші та переносили до електропораційної кювети 0,2см. Суміш дріжджі/ДНК піддавали електроімпульсу при 0,75кВ (5кВ/см), невизначено ом, 25мкФ. Кожна кювета мала 600мкл 1,2М доданого сорбіту та дріжджі засівали в одну з аліквот по 100мкл та одну з аліквот по 300мкл на два планшети URA-D та інкубували при 30°C. Після приблизно 72 годин, трансформанти дріжджів Ura+ з одиначного планшету ресуспендували у 1мл води та центрифугували до гранули клітин дріжджів. Гранулу клітин ресуспендували у 500мкл лізисного буферу (2% Тритон X-100, 1% SDS, 100мМ NaCl, 10мМ Трис, pH 8,0, 1мМ EDTA). 500мкл лізисної суміші додавали до туби Еппендорфа, що містить 300мкл промитих кислотою 600мкМ скляних кульок та 300мкл фенол-хлороформ, центрифугували протягом 1 хвилини з інтервалами два або 3 рази, а потім 5 хвилин центрифугували у центрифугузі Еппендорфа при максимальній швидкості. Три сотні мікролітрів водної фази переносили до свіжої туби та ДНК осаджували 600мкл 100% етанолу (EtOH), а потім центрифугували протягом 10 хвилин при 4°C. ДНК-гранулу тоді промивали 500/мкл 70% EtOH, а потім центрифугували протягом 1 хвилини при 4°C. ДНК-гранулу ресуспендували у 30мкл води.

Трансформацію електрокомпетентних клітин *E. coli* (MC 1061) робили з 5мкл ДНК-препарату дріжджів та 50мкл клітин MC1061. Клітини піддавали електроімпульсу при 2,0кВ, 25мкФ та 400ом. Після електропорації додавали 600мкл SOC (2% Bacto Tryptone (Difco, Detroit, MI), 0,5% екстракту дріжджів (Difco), 10мМ NaCl, 2,5мМ KCl, 10мМ MgCl<sub>2</sub>, 10мМ MgSO<sub>4</sub>, 20мМ глюкози). Електропоровані клітини *E. coli* засівали у аліквоті 200мкл та 50мкл на два планшети LB АМФ (бульйон LB (Lennox), 1,8% агар Bacto (Difco), 100мг/л ампіциліну). Планшети інкубували уверх дном протягом приблизно 24 години при 37°C. Три ампіцилін-

резистентні колонії селектували наугад та подавали на аналіз послідовності вставки. Великомасштабну плазмідну ДНК виділяли від клону з підтвердженою послідовністю, використовуючи комплект Qiagen Maxi (Qiagen) відповідно інструкціям виробника.

#### В. Експресія у ссавцях zcytor17lig людини

Повної довжини білок zcytor17lig продукували у клітинах ВНК, трансфектованих zcytor17lig-CEE/pZMP21 (Приклад 23А). Клітини ВНК 570 (ATCC CRL-10314) засівали у колби культивування тканин Т75 та давали рости до приблизно 50-70% конфлюентності при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, у середовищі для росту (SL7V4, 5% FBS, 1% pen/strep).

Клітини тоді трансфектували zcytor17lig-CEE/pZMP21 опосередкованою ліпосомами трансфекцією (використовуючи Lipofectamin™; Life Technologies), у вільному від сироватки середовищі (SF) (SL7V4). Плазмиду (16мкг) розбавляли у 1,5мл тубах до загального кінцевого об'єму 640мкл середовищем SF. Тридцять п'ять мікролітрів ліпідної суміші змішували з 605мкл середовища SF та суміш інкубували приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі. 5 мілілітрів середовища SF тоді додавали до суміші ДНК:ліпід. Клітини промивали одноразово 10мл PBS, PBS декантували та додавали суміш ДНК:ліпід. Клітини інкубували при 37°C протягом 5 годин, тоді 15мл середовища (SL7V4, 5% FBS, 1% pen/strep) додавали до кожного планшета. Планшети інкубували при 37°C протягом ночі та суміш ДНК:ліпідне середовище заміщали селекційним середовищем (SL7V4, 5% FBS, 1% pen/strep, 1мкМ метотрексат) наступної доби. Приблизно 10 дб після трансфекції, метотрексат-резистентні колонії з трансфекційної колби Т75 трипсинізували та клітини поєднували та засівали у колбу Т-162 та переносили для великомасштабного культивування.

#### Приклад 24

Експресія розчинного рецептору zcytor17 у *E. coli*

А. Створення вектору експресії pCMH01, що експресує конденсований поліпептид huzcytor17/MBP-6Н

Експресійну плазмиду, що містить поліпептид, що кодує розчинний рецептор zcytor17, конденсований С-термінально до білку приєднання мальтози (MBP), створювали через гомологічну рекомбінацію. Конденсований поліпептид містить N-термінально MBP-частину, приблизно з 388 амінокислот, конденсовану до будь-якого з розчинних рецепторів zcytor17, що описано тут. Фрагмент zcytor17 кДНК (SEQ ID NO: 4) виділяли, використовуючи PCR, як описано тут. Два праймери застосовували при продукуванні фрагменту zcytor17 у стандартній PCR-реакції: (1) один, що містить приблизно 40 по вектору фланкувальної послідовності та приблизно 25 по аміно-закінченню zcytor17 та (2) інший, що містить приблизно 40 по 3' кінця вектору фланкувальної послідовності та приблизно 25 по карбокси-закінченню zcytor17. Два мкл 100мкл PCR-реакції провадили на 1,0% агаровому гелі з буфером для аналізу 1 x TBE та спостерігали приблизно очікуваний фрагмент. Залишкову PCR-реакцію комбінували з другою PCR-тубою та осаджували 400мкл абсолютного етанолу. Оса-

джену ДНК застосовували для рекомбінування у розрізаний SmaI реципієнтний вектор pTAP170 для утворення констракту, що кодує конденсат MBP-zcytor17, який описано нижче.

Плазміда pTAP170 була похідною з плазмід pRS316 та pMAL-c2. Плазміда pRS316 є *Saccharomyces cerevisiae* човниковим вектором [Hieter P. та Sikorski, R., Genetics 122: 19-27, 1989]. pMAL-C2 (NEB) є експресійною плазмідною *E. coli*. Вона несе промотор tac, стимулюючий MalE (ген, що кодує MBP), а потім приналежність His, сайт розщеплення тромбіну, сайт клонування та термінатор trnB. Вектор pTAP170 створювали, використовуючи гомологічну рекомбінацію дріжджів, 100нг розрізаного EcoRI pMAL-c2 рекомбінували з 1мкг розрізаного PvuI pRS316, 1мкг лінкера, та 1мкг розрізаного SmaI/EcoRI pRS316. Лінкер складався з олігоелементів zc19, 372 (SEQ ID NO: 157) (100пмоль): zc19, 351 (SEQ ID NO: 158) (1пмоль): zc19, 352 (SEQ ID NO: 159) (1пмоль), та zc19, 371 (SEQ ID NO: 160) (100пмоль) скомбінованих у PCR-реакції.

Умови були такими: 10 циклів 94°C протягом 30с, 50°C протягом 30с та 72°C протягом 30с, а потім вимочування при 4°C. PCR-продукти концентрували осадженням 100% етанолом.

Одну сотню мікролітрів компетентних клітин дріжджів (*S. cerevisiae*) комбінували з 10мкл суміші, що містить приблизно 1мкг вставки zcytor17 людини та 100нг розщепленого SmaI вектору pTAP170 та переносили у електропораційну кювету 0,2см. Суміш дріжджів/ДНК піддавали електроімпульсу при 0,75кВ (5кВ/см), невизначено ом, 25мкФ. До кожної кювети додавали 600мкл 1,2М сорбіту. Дріжджі тоді засівали у 2 аліквоти по 300мкл на 2 планшети URA D та інкубували при 30°C.

Через приблизно 48 годин трансформанти дріжджів Ura<sup>+</sup> з одиничного планшета збирали, ДНК виділяли та трансформували в електрокомпетентні клітини *E. coli* [наприклад, MC1061, Casadaban et. al. J. Mol. Biol. 138, 179-207] та засівали на планшети MM/CA+KAN 25мкг/л [Pryor та Leitig, Protein Expression and Purification 10: 309-319, 1997], використовуючи стандартні процедури. Клітини вирощували у MM/CA з 25мкг/мл каноміацину протягом двох годин, зі струшуванням при 37°C. Один мл культури індукували 1мМ IPTG. Через 2-4 години 250мкл кожної з культур змішували з 250мкл промитих кислотою скляних кульок та 250мкл буферу Тхорнера з 5% βME та проявнику (8М сечовина, 100мМ Трис pH7,0, 10% гліцерин, 2мМ EDTA, 5% SDS). Зразки перемішували протягом 1 хвилини та нагрівали до 65°C протягом 10 хвилин. 20мкл завантажували на ряд на 4%-12% гелі PAGE (NOVEX). Гелі провадили у буфері IXMES. Позитивні клони було позначено pCMH01 та піддано аналізу послідовності.

Один мікролітр секвенсованої ДНК застосовували для трансформації штаму BL21. Клітини піддавали електроімпульсу при 2,0кВ, 25мкФ та 400ом. Після електропорації 0,6мл MM/CA з 25мкг/л каноміацину. Клітини вирощували у MM/CA та індукували з IPTG, як описано вище. Позитивні клони застосовували для вирощування для білкової очистки конденсованого білку

huzcytor17/MBP-6H, використовуючи стандартні способи.

В. Очистка розчинного рецептору huzcytor17/MBP-6H від ферментації *E. coli*

Якщо не визначено біології, усі операції здійснювали при 4°C. Застосовували наступну процедуру очистки рекомбінантного розчинного рецепторного поліпептиду huzcytor17/MBP-6H. Клітини *E. coli*, що містили констракт рСМН01 та експресували розчинний рецепторний поліпептид huzcytor17/MBP-6H, створювали, використовуючи стандартні способи молекулярної біології, та культивували у SuperBroth II (12г/л казеїну, 24г/л екстракту дріжджів, 11,4г/л дикалій фосфату, 1,7г/л моно-калій фосфату; Becton Dickenson, Cockeysville, MD). Утворені клітини збирали та заморожували у 0,5% гліцерині. 20 грам заморожених клітин застосовували для очистки білку.

Розморожені клітини ресуспендували у 500мл амілозного буферу для урівноваження (20мМ Трис, 100мМ NaCl, pH 8,0). Систему руйнування клітин French Press (Constant Systems Ltd., Warwick, UK) з температурою -7°C - -10°C застосовували для лізування клітин. Знов суспендовані клітини перевіряли стосовно руйнування зчитуванням A600 перед та після циклювання через French Press. Лізовану суспензію клітин гранулювали при 10000g протягом 30 хвилин. Супернатант відділяли від обривків гранул для очистки білку.

25 мілілітрів амілозної смоли (New England Biolabs, Beverly, MA) виливали у скляну колонку Bio-Rad, 2,5см Dx10см Н. Колонку пакували та урівноважували силою ваги 10 об'ємами колонки (CV) амілозного буферу для урівноваження. Зібраний супернатант клітин партіями завантажували на амілозну смолу, протягом ночі зі струшуванням. Завантажену смолу повертали у скляну колонку, промивали 10 CV амілозного буферу для урівноваження та елювали силою ваги 2 CV амілозного буферу для елювання (амілозний буфер для урівноваження, 10мМ Мальтози, Fluka Biochemical, Switzerland). Десять фракцій по 5мл збирали при елюванні та аналізували на поглинання при 280 та 320нм. Амілозну смолу було відтворено 1 CV дистильованої води, 5 CV 0,1% (за масою/об'ємом) SDS (Sigma), 5 CV дистильованої води, 5 CV амілозного буферу для урівноваження та наприкінці 1 CV амілозного зберігального буферу (амілозний буфер для урівноваження, 0,02% (за масою/об'ємом) натрій азида). Відтворену смолу зберігали при 4°C.

Елювані фракції поєднували та діалізували у камері для діалізу 10K (Slide-A-Lyzer, Pierce Immunochemical) проти 4 змін 4л PBS pH 7,4 (Sigma) протягом 8 годин. Після діалізу зібраний матеріал репрезентував очищений поліпептид huzcytor17/MBP-6H. Очищений поліпептид huzcytor17/MBP-6H стерилізували на фільтрі та аналізували SDS-PAGE-виявленням кумасі на продукт прийнятної молекулярної маси. Концентрацію поліпептиду huzcytor17/MBP-6H визначали аналізом BCA як 0,76мг/мл.

Очищений поліпептид huzcytor17/MBP-6H відповідно формували для імунізації кролів та посиляли до R & R Research and Development (Stanwood, WA) для продукування поліклонально-

го антитіла (Приклад 25, нижче).

Приклад 25

Поліклональне антитіло розчинного рецептору людини zcytor17

А. Отримання та очистка

Поліклональні антитіла отримували імунізацією 2 самиць білих кролів New Zealand очищеним рекомбінантним білком huzcytor17/MBP-6H (Приклад 24). Кролям робили початкову інтраперитональну (IP) ін'єкцію 200мкл очищеного білку у повному ад'юванті Фрейнда, а потім стимулювальних IP ін'єкцій по 100мкл білку у неповному ад'юванті Фрейнда кожні три тижні.

Через сім-десять днів після застосування другої стимулювальної IP ін'єкції (3 загальні ін'єкції), у тварин відбирали кров та збирали сироватку. Тварин тоді стимулювали та відбирали кров кожні три тижні.

Специфічну стосовно huzcytor17/MBP-6H сироватку кролів попередньо абсорбували на анти-MBP антитілах, застосовуючи білкову колонку CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), що отримували, використовуючи 10мг неспецифічного очищеного рекомбінантного MBP-конденсованого білку на грам CNBr-SEPHAROSE. Huzcytor17/MBP-6H-специфічні поліклональні антитіла афінно очищали від попередньо абсорбованої сироватки кролів, використовуючи білкову колонку CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), що отримували, використовуючи 10мг очищеного специфічним антигеном рекомбінантного білку huzcytor17/MBP-6H.

Після очистки поліклональні антитіла діалізували 4 змінами по 20 разів об'ємом антитіл PBS протягом принаймні 8 годин. Huzcytor17-специфічні антитіла характеризували ELISA, використовуючи 500нг/мл очищеного рекомбінантного білку huzcytor17/MBP-6H, як мету антитіла. Нижче обмеження визначення (LLD) анти-huzcytor17/MBP-6H-афінно очищеного кролячого антитіла було 500нг/мл на його специфічно очищений рекомбінантний антиген huzcytor17/MBP-6H.

В. Аналіз SDS-PAGE та Вестерн-блотування анти-людини zcytor17 MBP-6H кролячого MBP-6H антитіла

Анти-людини zcytor17 Кроляче MBP-6H антитіло тестували способом SDS-PAGE (NuPage 4-12%, Invitrogen, Carlsbad, CA) з виявленням кумасі та Вестерн-блотуванням, використовуючи козячий анти-кролячий IgG-HRP. Очищений білок (200-25нг) або стандартизоване середовище, що містить zcytor17 електрофорезували, використовуючи Invitrogen Novex's XcellIII та переносили до нітроцелюлози (0,2мм; Invitrogen, Carlsbad, CA) при кімнатній температурі, використовуючи блот-модуль Novex's Xcell, перемішуючи відповідно вказівкам, запропонованим в інструкції до приладу. Переніс провадили при 300мА протягом 1 години у буфері, що містив 25мМ основи Трис, 200мМ гліцерину та 20% метанолу. Фільтр тоді блокували буфером Вестерн-А (власний, 50мМ Трис, pH 7,4, 5мМ EDTA, pH 8,0, 0,05% ірепал CA-630, 150мМ NaCl та 0,25% желатину) протягом ночі з обережним струшуванням при 4°C. Нітроцелюлозу швидко промивали, тоді кролячий анти-людини zcytor17

MBP-6H (1:1000) додавали у буфер Вестерн-А. Блот інкубували протягом 1,5 годин при кімнатній температурі з обережним струшуванням. Блот промивали 3 рази протягом 5 хвилин кожного разу у буфері Вестерн-А, тоді козяче анти-кроляче IgG HRP антитіло (1:1000) додавали у буфері Вестерн-А. Блот інкубували протягом 1,25 годин при кімнатній температурі з обережним струшуванням. Блот промивали 3 рази протягом 5 хвилин кожного разу у буфері Вестерн-А, тоді швидко промивали у воді. Блот виявляли, використовуючи комерційно доступні хемілюмінісцентні субстратні реагенти (реагенти визначення ECL Вестерн-блотуванням 1 та 2 змішані 1:1; реагенти отримано з Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) та блот експонували на рентгено-плівці протягом 15 хвилин.

Кролячий анти-людини zcytor17 MBP-6H був придатним для визначення zcytor17 людини, представленого у стандартизованому середовищі, а також очищеного білку zcytor17, як смуга при 120кДа в умовах відновлення.

#### Приклад 26

Тканинний розподіл мишачого zcytor17 у панелі тканин, використовуючи PCR

Панель кДНК від мишачих тканин скринінгували для експресії zcytor17 миші, використовуючи PCR. Панель було вироблено власними силами та зразки з вмістом кДНК марафон 94 та кДНК від різних нормальних та ракових мишачих тканин та ліній клітин показано у таблиці 6, нижче. КДНК походила з власної бібліотеки або кДНК марафон з власних РНК-препаратів, РНК Clontech, або РНК Invitrogen. Марафонну кДНК миші було вироблено, використовуючи комплект marathon-Ready™ (Clontech, Palo Alto, CA) та QC, що тестовано праймерами трансферинного рецептору миші ZC10, 651 (SEQ ID NO: 46) та ZC10, 565 (SEQ ID NO: 47), а тоді розбавляли на основі інтенсивності трансферинної смуги. Для гарантії якості ампліфікованих зразків бібліотеки у панелі, проводили три тести для контролю якості (QC): (1) Для оцінки якості РНК, застосовуваної для бібліотеки, власну кДНК тестували стосовно вставки PCR-олігопекторів середнього розміру, що були специфічними стосовно послідовності вектору для певної бібліотеки кДНК; (2) Стандартизації концентрації кДНК у зразках панелі досягали, використовуючи стандартні способи PCR для ампліфікації повної довжини альфа тубулінової кДНК або кДНК G3PDH, використовуючи 5' олігопектор: ZC 14, 063 (SEQ ID NO: 48) та 3'альфа тубуліново-специфічний олігопраймер ZC 17, 574 (SEQ ID NO: 49) або 3'G3PDH-специфічний олігопраймер ZC 17, 600 (SEQ ID NO: 50); та (3) зразки секвенсували для перевірки можливого рибосомального або мітохондріального забруднення ДНК. Панель ставили у 96-комірковий формат, що включав позитивний контрольний зразок геномної ДНК миші (Clontech, Palo Alto, CA).

Кожна комірка вміщувала приблизно 0,2-100нг/мл кДНК. PCR ставили, використовуючи олігоелементи ZC38, 065 (SEQ ID NO: 51) та ZC38, 068 (SEQ ID NO: 52), TaKaRa ExTaq™ (TAKARA Shuzo Co LTD, Biomedicals Group, Japan) та проявник Rediload (Research Genetics, Inc., Huntsville,

AL). Ампліфікацію здійснювали таким чином: 1 цикл при 94°C протягом 5 хвилин; 5 циклів 94°C протягом 30с, 68°C протягом 30с; 35 циклів 94°C протягом 30с, 56°C протягом 30с та 72°C протягом 30с, а потім 1 цикл при 72°C протягом 5 хвилин. Приблизно 10мкл PCR-продукту реакції піддавали стандартному гель-ектрофору на агарі, використовуючи 4% агаровий гель. Передбачуваний фрагмент ДНК відповідного розміру спостерігали у мозку, CD90+клітинах, дендритних, ембріональних, MEWt#2, Tuvak-простати ліній клітин, клітинах слинних залоз, шкіри та яєчок.

Фрагмент ДНК шкіри та яєчок вирізали та очищали, використовуючи комплект гель-екстракції (Qiagen, Chatsworth, CA) відповідно інструкціям виробника.

Фрагменти підтверджували секвенсуванням, яке показувало, що вони насправді належали zcytor17 миші.

Таблиця 6

Лінії Тканин/Клітин	№ зразку
229	1
7F2	1
Ампліфіковані адипоцити	1
aTC1,9	1
Мозок	4
CCC4	1
Ампліфіковані CD90+	1
OC10B	1
Дендритні	1
Ембріональні	1
Серця	2
Нирок	3
Печінки	2
Легенів	2
MEWN#2	1
P388D1	1
Підшлункової залози	1
Плаценти	2
Jakotaу-простати	1
Nelix-простати	1
Paris-простати	1
Torres-простати	1
Tuvak-простати	1
Слинних залоз	2
Скелетних м'язів	1
Шкіри	2
Тонкого кишечника	1
Гладеньких м'язів	2
Селезінки	2
Шлунка	1
Яєчок	3
Тимусу	1

#### Приклад 27

Експресія zcytor17 людини у різних тканинах, використовуючи кількісну RT/PCR у реальному часі

А. Праймери та зонди для zcytor17 людини, OSMRбета та zcytor17lig для звичайної та кількісної RT-PCR

Кількісна RT/PCR у реальному часі, викорис-

товуючи систему ABI PRISM 7900 Sequence Detection System [PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA] описана раніше [Дивись, Heid, C. A. et al., *Genome Research* 6: 986-994, 1996; Gibson, U. E. M. et al., *Genome Research* 6: 995-1001, 1996; Sundaresan, S. et al., *Endocrinology* 139: 4756-4764, 1998]. Цей спосіб включає застосування ген-специфічного зонду, що містить репортер та гаситель флуоресцентного барвнику. Коли зонд є непошкодженим, емісія репортерного барвнику є відсутньою внаслідок тісної близькості гасителя барвнику.

При поширенні шляхом PCR, використовуючи додаткові ген-специфічні прямий та зворотний праймери, зонд розщеплюють 5'нуклеазною активністю Taq-полімерази, яка вивільняє репортерний барвник із зонду, що призводить до збільшення флуоресцентної емісії.

Праймери та зонди, застосовувані для аналізів кількісною RT/PCR у реальному часі зcytor17 людини, OSMRбета та експресії зcytor17lig, створювали, використовуючи програму виявлення праймеру Primer Express (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

Праймери для зcytor17 людини створювали проміжок інтрон-екзонного зчленування для позбавлення від можливої ампліфікації геномної ДНК. Прямий праймер, ZC37, 877 (SEQ ID NO: 53) та зворотний праймер, ZC37, 876 (SEQ ID NO: 54) застосовували у PCR-реакції при концентрації 200нМ для синтезу продукт 73 по. Відповідний зонд зcytor17TaqMan<sup>(R)</sup>, що позначено ZC37, 776 (SEQ ID NO: 55) було синтезовано та мічено PE Applied Biosystems та застосовано у кожній PCR-реакції при концентрації 200нМ. Зонд ZC37, 776 (SEQ ID NO: 55) було мічено на 5' кінці репортерним флуоресцентним барвником (6-карбоксі-флуоресцеїн) (FAM) (PE Applied Biosystems), а на 3' кінці флуоресцентним гасителем барвнику (6-карбоксі-тетраметил-родамін)(TAMRA) (Epoch Biosciences, Bothell, WA).

Праймери для людини OSMRбета створювали проміжок інтрон-екзонного зчленування для позбавлення від можливої ампліфікації геномної ДНК. Прямий праймер, ZC43, 891 (SEQ ID NO: 122) та зворотний праймер, ZC43, 900 (SEQ ID NO: 123) застосовували у PCR-реакції (нижче) при концентрації 200нМ. Відповідний зонд OSMRбетаTaqMan<sup>(R)</sup>, позначений ZC43, 896 (SEQ ID NO: 124), було синтезовано та мічено PE Applied Biosystems та застосовано у кожній PCR-реакції при концентрації 200нМ. Зонд ZC43, 896 (SEQ ID NO: 124) було мічено на 5' кінці репортерним флуоресцентним барвником (6-карбоксі-флуоресцеїн) (FAM) (PE Applied Biosystems), а на 3' кінці нефлуоресцентним гасителем барвнику (ECLIPSE) (Epoch Biosciences).

Праймери для зcytor17lig людини створювали проміжок інтрон-екзонного зчленування для позбавлення від можливої ампліфікації геномної ДНК. Прямий праймер, ZC43, 280 (SEQ ID NO: 125) та зворотний праймер, ZC43, 281 (SEQ ID NO: 126) застосовували у PCR-реакції (нижче) при концентрації приблизно 200нМ. Відповідний зонд зcytor17ligTaqMan<sup>(R)</sup>, позначений ZC43, 275 (SEQ ID NO: 127) було синтезовано та мічено PE Applied

Biosystems та застосовано у кожній PCR-реакції при концентрації 200нМ. Зонд ZC43, 275 (SEQ ID NO: 127) було мічено на 5' кінці репортерним флуоресцентним барвником (6-карбоксі-флуоресцеїн) (FAM) (PE Applied Biosystems), а на 3' кінці нефлуоресцентним гасителем барвнику (ECLIPSE) (Epoch Biosciences).

Як контроль для тестування цілісності та якості тестованих зразків РНК, усі зразки РНК скринінгували на РНК або GUS, використовуючи комплекти праймеру та зонду від PE Applied Biosystems (комплект рРНК) або створені власними силами (GUS).

Комплект рРНК з вмістом прямого праймеру (SEQ ID NO: 56), рРНК-зворотного праймеру (SEQ ID NO: 57) та зонду рРНК TaqManO (SEQ ID NO: 58). Зонд рРНК було мічено на 5' кінці репортерним флуоресцентним барвником VIC (PE Applied Biosystems), а на 3' кінці гасителем флуоресцентного барвнику TAMRA (PE Applied Biosystems).

Праймери та зонд GUS створювали самі та застосовували у кожній PCR-реакції при 200нМ та 100нМ, відповідно. Прямий праймер був ZC40, 574 (SEQ ID NO: 128), а зворотний праймер був ZC40, 575 (SEQ ID NO: 129). Зонд GUS ZC43, 017 (SEQ ID NO: 130) було мічено на 5' кінці репортерним флуоресцентним барвником (Yakima-Yellow) (Epoch Biosciences), а на 3' кінці нефлуоресцентним гасителем барвнику (ECLIPSE) (Epoch Biosciences). Утворені рРНК та GUS також корисні як ендogenous контролю та дали змогу для нормалізації результатів експресії мРНК зcytor17, спостереженої у тест-зразках.

Для звичайної не кількісної RT-PCR праймери створювали, використовуючи програму створення праймерів design Primer Express<sup>TM</sup> (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Праймери зcytor17 людини створюють продукт з приблизно 1000 пар основ та є таким чином: прямим праймером ZC28, 917 (SEQ ID NO: 83) та зворотним праймером ZC28, 480 (SEQ ID NO: 131). Праймери людини OSMRбета створюють продукт з 202 пар основ та є таким чином: прямим праймером ZC41, 653 (SEQ ID NO: 132) та зворотним праймером ZC41, 655 (SEQ ID NO: 133). Праймери людини зcytor17lig створюють продукт з 305 пар основ та є таким чином: прямим праймером ZC41, 703 (SEQ ID NO: 134) та зворотним праймером ZC41, 704 (SEQ ID NO: 135).

В. Праймери та зонди для мишачого зcytor17, OSMRGeTa та зcytor17lig для звичайної та кількісної RT-PCR

Праймери та зонди, застосовувані для аналізів кількісною RT/PCR у реальному часі мишачого зcytor17, OSMRбета та експресії зcytor17lig створювали, використовуючи програму створення праймерів Primer Express<sup>TM</sup> (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Праймери для мишачого зcytor17 створювали проміжок інтрон-екзонного зчленування для позбавлення від можливої ампліфікації геномної ДНК. Прямий праймер, ZC43, 272 (SEQ ID NO: 136) та зворотний праймер, ZC43, 273 (SEQ ID NO: 137) застосовували у PCR-реакції (нижче) при концентрації 300нМ. Відповідний зонд зcytor17TaqManO, позначений як ZC43, 478 (SEQ ID NO: 138) було синтезовано та мічено

PE Applied Biosystems. Зонд ZC43, 478 (SEQ ID NO: 138) було мічено на 5' кінці репортерним флуоресцентним барвником (6-карбоксі-флуоресцеїн) (FAM) (PE Applied Biosystems), а на 3' кінці гасителем флуоресцентного барвнику (6-карбокситетраметил-родамін) (TAMRA) (PE Applied Biosystems). Зонд ZC43, 478 (SEQ ID NO: 138) застосовували у PCR-реакції при концентрації 100нМ.

Праймери для zcytor17lig миші створювали проміжок інтрон-екзонного зчленування для позбавлення від можливої ампліфікації геномної ДНК. Прямий праймер, ZC43, 278 (SEQ ID NO: 139) та зворотний праймер, ZC43, 279 (SEQ ID NO: 140) застосовували у PCR-реакції при концентрації 500 нМ. Відповідний зонд zcytor17ligTaqMan<sup>(R)</sup>, позначений ZC43, 276 (SEQ ID NO: 141), було синтезовано та мічено PE Applied Biosystems. Зонд ZC43, 478 (SEQ ID NO: 138) було мічено на 5' кінці репортерним флуоресцентним барвником (6-карбоксі-флуоресцеїн) (FAM) (PE Applied Biosystems), а на 3' кінці нефлуоресцентним гасителем барвнику (ECLIPSE) (Epoch Biosciences). Зонд ZC43, 276 (SEQ ID NO: 141) застосовували у PCR-реакції (нижче) при концентрації 200нМ.

Праймери для мишачого OSMRбета створювали проміжок інтрон-екзонного зчленування для позбавлення від можливої ампліфікації геномної ДНК. Прямий праймер, ZC43, 045 (SEQ ID NO: 142) та зворотний праймер, ZC43, 046 (SEQ ID NO: 143) застосовували у PCR-реакції при концентрації 300нМ. Відповідний зонд OSMRбетаTaqMan<sup>(R)</sup>, позначений ZC43, 141 (SEQ ID NO: 144), було синтезовано та мічено EpochBiosciences. Зонд ZC43, 141 (SEQ ID NO: 144) було мічено на 5' кінці репортерним флуоресцентним барвником (6-карбоксі-флуоресцеїн) (FAM) (PE Applied Biosystems), а на 3' кінці нефлуоресцентним гасителем барвнику (ECLIPSE) (Epoch Biosciences). Зонд ZC43, 141 (SEQ ID NO: 144) застосовували у PCR-реакції (нижче) при концентрації 100нМ.

Як контроль для тестування цілісності та якості тестованих зразків РНК, усі зразки РНК скринінгували на мишачий GUS або трансфериновий рецептор, використовуючи створені праймери та зонди, використовуючи програму створення праймеру Primer Express (PE Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Мишачі праймери GUS є такими: прямий праймер, ZC43, 004 (SEQ ID NO: 145), зворотний праймер, ZC43, 005 (SEQ ID NO: 146), та зонд TaqManX ZC43, 018 (SEQ ID NO: 147). Мишачий зонд GUS ZC43, 018 (SEQ ID NO: 147) було мічено на 5' кінці репортерним флуоресцентним барвником Yakima-Yellow (Epoch Biosciences), а на 3' кінці нефлуоресцентним гасителем барвнику ECLIPSE (Epoch Biosciences). Мишачі праймери GUS застосовували у PCR-реакції при 300нМ, а зонд, ZC43, 018 (SEQ ID NO: 147), застосовували при 100нМ. У деяких випадках мишачий трансфериновий рецептор застосовували замість GUS, як ендогенний контроль. Прямий праймер трансферинового рецептору, ZC40, 269 (SEQ ID NO: 148) та зворотний праймер, ZC40, 268 (SEQ ID NO: 149) застосовували при 300нМ.

Зонд трансферинового рецептору, ZC40, 298 (SEQ ID NO: 150) застосовували у PCR при 100нМ

та його було мічено на 5' кінці репортерним флуоресцентним барвником VIC (PE Applied Biosystems), а на 3' кінці флуоресцентним гасителем барвнику(TAMRA) (PE Applied Biosystems). Результати від мишачого GUS та трансферинового рецептору також корисні як ендогенний контроль та дали змогу для нормалізації результатів експресії мРНК zcytor17, OSMRбета та zcytor17lig, спостереженої у тест-зразках.

Для звичайної напів-кількісної RT-PCR праймери створювали, використовуючи програму створення праймерів Primer Express (PE Applied Biosystems). Мишачі zcytor17 праймери створюють продукт з 276 пар основ та є таким чином: прямим праймером ZC43, 140 (SEQ ID NO: 151) та зворотним праймером ZC43, 139 (SEQ ID NO: 152). Мишачі праймери OSMRбета створюють продукт з 575 пар основ та є таким чином: прямим праймером ZC41, 608 (SEQ ID NO: 153) та зворотним праймером ZC41, 609 (SEQ ID NO: 154). Праймери zcytor17lig миші створюють продукт з 657 по та є таким чином: прямим праймером ZC41, 502 (SEQ ID NO: 155) та зворотним праймером ZC41, 500 (SEQ ID NO: 156).

С. Протоколи для кількісної RT-PCR у реальному часі та звичайної напів-кількісної RT-PCR

Відносні рівні мРНК zcytor17, OSMRбета та zcytor17lig визначали аналізом зразків загальної РНК, використовуючи одно-етапний спосіб RT-PCR (PE Applied Biosystems). Загальну РНК від zcytor17- та OSMRбета-трансфектованих клітин BAF (людини) або клітин BHK (мишачих) виділяли стандартними способами та застосовували для створення стандартної кривої, застосовуваної для кількісного аналізу zcytor17 та OSMRбета. Крива складається з 10-кратних серійних розбавлень в межах 100-0,01нг/мкл, кожну точку стандартної кривої аналізували у потроєнні. Подібно, для zcytor17lig, РНК активованих Т-клітин CD4+ (що раніше показано для вироблення zcytor17lig) застосовували для створення стандартної кривої у тих же межах 100-0,01нг/мкл. Загальну РНК від клітин людини або миші аналізували у потроєнні на рівні транскрипції zcytor17, OSMRбета та zcytor17lig людини або миші та для одного з наступних ендогенних контрольних генів: рРНК, GUS або трансферинового рецептору. Загальному об'ємі 10мкл, кожний зразок РНК піддавали одно-етапній RT-PCR-реакції, з вмістом: приблизно 50-100нг загальної РНК у попередньо утвореній 2X еталонній суміші, що містить внутрішній контрольний барвник (ROX) (карбоксі-х-родамін) та ДНК-полімеразу Thermo-Start<sup>(R)</sup>; (Abgene, Surrey, UK); прийнятні праймери для досліджуваного гена (дивись частини А та В цього прикладу); прийнятний зонд (дивись частини А та В стосовно концентрації); зворотна транскриптаза Superscript<sup>(R)</sup> (50од/мкл) (PE Applied Biosystems) та прийнятний об'єм вільної від РНКаз води. Умови PCR-термічного циклювання були такими: початковий етап зворотної транскрипції (RT) один цикл при 48°C протягом 30 хвилин, а потім етап активації ферменту Thermo-Start<sup>(R)</sup> один цикл при 95°C протягом 10 хвилин, а потім 40 циклів ампліфікації при 95°C протягом 15с та 60°C протягом 1 хвилини. Відносні рівні РНК zcytor17lig zcytor17, OSMRбета,

визначали використанням стандартної кривої, як описано виробником, PE Biosystems [User Bulletin &#2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, December 11, 1997]. Виміри рНК, GUS або трансферинового рецептору застосовували для нормалізації рівнів досліджуваного гена.

Напів-кількісні RT-PCR-реакції застосовували, використовуючи Superscript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq' (Invitrogen, Carlsbad, CA). Кожні 25мкл реакції складалися з наступного: 12,5мкл 2X реакційного буферу, 0,5мкл (20пмоль/мкл) прямого праймеру, 0,51 (20пмоль/мкл) зворотного праймеру, 0,4мкл суміші RT/Taq-полімераза, 5,0мкл завантажувального буферу для гелю Rediload (Invitrogen), 5мкл вільної від РНКаз води, та 1,0мкл загальної РНК (100нг/мкл). Ампліфікацію здійснювали таким чином: один цикл при 45°C протягом 30 хвилин, а потім 35-38 циклів 94°C, 20с; змінна темп, гібридизації (Дивись Таблицю 7 нижче), 20с; 72°C, 45с; тоді закінчували з кінцевим подовженням при 72°C протягом 5 хвилин. 8-10 мікролітрів продукту PCR-реакції піддавали стандартному гель-ектрофорезу на агарі, використовуючи 2% агаровий гель.

Таблиця 7

Мишачий zcytor17	темп, гібридизації 58°C
Мишачий OSMRбета	темп, гібридизації 60°C
Мишачий zcytor17lig	темп, гібридизації 52°C
zcytor17 людини	темп, гібридизації 55°C
OSMRбета людини	темп, гібридизації 59°C
zcytor17lig людини	темп, гібридизації 59°C

D. Виділення РНК з підкласів та ліній клітин PBMC людини та миші

Кров брали від кількох анонімних донорів та виділяли мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC), використовуючи стандартну градієнтну методологію Ficoll.

Моноцити тоді виділяли, використовуючи комплект виділення моноцитів та систему магнітної сепарації клітин (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Моноцити тоді засівали на ультранизько-адгезійні 24-коміркові планшети у вільному від ендотоксину середовищі. Вони були нестимульованими або обробленими рекомбінантним IFN $\gamma$  людини (R & D Systems Inc.) при 10нг/мл.

Клітини збирали на 24 та 48 години. Подібним способом CD4+ та CD8+ Т-клітини виділяли з PBMC, використовуючи анти-CD4 або анти-CD8 магнітні кульки від Miltenyi Biotec. Клітини тоді активували протягом 4 або 16 годин у планшетах культивування тканин, покритих 0,5мкл анти-CD3-антитіла у середовищі, що містять 5мкг/мл анти-CD28 антитіла. НК-клітини також виділяли з PBMC, використовуючи магнітні кульки Miltenyi, покриті анти-CD56. Деякі з НК-клітин збирали у час нуль для РНК, а інші засівали у середовища, що містять Форбол-міристат-ацетат (PMA) (5нг/мл) та іономіцин (0,5мкг/мл) протягом 24 годин. Додатково, кілька моноцито-подібних ліній клітин людини, U937, THP-1 та HL-60, збирали у їх спочиваючому або активованому станах. Клітини U937 активували протягом ночі з PMA (10нг/мл). HL-60 активували

протягом ночі з PMA (10нг/мл) або протягом 72 та 96 годин з IFN $\gamma$  (10нг/мл) для просування їх униз по моноцитному провідному шляху. Клітини THP-1 активували протягом ночі комбінацією LPS (10нг/мл) та IFN $\gamma$  (10нг/мл). РНК отримували від усіх первинних клітин, використовуючи комплект Rneasy Midiprep (Qiagen, Valencia, CA) за інструкціями виробника. ДНК видаляли, використовуючи комплект позбавлення від ДНК (Ambiol, Inc., Austin, TX). Концентрацію РНК визначали, використовуючи стандартну спектрофотометрію, а якості РНК визначали, використовуючи Біоаналізатор 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Мишачу Т-клітинну РНК збирали, використовуючи різні способи, добре відомі у рівні техніки. Первинні Т-клітини селезінки CD4+ та CD8+ виділяли від селезінки C57Bl/6 миші, використовуючи покриті антитілом магнітні кульки та систему магнітної сепарації клітин від Miltenyi Biotec. Т-клітини CD4+ та CD8+ тоді активували культивацією клітин у 24-коміркових планшетах, покритих анти-CD3-антитілом (500нг/мл) у середовищі, що містить анти-CD28-антитіла при 5мкг/мл. Клітини збирали для РНК на 0, 4 та 16 години. Подібно, Т-клітини CD4+ виділяли та тоді змінювали до фенотипу Th1 або Th2, використовуючи такий протокол. Оскільки Т-клітини C57Bl/6 є вже зміненими у напрямі до Th1, усі, що цього потребували, активували протягом 6 годин з 0,5мкг/мл PMA та 10нг/мл іономіцину. Th2-зміну отримували засіванням не підданих дії Т-клітин CD4+ 2,5нг/мл анти-CD28, 10нг/мл mIL-2 (R & D Systems Inc.) та 25нг/мл mIL-4 (R & D Systems) у планшета, покриті 0,5мкг/мл airra-CD3. Після 2 діб культивування клітини ресуспендували у середовищі, що містить 10нг/мл mIL-2 (R & D Systems) та 25нг/мл mIL-4. Клітини культивували ще додаткові три доби, тоді активували PMA та іономіцином протягом 6 годин.

Один додатковий комплект змінених Th1 та Th2 Т-клітини створювали, використовуючи трансгенний Т-клітинний рецептор D011,10Т лінії клітин. Усі клітини засівали у покриті анти-CD3- та анти-CD28 планшети. Клітини Th1 засівали у середовищі, що містить mIL-12 (1нг/мл) та анти-IL-4 (10мкг/мл). Клітини Th2 засівали у середовищі, що містить mIL-4 (10нг/мл) та анти-IFN $\gamma$  (10мкг/мл). Через 24 години усі культури піддавали дії L-2 (10нг/мл). Після ще двох діб, середовище на клітинах заміняли та нове середовище, що містить вищезазначені цитокіни, додавали та клітини культивували ще 4 доби перед збиранням.

Усі РНК з мишачих Т-клітин отримували, використовуючи комплект Rneasy Midiprep (Qiagen), а забруднювальну ДНК видаляли, використовуючи комплект позбавлення від ДНК від Ambiol.

Е. Виділення РНК з мишачої моделі панкреатиту та при хворобі подразненого кишечника

Для індукування умов, подібних хворобі подразненого кишечника людини (IBD), застосовували вид гібридних мишей C57Bl6/129S6F1. Мишей ділили на 4 групи з середнім розміром з шести мишей на групу. Групу 1 не піддавали дії натрій декстран-сульфату (DSS) та вбивали на добу 14. Група 2 отримувала 2% DSS протягом двох діб перед вбиттям. Група 3 отримувала 2% DSS протягом семи діб перед убивством.

Група 4 отримувала 2% DSS протягом семи діб, а тоді їй давали відновлюватися протягом семи діб та вбивали на добу 14. На добу убивства дистальні зрізи ободової кишки видаляли та розміщали у RNeasy Lysis Buffer (Qiagen). Зрізи ободової кишки гомогенізували, використовуючи стандартні способи та РНК виділяли, використовуючи комплект RNeasy Midiprep (Qiagen). Забруднювальну ДНК видаляли обробкою комплектом позбавлення від ДНК (Ambiol) за інструкціями виробника.

В іншому дослідженні гострий панкреатит індукували у самців мишей CD-1 ін'єкцією церулеїну. Мишей ділили на три групи (n=8мишей/груп). Групу 1 тварин піддавали семи інтраперитональним ін'єкціям (1 ін'єкція на годину) з наповнювачем (фізіологічний розчин) та тоді вбивали на 12 та 24 години після першої ін'єкції. Групи 2 та 3 піддавали семи інтраперитональним ін'єкціям церулеїну (Sigma) (Каталог#C-9026) при дозі 50мкг/кг/годину протягом 6 годин (1 ін'єкція на годину). Групу 2 вбивали на 12 годину після першої ін'єкції, а групу 3 вбивали на 24 годину після першої ін'єкції. Підшлункові залози видаляли на час убивства та різко заморожували для виділення РНК. Тканини гомогенізували та РНК виділяли, використовуючи комплект Qiagen RNeasy Midiprep.

В наступному дослідженні zcytor17lig мишей створювали трансгенних мишей та спостерігали на фенотипові зміни (дивись Приклад 41). Пілоерекцію та втрату волос спостерігали у багатьох трансгенних мишей. Чотирьох трансгенних мишей вбивали та зразки шкіри від нормальної та безволосої зон видаляли та різко заморожували для наступного виділення РНК. Зрізи шкіри від двох нетрансгенних контрольних мишей збирали також. Зразки шкіри гомогенізували та тоді розщеплювали Протеїназою К (Qiagen) (Ката-лог#19133) протягом 20 хвилин при 60°C. РНК тоді виділяли, використовуючи комплект Qiagen RNeasy Midiprep за інструкціями виробника. ДНК видаляли, використовуючи комплект позбавлення від ДНК від Ambiol.

Результати кількісної та напів-кількісної RT-PCR для zcytor17, OSMRбета та zcytor17lig людини

Експресію Zcytor17 та OSMRбета визначали кількісною RT-PCR у чотирьох комплектах первинних моноцитів людини, що були у їх спочиваючому стані або активованими IFNg протягом 24 або 48 годин. Експресія zcytor17 була нижче визначеної у нестимульованих клітинах але збільшувалася ефектно після 24-годин активації IFNg та була найвищою після 48 годин активації. В усіх випадках OSMRбета був нижче визначеного. Zcytor17lig не тестували у цих зразках.

У первинних Т-клітинах zcytor17 був нижче визначеного у підкласах спочиваючих CD4+ та CD8+. Після чотирьох-годинної активації, однак, експресія zcytor17 проходила у обох підкласах, а тоді зменшувалася до слабо нижчого рівня на час 16 годин. OSMRбета був нижче визначеного у цих зразках. Експресію zcytor17lig визначали, використовуючи напів-кількісну RT-PCR. Жодної експресії не визначали у нестимульованих Т-клітинах CD4+ та CD8+. Однак, після чотирьох годин активації визначали високі рівні zcytor17lig. Цей рівень дещо знижувався на час 16 годин.

Експресію zcytor17 не визначали у NK-клітинах. OSMRбета був нижче визначеного у цих зразках. Експресія zcytor17lig була нижче визначеної у спочиваючих NK-клітинах, однак був слабкий сигнал, створений активованими NK-клітинами, підказуючи, що ці клітини можуть виробляти zcytor17lig у деяких станах.

У моноцито-подібних лініях клітин людини U937, THP-1 та HL-60, OSMRбета експресія була нижче визначеної в усіх зі спочиваючих та активованих зразків за винятком активованих THP-1 зразків, де визначали слабкий сигнал. Експресія zcytor17 була високою у спочиваючих лініях клітин U937 та THP-1 та показувала сильну підвищуючу регуляцію після активації. Експресія у U937 була найвищою за будь-який тип клітин. У HL-60, zcytor17 було експресовано у помірних рівнях у нестимульованих клітинах та зменшених при стимулюванні PMA. Однак, експресія zcytor17 була ефектно підвищено регульованою у HL-60 при стимулюванні IFNg протягом 72 та 96 годин. Усі дані експресії людини зведено у таблиці 8 нижче.

Таблиця 8

Первинні моноцити людини	Активацийний статус	zcytor17	OSMRbet	zcytor17lig
Моноцити людини	Нестимульовано	-	-	
Моноцити людини	Активация IFNg 24г.	+	-	
Моноцити людини	Активация IFNg 48г.	++	-	
Людини CD4+	Нестимульовано	-	-	-
Людини CD4+	Активация 4г.	++	-	++
Людини CD4+	Активация 16г.	+	-	+
Людини CD8+	Нестимульовано	-	-	-
Людини CD8+	Активация 4г.	++	-	++
Людини CD8+	Активация 16г.	+	-	+
Клітини NK людини	Нестимульовано		-	-
Клітини NK людини	Активация 24г.		-	+
U937	Нестимульовано	++	-	-
U937	Активация 16г.	+++	-	-
THP-1	Нестимульовано	++	-	-
THP-1	Активация 16г.	+++	+	-
HL-60	Нестимульовано	++	-	-

1	2	3	4	5
HL-60	Активация PMA 16г.	+	-	-
HL-60	Активация IFNg 72г.	+++	-	-
HL-60	Активация IFNg 96г.	+++	-	-

G. Результати кількісної та напів-кількісної RT-PCR для мишачого *zcytor17*, *OSMR*бета та *zcytor17lig*

Рівні експресії мишачих *zcytor17*, *OSMR*бета та *zcytor17lig* визначали у кількох популяціях мишачих Т-клітин та результати зведено у таблиці 9 нижче. Мишачу експресію *zcytor17* тестували напів-кількісною RT-PCR та показано її низькі рівні на спочиваючих та активованих первинних Т-клітинах CD4+. Експресію *zcytor17* визначали на спочиваючих Т-клітинах CD8+, а тоді спостерігали зниження активзації антитілами анти-CD3-та анти-CD28 на час 4 та 16 годин. Експресію *OSMR*бета вимірювали кількісною RT-PCR та її показано у спочиваючих та активованих Т-клітинах CD4+ та CD8+. Експресія *OSMR*бета проходила після 4-годин активзації, а тоді поверталася до нестимульованих рівнів на 16 годину у Т-клітинах CD4+ та CD8+. *Zcytor17lig* визначали кількісною RT-PCR та показано його експресію у дуже низьких рівнях у нестимульованих Т-клітинах CD4+. Однак, після 4-годин активзації, експресія *zcytor17lig* була ефектно надрегульованою, а тоді слабко знижувалася на час 16 годин. У Т-клітини CD8+ *zcytor17lig* не визначено у нестимульованих клітинах. Спостерігали

деяку експресію *zcytor17lig* на час 4 години, але на 16 годину рівні експресії трохи знижувалися знов нижче визначених.

У Т-клітинах DO11,10 експресію *zcytor17* визначали у не підданих дії та Th2 змінених клітинах, але не у змінених Th1-клітинах. Експресія *OSMR*бета відбувалася при низьких рівнях у не підданих дії DO11,10 клітинах. Спостерігали ефектне збільшення рівнів експресії *OSMR*бета у змінених Th1-клітинах та помірно збільшення експресії у змінених Th2-клітинах. Експресію *zcytor17lig* у цих клітинах було показано як домінуючу у підкласі змінених Th2. Низькі рівні визначали у підкласі Th1 та не визначали експресію у не підданих дії клітинах. Ці результати зведено у таблиці 9 нижче.

У первинних Т-клітинах CD4+, що були зміненими у Th1 або напрямі Th2, *zcytor17* не визначали. Експресію *OSMR*бета визначали в усіх трьох зразках з найвищими рівнями, знайденими у зразку Th2. Подібно результатам DO11,10 експресію *zcytor17lig* визначали у високих рівнях у підкласі змінених Th2, з невеликою кількістю, визначеною у підкласі Th1, і рівні були нижче визначених у нестимульованих клітинах. Ці результати зведено у таблиці 9 нижче.

Таблиця 9

Мишачі Т-клітини	<i>zcytor17</i>	<i>OSMR</i> бета	<i>zcytor17lig</i>
Т-клітини CD4+ Нестимульовані	+	+	+/-
Т-клітини CD4+ Активация 4г.	+	++	-/-
Т-клітини CD4+ Активация 16г.	+	+	+
Т-клітини CD8+ Нестимульовані	+	+	-
Т-клітини CD8+ Активация 4г.	+/-	++	+
Т-клітини CD8+ Активация 16г.	-	+	-
Не піддані дії DO11,10	+	+	-
DO11,10		+++	+
Th1			
DO11,10		+	++
Th2			
Т-клітини CD4+ Нестимульовані		++	-
Т-клітини CD4+ змінені Th1		+++	+
Т-клітини CD4+ змінені Th2		++	++

У *zcytor17lig*-трансгенних зразків шкіри рівні експресії *zcytor17*, *OSMR*бета та *zcytor17lig* визначали, використовуючи кількісну RT-PCR. *Zcytor17* показано як представлений в усіх зразках у приблизно еквівалентних рівнях. Вони були ефектно вище рівнів експресії *OSMR*бета у нетрансгенних

контрольних тваринах, ніж трансгенних зразках. Експресія *zcytor17lig* була нижче визначеної у нетрансгенних контрольних тваринах з рівнями експресії від помірних до високих у трансгенних тваринах. Результати зведено у таблиці 10 нижче.

Таблиця 10

Мишачий zcytor17lig Трансгенна шкіра	Фенотип шкіри	zcytor17	OSMRбета	zcytor17lig
Миші дикого типу	Нормальний	+	+++	-
Миші дикого типу	Нормальний	+	+++	-
Трансгенні №1	Нормальний	+	+	+
Трансгенні №1	Втрата волосся	+	+	+
Трансгенні №2	Нормальний	+	+	+
Трансгенні №2	Втрата волосся	+	+	+
Трансгенні №3	Нормальний	+	+	+
Трансгенні №3	Втрата волосся	+	+	+
Трансгенні №4	Нормальний	+	+	+++
Трансгенні №4	Втрата волосся	+	+	+++

У відмінному експерименті рівні експресії zcytor17, OSMРбета та zcytor17lig вимірювали кількісною RT-PCR у підшлункових залозах мишей, підданих гострому панкреатиту. Експресія zcytor17 була нижче визначеної в усіх зразках. Експресію OSMРбета спостерігали у низьких рівнях у нормальних контрольних зразках (Група 1), але показано

сильну підвищуючу регуляцію на час 12 годин (Група 2) та слабко нижчі рівні на час 24 години (Груп 3). Експресія zcytor17lig була нижче визначеної у контрольних тварин, але показано високі рівні у обох групах ін'єкцій церулеїну. Дані зведено у таблиці 11 нижче.

Таблиця 11

Модель панкреатиту	Опис	zcytor17	OSMRбета	zcytor17lig
Група 1	Нормальний контроль	-	+	-
Група 2	12г. після ін'єкції	-	+++	++
Група 3	24г. після ін'єкції	-	++	++

В іншому експерименті рівні експресії zcytor17 та OSMРбета визначали у дистальних ободових кишках мишей, підданих дії DSS. У цій мишачій моделі запальної хвороби кишечника, рівні експресії обох генів визначали кількісною RT-PCR, результати зведено у таблиці 12 нижче. Рівні експресії Zcytor17 збільшувалися із суворістю хвороби, з низькими рівнями експресії у групі 1 норма-

льних тварини та збільшеними кількостями, спостереженими для груп 2 та 3. У групі 4 тварин, рівні zcytor17 повернули до більш нормальних рівнів. На відміну від експресії zcytor17, рівні OSMРбета були найвищими у контрольних тварин та помітно зменшеними в усіх трьох групах, які лікували DSS.

Таблиця 12

Модель IBD	Опис	Доба убивства	zcytor17	OSMRбета
Група 1	Нормальний контроль	14	+	++
Група 2	Ліковані DSS 2 доби	2	+++	+
Група 3	Ліковані DSS 7 діб	7	++	+
Група 4	Ліковані DSS 7 діб	14	+	+

#### Приклад 28

Тканинний розподіл експресії zcytor17lig людини на основі RT-PCR-аналізу першо-ланцюгових кДНК багатьох тканин

Експресію гена zcytor17lig визначали, використовуючи комерційно доступні нормалізовані панелі першо-ланцюгових кДНК багатьох тканин (OriGene Technologies, Inc. Rockville, MD; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Вони включали панель OriGene Human Tissue Rapid-Scan™ (Cat. №;CHSCA-101), що містить 22 відмінних тканини, кістковий мозок та лейкоцити плазми крові) та панель BD Biosciences Clontech Human Blood Fractions MTC™ (Cat№;K 1428-1), що містить 9 відмінних фракцій крові.

PCR-реакції провадили, використовуючи специфічні олігопраймери zcytor17lig ZC41, 458 (SEQ ID NO: 60) та ZC41, 457 (SEQ ID NO: 61), отримуючи продукт з 139 по, та ZC41, 459 (SEQ ID NO: 62) та ZC41, 460 (SEQ ID NO: 63), отримуючи продукт з 92 по, ДНК-полімеразу Qiagen HotStarTaq та буфер (Qiagen, Inc., Valencia, CA), дистильовану воду та барвник RediLoad™ (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL).

Умови PCR-циклів були такими: початковий 1 цикл 15 хвилин денатурації при 95°C, 35 циклів 45 другої денатурації при 95°C, 1 хвилин гібридизації при 53°C чи 56°C та 1 хвилин та 15с подовження при 72°C, а потім кінцевий 1 цикл подовження 7 хвилин при 72°C. Реакції сепарували електрофорезом на 2,0% агаровому гелі (EM Science, Gibbstown, NJ) та візуалізували виявленням етидіум бромідом.

Фрагмент ДНК відповідного розміру спостерігали у таких тканинах дорослої людини, використовуючи панель OriGene Human Tissue Rapid-

Scan™: яєчко, лейкоцити плазми крові (PBL) та кістковий мозок.

Фрагмент ДНК відповідного розміру спостерігали у таких фракціях крові людини, використовуючи панель BD Biosciences Clontech Human Blood Fractions MTC™: активовані мононуклеарні клітини (В- та Т-клітини та моноцити), активовані клітини CD8+ (Т-супресорні/цитотоксичні), активовані клітини CD4+ (Т-хелпер/індуктор) та слабко у спочиваючих клітинах CD8+.

#### Приклад 29

Клонування рецептору Онкостатину М людини  
Рецептор онкостатину-М-бета (OSMRбета) є типом І рецептору цитокіну зі структурною подібністю до IL12R-B2. Zcytor17 має структурну подібність до IL12R-B1. OSMRбета та zcytor17 тестували для виявлення, чи могли б вони взаємодіяти, як субелементи у цитокіновому комплексі сигналізування та чи могли б вони разом діяти як сигнальний рецептор, або антагоніст розчинного рецептору для zcytor17lig.

Для виділення OSM-Rбета, олігонуклеотидні праймери PCR ZC39982 (SEQ ID NO: 64) та ZC39983 (SEQ ID NO: 65) створювали для ампліфікації кодувального регіону повної довжини людини кДНК-послідовності онкостатину-М-бета (SEQ ID NO: 6) [Genbank Accession №U60805; Mosley B, JBC Volume 271, №50, Issue of December 20, 1996 pp.32635-32643].

PCR-реакції провадили на множини темплатів кДНК бібліотеки, використовуючи сильну полімеразу, Advantage II (Clontech, Palo Alto, CA), для ідентифікування джерела кДНК. Застосовуваний темплат ДНК був від ампліфікованої бібліотеки кДНК-плазмід, що містила 5 мільйонів незалежних клонів кДНК. Реакції провадили за інструкціями виробника, використовуючи 400 фмоль/мкл кожного олігонуклеотиду та 2-20 нг/мкл очищеної плазмід-ди ДНК бібліотеки як темплат. Бібліотеки кДНК були похідними від таких тканин та ліній клітин людини: мозку зародка, гладеньких м'язів простати, кісткового мозку, RPMI1588, тиреоїдна, WI-38, яєчок, стимульованих мононуклеарних клітин периферійної крові, стимульованих CD3+ клітин, THP-1, активованих міндалевидних залоз, HSCAT та печінки зародка. Реакції провадили на термоциклері, використовуючи такі умови: 30 циклів 95°C протягом 20с, 68°C протягом 3 хвилин. При заключних 30 циклах провадили додатково одиничний цикл подовження 8 хвилин при 68°C. PCR-продукти візуалізували геле-ектрофорезом з агаром TAE, при наявності етидіум броміду, а потім УФ освітленням. Найбагатший продукт було знайдено від бібліотеки кДНК гладеньких м'язів простати. PCR-реакцію, використовуючи темплат гладеньких м'язів простати та олігонуклеотиди ZC39982 (SEQ ID NO: 64) та ZC39983 (SEQ ID NO: 65) повторювали, використовуючи менш сильну але більш точну термостабільну ДНК-полімеразу turboPFu, (Stratagene, La Jolla, CA). Тридцять ампліфікаційних циклів провадили в таких умовах: денатурування при 94°C, 30с, гібридизації при 63°C 45с, подовження при 72°C 3,5 хвилин. Одиничну смугу продукту очищали на 0,8% агаровому гелі TAE.

Цю ДНК тоді ампліфікували знов, використо-

вуючи праймери ZC39980 (SEQ ID NO: 66) та ZC39981 (SEQ ID NO: 67), створені для залучення розпізнавальної послідовності рестрикційного ферменту для дозволу клонування цієї кДНК у вектор експресії ссавців.

PCR-реакції провадили, використовуючи TurboPfu та очищений PCR-продукт протягом 15 циклів: 95°C 1 хвилини, 64°C 1 хвилини 20с, 72°C 4,5 хвилин. PCR-реакцію тоді розщеплювали EcoRI та XhoI (Invitrogen, Carlsbad, CA) та очищали на гелі, як описано вище. Вектор експресії ссавців, pZ7NX, отримували розщепленням EcoRI та XhoI та PCR-продукт вшивали у цей вектор та електропорували у клітини E. coli DH10b. Кілька бактеріальних колоній виділяли та секвенсували. Один клон був відповідним за винятком одиничної неконсервативної мутації. Для заміни цієї основи до відповідної очікуваної послідовності, олігонуклеотид, що охоплює мутацію та сусідній рестрикційний сайт PstI застосовували у PCR-реакції з TurboPfu використовуючи pZP7Nx-h. Онкостатин-М-Р-плазмиду раніше секвенсували, як темплат. PCR-ампліфіковану ДНК розщеплювали PstI та XhoI та клонували назад у pZP7Nx-h Онкостатин-М-Р-плазмиду замість фрагменту PstI/XhoI, що містить неприйнятну мутацію. Цю нову плазмиду секвенсували по нещодавно ампліфікованому регіону від PstI до XhoI для підтвердження відповідності та впевненості в тому, що не було створено інших помилок при ампліфікації.

Цей аналіз підтверджував послідовність, що відповідає очікуваній послідовності по кодувальному регіону. Послідовність показано у SEQ ID NO: 6, а відповідну амінокислотну послідовність, показано у SEQ ID NO: 7.

#### Приклад 30

Констракти для створення гетеродимеру рецептору Zcytor17 людини/Онкостатин М (OSMRбета)

Система для створення, експресії та очистки таких розчинних гетеродимерних рецепторів відома у рівні техніки та повинна бути пристосованою до рецепторної пари, рецептор онкостатину М людини (OSMRбета) та zcytor17 людини. Для цього констракту поліпептид а OSMRбета показано у SEQ ID NO: 68, а відповідний поліпептид показано у SEQ ID NO: 69; поліпептид для розчинного рецептору для zcytor17 людини показано у SEQ ID NO: 70, а відповідний поліпептид показано у SEQ ID NO: 71.

Для створення ліній клітин, що експресують секретований розчинний гетеродимер hzcytor17/OSMRбета людини, констракт було вироблено таким чином, щоб дати гетеродимерний розчинний рецептор містив зовнішньоклітинний домен OSMRбета людини, конденсований з важким ланцюгом IgG гама1 (Fc4) (SEQ ID NO: 37) з додатком Glu-Glu (SEQ ID NO: 35) на С-закінченні; при цьому зовнішньоклітинний домен zcytor17 конденсували з Fc4 (SEQ ID NO: 37) з додатком His (SEQ ID NO: 72) на С-закінченні. Для відгалужень hzcytor17 та OSMRбета людини гетеродимерний спейсер Gly-Ser з 12 амінокислот (SEQ ID NO: 73) було сконструйовано між зовнішньоклітинною частиною рецептору та N-закінченням Fc4.

А. Створення розчинного OSMRбета/Fc4-CEE людини

Для створення розчинного OSMRбета/Fc4-CEE людини частину зовнішньоклітинної частини людини OSMRбета гетеродимеру виділяли, використовуючи PCR з олігоелементами ZC14063 (SEQ ID NO: 48) та ZC41557 (SEQ ID NO: 74) у таких умовах PCR-реакції: 30 циклів 95°C протягом 60с, 57°C протягом 30с, та 72°C протягом 100с; та 72°C протягом 7 хвилин. PCR-продукти очищали, використовуючи комплект QIAquick PCR Purification (Qiagen), розщеплювали EcoRI та BamHI (Boehringer Mannheim), виділяли гель-еклектрофорезом та очищали, використовуючи комплект гель-екстракції QIAquick (Qiagen).

Касета експресії, структура плазмід та придаток частини химери Fc4-GluGlu містилися у раніше виробленому власному плазмідному векторі. Плазмідний вектор розщеплювали EcoRI та BamHI (Boehringer-Mannheim), виділяли гель-еклектрофорезом та очищали, використовуючи комплект гель-екстракції QIAquick (Qiagen). Розщеплені та очищені фрагменти OSMRбета людини та Fc4-CEE, що містить плазмиду, вшивали разом, використовуючи ДНК-лігазу T4 (Life Technologies, Bethesda, MD), використовуючи стандартні способи лігування. Мініпрепарати від лігування скринували стосовно вставки EcoRI/SmaI відповідного розміру (772 по) для розчинного OSMRбета та позитивні мініпрепарати секвенсували для підтвердження точності PCR-реакції. Цю нову плазмиду названо pZP9-ONCOMR-Fc4CEE.

В. Створення розчинного zcytor17/Fc4-CHIS людини

Для створення hzcytor17/Fc4-CHIS частину гетеродимеру, зовнішньоклітинну частину zcytor17 людини виділяли розщепленням раніше утвореної плазмід, що містить розчинний рецептор zcytor17-Fc4. Плазмиду спершу розщеплювали Sail (New England Biolabs, Beverly, MA), після чого реакцію серійно екстрагували фенолом-хлороформом та осаджували етанолом. Розщеплену ДНК далі обробляли ДНК-полімеразою T4 (Boehringer-Mannheim), для заповнення у 5'виступах, створених розщепленням Sail, кінці відщепленої ДНК затуплювали, після чого реакцію серійно екстрагували фенолом-хлороформом та осаджували етанолом. Затуплену ДНК тоді далі розщеплювали BglII для розрізання на 3' кінці, виділяли гель-еклектрофорезом та очищали, використовуючи комплект гель-екстракції QIAquick (Qiagen) за інструкцією виробника. Утворений фрагмент ДНК, що містить послідовність, кодувальну стосовно зовнішньоклітинного домену zcytor17, вшивали у придаток Fc4-CHIS, що містить вектор експресії ссавців, отриманий таким чином.

Касета експресії, структура плазмід та придаток частини химери Fc4-CHIS містилися у раніше виробленому власному плазмідному векторі; Цей плазмідний вектор розщеплювали EcoRI (Boehringer-Mannheim) після чого реакцію серійно екстрагували фенолом-хлороформом та осаджували етанолом. Розщеплену ДНК далі обробляли ДНК-полімеразою T4 (Boehringer-Mannheim), для заповнення у 5'виступах, створених розщепленням EcoRI, кінці відщепленої ДНК затуплювали, після

чого реакцію серійно екстрагували фенолом-хлороформом та осаджували етанолом. Затуплену ДНК тоді далі розщеплювали BamHI (Boehringer-Mannheim) для розрізання на 3' кінці, виділяли гель-еклектрофорезом та очищали, використовуючи комплект гель-екстракції QIAquick (Qiagen). Розщеплені та очищені фрагменти zcytor17 людини та Fc4-CHIS, що містить плазмиду, вшивали разом, використовуючи ДНК-лігазу T4 (Life Technologies, Bethesda, MD), використовуючи стандартні способи лігування.

Мініпрепарати від лігування скринували шляхом PCR, використовуючи zcytor17-специфічний сенсовий праймер ZC29180 (SEQ ID NO: 22) та Fc4-специфічний антисенсовий праймер ZC29232 (SEQ ID NO: 75) з такими умовами PCR-реакції: 30 циклів 94°C протягом 60с, 68°C протягом 150с; та 72°C протягом 7 хвилин. Очікуваний розмір продукту 848 по підтверджували відповідним об'єднанням плазмід, названої pZEM228hzcytor17/Fc4HIS.

Другий констракт zcytor17-Fc4 створювали для застосування при створенні гомодимерного білку від клітин COS. Коротше кодувальний регіон для повного конденсованого білку виділяли розщепленням раніше отриманої плазмід, що містить розчинний рецептор zcytor17-Fc4 з Sail (Boehringer-Mannheim). Реакцію серійно екстрагували фенолом-хлороформом та осаджували етанолом. Розщеплену ДНК далі обробляли ДНК-полімеразою T4 (Boehringer-Mannheim), для заповнення у 5'виступах, створених розщепленням EcoRI, кінці відщепленої ДНК затуплювали, після чого реакцію серійно екстрагували фенолом-хлороформом та осаджували етанолом. Затуплену ДНК тоді далі розщеплювали NotI (Boehringer-Mannheim) для розрізання на 3' кінці, виділяли гель-еклектрофорезом та очищали, використовуючи комплект гель-екстракції QIAquick (Qiagen). Вектор експресії ссавців, що містить керовану CMV касету експресії розщеплювали для створення сумісних кінців та 2 фрагменти вшивали разом.

Мініпрепарати з утвореного лігування скринували шляхом PCR, використовуючи специфічний сенсовий праймер вектору ZC14063 (SEQ ID NO: 48) та zcytor17 специфічний антисенсовий праймер ZC27899 (SEQ ID NO: 19) з такими умовами PCR-реакції: 30 циклів 94°C протягом 30с, 64°C протягом 30с; 70°C протягом 90с; та 72°C протягом 7 хвилин. Очікуваний продукт розміром приблизно 1000 по підтверджено відповідним об'єднанням плазмід, названої pZP7NX-zcytor17-Fc4. Цю плазмиду потім трансфектували у клітини COS, використовуючи Lipofectamin™ (Gibco/BRL), за інструкціями виробника. Клітини кондиціювали протягом 60 годин у DMEM+5% FBS (Gibco/BRL) після чого білки очищали хроматографією на білкової колонці G-sepharose 4B та провадили доступні in vitro біодослідження, наприклад, ті, що описано тут.

С. Створення рецептору Zcytor17 людини/Онкоостатин М (OSMRбета)

Приблизно 16 мкг кожного з pZP9-ONCOMR-Fc4CEE та pZEM228hzcytor17/Fc4HIS котрансфектували у клітини BHK-570 (ATCC №CRL-10314), використовуючи Lipofectamin™ (Gibco/BRL), за

інструкціями виробника. Трансфектовані клітини селектували протягом 10 діб у DMEM+5% FBS (Gibco/BRL), що містить 0,5мг/мл G418 (Gibco/BRL) та 250нМ метилтресату (MTX) (Sigma, St. Louis, MO) протягом 10 діб.

Утворену множину подвійно-вибраних клітин застосовували для створення гетеро-димерного білку. Три фактори клітин (Nunc, Denmark) цієї множини застосовували для створення 10л вільного від сироватки стандартизованого середовища. Це стандартизоване середовище пропускали через 1мл protein-A колонку та елювали на (10) фракцій по 750 мікролітрів. Чотири ці фракції, знайдені як маючі найвищу концентрацію, поєднували та діалізували (гранична молекулярна маса 10кДа) проти PBS. Потрібний комплекс гетеро-димерного розчинного білку zcytor17/OSMRбета відділяли від інших компонентів середовища проходження множини через колонку Nickel та промивкою колонки різними концентраціями імідазолу. Розчинний білок zcytor17/OSMRбета елювали при середній концентрації імідазолу, а гомодимер hzcytor17/Fc4HIS елювали при вищій концентрації імідазолу.

#### Приклад 31

Тканинний розподіл zcytor17 людини у панелі тканин, використовуючи Норзерн-блот та PCR

А. Тканинний розподіл zcytor17 людини, використовуючи Норзерн-блот

Норзерн-блоти тканин (Human 12-lane MTN Blot I та II, та Human Immune System MTN Blot II; Human Endocrine MTN, Human Fetal MTN Blot II, Human Multiple Tissue Array) (Clontech) а також власні блоти, що містять різні тканини, зондували для визначення тканинного розподілу експресії zcytor17 людини. Власні отримані блоти включали такі мРНК тканин та ліній клітин: клітини SK-Nер-1, клітини THP1, надниркових залоз (Clontech); нирок (Clontech), печінки (Clontech та Invitrogen); спинного хребта (Clontech), яєчка (Clontech), Т-клітин CD4+ людини, Т-клітин CD8+ людини, Т-клітин CD19+ людини, змішаної лімфоцитної реакції людини (MLR), лінії клітин THP1 (ATCC №T1B-202), лінії клітин U937, р388D1 лінії Т-клітин лімфобластоми миші (ATCC №CCL-46) зі стимулюванням або без стимулювання іономіном; та лінії клітин легень ембріону людини WI-38 (ATCC №CRL-2221) зі стимулюванням або без стимулювання іономіном.

PCR-похідний зонд з приблизно 500 по для zcytor17 (SEQ ID NO: 4) ампліфікували, використовуючи олігонуклеотиди ZC28, 575 (SEQ ID NO: 77) та ZC27, 899 (SEQ ID NO: 19), як праймери. PCR-ампліфікацію здійснювали таким чином: 30 циклів 94°C протягом 1 хвилини, 65°C протягом 1 хвилини, та 72°C протягом 1 хвилини; а потім 1 цикл при 72°C протягом 7 хвилин. PCR-продукт візуалізували гель-еклектрофорезом на агарі та PCR-продукт з приблизно 500 по очищали на гелі, як описано тут. Зонд радіоактивно мітили, використовуючи комплект PRIME ITR™ Random Primer Labeling (Stratagene) відповідно інструкціям виробника. Зонд очищали, використовуючи NUCTRAP™ напірну колонку (Stratagene). Розчин EXPRESSHYB™ (Clontech) застосовували для предгібридизації та, як гібридизаційний розчин для Норзерн-блотів.

Предгібридизацію здійснювали при 68°C протягом 2 годин. Гібридизація проходила протягом ночі при 68°C з приблизно  $1,5 \times 10^6$  імпульсів/мл міченого зонду. Блоти промивали 3 рази при кімнатній температурі у 2X SSC, 0,05% SDS, а потім промивали протягом 10 хвилин у 2X SSC, 0,1% SDS при 50°C. Кілька слабких смуг спостерігали після кількох діб піддавання. Транскрипт з приблизно 9 ко спостерігали у трахеях, скелетних м'язах та тимусі; транскрипт з приблизно 2 ко спостерігали у клітинах PBL, HPV, U937 та THP-1; а транскрипт з приблизно 1,2 ко спостерігали у плаценті, кістковому мозку та щитовидній залозі та клітинах HPV та U937. В усіх тканинах, перерахованих вище, інтенсивність сигналу була слабкою.

Виявлено невелику експресію у більшості нормальних тканин, підказуючи, що експресія zcytor17 може бути залежною від активації клітин або тканини, в яких вона виражена.

В. Тканинний розподіл у панелі тканин, використовуючи PCR

Панель кДНК від тканин людини скринінгували на експресію zcytor17, використовуючи PCR. Панель була власною з вмістом 94 марафонних кДНК та зразків кДНК від різних нормальних та ракових тканин та ліній клітин людини, що показано у таблиці 13, нижче. КДНК брали з власних бібліотек або марафони кДНК з власних РНК-препаратів, РНК Clontech, або РНК Invitrogen. Марафонну кДНК було вироблено, використовуючи комплект marathon-Ready™ (Clontech, Palo Alto, CA) та тестовано QC з клатриновими праймерами ZC21195 (SEQ ID NO: 78) та ZC21196 (SEQ ID NO: 79), а тоді розбавлено на основі інтенсивності клатринової смуги. Для гарантії якості панельних зразків, провадили три тести для контролю якості (QC): (1) Для оцінки якості РНК, застосовуваної для бібліотеки, власну кДНК тестували стосовно вставки PCR-оліговекторів середнього розміру, що були специфічними стосовно послідовності вектору для певної бібліотеки кДНК; (2) Стандартизацію концентрації кДНК у панелі зразків досягали, використовуючи стандартні способи PCR для ампліфікації повної довжини альфа тубулінової кДНК або кДНК G3PDH, використовуючи 5'оліговектор ZC 14, 063 (SEQ ID NO: 48) та 3'альфа тубуліново-специфічний олігопраймер ZC17, 574 (SEQ ID NO: 49) або 3'G3PDH-специфічний олігопраймер ZC17, 600 (SEQ ID NO: 50); та (3) зразок піддавали секвенсуванню для перевірки можливого рибосомального або мітохондріального забруднення ДНК. Панель ставили у 96-комірковий планшет, що включав позитивний контрольний зразок геномної ДНК людини (Clontech, Palo Alto, CA). Кожна комірка вміщувала приблизно 0,2-100мкл кДНК. PCR-реакції ставили, використовуючи олігоелементи ZC26, 358 (SEQ ID NO: 80) та ZC26, 359 (SEQ ID NO: 81), TaKaRa ExTaq (TAKARASHUZO Co LTD, Biomedicals Group, Japan) та барвник Rediload (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). Ампліфікацію здійснювали таким чином: 1 цикл при 94°C протягом 2 хвилин, 35 циклів 94°C протягом 30с, 66,3°C протягом 30с та 72°C протягом 30с, а потім 1 цикл при 72°C протягом 5 хвилин. Приблизно 10мкл PCR-продукту реакції піддавали стандартному гель-еклектрофорезу на агарі, використовуючи

4% агаровий гель.

Передбачуваний фрагмент ДНК відповідного розміру спостерігали у реакціях лімфатичних вузлів, простати, щитовидної залози, HPV (епітелію простати), HPVS (епітелію простати, вибраного), пухлин легенів, пухлин матки, разом з реакцією геномної ДНК.

Фрагмент ДНК для тканин простати (2 зразки), HPV (епітелію простати), HPVS (епітелію простати, вибраного) та геномної вирізали та очищали, використовуючи комплект гель-екстракції (Qiagen, Chatsworth, CA) відповідно інструкціям виробника. Фрагменти підтверджували секвенсуванням для підтвердження, що вони насправді були zcytor17.

Таблиця 13

Лінія тканин/клітин	№ зразку	Лінія тканин/клітин	№ зразку
Надниркова залоза	1	Пухлина нирок	1
Сечовий міхур	1	Пухлина печінки	1
Кістковий мозок	1	Пухлина легенів	1
Мозок	1	Пухлина яєчника	1
Шия	1	Пухлина прямої кишки	1
Ободова кишка	1	Пухлина матки	1
Мозок зародка	1	Кістковий мозок	3
Серце зародка	1	Мозок зародка	3
Нирки зародка	1	Острівцець	2
Печінка зародка	1	Простата	3
Легені зародка	1	RPMLNbl 788	2
М'язи зародка	1	Яєчка	4
Шкіра зародка	1	Щитовидна залоза	2
Серце	2	WI38	2
K562	1	ARIP	1
Нирки	1	HaCat (кератиноцити людини)	1
Печінка	1	HPV	1
Легені	1	Надниркова залоза	1
Лімфатичний вузол	1	Простата SM	2
Меланома	1	CD3+вибр.РВМС,стим.іоном.+РМА	1
Підшлункова залоза	1	HPVS	1
Гіпофіз	1	Серце	1
Плацента	1	Гіпофіз	1
Простата	1	Плацента	2
Пряма кишка	1	Слинні залози	1
Слинні залози	1	PL-60	3
Скелетні м'язи	1	Тромбоцити	1
Тонкий кишечник	1	HBL-100	1
Спинний хребет	1	Нирковий мезангій	1
Селезінка	1	Т-клітини	1
Шлунок	1	Нейтрофіли	1
Яєчка	2	MPC	1
Тимус	1	Hut-102	1
Щитовидна залоза	1	Ендотелій	1
Трахеї	1	HerG2	1
Матка	1	Фібробласт	1
Пухлина стравоходу	1	E.Histo	1
Пухлина шлунку	1		

С. Аналіз експресії zcytor17 шляхом PCR та Норзерн

Розглянуті типи клітин та умови росту, що впливали на експресію рецептору є корисними засобами пояснення їх функції та передбачуваного джерела ліганду. Широке коло тканин та типів клітин розглянуто шляхом PCR. Термостабільну полімеразу Advantage II™ (Clontech, La Jolla, CA) застосовували з олігонуклеотидними праймерами

ZC29, 180 (SEQ ID NO: 22) та ZC29, 179 (SEQ ID NO: 82) та 1-10нг різних темплатних кДНК, перерахованих нижче, протягом 30 ампліфікаційних циклів (94°C, 30с; 66°C, 20с; 68°C, 1 хвилини 30с). Після цього, 20% кожної з реакцій провадили на 0,8% агарі, гелі ТАЕ/етидіум бромід та візуалізували УФ світлом. Зразки тоді оцінювали на основі інтенсивності смуг. Дивись Таблицю 14 нижче.

Таблиця 14

Клітини та умови	Бал 0-5
HeI, стимульовані PMA	0
U937	3
MCF-7	0
HuH7	1
	0
HT-29	0
HEPG2	0
HEPG2 HeI, стимульовані IL-6	0
Дермальний ендотелій людини	0
Венозний ендотелій людини	0
CD4+ людини	0
BEWO	0
CD19+ людини	1
PBMC людини, стимульовані PMA, PHA, іономіцином, IL-2, IL-4, TNF $\alpha$ , 24г.	0
PBMC людини, стимульовані LEIS, PWM, IFN $\gamma$ , TNF $\gamma$ , 24г.	0
PBMC людини в усіх вищезазначених умовах протягом 48г.	4
HUVECs, 2	4
RPMI1788	0
TF1	0
T-клітини селезінки мавпи, стимульовані PMA, іономіцином	0
Ендотелій простати HPV-трансформовані	5
Міндалини людини, незапальні	0
НАСАТ	0
Хондроцити людини	1
Синовіоцити людини	1
THP1	5
REN	0

З сильних позитивних PCR-сигналів, два були від ліній клітин моноцитів людини U937 та THP1.

Ці дві лінії клітин разом з лінією епітелію простати було вибрано для наступного аналізу Норзерн-блотуванням. Попередні спроби при візуалізуванні транскрипту Норзерн-аналізом, використовуючи мРНК від різних тканин давали слабкі та дифузні сигнали при несподівано великому розмірі 7-10 ко, роблячи ці дані важкими для інтерпретації. Денатурований агаровий гель формальдегід/MOP8/0,8% отримували (Методології РНК, Farrell, RE Academic Press) та 2мкг поліА+мРНК провадили для кожного зразку разом з бічною ледер-послідовністю РНК (Life Technologies, Bethesda, MD). Гель тоді переносили на нейлон Hybond (Amersham, Buckinghamshire, UK), перехресно УФ-зв'язували та гібридизували у розчині ExpressHyb (Clontech, LaJolla, CA) при 68°C протягом ночі, використовуючи зонд для zcytor17 людини, створений шляхом PCR з олігоелементами ZC28, 575 (SEQ ID NO: 77) та ZC27, 899 (SEQ ID NO: 19) та мічений комплектом Megaprime32p (Amersham). Норзерн-блот потім промивали 0,2xSSC+0,1% SDS при 65°C протягом 15 хвилин та експонували на плівці протягом 7 днів з інтенсифікуючими екранами. Помітну смугу 8 ко спостерігали в епітелії простати та рядах U937 в той час,

як слабку смугу було представлено у ряді THP1.

Для оптимізації кДНК, застосовували як гібридаційний зонд чотири відмінні регіони послідовності zcytor17 людини повної довжини ампліфікували шляхом PCR, мітили та гібридизували, як описано вище, до саузерн-блотів, що містили ДНК геномної та ампліфікованої бібліотек кДНК. Чотири зонди, позначені тут як зонди A-D, ампліфікували, використовуючи такі праймерні пари: (A) ZC28, 575 (SEQ ID NO: 77), ZC27, 899 (SEQ ID NO: 19); (B) ZC27, 895 (SEQ ID NO: 20), ZC28, 917 (SEQ ID NO: 83); (C) ZC28, 916 (SEQ ID NO: 84), ZC28, 918 (SEQ ID NO: 85); та (D) ZC28, 916 (SEQ ID NO: 84), ZC29,122 (SEQ ID NO: 21). Геномну ДНК людини разом з ампліфікованими бібліотеками кДНК, що продемонструвала вміст zcytor17 шляхом PCR, розщеплювали EcoRI та XhoI для вивільнення вставок та проганяли на дублюкатних агарових гелях TAE/0,8%, денатурували 0,5M NaOH, 1,5M NaCl, блотували до Hybond, перехресно УФ-зв'язували та кожну гібридизували з відмінним зондом. Зонд В було знайдено як маючий найменше неспецифічне приєднання та найсильніший сигнал. Відтак, Зонд В застосовували для усіх наступних гібридацій.

Встановивши, що клітини THP1 є чудовою моделлю циркуляційних моноцитів та експресують zcytor17 у низьких рівнях ми обробляли їх різними сполуками у спробі збільшення експресії zcytor17. Клітини вирощували до густини 2e5/мл, промивали та ресуспендували у різних стимулювальних середовищах, вирощували протягом 4 або 30 годин та збирали для РНК-препаратів. Кожне середовище доповнювали одним з таких ліків або пари цитокінів: LPS, 2мкг/мл (Sigma Chemicals, St. Louis, MO), hTNF $\alpha$  2нг/мл (R & D Systems, Minneapolis, MN), hGM-CSF 2нг/мл (R & D Systems, Minneapolis, MN), hIFN $\gamma$  50нг/мл (R & D Systems, Minneapolis, MN), hMCSF 1нг/мл (R & D Systems, Minneapolis, MN), hIL6 1нг/мл (R & D Systems, Minneapolis, MN), hIL-1 $\beta$  2нг/мл (R & D Systems, Minneapolis, MN), hIFN $\gamma$ 50нг/мл+hILA 0,5нг/мл (R & D Systems, Minneapolis, MN), hIFN $\gamma$  50нг/мл+hIL10 1нг/мл (R & D Systems, Minneapolis, MN), PMA 10нг/мл (Calbiochem, SanDiego, CA) та необроблений контроль. У кінці періоду культивування загальну РНК отримували, використовуючи Міді-комплект RNeasy (Qiagen; Valencia, CA). Полі А+ РНК було вибрано з групи: загальних РНК, використовуючи комплект MPG (CPG, Lincoln Park, NJ). 2 мкг поліА+ РНК від кожної з умов провадили на формальдегід/MOPS/агаровому гелі, переносили до нейлону та УФ перехресно зв'язували, як описано вище. Ці Норзерн-блоти тоді гібридизували, як вище, до зонду В при 68°C протягом ночі, промивали при високій суворості з 0,2xSSC, 0,1% SDS при 65°C, експонували плівку протягом ночі, тоді піддавали фосфоресцентному відбору для кількісного аналізу сигналу. Домінантну мРНК з 8 ко також з відносно слабшою смугою 2:8 ко спостерігали в усіх рядах. 20-разове збільшення мРНК zcytor17 спостерігали у РНК від клітин, які обробляли hIFN $\gamma$  протягом 30 годин, цей ефект слабо змінювався з одночасною обробкою IL4. Несуттєве збільшення мРНК у 3 рази спостерігали у РНК від клітин, які обробляли LPS, TNF $\alpha$  та GM-CSF в той

час, як MCSF, IL6 та IL1 (3 не мали впливу на рівні мРНК *zcutor17*). Ці дані підказують роль рецептору *zcutor17* та його ліганду у біології моноцит-макрофагів та розширенню будь-якого числа процесів хвороб, в яких ці клітини приймають участь.

#### Приклад 32

Тканинний розподіл *zcutor17lig* людини у панелі тканин, використовуючи Норзерн-блот та PCR

Фрагмент кДНК *zcutor17lig* людини отримували, використовуючи PCR з ген-специфічними праймерами: сенсовий праймер ZC41438 (SEQ ID NO: 93) та антисенсовий праймер ZC41437 (SEQ ID NO: 94) та темплат кДНК *zcutor17lig* людини (SEQ ID NO: 90) Цей фрагмент очищали, використовуючи стандартні способи та приблизно 25нг мітили 32р альфа dCTP, використовуючи комплект рандомізованих праймерів мічення Prime-It RmT (Stratagene) та гібридизували у Ultrasorb, (Ambiol) і застосовували для експозиції плівки/інтенсифікуючих екранів Biotax за рекомендаціями виробника у кожному випадку. Нові, раніше невикористовувані блоти, включаючи блот IV 12 ряду MTN людини Clontech, MTNII мозку людини та MTN мозку людини, MTN II імунної системи людини та множини U MTE людини, від Clontech гібридизували протягом ночі при 42°C способом Ambiol ultrasorb. Неспецифічні радіоактивні підрахунки змивали, використовуючи 1SSC/5% SDS при 55°C. Позитивні блоти включали 12 ряд MTN людини (Clontech). Визначали 12 тканин, тільки плацента була позитивною для транскрипту з приблизно 1,2 ко.

#### Приклад 33

Створення векторів експресії ссавців, що експресують *zcutor17lig* людини-CEE

##### А. Створення *zcutor17lig*-CEE/pZMP21

Експресійну плазмиду, що містить увесь або частину полінуклеотиду, що кодує *zcutor17lig*-CEE (SEQ ID NO: 95), створювали гомологічною рекомбінацією. Плазміда мала назву *zcutor17lig*-CEE/pZMP21.

Створення *zcutor17lig*-CEE/pZMP21 супроводжували створенням фрагменту *zcutor17Ug*-CEE, використовуючи PCR-ампліфікацію. ДНК-темплат, застосовуваний для продукування фрагменту *zcutor17lig*-CEE, був *zcutor17lig*/pZP7nx. Праймери, застосовувані для продукування фрагменту *zcutor17lig*-CEE були: (1) ZC41, 607 (SEQ ID NO: 97) (сенсова послідовність), який включає від 5' до 3' кінця: 28 по фланкувальній послідовності вектору (5' вставки) та 21 по відповідних 5' послідовності *zcutor17lig*; та (2) ZC41, 605 (SEQ ID NO: 98) (антисенсова послідовність), який включає від 5' до 3' кінця: 37 по фланкувальній послідовності вектору (3' вставки), 3 по стоп-кодону, 21 по, що кодує С-термінальний придаток EE та 21 по, відповідних 3' кінцевій послідовності *zcutor17lig*. Фрагмент, що є результатом вищезазначеної PCR-ампліфікації був копією темплату *zcutor17lig* з додаванням С-термінального придатку EE, утворюючи кінцевий продукт *zcutor17lig*-CEE.

PCR-реакції провадили таким чином: До 100мкл кінцевого об'єму додавали: 10мкл буферу полімеразної реакції 10x Taq з 15мМ MgCl<sub>2</sub> (Gibco), 1мкл ДНК-полімерази Taq (5 одиниць/мкл, Gibco),

3мкл 10мМ dNTPs, 78мкл дистильованої води, 3мкл 20моль/мкл резервного розчину праймеру ZC41, 607 (SEQ ID NO: 97), 3мкл 20моль/мкл резервного розчину праймеру ZC41, 605 (SEQ ID NO: 98), та 2мкл 0,13мкг/мкл резервного розчину темплат ДНК *zcutor17lig*. Об'єм мінерального масла 50мкл додавали у суміш. Реакцію нагрівали до 94°C протягом 5 хвилин, а потім 35 циклів при 94°C протягом 1 хвилини; 55°C протягом 2 хвилин; 72°C протягом 3 хвилин, а потім 10 хвилин подовження при 72°C та тримали при 4°C, а потім реакцію збирали.

Плазмиду pZMP21 рестрикційно розщеплювали ферментом BglII, очищали PCR-комплексом очистки QiaQuick (Qiagen), використовуючи мікроцентрифугу, та застосовували для рекомбінації з PCR-фрагментом. Плазмиду pZMP21 створювали з pZMP20, яку створювали з pZP9 (зберігається у ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 та позначена №98668) з генетичними елементами дріжджів від pRS316 (зберігається у ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 та позначена №77145), елементу IRES від поліовірусу та зовнішньоклітинного домену CD8, усіченого на карбоксил-термінальному кінці трансмембранного домену. PZMP21 є вектором експресії ссавців, що містить касету експресії, що має промотор MPSV, інтрон імуноглобулінового сигнального пептиду, складні рестрикційні сайти для вставки кодувальної послідовності, стопко дон та термінатор гормону росту людини. Плазміда також має початок реплікації *E. coli*, елемент придатного для селекції маркеру експресії ссавців, що має промотор SV40, енансер та початок реплікації, ген DHFR, термінатор SV40, а також послідовності URA3 та CEN-ARS, потрібні для селекції та реплікації у *S. cerevisiae*.

П'ятдесят мікролітрів компетентних клітин дріжджів (*S. cerevisiae*) незалежно комбінували з 100нг розрізаної плазмиди, 5мкл описаної раніше PCR-суміші та переносили до електропораційної кювети 0,2см. Суміш дріжджі/ДНК піддавали електроімпульсу при 0,75кВ (5кВ/см), невизначено ом, 25мкФ. Кожна кювета мала 600мкл 1,2М доданого сорбіту та дріжджі засівали в одну з аліквот по 100мкл та одну з аліквот по 300мкл на два планшети URA-D та інкубували при 30°C. Після приблизно 72 годин, трансформанти дріжджів Ura+ з одиначного планшету ресуспендували у 1мл води та центрифугували до гранули клітин дріжджів. Гранулу клітин ресуспендували у 500мкл лізисного буферу (2% Тритон X-100, 1% SDS, 100мМ NaCl, 10мМ Трис, pH 8,0, 1мМ EDTA). 500мкл лізисної суміші додавали до труби Еппендорфа, що містить 300мкл промитих кислотою 600мкм скляних кульок та 300мкл фенол-хлороформ, центрифугували протягом 1 хвилини з інтервалами два або 3 рази, а потім 5 хвилин центрифугували у центрифугу Еппендорфа при максимальній швидкості. Три сотні мікролітрів водної фази переносили до свіжої труби та ДНК осаджували 600мкл 100% етанолу (ЕтОН), а потім центрифугували протягом 10 хвилин при 4°C. ДНК-гранулу тоді промивали 500/мкл 70% EtOH, а потім центрифугували протягом 1 хвилини при 4°C. ДНК-гранулу ресуспендували у 30мкл води.

Трансформацію електрокомпетентних клітин *E. coli* (MC 1061) робили з 5мкл ДНК-препарату дріжджів та 50мкл клітин MC1061. Клітини піддавали електроімпульсу при 2,0кВ, 25мкФ та 400ом. Після електропорації додавали 600мкл SOC (2% Bacto Tryptone (Difco, Detroit, MI), 0,5% екстракту дріжджів (Difco), 10мМ NaCl, 2,5мМ KCl, 10мМ MgCl<sub>2</sub>, 10мМ MgSO<sub>4</sub>, 20мМ глюкози). Електропоровані клітини *E. coli* засівали у аліквоті 200мкл та 50мкл на два планшети LB АМФ (бульйон LB (Lennox), 1,8% agar Bacto (Difco), 100мг/л ампіциліну). Планшети інкубували уверх дном протягом приблизно 24 години при 37°C. Три ампіцилін-резистентні колонії селектували наугад та подавали на аналіз послідовності вставки. Великомасштабну плазмідну ДНК відділяли від клону з підтвердженою послідовністю, використовуючи комплект Qiagen Maxi (Qiagen) відповідно інструкціям виробника.

В Створення мишачого zcytor17Lig(m)-CEE/pZMP21

Експресійну плазмиду, що містить повний полінуклеотид, що кодує zcytor17lig миші-CEE (SEQ ID NO: 104 та SEQ ID NO: 105) також створювали гомологічною рекомбінацією, використовуючи спосіб, описаний у прикладі 33А вище. Праймерами, що застосовували були: (1) ZC41643 (SEQ ID NO: 106) (прямий, від 5' до 3'сенсовий), що мав 28 по перекривання вектору точки 5'вставки; 21 по на 5' кінці zcytor17lig (m) та (2) ZC41641 (SEQ ID NO: 107) (зворотний, від 5' до 3'анти-сенсовий), що мав 37 по перекривання вектору точки 3'вставки; 3 по стоп-кодон; 21 по С-термінального EE придадку; 24 по 3' кінцевого zcytor17lig(m)-CEE. Плазміда мала назву zcytor17lig(m)-CEE/pZMP21.

Полінуклеотидну послідовність zcytor17lig(m)-CEE показано у SEQ ID NO: 104, а відповідну поліпептидну послідовність показано у SEQ ID NO: 105.

#### Приклад 34

Трансфекція та експресія поліпептидів Zcytor1 7Ug-CEE

А. Експресія zcytor17lig-CEE/pZMP21 людини у 293Т-клітинах

Zcytor1 7Hg-CEE експресували тимчасово у 293Т-клітинах (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, ATCC (SD-3515)) для створення початково очищеного білку. За добу перед трансфекцією 293Т-клітини засівали при  $6,5 \times 10^4$  клітин/см<sup>2</sup> у 30 культивувальних колб Т162 з загальним об'ємом культивувального середовища 30мл (SL7V4+5% FBS+1% Pen/Strep) на колбу. Клітини інкубували протягом 24 годин при 37°C.

Суміш ДНК/ліпосоми отримували таким чином: Дві конічні труби по 50мл заповнювали 25мл трансфекційного середовища (SL7V4+1% Pen/Strep) та 1,13мг zcytor17lig-CEE/pZMP21 (Приклад 33) додавали до кожного. Відокремлений комплект з двох конічних труб по 50мл заповнювали 22мл трансфекційного середовища (вище) та 3мл ліпосом (Lipofectamin™, Gibco) додавали до кожної. Для кожного, комплекту труб одну трубу ДНК додавали до одної труби ліпосом та суміш ДНК/ліпосоми інкубували протягом 30 хвилин. Дві 50мл конічні труби, що містили суміші ДНК/ліпосом поєднували (приблизно 100мл) та додавали 300мл

трансфекційного середовища.

30 колб 293Т-клітин декантували, промивали 1х приблизно 15мл PBS та додавали до кожної колби 12,5мл розбавленої суміші ДНК/ліпосоми.

Колби інкубували протягом 3 годин при 37°C. Після інкубування 25мл культивувального середовища (вище) додавали до кожної колби Т162. Трансфекційне середовище збирали через приблизно 96 годин та застосовували для очистки білку (Приклад 35).

В. Експресія zcytor17lig-CEE/pZMP21 людини у клітинах ВНК

Повної довжини білок zcytor17lig отримували у клітинах ВНК, трансфектованих zcytor17lig-CEE/pZMP21 (дивись Приклад 33 вище). Клітини ВНК 570 (ATCC CRL-10314) засівали у Т75 колби культивування тканин та давали рости до приблизно 50 до 70% конфлюентності при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, у середовищі для росту (SL7V4, 5% FBS, 1% pen/strep). Клітини тоді трансфектували zcytor17lig-CEE/pZMP21 опосередкованою ліпосомами трансфекцією (використовуючи Lipofectamin™; Life Technologies), у вільному від сироватки середовищі (SF) (SL7V4). Плазмиду (16мкг) розбавляли у 1,5мл труби середовищем SF до загального кінцевого об'єму 640мкл. Тридцять п'ять мікролітрів ліпідної суміші змішували з 605мкл середовища SF та суміш інкубували приблизно 15 хвилин при кімнатній температурі. 5 мілілітрів середовища SF тоді додавали до суміші ДНК:ліпід. Клітини промивали одноразово 10мл PBS, PBS декантували та додавали суміш ДНК:ліпід.

Клітини інкубували при 37°C протягом 5 годин, тоді додавали до кожного планшету 15мл середовища (SL7V4, 5% FBS, 1% pen/strep). Планшети інкубували при 37°C протягом ночі та середовище суміші ДНК:ліпід заміщали селекційним середовищем (SL7V4, 5% FBS, 1% pen/strep, 1мкМ метотрексат) наступної доби. Приблизно 10 діб після трансфекції метотрексат-резистентні колонії з трансфекційної колби Т75 трипсинізували та клітини поєднували і засівали у колбу Т-162 та переносили для великомасштабного культивування.

С. Експресія мишачого zcytor17lig-CEE (m)/pZMP21 у 293Т-клітинах

Zcytor17lig миші (m)-CEE експресували тимчасово у 293Т-клітинах, як описано у прикладі 34А та культивувальне середовище застосовували для очистки білку (Приклад 35).

#### Приклад 35

Очистка zcytor17lig-CEE від 293Т-клітин

Якщо не визначено інше, усі операції здійснювали при 4°C. Застосовували наступну процедуру іммобілізування zcytor17lig миші та людини, що містили С-термінальні придатки Glu-Glu (EE) (SEQ ID NO: 103). Стандартизоване середовище очищали від 293Т-клітини, що експресували zcytor17lig-CEE (Приклад 34). Загальні концентрації цільового білку стандартизованих середовищ визначали через SDS-PAGE та Вестерн-блотуванням з анти-EE антитілом.

5,5мл з колонки анти-EE Poros 50 А (PE Biosystems, Framingham, MA) (отримано, як описано нижче) виливали у скляну колонку Waters AP-1, 1,1см×7см (Waters, Milford, MA). Колонку пакували

у потоці та урівнювали на BioCad Sprint (PE Biosystems, Framingham, MA) буферованим фосфатом сольовим розчином (PBS) pH 7,4. Стандартизоване середовище доводили NaCl до 0,3М та pH доводили до 7,2. Стандартизоване середовище було тоді завантажено на колонку протягом ночі зі швидкістю потоку приблизно 3мл/хвилини. Колонку промивали 10 об'ємами колонки (CV) PBS pH 7,4 та знов промивали 3 CV 5X Sigma PBS pH 7,4. Її поетапно елювали 0,5М Ацетат, 0,5М NaCl, pH 2,5 при 3мл/хвилини. Туби фракції містили 1мл Трис-основи (pH не доводили) для негайної нейтралізації елювання. Колонку знов промивали 2 CV з 5X Sigma PBS, pH 7,4 для нейтралізації колонки, а тоді урівнювали у PBS (pH 7,4). Два мл фракції збирали протягом повного хроматографічного елювання та відстежували поглинання при 280 та 215нм; пропущені та промиті множини також зберігали та аналізували. Фракції 5X PBS та піку елювання кислотою аналізували на цільовий білок шляхом SDS-PAGE виявлення сріблом та Вестерн-блотуванням з первинним антитілом анти-ЕЕ та вторинним антитілом анти миші-HRP сполучення. Фракції елювання кислотою поєднували та концентрували від 38мл до 0,8мл, використовуючи обертотний концентратор з обмеженою молекулярною масою 5000Да мембраною (Millipore, Bedford, MA) відповідно інструкціям виробника.

Для відокремлення zcytor17lig-CEE від агрегованого матеріалу та будь-яких інших забруднювальних білків, поєднані концентровані фракції піддавали ексклюзійній хроматографії за розміром на колонці 1,6х60см (120мл) Superdex 75 (Pharmacia, Piscataway, NJ), що урівнювали та завантажували у PBS при швидкості потоку 1,0мл/хвилини, використовуючи BioCad Sprint. Три мл фракції збирали протягом повної хроматографії та відстежували поглинання при 280 та 215нм. Пікові фракції характеризували шляхом SDS-PAGE-виявлення сріблом і поєднували тільки найчистіші фракції. Цей матеріал репрезентував очищений білок zcytor17lig-CEE.

На Вестерн-блотованих, виявлюваних Кумассі Блакитним та сріблом гелях SDS-PAGE, zcytor17lig-CEE був одною головною смугою. Концентрацію білку очищеного матеріалу визначали аналізом BCA (Pierce, Rockford, IL) та білок аліквотували та зберігали при -80°C згідно зі стандартними процедурами.

Для отримання PorosA50 анти-ЕЕ шар Poros A50 об'ємом 65мл (PE Biosystems) промивали 100мл води, а тоді 0,1М триетаноламіном, pH 8,2 (TEA, ICN, Aurora, Ohio), 1М натрій сульфатом, pH 8,8, що містить 0,02% натрій азиду, використовуючи фільтр-елемент з вакуумною колбою. Розчин ЕЕ моноклонального антитіла при концентрації 2мг/мл в об'ємі 300мл, змішували з промитою смолою в об'ємі 250мл.

Після інкубування протягом ночі при кімнатній температурі, неприєднане антитіло видаляли промивкою смоли 5 об'ємами 200мМ TEA, 1М натрій сульфату, pH 8,8, що містить 0,02% натрій азиду, як описано вище. Смолу ресуспендували у 2 об'ємах TEA, 1М натрій сульфату, pH 8,8, що містить 0,02% натрій азиду та переносили у підходящий контейнер. Три мл 25мг/мл (68мМ) дисукцинімідилсу-

берату (у ДМСО від Pierce, Rockford, IL) додавали та розчин інкубували протягом 3 годин при кімнатній температурі. Неспецифічні сайти на смолі тоді блокували інкубуванням протягом 10 хвилин при кімнатній температурі 5 об'ємами 20мМ етаноламіну (Sigma, St. Louis, MO) у 200мМ TEA, pH 8,8, використовуючи фільтр-елемент з вакуумною колбою. Смолу промивали PBS, pH 7,4, а потім 0,1М Гліцином, pH 3, а тоді нейтралізували 10X PBS. Після промивки дистильованою водою, кінцеву сполучену з анти-ЕЕ Poros-A 50 смолу зберігали при 4°C у 20% етанолі.

#### Приклад 36

N-термінальне секвенсування zcytor17lig людини та миші

A. N-термінальне секвенсування zcytor17lig людини

Стандартне автоматизоване N-термінальне секвенсування поліпептиду (Edman розкладання) провадили, використовуючи реагенти від Applied Biosystems. Аналіз N-термінальної послідовності провадили на моделі 494 Protein Sequencer System (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Аналіз даних провадили на моделі 610A Data Analysis System for Protein Sequencing, версія 2. 1a (Applied Biosystems).

Очищений зразок zcytor17lig людини-CEE (Приклад 35) був доставленим.

Зразок завантажували на отриманий фільтр зі скляного волокна для п-термінального секвенсування. Фільтр зі скляного волокна отримували його предікльованням з Biobrene™.

Аналіз N-термінальної послідовності секретованого поліпептиду zcytor17lig людини не підтвердив передбачуваного сайту розщеплення сигнальної послідовності, але мав результатом розвинений початок на залишку 27 (Leu) у послідовності попереднику SEQ ID NO: 2 zcytor17lig людини.

B. N-термінальне секвенсування zcytor17lig миші

Стандартне автоматизоване N-термінальне секвенсування поліпептиду (Edman розкладання) провадили, використовуючи реагенти від Applied Biosystems. Аналіз N-термінальної послідовності провадили на моделі 494 Protein Sequencer System (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Аналіз даних провадили на моделі 610A Data Analysis System for Protein Sequencing, версія 2. 1a (Applied Biosystems).

Очищений zcytor17lig миші-CEE зразок було доставлено захваченим на кульках з білком G сффароза/анти-ЕЕ (Приклад 35). Кульки розміщали у відновленому буфері зразку SDS PAGE та на киплячій водяній бані перед прогоном на SDS PAGE, використовуючи систему Novex SDS PAGE (4-12% Біс-Трис MESNuPAGE; Invitrogen) за інструкціями виробника. Гель електропереносили до мембрани Novex PVDF (Invitrogen) та забарвлювали Кумассі блакитним (Sigma, St. Louis, MO), використовуючи стандартні способи. Відповідне анти-ЕЕ Вестерн-блотування провадили для ідентифікування смуги zcytor17lig для N-термінального секвенсування білку. Застосовуване анти-ЕЕ IgG HRP миші сполучене антитілом, отримували самі.

Аналіз N-термінальної послідовності секретованого

ваного поліпептид *zcutor17lig* миші підтвердив передбачуваний сайт розщеплення сигнальної послідовності, що призводить до розвиненого початку на 31 (Ala) з посиланням на послідовності попереднику *zcutor17lig* миші SEQ ID NO: 11 та SEQ ID NO:91.

#### Приклад 37

Дослідження приєднання клітин COS

Дослідження приєднання застосовували для тестування приєднання *zcutor17lig* до рецепторів, що містять рецептор *zcutor17*, як-то рецептор *zcutor17* або гетеродимери та тримери рецептору, що містять рецептор *zcutor17* (наприклад, *zcutor17/OSMR*, *zcutor17/WSX-1*, або *zcutor17/OSMR/WSX-1*, або інші субелементи класу I рецепторів цитокіну) Плазмідну ДНК рецептору *zcutor17* трансфектували у клітини COS та трансфектовані клітини COS застосовували для оцінки приєднання *zcutor17lig* до рецепторів, що містять рецептор *zcutor17*, як описано нижче.

#### А. Трансфекції клітин COS

Трансфекцію клітин COS провадили таким чином: Змішували 800 нг плазмідної рецептору ДНК у таких комбінаціях: *pZp7pX/zcutor17* поодинці; *pZp7Z/WSX-1* поодинці; *pZp7NX/OSMR* поодинці; *pZp7pX/zcutor17+pZp7NX/OSMR*; *pZp7pX/zcutor17+pZp7Z/WSX-1*; *pZp7NX/OSMR+pZp7Z/WSX-1*; *pZp7pX/zcutor17+pZp7NX/OSMR+pZp7Z/WSX-1*) та 4мкл ліпофектаміну у 80мкл вільного від сироватки DMEM-середовища (55мг натрій пірувату, 146мг L-глутаміну, 5мг трансферину, 2,5мг інсуліну, 1мг селену та 5мг фетюїну у 500мл DMEM), інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин та тоді додавали 320мкл вільного від сироватки DMEM-середовища.

Додавали ці 400мкл суміш на 2x10<sup>5</sup> клітин COS/комірку, засіяних на 12-комірковий планшет культивування тканин (покритий фібронектином), та інкубували протягом 5 годин при 37°C. Додавали 500мкл 20% FBS DMEM-середовища (100мл FBS, 55мг натрій пірувату та 146мг L-глутаміну у 500мл DMEM) та інкубували протягом ночі.

#### В. Дослідження приєднання

Дослідження приєднання провадили таким чином: середовище змивали з клітин PBS+0,1% BCA, а тоді клітини блокували протягом 60 хвилин тим же розчином. Клітини тоді інкубували протягом 1 години у PBS+0,1% BCA з 1,0мкг/мл очищеного білку *zcutor17lig*CEE. Клітини тоді промивали PBS+0,1% BCA та інкубували ще годину з 1:1000 розбавленим мишачим анти-GluGlu антитілом. Знов клітини промивали PBS+0,1% BCA, тоді інкубували протягом 1 години з 1:200 розбавленим козячим анти-миші-HRP сполученим антитілом.

Позитивне приєднання визначали флуоресцентним тирамідним реагентом, розбавленим 1:50 у буфері для розбавлення (комплект NEN) та інкубували протягом 4-6 хвилин і промивали PBS+0,1% BCA. Клітини фіксували протягом 15 хвилин 1,8% формальдегідом у PBS, тоді промивали PBS+0,1% BCA. Клітини консервували середовищем Vectashield Mounting (Vector Labs Burlingame, CA) розбавленим 1:5 у PBS. Клітини візуалізували, використовуючи фільтр FITC на флуоресцентному мікроскопі.

Позитивне приєднання визначали для клітин, трансфектованих *zcutor17* тільки, *zcutor17+OSMR*бета, *zcutor17+WSX-1* та *zcutor17+OSMR*бета+*WSX-1*. Жодного приєднання не визначали для клітин, трансфектованих *WSX-1+OSMR*бета, *OSMR*бета тільки, або *WSX-1* тільки.

#### Приклад 38

*Zcutor17lig* миші активує рецептор *zcutor17/OSMR*бета миші у аналізі з люциферазою. А. Клонування *zcutor17* миші та *OSMR*бета миші повної довжини для експресії

Бібліотеку кДНК яєчок миші скринінгували стосовно клону мишачого *zcutor17* повної довжини. Бібліотеку засівали при 65500 клітин/планшет на 24 планшетах LB+Amp.

Фільтр-ліфти отримували, використовуючи HybondN [Amersham-Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ], на загал приблизно 1,6 мільйон колоній. Фільтри маркували гарячими голками для орієнтації та тоді денатурували протягом 6 хвилин у 0,5M NaOH та 1,5M Tris-HCl, pH 7,2. Фільтри тоді нейтралізували у 1,5M NaCl та 0,5M Tris-HCl, pH 7,2 протягом 6 хвилин. ДНК додавали до фільтрів, використовуючи УФ-креслінкер (Stratalinker (3), Stratagene, La Jolla, CA) при 1200Дж. Фільтри тоді сушили протягом ночі при кімнатній температурі.

Наступної доби фільтри попередньо промивали при 65°C у попередньому промивальному буфері, що складався з 0,25X SSC, 0,25% SDS та 1мМ EDTA. Обривки клітин видаляли вручну, використовуючи Kimwipes® (Kimberly-Clark) та розчин заміняли 3 рази протягом 1 години. Фільтри сушили на повітрі та зберігали при кімнатній температурі до потреби. Фільтри було тоді попередньо гібридизовано протягом приблизно 3 годин при 63°C у 20мл розчину ExpressHyb™ Hybridization Solution (Clontech, Palo Alto, CA).

Зонд В (Приклад 31) створювали шляхом PCR з темплату *zcutor17* людини, використовуючи олігонуклеотидні праймери ZC27, 895 (SEQ ID NO: 20) та ZC28, 917 (SEQ ID NO: 83), та радіоактивно мітили 32p, використовуючи комерційно доступний комплект (Megaprime DNA Labeling System; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) відповідно інструкціям виробника. Зонд очищали, використовуючи напірну колонку Stratagene (NucTrap(R); Stratagene, La Jolla, CA). Зонд денатурували при 100°C протягом 15 хвилин та додавали до ExpressHyb™. Фільтри гібридизували у 15мл гібридизаційного розчину, що містив 1,6x10<sup>6</sup> імпульсів/мл зонду при 63°C протягом ночі.

Фільтри промивали при 55°C у 2X SSC, 0,1% SDS та 1мМ EDTA та експонували на рентгеноплівці при -80°C протягом 41/2 діб. 13 позитивів збирали з планшетів, як пробки та розміщали у 1мл LB+amp у тубах 1,7мл. Туби тримали при 4°C протягом ночі. Ці 13 позитивів піддавали дво наступним циклам очистки. Терціарні планшети вирощували при 37°C після збирання фільтр-ліфтів та одиничні колонії збирали та піддавали секвенсуванню. Три з них визначали як такі, що містять послідовність ортологу *zcutor17* мишей.

На додаток, PCR-продукт створювали, використовуючи кДНК CTLL-2 як темплат та олігонуклеотиди ZC38, 239 (SEQ ID NO: 108) та ZC38, 245

(SEQ ID NO: 109), як праймери. CTLL-2 є лінією клітин цитотоксичних Т-лімфоцитів миші (ATCC №TIB-214). Цю PCR-реакцію провадили таким чином: 1 цикл при 95°C протягом 1 хвилини, 30 циклів при 95°C протягом 15с, 68°C протягом 3 хвилин, тоді 68°C протягом 10 хвилин; вимочування при 4°C. У PCR-реакції застосовували приблизно 0,5нг кДНК, 20 пмолей кожного олігонуклеотиду та 1мкл полімеразної суміші Advantage II (ClonTech). Приблизно 6% PCR-продукту застосовували, як темплат у новій PCR-реакції, як вище, за винятком олігонуклеотидів ZC38, 239 (SEQ ID NO: 108) та ZC38, 238 (SEQ ID NO: 110). Цю PCR-реакцію провадили таким чином: 30 циклів при 94°C протягом 45с, 65°C протягом 45с, 72°C протягом 1 хвилини, тоді 72°C протягом 7 хвилин; вимочування при 10°C. Більшу частину PCR-реакції завантажували на 1,0% агаровий гель та вирізали домінуючу смугу приблизно при 360 пб, елювали фрагмент ДНК та провадили ДНК секвенсування.

Послідовність мишачого полінуклеотиду zcytor17 показано у SEQ ID NO: 111, а відповідну амінокислотну послідовність показано у SEQ ID NO: 112. На додаток, усічену форму розчинного мишачого полінуклеотиду zcytor17 показано у SEQ ID NO: 113, а відповідну амінокислотну послідовність показано у SEQ ID NO: 114.

Для отримання кДНК OSMRбета миші повної довжини, 5' та 3'PCR-продукти виділяли та з'єднували, використовуючи внутрішній сайт BamHI. Праймери PCR створювали, використовуючи нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 119, вони включали рестрикційні сайти EcoRI та XbaI для клонування. Геномну послідовність нуклеїнової кислоти OSMRбета миші показано у SEQ ID NO: 119, де кодувальна послідовність охоплює залишки 780-3692, що кодують поліпептид миші OSMRбета з 970 амінокислот, як показано у SEQ ID NO: 120. Вироджену послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид SEQ ID NO: 120 показано у SEQ ID NO: 121.

5'PCR-продукт створювали, використовуючи власну бібліотеку кДНК 3T3-L1 (диференційовані адипоцити миші) як темплат та олігонуклеотиди ZC41, 764 (SEQ ID NO: 115) та ZC41, 598 (SEQ ID NO: 116), як праймери. Цю 5'PCR-реакцію провадили таким чином: 30 циклів при 95°C протягом 45с, 55°C протягом 45с, 72°C протягом 1 хвилини 30с, тоді 72°C протягом 7 хвилин; вимочування при 4°C. У PCR-реакції застосовували приблизно 3мкг плазмід, отриманої з бібліотеки кДНК, 20 пмолей кожного олігонуклеотиду та 5 одиниць ДНК-полімерази Pwo (Roche). Приблизно 90% 5'PCR-продукту розщеплювали EcoRI та BamHI та очищали на 1,0% агаровому гелі. Смугу приблизно з 1446 пб вирізали та застосовували для лігування (дивись нижче).

3'PCR-продукт створювали, використовуючи власну бібліотеку кДНК мишачої плаценти як темплат та олігонуклеотиди ZC41, 948 (SEQ ID NO: 117) та ZC41, 766 (SEQ ID NO: 118), як праймери. Цю 3'PCR-реакцію провадили таким чином: 30 циклів при 95°C протягом 45с, 55°C протягом 45с, 72°C протягом 1 хвилини 30с, тоді 72°C протягом 7 хвилин; вимочування при 4°C. У PCR-реакції за-

стосовували приблизно 3 мкг плазмід, отриманої від бібліотеки кДНК, 20пмолей кожного олігонуклеотиду та 5 одиниць ДНК-полімерази Pwo (Roche). Приблизно 90% 3'PCR-продукту розщеплювали BamHI та XbaI та очищали на 1,0% агаровому гелі. Смугу приблизно з 2200 пб вирізали та застосовували для лігування разом з 5'PCR- продуктом (описано вище) з вектором експресії pZP-5Z, розщепленим EcoRI та XbaI. Трьох-частинне лігування провадили з вищезазначеним фрагментом 5'EcoRI - BamHI, фрагментом 3'BamHI - XbaI та вектором експресії pZP-5Z розщепленим EcoRI та XbaI. Цю створену плазмиду pZP-5Z, що містить повної довжини кДНК для миші OSMRбета (нуклеотиди 780 до 3692 SEQ ID NO: 119), позначено як pZP-5Z/OSMRбета. кДНК OSMRбета миші повної довжини у pZP5Z/OSMRбета має дві амінокислотні вставки від SEQ ID NO: 120. Існує дуплікація амінокислоти -гліцин у позиції 370 та дуплікація амінокислоти глутамінова кислота у позиції 526. Плазмід pZP-5Z є вектором експресії ссавців, що містить касету експресії, що має промотор CMV, складні рестрикційні сайти для вставки кодувальної послідовності та термінатор гормону росту людини. Плазмід також має початок реплікації E. coli, елемент придатного для селекції маркеру експресії ссавців, що має промотор SV40, енхансер та початок реплікації, ген резистентності до зеоцину та термінатор SV40.

Утворені трансформанти секвенсували для підтвердження послідовності кДНК OSMRбета миші.

В. Створення ліній клітин BaF3/KZ134/zcytor17m, BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRбетам, BHK/KZ134/zcytor17ms та BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRбетам

Стабільні лінії клітин BaF3/KZ134 та BHK/KZ134 (Приклад 20) було трансфектовано експресійною плазмідною, що кодує повної довжини миші zcytor17, pZP-7P/zcytor17m (Приклад 38A), для утворення клітин BaF3/KZ134/zcytor17m та BHK/KZ134/zcytor17m, відповідно. Експресійну плазмиду миші OSMRбета, pZP-5Z/OSMRбетам (Приклад 38A), тоді трансфектували у ці клітини для утворення ліній клітин BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRбетам та BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRбетам, відповідно. Способи описано у прикладі 4 за винятком того, що BaG/KZ134/zcytor17m та BHK/KZ134/zcytor17m селектували, на додаток до Geneticin, 2мкг/мл пуроміцину, в той час як BaO/KZ134/zcytor17m/OSMRбетам та BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRбетам селектували, на додаток до Geneticin, 2мкг/мл пуроміцину та 200мкг/мл зеоцину.

Клони розбавляли, засівали та селектували, використовуючи стандартні способи.

Клони скринінгували дослідженням з люциферазою (дивись Приклад 20, вище), використовуючи стандартизоване середовище zcytor17lig миші або очищений білок zcytor17lig миші (Приклад 35), як індуктор. Було вибрано клони з найвищою люциферазною реакцією (з люциферазою STAT) та найнижчим фоном. Було вибрано стабільні лінії трансфектованих клітин.

С. Zcytor17lig миші активує рецептор zcytor17 миші у дослідження з люциферазою BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRбетам чи BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRбетам

Лінії клітин засівали для дослідження з люциферазою, як описано у прикладі 20 вище. STAT-активацію клітин BaF3/KZ134/zcytor17m, BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRбетам, BHK/KZ134/zcytor17m, або BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRбетам оцінювали, використовуючи (1) стандартизоване середовище від клітин BHK570, трансфектованих zcytor17lig людини (Приклад 7), (2) стандартизоване середовище від клітин BHK570, трансфектованих zcytor17lig миші (Приклад 18), (3) очищений zcytor17lig миші та людини (Приклад 35) та (4) вільне від mL-3 середовище для виміру середовища тільки контрольної реакції. Дослідження з люциферазою провадили, як описано у прикладі 20.

Результати цього дослідження підтверджують STAT-репортерну реакцію клітин BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMRбетам та BHK/KZ134/zcytor17m/OSMRбетам з клітинами zcytor17lig миші у порівнянні з клітинами BaF3/KZ134/zcytor17m, BHK/KZ134/zcytor17m або нетрансфектованими BaF3/KZ134 чи BHK/KZ134 контрольними клітинами та показують, що реакція опосередкована рецепторами zcytor17/OSMRбета миші. Результати також показують, що zcytor17lig людини не активує STAT-репортерне дослідження через рецепторний комплекс миші.

#### Приклад 39

Приєднання zcytor17lig людини до zcytor17 та zcytor17/OSMRбета при цитометрії у потоці

Біотинілування zcytor17L людини робили таким чином: 100мкл zcytor17 при 5,26мг/мл комбінували з 30мкл 10мг/мл EZ-linkSulfo-NHS-LC-біотину (Pierce, Rockford, IL) розчиненого у двічі дистильо-

ваній воді. Цей розчин інкубували на рокері протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Після біотинілування розчин діалізували у PBS, використовуючи касету для діалізу Slide-A-Lyzer.

Для тестування властивостей zcytor17lig людини стосовно приєднання до різних комбінацій рецептору клітини BHK та BAF3 було трансфектовано експресійними плазмідами, використовуючи стандартні способи, добре відомі у рівні техніки. Ці плазміди трансфектували у ці лінії клітин у таких комбінаціях: zcytor17 поодиночі, OSMРбета поодиночі та zcytor17 та OSMРбета разом. Трансфекцію провадили, як вищезазначено.

Нетрансфектовані клітини BHK та BAF3 застосовували, як контроль. Клітини виявляли шляхом FACS таким чином: клітини 2E5 виявлялися: 2,0мкг/мл, 100нг/мл, 10нг/мл, 1,0нг/мл, 100пг/мл, 10пг/мл, 1,0пг/мл біотинілованого zcytor17L або залишалися невиявленими протягом 30 хвилин на льоді у буфері FACS (PBS+2% BCA+2% NHS (Gemini)+2% NGS).

Клітини промивали 1,5 рази та тоді виявляли SA-PE (Jackson Immuno Laboratories) при 1:250 протягом 30 хвилин на льоді. Клітини тоді промивали 1,5 рази буфером FACS та ресуспендували у буфері FACS та аналізували шляхом FACS на BD FACSCaliber, використовуючи програму CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Клітини BHK та BAF3 показували, що zcytor17lig приєднувався до zcytor17 поодиночі та у комбінації з OSMРбета, приєднання до zcytor17/OSMRбета гетеродимеру було трохи сильнішим. Жодного приєднання не спостерігали у будь-якій з ліній клітин, що експресували тільки поодиночі. Приєднання zcytor17lig було залежним від концентрації. Середні величини інтенсивності флуоресценції (MFI) для приєднання BHK показано нижче у таблиці 15.

Таблиця 15

zcytor17мкг/мл	2,0	0,10	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001	0,0
BHKC17+OSMRбета	3780	2126	328	53	17	15	14	13
BHK C17	3032	1600	244	39	16	15	14	15
OSMR-бета	13	X	X	X	X	X	X	0
BHK-WT	15	14	13	X	X	X	X	13
zcytor17мкг/мл	10,0	3,33	1,11	0,37	0,12	0,04	0,00	
BAF3-C17+OSMRбета	531	598	489	441	364	247	7	
BAF3-OSMRбета	6	5	5	5	5	5	11	
BAF3-WT	13	13	12	12	12	12	13	
zcytor17нг/мл	100,0		10,0		1,0		0,0	
BAF3-C17	347		72		17		7	

#### Приклад 40

Аналіз експресії клітинами людини множини генів zcytor17lig

РНК відділяли від оброблених zcytor17lig людини клітин A549, оброблених zcytor17lig клітин SK-LU-1 та необроблених контрольних клітин, використовуючи комплект RNeasy Midi (Qiagen, Valencia, CA) за інструкціями виробника. Профілювання експресії гена zcytor17lig обробленими клітинами та відповідними контрольними клітина-

ми провадили, використовуючи множину експресійних кДНК GEArray Q серії (SuperArray Inc., Bethesda, MD). Серії Q множин експресійних кДНК містять до 96 фрагментів кДНК, асоційованих з конкретним біологічним провідним шляхом, або гени з подібними функціональними або структурними особливостями. Порівняння оброблених та контрольних клітин дозволяє визначення підвищуючої та понижуючої регуляції конкретних генів. Обробка, мічення, гібридизація та визначення зон-

ду здійснювали за інструкціями виробника. Хемілюмінесцентний сигнал визначали та дані отримували на автоматизованому робочому місці LumiImager (Roche, Indianapolis, IN). Утворені дані аналізували, використовуючи аналізатор ImageQuant 5,2 (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ) та GEArray програму 1,2 (SuperArray Inc., Bethesda, MD).

Аналіз результатів від множин інтерлейкінів та рецепторів людини Q-серії HS-014N показав після нормалізації збільшення приблизно у 4,7 раз сигналу IL13RA2 в оброблених zcytor17lig людини SK-LU-1 клітинах та збільшення приблизно у 2,2 рази сигналу IL13RA2 в оброблених zcytor17lig людини A549 клітинах.

Ці результати вказували, що zcytor17lig значно регулює з підвищенням IL13RA2 у клітинах SK-LU-1 та A549. Обидві ці є встановлені лінії клітин є похідними від карциноми легень людини [Blobel et al., *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*, 1984; 45 (4): 407-29]. Більш конкретно, A549 характеризуються, як клітини легеневої епітеліальної лінії клітин людини [Lin, et al., *J. Pharm Pharmacol.*, 2002 Sep; 54 (9): 1271-8; Martinez et al., *Toxicol Sci*, 2002 Oct; 69 (2): 409-23].

Інтерлейкін-13 (IL13), цитокін, секретований активованими Т-лімфоцитами, продемонстровано як обов'язковий та достатній для експресії алергічної астми та для застосування у експериментальній моделі астми, яка включає гіперчутливість дихальних шляхів, збільшення чисельності еозинофілів та надпродукування слизу [Wills-Kap et al., *Science*, 1998; 282: 2258-2261]. Показано, що селективна нейтралізація IL13 полегшуватиме фенотип астми [Grunig et al., *Science*, 1998; 282: 2261-2263]. Також повідомлено, що IL13 є залученим у регуляцію з підвищенням експресії муцинового гена MUC8 у епітелії назального поліпу людини та культивованій назальній епітелії [Kimm et al., *Acta Otolaryngol.*, 2002; Sep; 122 (6): 638-643; Seong et al., *Acta Otolaryngol.*, 2002; Jun; 122 (4): 401-407]. MUC8, головний муциновий глікоболок дихальних шляхів, є залученим як граючий роль у патогенезі гіперсекреції слизу у хронічному синуситі [Seong et al., *Acta Otolaryngol.*, 2002; Jun; 122 (4): 401-407].

Функціонально, IL13 сигналізує через рецепторний комплекс, що складається з ланцюга альфа-1 рецептору інтерлейкіну-13 (IL13RA1) та рецептору альфа IL-4 (IL4RA) [Daines та Hershey, *J Biol Chem.*, 2002; 22 (12): 10387-10393]. Також показано, що рецептор альфа-2інтерлейкіну-13 (IL13RA2) приєднується до IL13 з високою афінністю, але окремо [Daines та Hershey, *J Biol Chem.*, 2002; 22 (12): 10387-10393].

Цьому рецептору не вистачає, однак, цитоплазматичного домену, обов'язкового для сигналізування, а тому його вважали пастковим рецептором. Показано, що IL13RA2 є домінуючою внутрішньоклітинною молекулою, що може бути швидко мобілізованою з внутрішньоклітинних резервів та експресованою поверхнею після обробки клітин інтерфероном (IFN)-гама.

Експресія поверхнею IL13RA2 після обробки IFN-гама не включає синтез білку та призводить до послабленого сигналізування IL13 [Daines та

Hershey, *J Biol Chem.*, 2002; 22 (12): 10387-10393].

Результати аналізу експресії клітинами людини множини генів zcytor17lig вказували дія zcytor17lig є новим стосовно IFN-гама тим, що обробка zcytor17lig від легеневого епітелію похідних ліній клітин призводить до значного збільшення експресії гена IL13RA2. Відтак, обробка zcytor17lig може бути корисною у випадках, де потрібна довготермінова регуляція з підвищенням IL13RA2 експресії та регуляція зниженням IL13, як-то при астмі, гіперактивності дихальних шляхів (AHR) та муциновій регуляції, включаючи хронічний синусит.

#### Приклад 41

##### Zcytor17lig мишей трансгенних мишей

Для оцінки *in vivo* дії зверхекспресії zcytor17lig різні ініціатори трансгенних мишей, що експресували мишачу форму гена, створювали за допомогою двох відмінних промоторів: лімфоцит-специфічного промотору E $\mu$ /lck та повсюдного промотору, EFl $\alpha$  (Приклад 22). Рівні білку сироватки були приблизно 20-300нг/мл. Промотор E $\mu$ /lck створювали миші з вищими рівнями білку сироватки ніж.

Трансгенні миші EF1a-zcytor17lig виявляли фенотип шкіри у віці приблизно 4-8 тижнів вік. Хутро трансгенних мишей ставало гофрованим, з ясною пілоерекцією та волосся втрачало від помірного до суворого, звичайно на їх спинах, боках тулубу та навкруги їх очей. Цей фенотип було також знайдено у мишей з виявлюваними рівнями білку zcytor17lig у їх сироватці. Серед ініціаторів 100% мишей, що експресували EtL/lck-driven ген та 50% трансгенних мишей у EFla-zcytor17lig було відмічено, що добре корелює з відносними рівнями zcytor17lig, що визначали у їх сироватці. Трансгенну шкіру виявлено як сверблячу, як засвідчено за поведінкою мишей, що іноді було достатньо для обдирання та ураження шкіри, яка звичайно ставала інфікованою (принаймні *Staphylococcus aureus*). Мишей спочатку ідентифікували з металевими придатками на вухах, але у більшості випадків, придатки на вухах швидко видаляли самі миші.

Це часто призводило до суворого пошкодження зовнішнього вуха. Ці поранені вуха часто не загоювалися належно, що призводило до появи гнійників та корок і просочування, поширюючи зону поранення, що виявлено у багатьох тварини, позаду їх вух та між ними. Деякі з трансгенних мишей також виявляли струпи на їх плечах та шиї. Ураження шкіри спостерігали у підкласі тварини, що звичайно виявляли зони шкіри, де втрата волосся була вже видимою та часто загострювалися поведінкою мишей.

Кількісну RT-PCR застосовували для визначення транскриптів РНК zcytor17lig у трансгенних (але не нетрансгенних) зразках шкіри, з E $\mu$ /lck-трансгенною шкірою, що експресує більше РНК zcytor17lig, ніж шкіра EFla-zcytor17lig-трансгенних мишей. Гени, що кодують субелементи рецептору zcytor17, zcytor17 та OSM-R6era, експресувалися у шкірі нетрансгенних та zcytor17lig-трансгенних мишей.

Дослідження лімфоїдних тканин від підкласу E $\mu$ /lck-трансгенних ініціаторів цитоме-трією у по-

тоці виявило значне збільшення у пропорції активованих Т-клітин у селезінці та лімфатичних вузлах цих мишей. Дві з чотирьох мишей, що аналізували, мали суворо збільшені лімфатичні вузли шийки матки, можливо внаслідок присутності уражень на їх шиї. Спостерігали помірне збільшення маси селезінки та слабке збільшення циркуляції моноцитів та нейтрофілів у крові трансгенних мишей. Не було збільшення у різних тестованих цитокінів, а також зміни рівнів циркуляції амілоїду А у сироватці у цих мишей. Дія на імунні клітини у трансгенних мишах може бути безпосереднім або непрямим результатом *zcutor17lig*, або є вторинними ефектами уражень шкіри.

Гістопатологію провадили на багатьох тканинах, включаючи печінку, тимус, селезінку, нирку та яєчка, та не виявлено значної аномальності у цих органах. Аналіз трансгенної шкіри, однак, не виявив ряду змін, які варіювали дуже залежно від джерела та локації шкіри (наприклад, нормальної, безволосої, або ураженої). У багатьох випадках, вуха трансгенних мишей мали ущільнений епідерміс у порівнянні з нетрансгенним контролем (наприклад, приблизно 4 шари проти 2 шарів) та лежачі в основі нижчерозташовані тканини мали вміст від низького до помірного запальних клітин, які були спочатку мононуклеарними з випадковими нейтрофілами.

Епідерміс поверх живота виявлявся мультифакально слабо товщим у трансгенних, але не було ясного збільшення запальних клітин у лежачій в основі шкірі або субкутисі. У безволосих частинах шкіри від цих мишей, були розширені фолікули волосся, що містили деякі обривки, але не стебла волосся (наприклад, волосся випадало поза корінцями). У уражених зонах було суворе потовщення епідермісу (акантоз), збільшення кератину на поверхні шкіри (гіперкератоз), розкидані виразки змінного розміру та значне число запальних клітин у дермісі (головним чином нейтрофілів, зі змінним числом макрофагів та лімфоцитів). Дерміс також містив ряд тучних клітин, обмежених ураження. Деякі зі стовбурів волосся в уражених зонах трансгенної шкіри були у активній фазі (анагенній), за контрастом з багатьма стовбурами волосся у нормальних зонах, які були у фазі від закрученої (катагенної) до інтактивної (телогенної).

Фенотип трансгенних мишей *zcutor17lig* сильно походить на фенотип atopічного дерматиту (AD) у пацієнтів та мишачих моделей AD. AD є звичайною хронічною запальною хворобою, що характеризується гіперактивованими цитокінами підкласу 2 хелперних Т-клітин (Th2). *Zcutor17lig* краще експресується Th2, ніж Th1-клітинами, що теж підтверджує це порівняння. Хоча точна етіологія AD є невідомою, залучено багато факторів, включаючи гіперактивні Th2-імунні реакції, автоімунітет, інфекції, алергени та генетичну схильність. Ключові особливості хвороби включали ксероз (сухість шкіри), свербіж (свербіж шкіри), кон'юнктивіт, запальні ураження шкіри, інфекція *Staphylococcus aureus*, підвищена еозинофілія крові, підвищення сироваточного IgE та IgG1 та хронічний дерматит з інфільтруванням Т-клітин, тучних клітин, макрофагів та еозинофілів. Колонізація або інфекція *S. aureus* розпізнана при загостренні AD та постійній

хронічності цієї хвороби шкіри.

AD часто знаходять у пацієнтів з астмою та алергічним ринітом і він часто є початковим виявленням алергічної хвороби. Приблизно 20% популяції у західних країнах страждають від цієї алергічної хвороби та випадки AD у виявлених країнах зростає з невідомих причин. AD звичайно починається у дітей та може часто утримуватися через юнацтво до дорослості. Сучасне лікування AD включає кортикостероїди місцево, циклоспорин А перорально, некортикостероїдні імуносупресанти, як-то такролімус (FK506 у формі мазі) та інтерферон-гамма. Незважаючи на різні лікування AD, багато пацієнтів не поліпшували симптомів, або вони мали несприятливі реакції до лікування, потребуючи пошуку інших, більш ефективних терапевтичних засобів.

Епітеліальні клітини, які експресують гетодимерний рецептор *zcutor17lig* (*zcutor17* та OSM-R-бета), локалізовано на ділянках (наприклад, шкірі, травному каналі, легенях, тощо.) входження алергену у тіло, і вони тісно взаємодіють з дендритними клітинами (професійне представлення антигену клітинам) на місці. Дендритні клітини грають важливу роль у патогенезі алергічної хвороби та *zcutor17lig* може взаємодіяти зі своїм рецептором на епітеліальних клітинах у шкірі та легенях та впливали на імунні реакції у цих органах.

*Zcutor17lig* та його рецептори можуть тому сприяти патогенезу алергічної хвороби, як-то AD та астма. Крім того, фенотип *zcutor17lig*-трансгенної миші підказує, що цей ліганд може грати роль у зціленні поранення, оскільки миші здаються нездатними для відновлення пошкодження на їх вухах та часто переносять довготривалі ураження на своїх спинах та боках. Антагоніст *zcutor17lig* міг би тому репрезентувати життєздатні терапевтичні засоби для цих та інших показань.

#### Приклад 42

Дослідження з люциферазою на лініях епітеліальних клітин людини, трансформованих тимчасово інфекцією з аденовірусним репортерним геном STAT/SRE

Різні лінії трансформованих епітеліальних клітин людини (дивись Таблицю 16 нижче) засівали у 96-коміркові планшети з плоским дном при 10000 клітин/комірку у звичайних середовищах для росту, які визначено для кожного типу клітин. Наступної доби клітини були інфіковані аденовірусним репортерним констрактом, KZ136, при множинності інфекції 5000. Репортер KZ136 містив елементи STAT на додаток до елементу сироваточної реакції.

Загальний об'єм був 100мкл/комірку, використовували DMEM, доповнений 2мМ L-глутаміну (GibcoBRL), 1мМ натрій пірувату (GibcoBRL) та з добавкою 1x Інсулін-трансферин-селену (GibcoBRL) (що далі позначено, як позбавлене сироватки середовище). Клітини культивували протягом ночі.

Наступної доби середовище видаляли та заміщали 100мкл індукційного середовища. Індукційним середовищем був *zcutor17lig* людини, розбавлений у позбавленому сироватки середовищі при 100нг/мл, 50нг/мл, 25нг/мл, 12,5нг/мл, 6,25нг/мл, 3,125нг/мл та 1,56нг/мл. Позитивний контроль 20%

FBS застосовували для підтвердження дослідження та для забезпечення успішності інфекції аденовірусом. Клітини індукували протягом 5 годин, в цей час з середовища видаляли рідину. Клітини тоді промивали у 50мкл/комірку PBS та далі лізували у 30мкл/комірку IX буферу для лізису клітин (Promega). Через 10 хвилин інкубування при кімнатній температурі, 25мкл/комірку лізату переносили до непрозорих білих 96-коміркових планшетів. Планшети тоді зчитували на люмінометрі, використовуючи 5-секундне інтегрування з ін'єкцією 40мкл/комірку люциферазного субстрату (Promega).

Результати виявили здатність множини ліній епітеліальних клітин реагувати на zcytor17lig, як показано у таблиці 16 нижче.

Таблиця 16

Лінія клітин	Вид	Тканина	Морфологія	Хвороба	Разів індукції
A549	Людини	Легені	Епітеліальна	Карцинома	2х
Sk-Lu-1	Людини	Легені	Епітеліальна	Аденокарцинома	6х
WI-38	Людини	Легені ембріону	Фібробласт		Негатив
MRC-5	Людини		Фібробласт		Негатив
DU 145	Людини	Простата	Епітеліальна	Карцинома	10х
PZ-HPV-7	Людини	Простата	Епітеліальна	Трансформовано	5х
PC-3	Людини	Простата	Епітеліальна	HPV	Негатив
U2OS	Людини	Кістки	Епітеліальна	Аденокарцинома	15,5х
SaOS2	Людини	Кістки	Епітеліальна	Остеосаркома	22х
MG-63	Людини	Кістки	Епітеліальна	Остеосаркома	Негатив
143B	Людини	Кістки	Епітеліальна	Остеосаркома	3,5х
HOS	Людини	Кістки	Фібробласт та Епітеліальна	Остеосаркома	8х
TRBMeC	Людини	Кістки	Епітеліальна		x2
HT144	Людини	Васкулярна	Фібробласт		5х
C32	Людини	Кісткового мозку		Меланома	Негатив
Sk-Mel-2	Людини	Шкіра	Полігональна	Меланома	2,7х
WM-115	Людини	Шкіра	Епітеліальна	Меланома	2х
HCT-116	Людини	Шкіра	Епітеліальна	Меланома	Негатив
HT-29	Людини	Шкіра	Епітеліальна	Карцинома	Негатив
CaCo2	Людини	Ободова кишка	Епітеліальна	Карцинома	3х
HBL-100	Людини		Епітеліальна	Аденокарцинома	1,5х
ME-180	Людини	Ободова кишка	Епітеліальна		Негатив
HeLa299	Людини		Епітеліальна	Карцинома	Негатив
SK-N-SH	Людини	Ободова кишка	Епітеліальна	Аденокарцинома	Негатив
U138MG	Людини		Епітеліальна	Нейробластома	Негатив
HerG2	Людини	Молочна залоза	Епітеліальна	Гліобластома	Негатив
Змін, печінки	Людини		Епітеліальна	Карцинома	Негатив
Sk-Hep-1	Людини	Шийка	Епітеліальна		4х
Int407	Людини	Шийка	Епітеліальна	Аденокарцинома	Негатив
Int407	Людини	Мозок			Негатив
3a-Sub E		Мозок			
		Печінка			
		Печінка			
		Печінка			
		Кишечник			
		Плацента			

## Приклад 43

Продуктування цитокіну лініями епітеліальних клітин людини, культивованих зі zcytor17lig людини

Лінії епітеліальних клітин людини при її хворобах (A549, епітеліальна карцинома легенів людини; SkLu1, епітеліальна аденокарцинома легенів людини; DU145, карцинома епітелію простати людини; PZ-HPV-7, трансформована HPV епітелію простати людини; U2OS, епітеліальна остеосаркома кісток людини) скринінгували на продуктування цитокіну у реакції на zcytor17lig in vitro. Ці лінії клітин мали zcytor17 та OSMR-бета, ідентифіковані шляхом RT-PCR та реагуючі на zcytor17lig людини при аналізі з аденовірусним люцифе-разним репо-

терним констрактом, KZ136 (Приклад 42). Продуктування цитокіну цими лініями клітин визначали у реакції на zcytor17lig людини у серії з трьох експериментів.

А. Продуктування цитокіну лініями епітеліальних клітин людини, культивованих зі zcytor17lig людини, при її хворобах

Клітини засівали при густині  $4,5 \times 10^5$  клітин на комірку у 6-комірковому планшеті (Costar) та культивували у відповідному середовищі для росту. Клітини культивували з тест-реагентами; 100нг/мл zcytor17lig, 10нг/мл інтерферону гама (IFN-гама) (R & D Systems, Minneapolis, MN), 1мкг/мл фактору некрозу пухлин альфа (TNF-альфа) (R & D Systems, Minneapolis, MN), 1мкг/мл IL-1бета (R & D

175

84540

176

Systems, Minneapolis, MN) чи 100мкг/мл ліпополісахариду (LPS) (Sigma). Супернатанти збирали на 24 та 48 години та аналізували на цитокіни; GM-CSF (фактор стимуляції колоній гранулоцит-макрофагів), IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1 (білок-1 хемоатрактанту макрофагів) та TNF $\alpha$ . Комплекти від BioSource International (Camarillo, CA) застосову-

вали для виміру цитокінів у зразках. Дослідження зчитували на приладі Luminex-100 (Luminex, Austin, TX) та дані аналізували, використовуючи програму MasterPlex (MiraiBio, Alameda, CA). Продуктування цитокіну (пг/мл) для кожного зі зразків ліній клітин на 24-годину показано нижче у таблиці 17.

Таблиця 17

GM-CSF пг/мл					
	A549	SkLu1	DU145	U20	SPZ-HPV-7
zcytor17L	18,80	10,26	16,19	13,26	14,10
IFN- $\gamma$	16,19	13,36	11,56	16,26	11,81
IL-1b	104,60	126,44	76,77	338,25	27,32
TNF $\alpha$	106,67	33,20	58,50	107,09	33,79
LPS	17,64	10,62	11,81	25,47	18,34
Контроль	14,81	8,56	13,26	21,67	13,96
IL-1b пг/мл					
	A549	SkLu1	DU145	U20	SPZ-HPV-7
zcytor17L	26,90	30,17	28,77	29,07	28,00
IFN- $\gamma$	29,07	35,33	21,96	26,90	26,73
IL-1b	1332,88	1256,17	979,02	1107,35	998,60
TNF $\alpha$	31,11	33,28	35,33	31,24	25,66
LPS	33,28	28,77	29,07	31,11	31,24
Контроль	28,77	28,77	26,73	31,24	29,07
IL-6 пг/мл					
	A549	SkLu1	DU145	U20	SPZ-HPV-7
zcytor17L	20,09	26,89	193,05	19,37	17,30
IFN- $\gamma$	17,52	33,64	217,58	27,02	17,63
IL-1b	175,44	5920,19	2375,29	304,08	18,44
TNF $\alpha$	354,16	1002,51	1612,17	103,58	18,33
LPS	18,06	35,65	162,18	22,42	17,30
Контроль	17,63	27,80	71,23	19,32	17,19
IL-8 пг/мл					
	A549	SkLu1	DU145	U20	SPZ-HPV-7
zcytor17L	86,33	150,81	150,61	45,92	6,81
IFN- $\gamma$	24,07	72,82	163,31	81,78	1,35
IL-1b	1726,24	4083,12	4407,79	5308,83	124,17
TNF $\alpha$	3068,68	3811,75	2539,39	3324,02	69,65
LPS	20,28	167,13	230,39	115,08	7,95
Контроль	14,92	109,78	107,27	93,44	9,49
MCP-1 пг/мл					
	A549	SkLu1	DU145	U20	SPZ-HPV-7
zcytor17L	8,97	187,29	26,84	105,15	7,20
IFN- $\gamma$	7,30	267,99	17,05	88,68	7,71
IL-1b	8,11	8039,84	88,78	3723,81	4,70
TNF $\alpha$	8,50	7100,37	153,26	3826,80	2,80
LPS	9,40	185,83	22,65	61,62	5,61
Контроль	8,16	167,93	13,68	47,78	5,61
TNF пг/мл					
	A549	SkLu1	DU145	U20	SPZ-HPV-7
zcytor17L	16,23	17,52	16,67	15,80	17,09
IFN- $\gamma$	15,80	17,09	15,80	16,65	15,80
IL-1b	16,66	17,09	15,80	17,95	16,23
TNF $\alpha$	1639,92	1648,83	2975,07	1348,33	3554,82
LPS	16,87	15,80	15,37	17,09	17,52
Контроль	16,23	15,80	15,80	17,09	16,66

Усі тестовані лінії клітин продукували GM-CSF та IL-8 у реакції на стимулювання з контролем цитокінами IL-1b та TNF $\alpha$ . Більшість ліній Т-клітин продукували IL-6 та MCP-1 у реакції на стимулю-

вання IL-1b та TNF $\alpha$ . Zcytor17lig-craMynbOBaHe продукування IL-6 у лінії клітин DU145 порівняно з контролем (193пг/мл проти 71пг/мл).

Zcytor17lig-стимульовані 3 з 5 ліній клітин для

утворення IL-8 з найбільшим ефектом спостерігали у клітинах A549 (5 разів), а зменшене IL-8 продукування у клітинах U20S у 2 рази. Спостерігали слабку дію на продукування MCP-1 клітинами DU145 та U20S при культивуванні з zcytor17lig.

В. Продукування цитокіну нормальними лініями епітеліальних культивованих клітин людини з zcytor17lig людини

На додаток до ліній епітеліальних клітин людини також тестували нормальні бронхіальні епітеліальні клітини людини (NHBE, Clonetics). Клітини засівали при густині  $1 \times 10^5$  клітин на комірку у

24-комірковий планшет та культивували з тест-реагентами; 1000нг/мл, 100нг/мл та 10нг/мл zcytor17lig (A760F), 1мкг/мл TNF $\alpha$ , 1мкг/мл OSM, 1мкг/мл IFN $\alpha$ , 1мкг/мл TGFb або 10нг/мл Lymptogactin. Супернатанти збирали на 24 та 48 години та аналізували на цитокіни; IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1a, RANTES та Еотаксин. Цитокіни аналізували, як раніше описано. Продукування цитокіну (пг/мл) для кожного зі зразків ліній клітин на 48-годину зразки нижче у таблиці 18.

Таблиця 18

IL-6 пг/мл					
	A549	DU145	SkLu1	U20S	NHBE
r17L 1000нг/мл	24,5	56,3	32,1	25,2	64,5
r171L 100нг/мл	25,0	65,0	31,0	25,4	50,2
r17L 1мкг/мл	24,8	51,8	30,2	25,3	54,3
TNF $\alpha$	272,9	355,4	437,5	36,1	299,3
OSM	24,6	73,5	112,4	25,6	80,4
IFN	26,4	109,3	33,7	26,4	52,4
TGFb	24,4	102,6	42,7	27,8	268,9
контроль	24,5	36,3	29,9	25,2	47,9
IL-8 пг/мл					
	A549	DU145	SkLu1	U20S	NHBE
r17L 1000нг/мл	35,0	243,3	45,6	18,6	402,0
r171L 100нг/мл	31,0	290,7	40,1	21,3	296,0
r17L 1мкг/мл	30,4	240,4	33,4	18,9	361,8
TNF $\alpha$	2809,3	2520,9	1385,2	784,9	1486,3
OSM	37,8	60,6	68,0	22,5	494,6
IFN	18,9	315,3	39,5	33,1	231,6
TGFb	9,9	77,5	19,6	88,9	246,9
контроль	10,9	238,0	38,0	39,7	315,8
MCP-1 пг/мл					
	A549	DU145	SkLu1	U20S	NHBE
r17L 1000нг/мл	не визнач.	не визнач.	149,1	81,0	не визнач.
r171L 100нг/мл	не визнач.	не визнач.	130,6	81,9	не визнач.
r17L 1мкг/мл	не визнач.	не визнач.	111,7	49,1	не визнач.
TNF $\alpha$	не визнач.	22,1	2862,6	1104,7	не визнач.
OSM	не визнач.	17,2	448,2	85,8	не визнач.
IFN	не визнач.	не визнач.	131,7	10,5	не визнач.
TGFb	не визнач.	1,7	54,5	27,6	не визнач.
контроль	не визнач.	не визнач.	113,0	1,7	не визнач.

Клітини DU145 продукували IL-6 у реакції на zcytor17lig, повторюючи попередні результати у прикладі 43A. Однак, тільки A549 та U20S мали подібні IL-8-реакції, як спостережено у прикладі 43A. Клітини SkLu1 та U20S продукували MCP-1 у реакції на zcytor17lig. Продукування цитокіну клітинами NHBE було мінімальним порівняно з контролем.

С. Продукування цитокіну лініями епітеліальних клітин людини, співкультивованих зі zcytor17lig

людини та IFN-гама, при її хворобах

Клітини засівали при густині  $2 \times 10^5$  клітин на комірку у 24-комірковий планшет та співкультивували з 1мкг/мл IFN гама +/-zcytor17lig при 100нг/мл, 1мкг/мл або 1нг/мл. Супернатанти збирали на 24 та 48 години та аналізували на IL-8 та MCP-1, як описано вище. Продукування цитокіну (пг/мл) для кожної лінії клітин у 24-годинних зразках показано нижче у таблиці 19.

Таблиця 19

		IL-8 пг/мл	MCP-1 пг/мл
A549	10мкг/мл IFNg+100нг/мл r17L	86,7	не визнач.
	10нг/мл IFNg+10нг/мл r17L	75,1	не визнач.
	10нг/мл IFNg+1нг/мл r17L	63,6	не визнач.
	10нг/мл IFNg	35,4	не визнач.
	Контроль	36,6	не визнач.
DU145	10мкг/мл IFNg+100нг/мл r17L	102,3	не визнач.
	10нг/мл IFNg+10нг/мл r17L	92,9	не визнач.
	10нг/мл IFNg+1нг/мл r17L	79,9	не визнач.
	10нг/мл IFNg	70,7	не визнач.
	Контроль	79,4	не визнач.
SKLu1	10мкг/мл IFNg+100нг/мл r17L	152,2	604,9
	10нг/мл IFNg+10нг/мл r17L	194,4	870,7
	10нг/мл IFNg+1нг/мл r17L	138,7	585,4
	10нг/мл IFNg	170,8	652,6
	Контроль	203,0	292,3
U20S	10мкг/мл IFNg+100нг/мл r17L	106,8	357,0
	10нг/мл IFNg+10нг/мл r17L	108,2	347,7
	10нг/мл IFNg+1нг/мл r17L	109,9	293,3
	10нг/мл IFNg	118,8	159,8
	Контроль	146,8	7,0

Клітини A549 продукували IL-8 у реакції на zcytor17lig, однак не було ефекту співкультивації клітини при додаванні IFN-гама. Клітини U20S виробляли у 20 разів більше MCP-1 при культивуванні з IFNg та у 50 разів більше MCP-1 при культивуванні з IFN гама+zcytor17lig.

#### Приклад 44

Дія zcytor17lig на  $^3\text{H}$ -TdR, інкорпорований у клітини карциноми епітелію простати DU145

Клітини засівали у 96-коміркові тканинні класери (Falcon) при густині 25000/комірку у середовище для росту MEM (Life Technologies), доповнене глутаміном, піруватом, замініми амінокислотами (Life Technologies) та 10% сироватки зародка теляти (Hyclone). При конфлюентності (через 24 години), клітини переводили у середовище для затримки росту заміщенням сироватки на 0,1% BCA (Life Technologies). Через 48 годин для досягнення синхронізації клітин, середовище для затримки росту заміняли свіжим середовищем. Тоді, рекомбінантний zcytor17lig людини (тест-реагент) додавали при різних концентраціях (від 0,24 до 60нг/мл) (дивись Таблицю 16 нижче), для тестування дії білку на реплікацію базальної ДНК. Деякі комірки отримували 2,5% FBS (Hyclone) на додаток до zcytor17lig, для тестування дії білку на підвищені рівні TdR-інкорпорованого. FBS 10% та 20нг/мл похідного з тромбоцитів фактору-BB росту (PDGF-BB) (R & D) застосовували, як позитивний контроль.

Через 18 годин після додавання zcytor17lig та залишку тест-реагентів, клітини піддавали імпульсу 250нКи/мл  $[^3\text{H}]$ -тимідину (NEN) протягом 4 годин.

Після 4-годинного пульсування середовище відкидали та 100мкл розчину трипсину (Life Technologies) додавали у кожну комірку для видалення клітин. Радіоактивність, уведена у DU145, визначали збиранням клітин збирачем Packard

Filtermate 196 та підрахунком уведеної мітки, використовуючи мікропланшетний сцинтиляційний лічильник Packard TopCount NXT.

Як можна бачити у таблиці 20 нижче, zcytor17lig індукував інкорпорацію тимідину у спокійних клітинах (у 0,1% BCA) концентраційно-залежним чином.

Ця дія збільшувалася у 2,5-разів від BCA-контролю при найвищій застосовуваній концентрації, 60нг/мл. На додаток, ця дія zcytor17lig була також виявленою, коли базове інкорпорування було підвищене додаванням 2,5% FBS (у цій серії, як потужний мітоген як 10% FBS). Ці результати тому вказували, що у базальних та стимульованих станах zcytor17lig може діяти, як мітогенний фактор стосовно клітин карциноми DU145.

Таблиця 16 показує дію zcytor17lig на тимідин, інкорпорований клітинами DU145. Результати виражено числом імпульсів/комірку та число є значення±стандартне відхилення для потроєних комірок.

Таблиця 20

	0,1% BCA	2,5% FBS
BCA-контроль	1139±336	4228±600
zcytor17lig (0,24нг/мл)	1430±136	4894±1037
zcytor17lig (0,74нг/мл)	1657±32	5038±810
zcytor17lig (2,22нг/мл)	1646±57	5162±808
zcytor17lig (6,67нг/мл)	2226±189	6385±1613
zcytor17lig (20нг/мл)	2168±108	5880±1085
zcytor17lig (60нг/мл)	2512±111	6165±417
PDGF-BB (20нг/мл)	4094±202	5927±360

#### Приклад 45

Експресія huzcytor17lig у E coli

А. Створення вектору експресії pRPSOI, що експресує конденсований полі пептид huzcytor17Lig/MBP-6H

Експресійну плазмиду, що містить полінуклеотид, що кодує *huzcytor17lig* було конденсовано С-термінально з білком приєднання мальтози (MBP), створювали гомологічною рекомбінацією. Конденсований поліпептид містить N-термінально приблизно 388 амінокислот MBP, конденсованих з *huzcytor17lig*, що описано тут. Фрагмент кДНК *huzcytor17lig* виділяли, використовуючи PCR-спосіб, як описано тут. Два праймери застосовували при продукуванні фрагменту *zcytor17lig* у стандартній PCR-реакції: (1) один, що містить 40 по вектору фланкувальної послідовності та 20 по аміно-закінченню *huzcytor17lig* та (2) інший, що містить 40 по 3'кінця вектору фланкувальної послідовності та 20 по карбокси-закінченню *huzcytor17lig*. Два мікролітри зі 100мкл PCR-реакції проганяли на 1,0% агаровому гелі 1 x TBE буфером для аналізу та спостерігали фрагмент очікуваної молекулярної маси. Залишок PCR-реакції комбінували з другою PCR-тубою та осаджували 400мкл абсолютного етанолу. Осаджену ДНК застосовували для рекомбінації у вирізаний *SmaI* реципієнтний вектор *pTAP98* для утворення констракту, що кодує конденсат MBP-*huzcytor17lig*, як описано нижче.

Вектор *pTAP98* створювали, використовуючи гомологічну рекомбінацію з дріжджами. Одну сотню нанограм вирізаного *EcoRI* *pMAL-c2* рекомбінували з 1мкг вирізаного *PvuI* *pRS316*, 1мкг лінкеру, та 1мкг вирізаного *ScaI/EcoRI* *pRS316* комбінували у PCR-реакції. PCR-продукти концентрували осадженням 100% етанолом. Компетентну клітину штаму дріжджів (*S. cerevisiae*) SF838-9Da, комбінували з 10мкл суміші, що містить приблизно 1мкг PCR-продукту *huzcytor17lig* (вище) та 100нг розщепленого *SmaI* вектору *pTAP98* та електропорували при 0,75кВ, 25мФ та безкінечно великим опором. Утворену реакційну суміш засівали на планшеті URA-D та інкубували при 30°C.

Через 48 годин трансформанти дріжджів Ura+ з одиничного планшета селектували. ДНК виділяли та трансформували в електрокомпетентні клітини *E. coli* наприклад, MC1061, Casadaban et. al. J. Mol. Bio, 138, 179-207]. Утворені клітини *E. coli* засівали на планшеті MM/CA+AMФ 100мг/л [Pryor та Leiting, Protein Expression and Purification 10: 309-319, 1997], використовуючи стандартні процедури. Чотири окремих клони збирали з планшетів та вводили у MM/CA з 100г/мл ампіциліну протягом двох годин при 37°C. Один мл кожної культури індукували з 1мкМ IPTG. Приблизно через 2-4 години 250мкл кожної з індукованих культур змішували з 250мкл промитих кислотою скляних кульок та 250мкл буферу Thomer з 5% OME та проявнику (8М сечовина, 100мМ Трис рН7,0, 10% гліцерин, 2мМ ЕДТА, 5% SDS). Зразки перемішували протягом 1 хвилини та нагрівали до 65°C протягом 10 хвилин. Двадцять мікролітрів кожного зразку завантажували на ряд гелів 4%-12% PAGE (NOVEX). Гелі проганяли у 1XMES буфер.

Позитивні клони було позначено *pRPSO1* та їх піддавали аналізу послідовності.

Один мікролітр секвенсованої ДНК застосовували протягом трансформації штаму електрокомпетентних клітин *E. coli* MC1061. Клітини піддавали електроімпульсу при 2,0кВ, 25мкФ та 400ом. Після електропорації клітини позбавляли 0,6мл

SOC та вирощували на планшетах LB+Аmp при 37°C протягом ночі з 100мг/л ампіциліну. Чотири культури індукували IPTG та скринінгували на позитиви, як описано вище. Позитивні клони нарощували для очистки конденсованого білку *huzcytor17lig/MBP-6H*, використовуючи стандартні способи.

В. Очистка *huzcytor17lig/MBP-6H* від ферментації *E. coli*

Якщо не визначено інше, усі операції здійснювали при 4°C. Застосовували наступну процедуру для очистки рекомбінантного поліпептиду *huzcytor17lig/MBP-6H*. Клітини *E. coli*, що містили констракт *pRPSO1* та експресували *huzcytor17lig/MBP-6H*, створювали, використовуючи стандартні способи молекулярної біології, та культивували у 50,0г/л SuperBroth II (12г/л казеїну, 24г/л екстракту дріжджів, 11,4г/л дикалій фосфату, 1,7г/л монокалій фосфату; Becton Dickinson, Cockeysville, MD), 5г/л гліцерин та 5мл/л 1М магній сульфату. 20 грам клітин збирали та заморожували для очистки білку.

Розморожені клітини ресуспендували у 500мл амілозного буферу для урівноваження (20мМ Трис, 100мМ NaCl, рН 8,0). Систему руйнування клітин French Press (Constant Systems Ltd., Warwick, UK) при температурі -7 - -10°C та 30К PSI застосовували для лізування клітин. Знов суспендовані клітини аналізували стосовно руйнування зчитуванням на А600 перед та після циклювання French Press. Оброблену суспензію клітин гранулювали при 10000g протягом 30 хвилин для видалення клітинних обривків та супернатант збирали для очистки білку.

Колонку 25мл з амілозною смолою (New England Biolabs, Beverly, MA) (отриману, як описано нижче) виливали у скляну колонку Bio-Rad, 2,5см Dх10см H. Колонку пакували та урівноважували силою ваги з 10 об'ємами колонки (CV) амілозного буферу для урівноваження. Оброблений супернатант від клітин партіями завантажували на амілозну смолу протягом ночі, зі струшуванням. Смола повертали до колонки Bio-Rad та промивали 10 CV амілозного буферу для урівноваження силою ваги. Колонку елювали приблизно 2 CV амілозного буферу для елювання (амілозний буфер для урівноваження +10мМ мальтози, Fluka Biochemical, Switzerland) силою ваги. Десять 5мл фракції збирали протягом профілю елювання та аналізували на поглинання при 280 та 320нМ. Амілозну смолу було регеновано 1 CV дистильованої води, 5 CV 0,1% (за масою/об'ємом) SDS (Sigma), 5 CV дистильованої води, 5 CV амілозного буферу для урівноваження та наприкінці 1 CV амілозного зберігального буферу (амілозний буфер для урівноваження+0,02% натрій азид). Регеновану колонку зберігали при 4°C.

Досліджувані фракції профілю елювання поєднували та діалізували у камері для діалізу 10К (Slide-A-Lyzer, Pierce Immunochemicals) проти 4х4л PBS рН 7,4 (Sigma) протягом 8 годин для видалення забруднень низької молекулярної маси, буферу обміну та опріснення. Після діалізу зібраний матеріал репрезентував очищений поліпептид *huzcytor17lig/MBP-6H*. Очищений поліпептид *huzcytor17lig/MBP-6H* фільтр-стерилізували на

фільтрі та аналізували шляхом SDS-PAGE з виявленням Кумасі на продукт прийнятної молекулярної маси. Концентрацію поліпептиду hzcytor17lig/MBP- 6H визначали аналізом BCA як 1,28мг/мл.

#### Приклад 46

Поліклональне антитіло Zcytor17lig людини

А. Отримання та Очищення

Поліклональні антитіла отримували імунізацією 2 самиць білих кролів New Zealand очищенням рекомбінантним білком hzcytor17L/MBP-6H (Приклад 45). Кролі отримували початкову інтраперитональну (IP) ін'єкцію 200мкг очищеного білку у повному ад'юванті Фрейнда, а потім бустерні IP ін'єкції по 100мкг білку у неповному ад'юванті Фрейнда кожні три тижні. Через сім-десять днів після застосування другої бустерної IP ін'єкції (загалом 3 ін'єкції), у тварин відбирали кров та збирали сироватку. Тварин тоді стимулювали та відбирали кров кожні три тижні.

Специфічну стосовно hzcytor17L/MBP-6H сироватку кролів було попередньо абсорбовано з антитілами анти-MBP, використовуючи білкову колонку CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), що отримували, використовуючи 10мг неспецифічного очищеного рекомбінантного MBP-конденсованого білку на грам CNBr-SEPHAROSE. Специфічні стосовно hzcytor17L/MBP-6H поліклональні антитіла афінно очищали від попередньо абсорбованої сироватки кролів, використовуючи білкову колонку CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), що отримували, використовуючи 10мг очищеного специфічним антигеном рекомбінантного білку hzcytor17L/MBP-6H. Після очистки поліклональні антитіла діалізували 4 змінами по 20 разів об'єму антитіла PBS протягом принаймні 8 годин. Специфічні стосовно hzcytor 17-ліганду антитіла характеризували ELISA, використовуючи 500нг/мл очищеного рекомбінантного білку hzcytor 17L/MBP-6H або hzcytor 17L-CEE, продуктового у бакуловірусній експресійній системі, як цілі антитіла. Нижче обмеження визначення (LLD) кролячого афінно очищеного антитіла анти-hzcytor17L/MBP-6H було 100пг/мл на його специфічному очищеному рекомбінантному антигені hzcytor 17L/MBP-6H та 500пг/мл на очищеному рекомбінантному hzcytor 17L-CEE, продуктованих у бакуловірусній експресійній системі.

В. Аналіз SDS-PAGE та Вестерн-блотуванням кролячого антитіла анти-zcytor17lig MBP-6H людини

Кроляче антитіло анти-zcytor17lig MBP-6H людини тестували способом SDS-PAGE (NuPage 4-12%, Invitrogen, Carlsbad, CA) з виявленням кумасі та Вестерн-блотуванням, використовуючи козячий анти-кролячий IgG-HRP. Очищений білок zcytor17lig людини та миші (200-25нг) електрофорезували, використовуючи мінікомірку Invitrogen Novex's Xcell II та переносили до нітроцелюлози (0,2мм; Invitrogen, Carlsbad, CA) при кімнатній температурі, використовуючи модуль Novex's Xcell blot з перемішуванням відповідно вказівкам, запропонованим в інструкції до приладу. Переніс провадили при 300мА протягом 1 години у буфер, що містив 25мМ Трис-основи, 200мМ гліцину, та 20% метанолу. Фільтр тоді блокували буфером Вестерн-А (власний, 50мМ Трис, рН 7,4, 5мМ ЕДТА, рН 8,0, 0,05% ігепалу CA-630, 150мМ NaCl та 0,25% желатину) протягом ночі з обережним струшуванням при 4°C. Нітроцелюлозу швидко промивали, тоді додавали у буфері Вестерн-А кролячий анти-людини zcytor17lig MBP-6H (1:1000). Блот інкубували протягом 1,5 годин при кімнатній температурі з обережним струшуванням. Блот промивали 3 рази протягом 5 хвилин кожного разу у буфері Вестерн-А, тоді козяче анти-кроляче IgG HRP антитіло (1:5000) додавали у буфері Вестерн-А. Блот інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі з обережним струшуванням. Блот промивали 3 рази протягом 5 хвилин кожного разу у буфері Вестерн-А, тоді швидко промивали водою. Блот виявляли, використовуючи комерційно доступні хемілюмінісцентні субстратні реагенти (реагенти визначення ECL Вестерн-блотуванням 1 та 2, змішані 1:1; реагенти отримано з Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) та блот експонували на рентгеноплівці протягом до 5 хвилин.

Очищений zcytor17lig людини виявляли як велику смугу при приблизно 30кДа та меншу смугу при приблизно 20кДа у відновних умовах. Zcytor17lig миші не визначався кролячим антитілом анти-zcytor17lig людини.

#### Приклад 47

Дія zcytor17lig на адгезію до моношару трансформованих ендотеліальних клітин кісткового мозку (TRBMEC) моноцитів U937

Трансформовані ендотеліальні клітини кісткового мозку (TRBMEC) засівали у 96-коміркові тканинні кластери (Falcon) при густині 25000/комірку у середовищі M131 (Cascade Biologies), доповненому Microvascular Growth Supplement (MVGs) (Cascade Biologies). При конфлюентності (через 24 годин), клітини переводили у M199 (Gibco-Life Technologies), доповнене 1% сироватки зародка теляти (Hyclone).

Рекомбінантний zcytor17lig людини (тест-реагент) додавали при різних концентраціях (від 0,4 до 10нг/мл) (дивись Таблицю 21 нижче), для тестування дії білку на взаємодії імунних клітин-ендотеліальних клітин, що призводить до адгезії. Деякі комірки отримували 0,3нг/мл фактору некрозу пухлин (TNFальфа R & D Systems), відомий прозапальний цитокін, на додаток до zcytor17lig, для тестування дії білку на ендотеліальні клітини в запальних станах. TNFальфа при 0,3нг/мл поодиночі застосовували, як позитивний контроль, а застосовувана концентрація складала приблизно 70% від максимальної дії TNFальфа у цій системі, тобто, не індукувала максимального злипання клітин U937 (моноцито-подібна лінія клітин людини) з ендотелієм. З огляду на це, ця схема може визначати як підвищуючу, так і знижуючу регуляцію дії ТИРальфа. Базальні рівні адгезії з "TNFальфа та без нього застосовували як базові для оцінки дії тест-реагентів.

Після інкубування ендотеліальних клітин протягом ночі з тест-реагентами (zcytor17lig та TNFальфа) клітини U937 виявляли 5мкМ флуоресцентним маркером кальцеїн-AM (Molecular Probes), клітини суспендували у RPMI 1640 (не фенол-червоний), доповненому 1% FBS, та засі-

вали при 100000 клітин/комірку на промитий моно шар TRBMES. Рівні флуоресценції вимірювали при довжинах хвиль збуження/емісії 485/538nm (мікро-планшетний зчитувач Molecular Devices, CytoFluor application) через 30 хвилин, перед та після промивки комірки 3 рази гарячим RPMI 1640 (не фенол-червоний), для видалення незлишх U937. Рівні флуоресценції перед промивкою (загальні) та після промивки (специфічні стосовно злипання) застосовували для визначення проценту злипання (нетто злиплих/нетто загальних $\times 100$ =% злипання).

Як можна бачити у таблиці 21 нижче, zcytor17lig при додаванні поодиноці порушує базальне злипання клітин U937 з ендотеліальними моношарами при застосовуваних концентраціях, (збільшує менше, ніж у 2-рази,  $p < 0,01$  за тестом ANOVA). Сам по собі позитивний контроль, 0,3нг/мл TNFальфа, збільшував злипання клітин U937 від базальних 5,8% до 35% (у 6-разів). При наявності TNFальфа, zcytor17lig синергізував з TNFальфа та ще посилював адгезію U937 залежно від концентрації між 0,4 та 1мкг/мл ( $p < 0,01$  за тестом ANOVA). При 10нг/мл, zcytor17lig посилював дію TNFальфа на 62%. Ці результати вказують, що zcytor17lig може сам бути прозапальним засобом. Zcytor17lig був здатним синергізувати з суб-максимальними концентраціями TNFальфа для збільшення злипання моноцитів з ендотеліальними клітинами. Ці результати також показують, що ендотеліальні клітини, особливо при дії прозапальних цитокінів, як-то TNFальфа, є, можливо, цільовою тканиною для дії zcytor17lig. Результатом дії zcytor17ligand на ендотеліальні клітини може бути підвищення адгезії моноцитів або макро-

фагів з ділянкою прозапальної активності. Активовані моноцити та макрофаги є важливими у багатьох запальних хворобах. Тому інгібування адгезії моноцитів/макрофагів може забезпечувати терапевтичне обґрунтування для антагоністів zcytor17ліганд. Ці дані могли б підтримати застосування антагоністів ліганду zcytor17 для лікування хвороб легенів, васкулярних хвороб, автоімунітету, метастазів пухлин, хвороб, що включають алергічні реакції, зцілення поранення та хвороб шкіри, включаючи контактні, алергічні або неалергічні дерматити або пооріаз та запальну хворобу кишечника. Таблиця 21 показує дію zcytor17lig на адгезію моноцитів U937 до ендотеліальних моношарів TRBMES. Результати виражено у процентах адгезії числом! стандартне відхилення від потроєних комірок.

Таблиця 21

	Базальний	0,3нг/мл TNFальфа
Базальний	5,8 $\pm$ 1,2	35 $\pm$ 5,5
zcytor17lig 0,4нг/мл	9 $\pm$ 0,7	44,7 $\pm$ 2,5
zcytor17lig 1,1нг/мл	10,4 $\pm$ 0,8	45,2 $\pm$ 0,6
zcytor17lig 3,3нг/мл	7,9 $\pm$ 1,7	51,1 $\pm$ 4
zcytor17lig 10нг/мл	9,5 $\pm$ 0,5	56,6 $\pm$ 3,9

З вищезазначеного слід усвідомити, що хоча специфічні втілення винаходу, що описано, представлено для ілюстрації, можна робити різні модифікації без відхилення від духу та рамок винаходу. Відповідно, винахід обмежено тільки нижченаведеною формулою винаходу.

&lt;110&gt; ZymoGenetics, Inc.

&lt;120&gt; Новий цитокін лігану ZCYTOR17

&lt;130&gt; 02-01PC

&lt;150&gt; US 60/350,325

&lt;151&gt; 2002-01-18

&lt;150&gt; US 60/375,323

&lt;151&gt; 2002-04-25

&lt;150&gt; US 60/435,315

&lt;151&gt; 2002-12-19

&lt;160&gt; 168

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 3.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 904

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Людина

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (28) . . (519)

&lt;400&gt; 1

agctgg cttgtctctc tctcgcc atg gcc tct cac tca ggc ccc tcg acg 54  
Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr  
gcggtgattc cttaaagtaca tttttccaat gaataatctc agggaccctc cataatggct 659  
agtcccggga gggctgagat gtgaatttgt gaattacctt gaaaaacatt aggtatttgt 719  
tattagtctt ggtatttatg gaatgctttt cttctgcagg cttaaagtctt acttattata 779  
ccctcgtgag ggtggggagt ggcagctatg ttaattttatt gatattttatt gtactaagag 839  
ttgtcaatgc tccctggggg agccctcgga atctatttaa taaattatat tgaatttttc 899  
tcata 904

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 164

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Людина

&lt;400&gt; 2

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

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 492

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

1

5

tct gtg ctc ttt ctg ttc tgc tgc ctg gga ggc tgg ctg gcc tcc cac 102  
Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His  
10 15 20 25

acg ttg ccc gtc cgt tta cta cga cca agt gat gat gta cag aaa ata 150  
Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile  
30 35 40

gtc gag gaa tta cag tcc ctc tcg aag atg ctt ttg aaa gat gtg gag 198  
Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu  
45 50 55

gaa gag aag ggc gtg ctc gtg tcc cag aat tac acg ctg ccg tgt ctc 246  
Glu Glu Lys Gly Val Leu Val Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro Cys Leu  
60 65 70

agc cct gac gcc cag ccg cca aac aac atc cac agc cca gcc atc cgg 294  
Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg  
75 80 85

gca tat ctc aag aca atc aga cag cta gac aac aaa tct gtt att gat 342  
Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp  
90 95 100 105

gag atc ata gag cac ctc gac aaa ctc ata ttt caa gat gca cca gaa 390  
Glu Ile Ile Glu His Leu Asp Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu  
110 115 120

aca aac att tct gtg cca aca gac acc cat gaa tgt aaa cgc ttc atc 438  
Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr Asp Thr His Glu Cys Lys Arg Phe Ile  
125 130 135

ctg act att tct caa cag ttt tca gag tgc atg gac ctc gca cta aaa 486  
Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys  
140 145 150

tca ttg acc tct gga gcc caa cag gcc acc act taaggccatc tcttcttttc 539  
Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln Gln Ala Thr Thr  
155 160

ggattggcag gaacttaagg agccttaaaa agatgaccga cagctaagtg tgggaactct 599

<223> Вироджений полінуклеотид zcytor17lig людини SEQ ID  
NO.11

&lt;221&gt; різномітні ознаки

&lt;222&gt; (1) . . . (492)

&lt;223&gt; n = A,T,C або G

&lt;400&gt; 3

atggcnwsc aywsnggncc nwsnacrwns gtnytnntty tnttytygt yytngnggn 60  
tgytngcnw sncayacny tncngtrmgn ytnytnmgn cnwsngayga ygtncaraa 120  
athgtngarg atrytnarws nytnwsnaar atgytnytna argaygtnga rgargaraa 180  
ggngtnytn gtnwsnaraa ytayacnytn cntgyytnw snccngaygc ncarccnccn 240  
aayaayathc aywsnccngc nathmngcn taytnaara cnathmgnca rytngayaay 300  
aarwsngtna thgaygarat hathgarayc ytngayary tnathttyca rgaygnccn 360  
garacnaaya thwsngtncc nacngayacn caygartgya armgnttyat hytnacnath 420  
wnscarcart tywsngartg yatggaytn gcnytnaarw snytnacnws ngngnccnar 480  
cargcnacna cn 492

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 2903

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Людина

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (497) . . . (2482)

&lt;400&gt; 4

tgaaaagaca tgtgtgtgca gtatgaaaat tgagacagga aggcagagtg tcagcttgtt 60  
ccacctcagc tgggaatgtg catcaggcaa ctcaagtttt taccacggc atgtgtctgt 120  
gaatgtccgc aaaacattag ttctactctt gtcgccaggt tggagtacaa tggcagatc 180  
ttggctcact gcaacctctg cctcccgggt tcaagcgatt ctctgctc agcctccga 240  
gtagctggga ttacagttaa caataatgca atccatttc cagcataagt gggtaagtgc 300  
cactttgact tgggctgggc ttaaaagcac aagaaaagct cgcagacaat cagagtggaa 360  
acactccac atcttagtgt ggataaatta aagtcagat tgttctct gtctgactt 420  
gtgctgtggg aggtggagtt gcctttgatg caaatcttt gagccagcag aacatctgtg 480  
gaacatcccc tgatag atg aag ctc tct ccc cag cct tca tgt gtt aac ctg 532  
Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu  
1 5 10

ggg atg atg tgg acc tgg gca ctg tgg atg ctc cct tca ctc tgc aaa 580  
Gly Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys  
15 20 25

## 189

ttc agc ctg gca gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc 628  
 Phe Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val  
 30 35 40  
 tac tac tat agg aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa 676  
 Tyr Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu  
 45 50 55 60  
 acc agt tat acc cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa 724  
 Thr Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu  
 65 70 75  
 aaa cat gat aat tgt aca acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct 772  
 Lys His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala  
 80 85 90  
 tgc tgc tct ttt ttc ctt cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc 820  
 Ser Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr  
 95 100 105  
 att gag gtg gaa gct gaa aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg 868  
 Ile Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met  
 110 115 120  
 aca tac tgg aga tta gag aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att 916  
 Thr Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile  
 125 130 135 140  
 ttc cgt gtg aaa cca gtt ttg gcc atc aaa cga atg att caa att gaa 964  
 Phe Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu  
 145 150 155  
 tgg ata aag cct gag ttg gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca 1012  
 Trp Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr  
 160 165 170  
 ctt cga ttc agg aca gtc aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc 1060  
 Leu Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe  
 175 180 185  
 gct aag aac cgt aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg 1108  
 Ala Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu  
 Val Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro  
 365 370 375 380  
 acc acc ctt tcc tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc 1684  
 Thr Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile  
 385 390 395  
 cag caa gat aaa tta aaa cct ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat 1732  
 Gln Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr  
 400 405 410  
 cca atg ttg cat gac aaa gtt gcc gag cca tat tcc atc cag gct tat 1780  
 Pro Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr  
 415 420 425  
 gcc aaa gaa ggc gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac 1828  
 Ala Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn  
 430 435 440  
 att gcc gtg aag acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt 1876  
 Ile Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser  
 445 450 455 460  
 gag aga aag ggt atc atc tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa 1924  
 Glu Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu  
 465 470 475  
 ggt gga aaa gga ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac 1972  
 Gly Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr  
 480 485 490  
 gcc ctg gag tcc ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg 2020  
 Gly Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met  
 495 500 505  
 gcc agc acc agt gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag 2068  
 Ala Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys  
 510 515 520  
 aca ttg tca ttc agt gtc ttt gag att atc ctc ata act tct ctg att 2116  
 Thr Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile  
 525 530 535 540

## 84540

## 190

190 195 200  
 cag cct ttt aca gaa tat gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag 1156  
 Gln Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu  
 205 210 215 220  
 tca aag ttc tgg agt gac tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag 1204  
 Ser Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu  
 225 230 235  
 gaa gaa gct cca tgt gcc ctg gaa ctg tgg aga gtc ctn aaa cca gct 1252  
 Glu Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Lys Pro Ala  
 240 245 250  
 gag gcg gat gga aga agg cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga 1300  
 Glu Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg  
 255 260 265  
 gga gcc cca gtc cta gag aaa aca ctt gcc tac aac ata tgg tac tat 1348  
 Gly Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr  
 270 275 280  
 cca gaa agc aac act aac ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag 1396  
 Pro Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln  
 285 290 295 300  
 cag ctt gaa ctg cat ctg gga gcc gag agc ttt tgg gtg tct atg att 1444  
 Gln Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile  
 305 310 315  
 tct tat aat tct ctt ggg aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca 1492  
 Ser Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro  
 320 325 330  
 gct att caa gaa aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc 1540  
 Ala Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys  
 335 340 345  
 gtt gct gag gac cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac 1588  
 Val Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp  
 350 355 360  
 gtg aac act tgg atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc 1636  
 ggt gga gcc ctt ctt att ctc att atc ctg aca gtg gca tat ggt ctc 2164  
 Gly Gly Gly Leu Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu  
 545 550 555  
 aaa aaa ccc aac aaa ttg act cat ctg tgt tgg ccc acc gtt ccc aac 2212  
 Lys Lys Pro Asn Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn  
 560 565 570  
 cct gct gaa agt agt ata gcc aca tgg cat gga gat gat ttc aag gat 2260  
 Pro Ala Glu Ser Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp  
 575 580 585  
 aag cta aac ctg aag gag tct gat gac tct gtg aac aca gaa gac agg 2308  
 Lys Leu Asn Leu Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg  
 590 595 600  
 atc tta aaa cca tgt tcc acc ccc agt gac aag ttg gtg att gac aag 2356  
 Ile Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys  
 605 610 615 620  
 ttg gtg gtg aac ttt ggg aat gtt ctg caa gaa att ttc aca gat gaa 2404  
 Leu Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu  
 625 630 635  
 gcc aga acg ggt cag gaa aac aat tta gga ggg gaa aag aat ggg act 2452  
 Ala Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr  
 640 645 650  
 aga att ctg tct tcc tgc cca act tca ata taagtgtgga ctaaaatgag 2502  
 Arg Ile Leu Ser Ser Cys Pro Thr Ser Ile  
 655 660  
 agaaaggtgt cctgtggtct atgcaaatga gaaaggacat gcagagtttt ccaactagga 2562  
 agactgaatc tctgccccca agagaaccat cctggaagac tgggtatgtg gtcttttcca 2622  
 cacatggacc acctacggat gcaatctgta atgcattgtc atgagaagtc tgttattaag 2682  
 tagagtgtga aaacatggtt atggtaatag gaacagcttt taaaatgctt ttgtatttgg 2742  
 gcctttcata caaaaaagcc ataataccat ttcatgtata tgctatactt ctatactatt 2802  
 ttcatgtaat actatacttc tatactattt tcatgtaata ctatacttct atactatttt 2862  
 catgtaatac tatacttcta tattaaggtt ttaccactc a 2903  
 <210> 5  
 <211> 662  
 <212> PRT

191

&lt;213&gt; Людина

&lt;400&gt; 5

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

660

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 2964

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Людина

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (13).. (2949)

&lt;400&gt; 6

gaattcgcca cc atg gct cta ttt gca gtc ttt cag aca aca ttc ttc tta 51  
 Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu  
 1 5 10  
 aca ttg ctg tcc ttg agg act tac cag agt gaa gtc ttg gct gaa cgt 99  
 Thr Leu Leu Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg  
 15 20 25  
 tta cca ttg act cct gta tca ctt aaa gtt tcc acc aat tct acg cgt 147  
 Leu Pro Leu Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg  
 30 35 40 45  
 cag agt ttg cac tta caa tgg act gtc cac aac ctt cct tat cat cag 195  
 Gln Ser Leu His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln  
 50 55 60  
 gaa ttg aaa atg gta ttt cag atc cag atc agt agg att gaa aca tcc 243  
 Glu Leu Lys Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser  
 65 70 75  
 aat gtc atc tgg gtg ggg aat tac agc acc act gtg aag tgg aac cag 291  
 Asn Val Ile Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Trp Asn Gln  
 80 85 90  
 gtt ctg cat tgg agc tgg gaa tct gag ctc cct ttg gaa tgt gcc aca 339  
 Val Leu His Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr  
 95 100 105  
 cac ttt gta aga ata aag agt ttg gtg gac gat gcc aag ttc cct gag 387  
 His Phe Val Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu

84540

192

Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu  
 325 330 335  
 Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp  
 340 345 350  
 Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp  
 355 360 365  
 Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys  
 385 390 395 400  
 Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His  
 405 410 415  
 Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly  
 420 425 430  
 Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys  
 435 440 445  
 Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly  
 450 455 460  
 Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly  
 465 470 475 480  
 Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser  
 485 490 495  
 Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser  
 500 505 510  
 Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe  
 515 520 525  
 Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly Leu  
 530 535 540  
 Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Pro Asn  
 545 550 555 560  
 Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser  
 565 570 575  
 Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys Leu Asn Leu  
 580 585 590  
 Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile Leu Lys Pro  
 595 600 605  
 Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu Val Val Asn  
 610 615 620  
 Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala Arg Thr Gly  
 625 630 635 640  
 Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr Arg Ile Leu Ser  
 645 650 655  
 Ser Cys Pro Thr Ser Ile  
 110 115 120 125  
 cca aat ttc tgg agc aac tgg agt tcc tgg gag gaa gtc agt gta caa 435  
 Pro Asn Phe Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln  
 130 135 140  
 gat tct act gga cag gat ata ttg ttc gtt ttc cct aaa gat aag ctg 483  
 Asp Ser Thr Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu  
 145 150 155  
 gtg gaa gaa ggc acc aat gtt acc att tgt tac gtt tct agg aac att 531  
 Val Glu Glu Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile  
 160 165 170  
 caa aat aat gta tcc tgt tat ttg gaa ggg aaa cag att cat gga gaa 579  
 Gln Asn Asn Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu  
 175 180 185  
 caa ctt gat cca cat gta act gca ttc aac ttg aat agt gtg cct ttc 627  
 Gln Leu Asp Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe  
 190 195 200 205  
 att agg aat aaa ggg aca aat atc tat tgt gag gca agt caa gga aat 675  
 Ile Arg Asn Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn  
 210 215 220  
 gtc agt gaa ggc atg aaa ggc atc gtt ctt ttt gtc tca aaa gta ctt 723  
 Val Ser Glu Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu  
 225 230 235  
 gag gag ccc aag gac ttt tct tgt gaa acc gag gac ttc aag act ttg 771  
 Glu Glu Pro Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu  
 240 245 250  
 cac tgt act tgg gat cct ggg acg gac act gcc ttg ggg tgg tct aaa 819  
 His Cys Thr Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys  
 255 260 265  
 caa cct tcc caa agc tac act tta ttt gaa tca ttt tct ggg gaa aag 867  
 Gln Pro Ser Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys  
 270 275 280 285  
 aaa ctt tgt aca cac aaa aac tgg tgt aat tgg caa ata act caa gac 915

## 193

Lys Leu Cys Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp 1443  
290 295 300

tca caa gaa acc tat aac ttc aca ctc ata gct gaa aat tac tta agg 963  
Ser Gln Glu Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg  
305 310 315

aag aga agt gtc aat atc ctt ttt aac ctg act cat cga gtt tat tta 1011  
Lys Arg Ser Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu  
320 325 330

atg aat cct ttt agt gtc aac ttt gaa aat gta aat gcc aca aat gcc 1059  
Met Asn Pro Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala  
335 340 345

atc atg acc tgg aag gtg cac tcc ata agg aat aat ttc aca tat ttg 1107  
Ile Met Thr Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu  
350 355 360 365

tgt cag att gaa ctc cat ggt gaa gga aaa atg atg caa tac aat gtt 1155  
Cys Gln Ile Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val  
370 375 380

tcc atc aag gtg aac ggt gag tac ttc tta agt gaa ctg gaa cct gcc 1203  
Ser Ile Lys Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala  
385 390 395

aca gag tac atg gcg cga gta cgg tgt gct gat gcc agc cac ttc tgg 1251  
Thr Glu Tyr Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp  
400 405 410

aaa tgg agt gaa tgg agt ggt cag aac ttc acc aca ctt gaa gct gct 1299  
Lys Trp Ser Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala  
415 420 425

ccc tca gag gcc cct gat gtc tgg aga att gtg agc ttg gag cca gga 1347  
Pro Ser Glu Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly  
430 435 440 445

aat cat act gtg acc tta ttc tgg aag cca tta tca aaa ctg cat gcc 1395  
Asn His Thr Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala  
450 455 460

tcc cac tcc ttc act ctg agt tgg aaa gat tac tct act gaa tct caa 1971  
Ser His Ser Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln  
640 645 650

cct ggt ttt ata caa ggg tac cat gtc tat ctg aaa tcc aag gcg agg 2019  
Pro Gly Phe Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg  
655 660 665

cag tgc cac cca cga ttt gaa aag gta gtt ctt tca gat ggt tca gaa 2067  
Gln Cys His Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu  
670 675 680 685

tgt tgc aaa tac aaa att gac aac ccg gaa gaa aag gca ttg att gtg 2115  
Cys Cys Lys Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val  
690 695 700

gac aac cta aag cca gaa tcc ttc tat gag ttt ttc atc act cca ttc 2163  
Asp Asn Leu Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe  
705 710 715

act agt gct ggt gaa ggc ccc agt gct acg ttc acg aag gtc acg act 2211  
Thr Ser Ala Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr  
720 725 730

ccg gat gaa cac tcc tgg atg ctg att cat atc cta ctg ccc atg gtt 2259  
Pro Asp Glu His Ser Ser Met Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val  
735 740 745

ttc tgc gtc ttg ctc atc atg gtc atg tgc tac ttg aaa agt cag tgg 2307  
Phe Cys Val Leu Leu Ile Met Val Met Cys Tyr Leu Lys Ser Gln Trp  
750 755 760 765

atc aag gag acc tgt tat cct gac atc cct gac cct tac aag agc agc 2355  
Ile Lys Glu Thr Cys Tyr Pro Asp Ile Pro Asp Pro Tyr Lys Ser Ser  
770 775 780

atc ctg tca tta ata aaa ttc aag gag aac cct cac cta ata ata atg 2403  
Ile Leu Ser Leu Ile Lys Phe Lys Glu Asn Pro His Leu Ile Ile Met  
785 790 795

aat gtc agt gac tgt atc cca gat gct att gaa gtt gta agc aag cca 2451  
Asn Val Ser Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro

## 84540

## 194

aat gga aag atc ctg ttc tat aat gca gtt gta gaa aac cta gac aaa 1443  
Asn Gly Lys Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Glu Asn Leu Asp Lys  
465 470 475

cca tcc agt tca gag ctc cat tcc att cca gca cca gcc aac agc aca 1491  
Pro Ser Ser Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr  
480 485 490

aaa cta atc ctt gac agg tgt tcc tac caa atc tgc gtc ata gcc aac 1539  
Lys Leu Ile Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn  
495 500 505

aac agt gtg ggt gct tct cct gct tct gta ata gtc atc tct gca gac 1587  
Asn Ser Val Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp  
510 515 520 525

ccc gaa aac aaa gag gtt gag gaa gaa aga att gca ggc aca gag ggt 1635  
Pro Glu Asn Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly  
530 535 540

gga ttc tct ctg tct tgg aaa ccc caa cct gga gat gtt ata ggc tat 1683  
Gly Phe Ser Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr  
545 550 555

gtt gtg gac tgg tgt gac cat acc cag gat gtg ctc ggt gat ttc cag 1731  
Val Val Asp Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln  
560 565 570

tgg aag aat gta ggt ccc aat acc aca agc aca gtc att agc aca gat 1779  
Trp Lys Asn Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp  
575 580 585

gct ttt agg cca gga gtt cga tat gac ttc aga att tat ggg tta tct 1827  
Ala Phe Arg Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser  
590 595 600 605

aca aaa agg att gct tgt tta tta gag aaa aaa aca gga tac tct cag 1875  
Thr Lys Arg Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln  
610 615 620

gaa ctt gct cct tca gac aac cct cac gtg ctg gtg gat aca ttg aca 1923  
Glu Leu Ala Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr  
625 630 635  
800 805 810

gaa ggg aca aag ata cag ttc cta ggc act agg aag tca ctc aca gaa 2499  
Glu Gly Thr Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu  
815 820 825

acc gag ttg act aag cct aac tac ctt tat ctc ctt cca aca gaa aag 2547  
Thr Glu Leu Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys  
830 835 840 845

aat cac tct ggc cct ggc ccc tgc atc tgt ttt gag aac ttg acc tat 2595  
Asn His Ser Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr  
850 855 860

aac cag gca gct tct gac tct ggc tct tgt ggc cat gtt cca gta tcc 2643  
Asn Gln Ala Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser  
865 870 875

cca aaa gcc cca agt atg ctg gga cta atg acc tca cct gaa aat gta 2691  
Pro Lys Ala Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val  
880 885 890

cta aag gca cta gaa aaa aac tac atg aac tcc ctg gga gaa atc cca 2739  
Leu Lys Ala Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro  
895 900 905

gct gga gaa aca agc ttt aat tat gtg tcc cag ttg gct tca ccc atg 2787  
Ala Gly Glu Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met  
910 915 920 925

ttt gga gac aag gac agt ctc cca aca aac cca gta gag gca cca cac 2835  
Phe Gly Asp Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His  
930 935 940

tgt tca gag tat aaa atg caa atg gca gtc tcc ctg cgt ctt gcc ttg 2883  
Cys Ser Glu Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu  
945 950 955

cct ccc ccg acc gag aat agc agc ctc tcc tca att acc ctt tta gat 2931  
Pro Pro Pro Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp  
960 965 970

cca ggt gaa cac tac tgc taaccagcac tcgag 2964

195

Pro Gly Glu His Tyr Cys  
975<210> 7  
<211> 979  
<212> PRT  
<213> Людина

<400> 7  
Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu Thr Leu Leu  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg Leu Pro Leu  
20 25 30  
Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg Gln Ser Leu  
35 40 45  
His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln Glu Leu Lys  
50 55 60  
Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser Asn Val Ile  
65 70 75 80  
Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Trp Asn Gln Val Leu His  
85 90 95  
Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr His Phe Val  
100 105 110  
Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu Pro Asn Phe  
115 120 125  
Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln Asp Ser Thr  
130 135 140  
Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu Val Glu Glu  
145 150 155 160  
Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile Gln Asn Asn  
165 170 175  
Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu Gln Leu Asp  
180 185 190  
Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe Ile Arg Asn  
195 200 205  
Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn Val Ser Glu  
210 215 220  
Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro  
225 230 235 240  
Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu His Cys Thr  
245 250 255  
Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys Gln Pro Ser  
Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala  
610 615 620  
Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser  
625 630 635 640  
Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe  
645 650 655  
Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His  
660 665 670  
Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys  
675 680 685  
Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu  
690 695 700  
Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala  
705 710 715 720  
Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu  
725 730 735  
His Ser Ser Met Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val Phe Cys Val  
740 745 750  
Leu Leu Ile Met Val Met Cys Tyr Leu Lys Ser Gln Trp Ile Lys Glu  
755 760 765  
Thr Cys Tyr Pro Asp Ile Pro Asp Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser  
770 775 780  
Leu Ile Lys Phe Lys Glu Asn Pro His Leu Ile Ile Met Asn Val Ser  
785 790 795 800  
Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro Glu Gly Thr  
805 810 815  
Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu Thr Glu Leu  
820 825 830  
Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys Asn His Ser  
835 840 845  
Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr Asn Gln Ala  
850 855 860  
Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser Pro Lys Ala  
865 870 875 880  
Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val Leu Lys Ala  
885 890 895  
Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro Ala Gly Glu  
900 905 910  
Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met Phe Gly Asp  
915 920 925  
Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His Cys Ser Glu  
930 935 940  
Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu Pro Pro Pro

84540

196

260 265 270  
Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys Lys Leu Cys  
275 280 285  
Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp Ser Gln Glu  
290 295 300  
Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg Lys Arg Ser  
305 310 315 320  
Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu Met Asn Pro  
325 330 335  
Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala Ile Met Thr  
340 345 350  
Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu Cys Gln Ile  
355 360 365  
Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val Ser Ile Lys  
370 375 380  
Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr  
385 390 395 400  
Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp Lys Trp Ser  
405 410 415  
Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala Pro Ser Glu  
420 425 430  
Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly Asn His Thr  
435 440 445  
Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala Asn Gly Lys  
450 455 460  
Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Val Glu Asn Leu Asp Lys Pro Ser Ser  
465 470 475 480  
Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys Leu Ile  
485 490 495  
Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val  
500 505 510  
Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn  
515 520 525  
Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Phe Ser  
530 535 540  
Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp  
545 550 555 560  
Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn  
565 570 575  
Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg  
580 585 590  
Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg  
595 600 605

945 950 955 960  
Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp Pro Gly Glu  
965 970 975  
His Tyr Cys

<210> 8  
<211> 2657  
<212> ДНК  
<213> Людина<220>  
<221> CDS  
<222> (133)...(2040)

<400> 8  
cggaggcggc ctgcccgggt ggttcggctt cccgttgccg cctcgggcgc tgtaccaga 60  
gctcgaagag gacgagcgcg gccgcgcgga ccggcaagg ctggcccgga ctggggctc 120  
ccgagggacg cc atg cgg gga ggc agg gcc cct ttc tgg ctg tgg ccg 171  
Met Arg Gly Gly Arg Gly Ala Pro Phe Trp Leu Trp Pro  
1 5 10

ctg ccc aag ctg gcg ctg ctg cct ctg ttg tgg gtg ctt ttc cag cgg 219  
Leu Pro Lys Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Trp Val Leu Phe Gln Arg  
15 20 25  
acg cgt ccc cag ggc agc gcc ggg cca ctg cag tgc tac gga gtt gga 267  
Thr Arg Pro Gln Gly Ser Ala Gly Pro Leu Gln Cys Tyr Gly Val Gly  
30 35 40 45  
ccc ttg ggc gac ttg aac tgc tcg tgg gag cct ctt ggg gac ctg gga 315  
Pro Leu Gly Asp Leu Asn Cys Ser Trp Glu Pro Leu Gly Asp Leu Gly  
50 55 60  
gcc ccc tcc gag tta cac ctg cag agc caa aag tac cgt tcc aac aaa 363  
Ala Pro Ser Glu Leu His Leu Gln Ser Gln Lys Tyr Arg Ser Asn Lys  
65 70 75  
acc cag act gtg gca gtg gca gcc gga cgg agc tgg gtg gcc att cct 411  
Thr Gln Thr Val Ala Val Ala Ala Gly Arg Ser Trp Val Ala Ile Pro  
80 85 90

197

cgg gaa cag ctc acc atg tct gac aaa ctc ctt gtc tgg ggc act aag 459  
 Arg Glu Gln Leu Thr Met Ser Asp Lys Leu Leu Val Trp Gly Thr Lys  
 95 100 105  
 gca ggc cag cct ctc tgg ccc ccc gtc ttc gtg aac cta gaa acc caa 507  
 Ala Gly Gln Pro Leu Trp Pro Pro Val Phe Val Asn Leu Glu Thr Gln  
 110 115 120 125  
 atg aag cca aac gcc ccc cgg ctg ggc cct gac gtg gac ttt tcc gag 555  
 Met Lys Pro Asn Ala Pro Arg Leu Gly Pro Asp Val Asp Phe Ser Glu  
 130 135 140  
 gat gac ccc ctg gag gcc act gtc cat tgg gcc cca cct aca tgg cca 603  
 Asp Asp Pro Leu Glu Ala Thr Val His Trp Ala Pro Pro Thr Trp Pro  
 145 150 155  
 tct cat aaa gtt ctg atc tgc cag ttc cac tac cga aga tgt cag gag 651  
 Ser His Lys Val Leu Ile Cys Gln Phe His Tyr Arg Arg Cys Gln Glu  
 160 165 170  
 gcg gcc tgg acc ctg ctg gaa ccg gag ctg aag acc ata ccc ctg acc 699  
 Ala Ala Trp Thr Leu Leu Glu Pro Glu Leu Lys Thr Ile Pro Leu Thr  
 175 180 185  
 cct gtt gag atc caa gat ttg gag cta gcc act ggc tac aaa gtg tat 747  
 Pro Val Glu Ile Gln Asp Leu Glu Leu Ala Thr Gly Tyr Lys Val Tyr  
 190 195 200 205  
 ggc cgc tgc cgg atg gag aaa gaa gag gat ttg tgg ggc gag tgg agc 795  
 Gly Arg Cys Arg Met Glu Lys Glu Glu Asp Leu Trp Gly Glu Trp Ser  
 210 215 220  
 ccc att ttg tcc ttc cag aca ccg cct tct gct cca aaa gat gtg tgg 843  
 Pro Ile Leu Ser Phe Gln Thr Pro Pro Ser Ala Pro Lys Asp Val Trp  
 225 230 235  
 gta tca ggg aac ctc tgt ggg acg cct gga gga gag gaa cct ttg ctt 891  
 Val Ser Gly Asn Leu Cys Gly Thr Pro Gly Gly Glu Glu Pro Leu Leu  
 240 245 250  
 cta tgg aag gcc cca ggg ccc tgt gtg cag gtg agc tac aaa gtc tgg 939  
 Leu Trp Lys Ala Pro Gly Pro Cys Val Gln Val Ser Tyr Lys Val Trp  
 255 260 265  
 430 435 440 445  
 cga ggc cac ctc acc cac tac acc ttg tgt gca cag agt gga acc agc 1515  
 Arg Gly His Leu Thr His Tyr Thr Leu Cys Ala Gln Ser Gly Thr Ser  
 450 455 460  
 ccc tcc gtc tgc atg aat gtg agt ggc aac aca cag agt gtc acc ctg 1563  
 Pro Ser Val Cys Met Asn Val Ser Gly Asn Thr Gln Ser Val Thr Leu  
 465 470 475  
 cct gac ctt cct tgg ggt ccc tgt gag ctg tgg gtg aca gca tct acc 1611  
 Pro Asp Leu Pro Trp Gly Pro Cys Glu Leu Trp Val Thr Ala Ser Thr  
 480 485 490  
 atc gct gga cag ggc cct cct ggt ccc atc ctc cgg ctt cat cta cca 1659  
 Ile Ala Gly Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ile Leu Arg Leu His Leu Pro  
 495 500 505  
 gat aac acc ctg agg tgg aaa gtt ctg cca ggc atc cta ttc ttg tgg 1707  
 Asp Asn Thr Leu Arg Trp Lys Val Leu Pro Gly Ile Leu Phe Leu Trp  
 510 515 520 525  
 ggc ttg ttc ctg ttg ggg tgt ggc ctg agc ctg gcc acc tct gga agg 1755  
 Gly Leu Phe Leu Leu Gly Cys Gly Leu Ser Leu Ala Thr Ser Gly Arg  
 530 535 540  
 tgc tac cac cta agg cac aaa gtg ctg ccc cgc tgg gtc tgg gag aaa 1803  
 Cys Tyr His Leu Arg His Lys Val Leu Pro Arg Trp Val Trp Glu Lys  
 545 550 555  
 gtt cct gat cct gcc aac agc agt tca ggc cag ccc cac atg gag caa 1851  
 Val Pro Asp Pro Ala Asn Ser Ser Ser Gly Gln Pro His Met Glu Gln  
 560 565 570  
 gta cct gag gcc cag ccc ctt ggg gac ttg ccc atc ctg gaa gtg gag 1899  
 Val Pro Glu Ala Gln Pro Leu Gly Asp Leu Pro Ile Leu Glu Val Glu  
 575 580 585  
 gag atg gag ccc ccg ccg gtt atg gag tcc tcc cag ccc gcc cag gcc 1947  
 Glu Met Glu Pro Pro Pro Val Met Glu Ser Ser Gln Pro Ala Gln Ala  
 590 595 600 605  
 acc gcc ccg ctt gac tct ggg tat gag aag cac ttc ctg ccc aca cct 1995

84540

198

ttc tgg gtt gga ggt cgt gag ctg agt cca gaa gga att acc tgc tgc 987  
 Phe Trp Val Gly Gly Arg Glu Leu Ser Pro Glu Gly Ile Thr Cys Cys  
 270 275 280 285  
 tgc tcc cta att ccc agt ggg cgc gag tgg gcc agg gtg tcc gct gtc 1035  
 Cys Ser Leu Ile Pro Ser Gly Ala Glu Trp Ala Arg Val Ser Ala Val  
 290 295 300  
 aac gcc aca agc tgg gag cct ctc acc aac ctc tct ttg gtc tgc ttg 1083  
 Asn Ala Thr Ser Trp Glu Pro Leu Thr Asn Leu Ser Leu Val Cys Leu  
 305 310 315  
 gat tca gcc tct gcc ccc cgt agc gtg gca gtc agc agc atc gct ggg 1131  
 Asp Ser Ala Ser Ala Pro Arg Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Ala Gly  
 320 325 330  
 agc acg gag cta ctg gtg acc tgg caa ccg ggg cct ggg gaa cca ctg 1179  
 Ser Thr Glu Leu Leu Val Thr Trp Gln Pro Gly Pro Gly Glu Pro Leu  
 335 340 345  
 gag cat gta gtg gac tgg gct cga gat ggg gac ccc ctg gag aaa ctc 1227  
 Glu His Val Val Asp Trp Ala Arg Asp Gly Asp Pro Leu Glu Lys Leu  
 350 355 360 365  
 aac tgg gtc cgg ctt ccc cct ggg aac ctc agt gct ctg tta cca ggg 1275  
 Asn Trp Val Arg Leu Pro Pro Gly Asn Leu Ser Ala Leu Leu Pro Gly  
 370 375 380  
 aat ttc act gtc ggg gtc ccc tat cga atc act gtg acc gca gtc tct 1323  
 Asn Phe Thr Val Gly Val Pro Tyr Arg Ile Thr Val Thr Ala Val Ser  
 385 390 395  
 gct tca ggc ttg gcc tct gca tcc tcc gtc tgg ggg ttc agg gag gaa 1371  
 Ala Ser Gly Leu Ala Ser Ala Ser Ser Val Trp Gly Phe Arg Glu Glu  
 400 405 410  
 tta gca ccc cta gtg ggg cca acg'ctt tgg cga ctc caa gat gcc cct 1419  
 Leu Ala Pro Leu Val Gly Pro Thr Leu Trp Arg Leu Gln Asp Ala Pro  
 415 420 425  
 cca ggg acc ccc gcc ata gcg tgg gga gag gtc cca agg cac cag ctt 1467  
 Pro Gly Thr Pro Ala Ile Ala Trp Gly Glu Val Pro Arg His Gln Leu  
 Thr Ala Pro Leu Asp Ser Gly Tyr Glu Lys His Phe Leu Pro Thr Pro  
 610 615 620  
 gag gag ctg ggc ctt ctg ggg ccc ccc agg cca cag gtt ctg gcc 2040  
 Glu Glu Leu Gly Leu Leu Gly Pro Pro Arg Pro Gln Val Leu Ala  
 625 630 635  
 tgaaccacac gtctggctgg gggctgccag ccaagctaga gggatgctca tgcaggttgc 2100  
 accccagttcc tggattagcc ctcttgatgg atgaagacac tgaggactca gagaggctga 2160  
 gtcaactacc taaggacacc cagccaggca gactgggat tgaaggacc ctatagagaa 2220  
 gggcttgccc cccatgggga agacacggat ggaagggtga gcaaggaaa atacatgaaa 2280  
 ttgagagtgg cagctgcctg ccaaaatctg ttccgctgta acagaactga atttgacc 2340  
 cagcacagtg gctcacgctt gtaatccag cacttggca ggccaagtg gaaggatcac 2400  
 ttagagctag gaggttgaga ccagcctggg caatatagca agacccctca ctacaaaaat 2460  
 aaaaatcaa aaacaaaaac aattagctgg gcatgatggc acacactgt agtcagacc 2520  
 acttgggagg ctgagtgagg aggatcggtt gagccagga gttcgaagct gcaggacct 2580  
 ctgattgcac cactgcactc caggtcggtt aacagaatga gaccttatct caaaaataaa 2640  
 caaactaata aaagca 2657  
 <210> 9  
 <211> 636  
 <212> PRT  
 <213> Людина  
 <400> 9  
 Met Arg Gly Gly Arg Gly Ala Pro Phe Trp Leu Trp Pro Leu Pro Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Trp Val Leu Phe Gln Arg Thr Arg Pro  
 20 25 30  
 Gln Gly Ser Ala Gly Pro Leu Gln Cys Tyr Gly Val Gly Pro Leu Gly  
 35 40 45  
 Asp Leu Asn Cys Ser Trp Glu Pro Leu Gly Asp Leu Gly Ala Pro Ser  
 50 55 60  
 Glu Leu His Leu Gln Ser Gln Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Val Ala Val Ala Ala Gly Arg Ser Trp Val Ala Ile Pro Arg Glu Gln  
 85 90 95  
 Leu Thr Met Ser Asp Lys Leu Leu Val Trp Gly Thr Lys Ala Gly Gln  
 100 105 110  
 Pro Leu Trp Pro Pro Val Phe Val Asn Leu Glu Thr Gln Met Lys Pro  
 115 120 125  
 Asn Ala Pro Arg Leu Gly Pro Asp Val Asp Phe Ser Gly Asp Asp Pro  
 130 135 140

199

Leu Glu Ala Thr Val His Trp Ala Pro Pro Thr Trp Pro Ser His Lys  
145 150 155 160  
Val Leu Ile Cys Gln Phe His Tyr Arg Arg Cys Gln Glu Ala Ala Trp  
165 170 175  
Thr Leu Leu Glu Pro Glu Leu Lys Thr Ile Pro Leu Thr Pro Val Glu  
180 185 190  
Ile Gln Asp Leu Glu Leu Ala Thr Gly Tyr Lys Val Tyr Gly Arg Cys  
195 200 205  
Arg Met Glu Lys Glu Glu Asp Leu Trp Gly Glu Trp Ser Pro Ile Leu  
210 215 220  
Ser Phe Gln Thr Pro Pro Ser Ala Pro Lys Asp Val Trp Val Ser Gly  
225 230 235 240  
Asn Leu Cys Gly Thr Pro Gly Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu Trp Lys  
245 250 255  
Ala Pro Gly Pro Cys Val Gln Val Ser Tyr Lys Val Trp Phe Trp Val  
260 265 270  
Gly Gly Arg Glu Leu Ser Pro Glu Gly Ile Thr Cys Cys Ser Leu  
275 280 285  
Ile Pro Ser Gly Ala Glu Trp Ala Arg Val Ser Ala Val Asn Ala Thr  
290 295 300  
Ser Trp Glu Pro Leu Thr Asn Leu Ser Leu Val Cys Leu Asp Ser Ala  
305 310 315 320  
Ser Ala Pro Arg Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Ala Gly Ser Thr Glu  
325 330 335  
Leu Leu Val Thr Trp Gln Pro Gly Pro Gly Glu Pro Leu Glu His Val  
340 345 350  
Val Asp Trp Ala Arg Asp Gly Asp Pro Leu Glu Lys Leu Asn Trp Val  
355 360 365  
Arg Leu Pro Pro Gly Asn Leu Ser Ala Leu Leu Pro Gly Asn Phe Thr  
370 375 380  
Val Gly Val Pro Tyr Arg Ile Thr Val Thr Ala Val Ser Ala Ser Gly  
385 390 395 400  
Leu Ala Ser Ala Ser Ser Val Trp Gly Phe Arg Glu Glu Leu Ala Pro  
405 410 415  
Leu Val Gly Pro Thr Leu Trp Arg Leu Gln Asp Ala Pro Pro Gly Thr  
420 425 430  
Pro Ala Ile Ala Trp Gly Glu Val Pro Arg His Gln Leu Arg Gly His  
435 440 445  
Leu Thr His Tyr Thr Leu Cys Ala Gln Ser Gly Thr Ser Pro Ser Val  
450 455 460  
Cys Met Asn Val Ser Gly Asn Thr Gln Ser Val Thr Leu Pro Asp Leu  
465 470 475 480  
Pro Trp Gly Pro Cys Glu Leu Trp Val Thr Ala Ser Thr Ile Ala Gly  
tct cag gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg 192  
Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met  
50 55 60

tca gca gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa 240  
Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu  
65 70 75 80

gca tta acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa 288  
Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys  
85 90 95

gtg ttg agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta 336  
Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu  
100 105 110

aca aac atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct 384  
Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro  
115 120 125

gga aat act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt 432  
Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val  
130 135 140

tta aag cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat 480  
Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn  
145 150 155 160

act aca tgc tgagtgatgg gggggggggg ggtgcagtgt cctcagcagt 529  
Thr Thr Cys

gcctgtcctt cgagggctga gcttgcaacc caggacttaa ctccaaaggg actgtgcggt 589  
cattactagt catgttatatt atgtttttat ttgtccact gaaatcttgt tctgctaccc 649  
tgtaggagact ggaagtggca gctatatttta ttattattatg tactgagttt gttacgcctc 709  
catggaggag ccttcagagt ctatttaata aattataattg acatga 755

<210> 11  
<211> 163  
<212> PRT

<213> М'язи миші

<400> 11

84540

200

485 490 495  
Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ile Leu Arg Leu His Leu Pro Asp Asn Thr  
500 505 510  
Leu Arg Trp Lys Val Leu Pro Gly Ile Leu Phe Leu Trp Gly Leu Phe  
515 520 525  
Leu Leu Gly Cys Gly Leu Ser Leu Ala Thr Ser Gly Arg Cys Tyr His  
530 535 540  
Leu Arg His Lys Val Leu Pro Arg Trp Val Trp Glu Lys Val Pro Asp  
545 550 555 560  
Pro Ala Asn Ser Ser Ser Gly Gln Pro His Met Glu Gln Val Pro Glu  
565 570 575  
Ala Gln Pro Leu Gly Asp Leu Pro Ile Leu Glu Val Glu Glu Met Glu  
580 585 590  
Pro Pro Pro Val Met Glu Ser Ser Gln Pro Ala Gln Ala Thr Ala Pro  
595 600 605  
Leu Asp Ser Gly Tyr Glu Lys His Phe Leu Pro Thr Pro Glu Glu Leu  
610 615 620  
Gly Leu Leu Gly Pro Pro Arg Pro Gln Val Leu Ala  
625 630 635

<210> 10  
<211> 755  
<212> ДНК  
<213> М'язи миші

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)...(489)

<400> 10  
atg atc ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc 48  
Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys  
1 5 10 15  
tgt ata gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca 96  
Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro  
20 25 30  
ata tcg aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag 144  
Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu  
35 40 45  
Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys  
1 5 10 15  
Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro  
20 25 30  
Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu  
35 40 45  
Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met  
50 55 60  
Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu  
65 70 75 80  
Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys  
85 90 95  
Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu  
100 105 110  
Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro  
115 120 125  
Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val  
130 135 140  
Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn  
145 150 155 160  
Thr Thr Cys

<210> 12  
<211> 489  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Вироджений полінуклеотид zcytor17lig миші SEQ ID  
NO.11

<222> (1).. (489)  
<223> n = A.T.C або G

<400> 12  
atgathittc ayacnggnac nacnaarccn acnytnngtn nytnntgytg yathggnacn 60  
tggtyngcna cntgywsnyt nwsnttyggn gncncnathw snaargarga yytnmgnacn 120  
acnathgayy tnytnaarca rgarwsncar gayytnaya ayaaytayws natharcar 180  
gcwsgngna tgwsngcnga ygarwsnath carytnccnt gyttyswnyt ngaymngar 240  
gcnynacna ayathwsngt nathathgcn cayytngara argtnaargt nytrwsngar 300

<221> різноманітні ознаки

201	84540	202
aayacngtng ayacwnstg ggtathmgn tgytnacna ayathwsntg ytyaayccn 360 ytnaayyna ayathwsntg nccnggnaay acngaygarw snaygaytg yaargtntty 420 gtnytnacng trytnaarca rtywsnaay tgyatggcng arytnarcg naargayaay 480 acnactngy 489		<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC29145
<210> 13 <211> 21 <212> ДНК <213> Штучна послідовність		<400> 16 gcgtctagag gggtatattg aagttgggca ggaaga 36
<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC6673		<210> 17 <211> 8 <212> PRT <213> Штучна послідовність
<400> 13 gcgcaagggtg ccgttcacag c 21		<220> <223> Gly-Ser, модифікований пептидним придатком Glu-Glu (CEE)
<210> 14 <211> 36 <212> ДНК <213> Штучна послідовність		<400> 17 Gly Ser Glu Tyr Met Pro Met Glu 1 5
<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC29082		<210> 18 <211> 33 <212> ДНК <213> Штучна послідовність
<400> 14 caatttggtg ggttttttta gcagcagtag gccccag 36		<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC29359
<210> 15 <211> 36 <212> ДНК <213> Штучна послідовність		<400> 18 gcgggatcca tgaagctctc tccccagcct tca 33
<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC29083		<210> 19 <211> 23 <212> ДНК <213> Штучна послідовність
<400> 15 ctgggcctac tgcgtctaag aaaacccaac aaattg 36		<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC27899
<210> 16 <211> 36 <212> ДНК <213> Штучна послідовність		<400> 19 ccagaacttt gactccttga ccg 23
<212> ДНК <213> Штучна послідовність		<210> 20 <211> 23 <212> ДНК <213> Штучна послідовність
<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC27895		<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC9791
<400> 20 gaagtcaact tcgctaagaa ccg 23		<400> 24 cgttccaaca aaacccaagac 20
<210> 21 <211> 34 <212> ДНК <213> Штучна послідовність		<210> 25 <211> 19 <212> ДНК <213> Штучна послідовність
<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC29122		<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC9793
<400> 21 ccgctcgagt tatattgaag ttgggcagga agac 34		<400> 25 tggcgttgac agcggacac 19
<210> 22 <211> 22 <212> ДНК <213> Штучна послідовність		<210> 26 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність
<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC29180		<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC40109
<400> 22 cctggagtcc ctgaacsgaa ag 22		<400> 26 ccattccagc accagccaac 20
<210> 23 <211> 34 <212> ДНК <213> Штучна послідовність		<210> 27 <211> 22 <212> ДНК <213> Штучна послідовність
<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC29122		<220> <223> Олігонуклеотидний праймер ZC40112
<400> 23 ccgctcgagt tatattgaag ttgggcagga agac 34		<400> 27 tacaacttca atagcatctg gg 22
<210> 24		

## 203

<210> 28  
 <211> 40  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC13496  
  
 <400> 28  
 ccctgcagtg atcaacatgg ccaagttgac cagtgccgtt  
  
 <210> 29  
 <211> 45  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC13945  
  
 <400> 29  
 gcccatggac tagtttcgaa aggtcgagtg tcagtcctgc tcctc  
  
 <210> 30  
 <211> 34  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC18698  
  
 <400> 30  
 tttttttctc gagacttttt tttttttttt tttt  
  
 <210> 31  
  
 <220>  
 <223> Плігачна послідовність  
  
 <400> 31  
 000  
  
 <210> 32  
 <211> 10  
 <400> 35  
 Glu Tyr Met Pro Met Glu  
 1 5  
  
 <210> 36  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> С-термінальна послідовність пептиду FLAG  
  
 <400> 36  
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys  
 1 5  
  
 <210> 37  
 <211> 684  
 <212> ДНК  
 <213> Людина  
  
 <400> 37  
 tcagacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagccgaggg ggcaccgtca 60  
 gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgagc ccttgaggtc 120  
 acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180  
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 240  
 taccgtgtgg tcagcgtctt caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 300  
 aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca tctccatcg agaaaaacct ctccaaagcc 360  
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgagg tgagctgacc 420  
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcttggtc aaaggttctt atccacgca catcgccgtg 480  
 gagtgggaga gcaatgggca gccggaaga aactacaaga ccagcgtccc cgtgctggac 540  
 tccgacggct ctttcttctt ctacagcaag ctacacgtgg acaagagcag gtggcagcag 600  
 gggaaactct tctcatgctc cgtgatgatc gaggtctctg acaaccacta cagcagaag 660  
 agcctctccc tgctccggg taaa 684  
  
 <210> 38  
 <211> 2295  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>

## 84540

40

45

34

## 204

<212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Пептидний придаток Glu-Glu (GEE) з парю залишків Gly-Ser  
  
 <400> 32  
 Gly Ser Gly Gly Glu Tyr Met Pro Met Glu  
 1 5 10  
  
 <210> 33  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC29451  
  
 <400> 33  
 ccggaattcc cctgatacat gaagctctct ccc 33  
  
 <210> 34  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC29124  
  
 <400> 34  
 cgcggaattccc tcaaagacac tgaatgacaa tgt 33  
  
 <210> 35  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Пептидний придаток Glu-Glu (GEE) без пари залишків Gly-Ser  
 <223> Конденсований полі пептид зсутор17-Fc4 людини  
  
 <221> CDS  
 <222> (1) (2295)  
  
 <400> 38  
 atg aag ctc tct ccc cag cct tca tgt gtt aac ctg ggg atg atg tgg 48  
 Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp  
 1 5 10 15  
  
 acc tgg gca ctg tgg atg ctc cct tca ctc tgc aaa ttc agc ctg gca 96  
 Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala  
 20 25 30  
  
 gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac tac tat agg 144  
 Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg  
 35 40 45  
  
 aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc agt tat acc 192  
 Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr  
 50 55 60  
  
 cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa cat gat aat 240  
 Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn  
 65 70 75 80  
  
 tgt aca acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tgg tgc tct ttt 288  
 Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe  
 85 90 95  
  
 ttc ctt cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att gag gtg gaa 336  
 Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu  
 100 105 110  
  
 gct gaa aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca tac tgg aga 384  
 Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg  
 115 120 125  
  
 tta gag aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc cgt gtg aaa 432  
 Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys  
 130 135 140  
  
 cca gtt ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg ata aag cct 480

205	84540	206
Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro 145 150 155 160	ctt ggg aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca gct att caa gaa Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu 325 330 335	1008
gag ttg gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt cga ttc agg Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg 165 170 175	aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc gtt gct gag gac Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp 340 345 350	1056
aca gtc aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct aag aac cgt Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg 180 185 190	cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac gtg aac act tgg Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp 355 360 365	1104
aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag cct ttt aca Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr 195 200 205	atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc acc acc ctt tcc Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser 370 375 380	1152
gaa tat gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca aag ttc tgg Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp 210 215 220	tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc cag caa gat aaa Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys 385 390 395 400	1200
agt gac tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa gaa gct cca Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro 225 230 235 240	tta aaa ccc ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat cca atg ttg cat Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His 405 410 415	1248
tgt ggc ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct gag gcg gat gga Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly 245 250 255	gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat gcc aaa gaa ggc Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly 420 425 430	1296
aga agg cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga gga gcc cca gtc Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val 260 265 270	gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac att gcc gtg aag Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys 435 440 445	1344
cta gag aaa aca ctt gcc tac aac ata tgg tac tat cca gaa agc aac Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn 275 280 285	acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt gag aga aag ggt Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly 450 455 460	1392
act aac ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag cag ctt gaa ctg Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu 290 295 300	atc atc tgc aac tac agc atc ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gga Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly 465 470 475 480	1440
cat ctg gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att tct tat aat tct His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser 305 310 315 320	ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac gcc ctg gag tcc Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser 485 490 495	1488
ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg gcc agc acc agt Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser 500 505 510	gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 660 665 670	2064
gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca ttg tca ttc Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe 515 520 525	gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 675 680 685	2064
agt gtc ttt gag gag ccc aga tct tca gac aaa act cac aca tgc cca Ser Val Phe Glu Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro 530 535 540	ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 690 695 700	2112
ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe 545 550 555 560	gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac gcc tcc Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser 705 710 715 720	2160
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val 565 570 575	ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 725 730 735	2208
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe 580 585 590	ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 740 745 750	2256
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro 595 600 605	tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys * 755 760	2295
cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr 610 615 620	<210> 39 <211> 764 <212> PRT <213> Штучна послідовність	
gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat gcc aag gag tac aag tgc aag gtc Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 625 630 635 640	<220> <223> Конденсований поліпептид зсутор17-Fc4 людини	
tcc aac aaa gcc ctc cfa tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 645 650 655	<400> 39 Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp 1 5 10 15 Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala 20 25 30 Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Arg 35 40 45 Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr	
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		

**207**

50 55 60  
 Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe  
 85 90 95  
 Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu  
 100 105 110  
 Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg  
 115 120 125  
 Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys  
 130 135 140  
 Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg  
 165 170 175  
 Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg  
 180 185 190  
 Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr  
 195 200 205  
 Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp  
 210 215 220  
 Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro  
 225 230 235 240  
 Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly  
 245 250 255  
 Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val  
 260 265 270  
 Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn  
 275 280 285  
 Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu  
 290 295 300  
 His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu  
 325 330 335  
 Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp  
 340 345 350  
 Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp  
 355 360 365  
 Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys  
 385 390 395 400

740 745 750  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 755 760

<210> 40  
 <211> 34  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC29157

<400> 40  
 ctgatatgac cggccatgaa gctctctccc cagc 34

<210> 41  
 <211> 41  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC29150

<400> 41  
 gtctgaagat ctgggctcct caaagacact gaatgacaat g 41

<210> 42  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC41458

<400> 42  
 tggacactgc actaaatca.t 21

<210> 43  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

**84540**

**208**

Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His  
 405 410 415  
 Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly  
 420 425 430  
 Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys  
 435 440 445  
 Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly  
 450 455 460  
 Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly  
 465 470 475 480  
 Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser  
 485 490 495  
 Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser  
 500 505 510  
 Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe  
 515 520 525  
 Ser Val Phe Glu Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
 530 535 540  
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 545 550 555 560  
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 565 570 575  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 580 585 590  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 595 600 605  
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 610 615 620  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 625 630 635 640  
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 645 650 655  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 660 665 670  
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 675 680 685  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 690 695 700  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 705 710 715 720  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 725 730 735  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC41457

<400> 43  
 aatcacggca gagttccac ac 22

<210> 44  
 <211> 100  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC12749

<400> 44  
 gtacctccc gtaaatccct ccccttccc gaattacacc cgcgtatttc ccagaaaagg 60  
 aactgtagat ttctaggaat tcaatccttg gccacgcgtc 100

<210> 45  
 <211> 100  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC12748

<400> 45  
 tcgagacgcg tggccaagga ttgaattcct agaaatctac agttcctttt ctgggaata 60  
 cgcgggtgta attccgggaa ggggagggat ttacgggaag 100

<210> 46  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC10651

<400> 46  
 agcttttctg cagcagctct 20

<210> 47  
 <211> 23

209	84540	210
<212> ДНК	<211> 21	
<213> Штучна послідовність	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
<220>	<220>	
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC1G565	<223> Олігонуклеотидний праймер ZC38065	
<400> 47	<400> 51	
tttcagaaa aggttgcaaa tgc	ctttcctggg aatctgtgtc t	21
<210> 48	<210> 52	
<211> 25	<211> 18	
<212> ДНК	<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	<213> Штучна послідовність	
<220>	<220>	
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC14063	<223> Олігонуклеотидний праймер ZC38068	
<400> 48	<400> 52	
caccagacat aatagctgac agact	cctccagctc tggctgtg	18
<210> 49	<210> 53	
<211> 21	<211> 24	
<212> ДНК	<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	<213> Штучна послідовність	
<220>	<220>	
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC17574	<223> Олігонуклеотидний праймер ZC37877	
<400> 49	<400> 53	
ggttrttgtctc agcatgcaca c	caaaaaacc aacaattga ctca	24
<210> 50	<210> 54	
<211> 24	<211> 25	
<212> ДНК	<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	<213> Штучна послідовність	
<220>	<220>	
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC17600	<223> Олігонуклеотидний праймер ZC37876	
<400> 50	<400> 54	
catgtaggcc atgaggtcca ccac	catgtggcta tactacttctc agcag	25
<210> 51	<210> 59	
<210> 55	<220>	
<211> 22	<223> Пливаюча послідовність	
<212> ДНК	<400> 59	
<213> Штучна послідовність	000	
<220>	<210> 60	
<223> Репортерний зонд zcytor17TaqMan®	<211> 21	
<400> 55	<212> ДНК	
ctgtgttgcc ccaccgttcc ca	<213> Штучна послідовність	
<210> 56	<220>	
<211> 20	<223> Олігонуклеотидний праймер ZC41458	
<212> ДНК	<400> 60	
<213> Штучна послідовність	tggacctcgc actaaatca t	21
<220>	<210> 61	
<223> Передній праймер рРНК	<211> 22	
<400> 56	<212> ДНК	
cggtaccac atccaaggaa	<213> Штучна послідовність	
<210> 57	<220>	
<211> 18	<223> Олігонуклеотидний праймер ZC41457	
<212> ДНК	<400> 61	
<213> Штучна послідовність	aatcacggca gagtccac ac	22
<220>	<210> 62	
<223> Зворотній праймер рРНК	<211> 19	
<400> 57	<212> ДНК	
gctggaatta ccgcggt	<213> Штучна послідовність	
<210> 58	<220>	
<211> 22	<223> Олігонуклеотидний праймер ZC41459	
<212> ДНК	<400> 62	
<213> Штучна послідовність	agaaggcgt gctcgtgtc	19
<220>	<210> 63	
<223> Зонд рРНК TaqMan®		
<400> 58		
tgctggcacc agacttgccc tc		

## 211

<211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC4146Q  
  
 <400> 63  
 ccggatggct ggcctgtg 18  
  
 <210> 64  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC39982  
  
 <400> 64  
 aatgtctgtg tagcataagg tatga 25  
  
 <210> 65  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC39983  
  
 <400> 65  
 cctgcctacc tgaaaaccag aa 22  
  
 <210> 66  
 <211> 36  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC39980  
  
 <400> 66  
 ttggaattcg ccaccatggc tctatttgca gtcttt 36  
 85 90 95  
  
 tgg agc tgg gaa tct gag ctc cct ttg gaa tgt gcc aca cac ttt gta 336  
 Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr His Phe Val  
 100 105 110  
  
 aga ata aag agt ttg gtg gac gat gcc aag ttc cct gag cca aat ttc 384  
 Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu Pro Asn Phe  
 115 120 125  
  
 tgg agc aac tgg agt tcc tgg gag gaa gtc agt gta caa gat tct act 432  
 Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln Asp Ser Thr  
 130 135 140  
  
 gga cag gat ata ttg ttc gtt ttc cct aaa gat aag ctg gtg gaa gaa 480  
 Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu Val Glu Glu  
 145 150 155 160  
  
 ggc acc aat gtt acc att tgt tac gtt tct agg aac att caa aat aat 528  
 Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile Gln Asn Asn  
 165 170 175  
  
 gta tcc tgt tat ttg gaa ggg aaa cag att cat gga gaa caa ctt gat 576  
 Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu Gln Leu Asp  
 180 185 190  
  
 cca cat gta act gca ttc aac ttg aat agt gtg cct ttc att agg aat 624  
 Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe Ile Arg Asn  
 195 200 205  
  
 aaa ggg aca aat atc tat tgt gag gca agt caa gga aat gtc agt gaa 672  
 Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn Val Ser Glu  
 210 215 220  
  
 ggc atg aaa ggc atc gtt ctt ttt gtc tca aaa gta ctt gag gag ccc 720  
 Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro  
 225 230 235 240  
  
 aag gac ttt tct tgt gaa acc gag gac ttc aag act ttg cac tgt act 768  
 Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu His Cys Thr  
 245 250 255  
  
 tgg gat cct ggg acg gac act gcc ttg ggg tgg tct aaa caa cct tcc 816

## 84540

## 212

<210> 67  
 <211> 28  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZC39981  
  
 <400> 67  
 ctgtctcgag tgctggttag cagtggtc 28  
  
 <210> 68  
 <211> 2217  
 <212> ДНК  
 <213> Людина  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(2217)  
  
 <400> 68  
 atg gct cta ttt gca gtc ttt cag aca aca ttc ttc tta aca ttg ctg 48  
 Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Leu Thr Leu Leu  
 1 5 10 15  
  
 tcc ttg agg act tac cag agt gaa gtc ttg gct gaa cgt tta cca ttg 96  
 Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg Leu Pro Leu  
 20 25 30  
  
 act cct gta tca ctt aaa gtt tcc acc aat tct acg cgt cag agt ttg 144  
 Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg Gln Ser Leu  
 35 40 45  
  
 cac tta caa tgg act gtc cac aac ctt cct tat cat cag gaa ttg aaa 192  
 His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln Glu Leu Lys  
 50 55 60  
  
 atg gta ttt cag atc cag atc agt agg att gaa aca tcc aat gtc atc 240  
 Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser Asn Val Ile  
 65 70 75 80  
  
 tgg gtg ggg aat tac agc acc act gtg aag tgg aac cag gtt ctg cat 288  
 Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Trp Asn Gln Val Leu His  
  
 Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys Gln Pro Ser  
 260 265 270  
  
 caa agc tac act tta ttt gaa tca ttt tct ggg gaa aag aaa ctt tgt 864  
 Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys Lys Leu Cys  
 275 280 285  
  
 aca cac aaa aac tgg tgt aat tgg caa ata act caa gac tca caa gaa 912  
 Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp Ser Gln Glu  
 290 295 300  
  
 acc tat aac ttc aca ctc ata gct gaa aat tac tta agg aag aga agt 960  
 Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg Lys Arg Ser  
 305 310 315 320  
  
 gtc aat atc ctt ttt aac ctg act cat cga gtt tat tta atg aat cct 1008  
 Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu Met Asn Pro  
 325 330 335  
  
 ttt agt gtc aac ttt gaa aat gta aat gcc aca aat gcc atc atg acc 1056  
 Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala Ile Met Thr  
 340 345 350  
  
 tgg aag gtg cac tcc ata agg aat aat ttc aca tat ttg tgt cag att 1104  
 Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu Cys Gln Ile  
 355 360 365  
  
 gaa ctc cat ggt gaa gga aaa atg atg caa tac aat gtt tcc atc aag 1152  
 Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val Ser Ile Lys  
 370 375 380  
  
 gtg aac ggt gag tac ttc tta agt gaa ctg gaa cct gcc aca gag tac 1200  
 Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr  
 385 390 395 400  
  
 atg gcg cga gta cgg tgt gct gat gcc agc cac ttc tgg aaa tgg agt 1248  
 Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp Lys Trp Ser  
 405 410 415  
  
 gaa tgg agt ggt cag aac ttc acc aca ctt gaa gct gct ccc tca gag 1296  
 Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala Pro Ser Glu  
 420 425 430

## 213

gcc cct gat gtc tgg aga att gtg agc ttg gag cca gga aat cat act 1344  
Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly Asn His Thr  
435 440 445

gtg acc tta ttc tgg aag cca tta tca aaa ctg cat gcc aat gga aag 1392  
Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala Asn Gly Lys  
450 455 460

atc ctg ttc tat aat gta gtt gta gaa aac cta gac aaa cca tcc agt 1440  
Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Val Glu Asn Leu Asp Lys Pro Ser Ser  
465 470 475 480

tca gag ctc cat tcc att cca gca cca gcc aac agc aca aaa cta atc 1488  
Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys Leu Ile  
485 490 495

ctt gac agg tgt tcc tac caa atc tgc gtc ata gcc aac aac agt gtg 1536  
Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val  
500 505 510

ggg gct tct cct gct tct gta ata gtc atc tct gca gac ccc gaa aac 1584  
Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn  
515 520 525

aaa gag gtt gag gaa gaa aga att gca ggc aca gag ggt gga ttc tct 1632  
Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Phe Ser  
530 535 540

ctg tct tgg aaa ccc caa cct gga gat gtt ata ggc tat gtt gtg gac 1680  
Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp  
545 550 555 560

tgg tgt gac cat acc cag gat gtg ctc ggt gat ttc cag tgg aag aat 1728  
Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn  
565 570 575

gta ggt ccc aat acc aca agc aca gtc att agc aca gat gct ttt agg 1776  
Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg  
580 585 590

cca gga gtt cga tat gac ttc aga att tat ggg tta tct aca aaa agg 1824  
Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg  
595 600 605

<400> 69  
Met Ala Leu Phe Ala Val Phe Gln Thr Thr Phe Phe Leu Thr Leu Leu  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Thr Tyr Gln Ser Glu Val Leu Ala Glu Arg Leu Pro Leu  
20 25 30  
Thr Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Thr Asn Ser Thr Arg Gln Ser Leu  
35 40 45  
His Leu Gln Trp Thr Val His Asn Leu Pro Tyr His Gln Glu Leu Lys  
50 55 60  
Met Val Phe Gln Ile Gln Ile Ser Arg Ile Glu Thr Ser Asn Val Ile  
65 70 75 80  
Trp Val Gly Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Trp Asn Gln Val Leu His  
85 90 95  
Trp Ser Trp Glu Ser Glu Leu Pro Leu Glu Cys Ala Thr His Phe Val  
100 105 110  
Arg Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Ala Lys Phe Pro Glu Pro Asn Phe  
115 120 125  
Trp Ser Asn Trp Ser Ser Trp Glu Glu Val Ser Val Gln Asp Ser Thr  
130 135 140  
Gly Gln Asp Ile Leu Phe Val Phe Pro Lys Asp Lys Leu Val Glu Glu  
145 150 155 160  
Gly Thr Asn Val Thr Ile Cys Tyr Val Ser Arg Asn Ile Gln Asn Asn  
165 170 175  
Val Ser Cys Tyr Leu Glu Gly Lys Gln Ile His Gly Glu Gln Leu Asp  
180 185 190  
Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe Ile Arg Asn  
195 200 205  
Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn Val Ser Glu  
210 215 220  
Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro  
225 230 235 240  
Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu His Cys Thr  
245 250 255  
Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys Gln Pro Ser  
260 265 270  
Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys Lys Leu Cys  
275 280 285  
Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp Ser Gln Glu  
290 295 300  
Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg Lys Arg Ser  
305 310 315 320  
Val Asn Ile Leu Phe Asn Leu Thr His Arg Val Tyr Leu Met Asn Pro  
325 330 335

## 84540

## 214

att gct tgt tta tta gag aaa aaa aca gga tac tct cag gaa ctt gct 1872  
Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala  
610 615 620

cct tca gac aac cct cac gtg ctg gtg gat aca ttg aca tcc cac tcc 1920  
Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser  
625 630 635 640

ttc act ctg agt tgg aaa gat tac tct act gaa tct caa cct ggt ttt 1968  
Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe  
645 650 655

ata caa ggg tac cat gtc tat ctg aaa tcc aag gcg agg cag tgc cac 2016  
Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His  
660 665 670

cca cga ttt gaa aag gca gtt ctt tca gat ggt tca gaa tgt tgc aaa 2064  
Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys  
675 680 685

tac aaa att gac aac ccg gaa gaa aag gca ttg att gtg gac aac cta 2112  
Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu  
690 695 700

aag cca gaa tcc ttc tat gag ttt ttc atc act cca ttc act agt gct 2160  
Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala  
705 710 715 720

ggg gaa ggc ccc agt gct acg ttc acg aag gtc acg act ccg gat gaa 2208  
Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu  
725 730 735

cac tcc tcg 2217  
His Ser Ser

<210> 69  
<211> 739  
<212> PRT  
<213> Людина  
Phe Ser Val Asn Phe Glu Asn Val Asn Ala Thr Asn Ala Ile Met Thr  
340 345 350  
Trp Lys Val His Ser Ile Arg Asn Asn Phe Thr Tyr Leu Cys Gln Ile  
355 360 365  
Glu Leu His Gly Glu Gly Lys Met Met Gln Tyr Asn Val Ser Ile Lys  
370 375 380  
Val Asn Gly Glu Tyr Phe Leu Ser Glu Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr  
385 390 395 400  
Met Ala Arg Val Arg Cys Ala Asp Ala Ser His Phe Trp Lys Trp Ser  
405 410 415  
Glu Trp Ser Gly Gln Asn Phe Thr Thr Leu Glu Ala Ala Pro Ser Glu  
420 425 430  
Ala Pro Asp Val Trp Arg Ile Val Ser Leu Glu Pro Gly Asn His Thr  
435 440 445  
Val Thr Leu Phe Trp Lys Pro Leu Ser Lys Leu His Ala Asn Gly Lys  
450 455 460  
Ile Leu Phe Tyr Asn Val Val Val Glu Asn Leu Asp Lys Pro Ser Ser  
465 470 475 480  
Ser Glu Leu His Ser Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys Leu Ile  
485 490 495  
Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val  
500 505 510  
Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn  
515 520 525  
Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Phe Ser  
530 535 540  
Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp  
545 550 555 560  
Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn  
565 570 575  
Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg  
580 585 590  
Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg  
595 600 605  
Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala  
610 615 620  
Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser  
625 630 635 640  
Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe  
645 650 655  
Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His  
660 665 670  
Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys

**215**

675 680 685  
Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu  
690 695 700  
Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala  
705 710 715 720  
Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu  
725 730 735  
His Ser Ser

<210> 70  
<211> 1557  
<212> ДНК  
<213> Людина

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)...(1557)

<400> 70  
atg atg tgg acc tgg gca ctg tgg atg ctc ccc tca ctc tgc aaa ttc 48  
Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe  
1 5 10 15  
agc ctg gca gct ctg cca gct aag cct gag aac att tcc tgt gtc tac 96  
Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr  
20 25 30  
tac tat agg aaa aat tta acc tgc act tgg agt cca gga aag gaa acc 144  
Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr  
35 40 45  
agt tat acc cag tac aca gtt aag aga act tac gct ttt gga gaa aaa 192  
Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys  
50 55 60  
cat gat aat tgt aca acc aat agt tct aca agt gaa aat cgt gct tgg 240  
His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser  
65 70 75 80  
tgc tct ttt ttc ctt cca aga ata acg atc cca gat aat tat acc att 288  
Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile

Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro  
260 265 270  
gaa agc aac act aac ctc aca gaa aca atg aac act act aac cag cag 864  
Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln  
275 280 285  
ctt gaa ctg cat ctg gga ggc gag agc ttt tgg gtg tct atg att tct 912  
Leu Glu Leu His Leu Gly Glu Ser Phe Thr Val Ser Met Ile Ser  
290 295 300  
tat aat tct ctt ggg aag tct cca gtg gcc acc ctg agg att cca gct 960  
Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala  
305 310 315 320  
att caa gaa aaa tca ttt cag tgc att gag gtc atg cag gcc tgc gtt 1008  
Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val  
325 330 335  
gct gag gac cag cta gtg gtg aag tgg caa agc tct gct cta gac gtg 1056  
Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val  
340 345 350  
aac act tgg atg att gaa tgg ttt ccg gat gtg gac tca gag ccc acc 1104  
Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr  
355 360 365  
acc ctt tcc tgg gaa tct gtg tct cag gcc acg aac tgg acg atc cag 1152  
Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln  
370 375 380  
caa gat aaa tta aaa cct ttc tgg tgc tat aac atc tct gtg tat cca 1200  
Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro  
385 390 395 400  
atg ttg cat gac aaa gtt ggc gag cca tat tcc atc cag gct tat gcc 1248  
Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala  
405 410 415  
aaa gaa ggc gtt cca tca gaa ggt cct gag acc aag gtg gag aac att 1296  
Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile  
420 425 430

**84540**

**216**

85 90 95  
gag gtg gaa gct gaa aat gga gat ggt gta att aaa tct cat atg aca 336  
Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr  
100 105 110  
tac tgg aga tta gag aac ata gcg aaa act gaa cca cct aag att ttc 384  
Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe  
115 120 125  
cgt gtg aaa cca gtt ttg ggc atc aaa cga atg att caa att gaa tgg 432  
Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp  
130 135 140  
ata aag cct gag ttg gcg cct gtt tca tct gat tta aaa tac aca ctt 480  
Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu  
145 150 155 160  
cga ttc agg aca gtc aac agt acc agc tgg atg gaa gtc aac ttc gct 528  
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala  
165 170 175  
aag aac cgt aag gat aaa aac caa acg tac aac ctc acg ggg ctg cag 576  
Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln  
180 185 190  
cct ttt aca gaa tat gtc ata gct ctg cga tgt gcg gtc aag gag tca 624  
Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser  
195 200 205  
aag ttc tgg agt gac tgg agc caa gaa aaa atg gga atg act gag gaa 672  
Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu  
210 215 220  
gaa gct cca tgt ggc ctg gaa ctg tgg aga gtc ctg aaa cca gct gag 720  
Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu  
225 230 235 240  
gcg gat gga aga agg cca gtg cgg ttg tta tgg aag aag gca aga gga 768  
Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly  
245 250 255  
gcc cca gtc cta gag aaa aca ctt gcc tac aac ata tgg tac tat cca 816  
gcc gtg aag acg gtc acg atc aca tgg aaa gag att ccc aag agt gag 1344  
Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu  
435 440 445  
aga aag ggt atc atc tgc aac tac acc atc ttt tac caa gct gaa ggt 1392  
Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly  
450 455 460  
gga aaa gga ttc tcc aag aca gtc aat tcc agc atc ttg cag tac gcc 1440  
Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly  
465 470 475 480  
ctg gag tcc ctg aaa cga aag acc tct tac att gtt cag gtc atg gcc 1488  
Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala  
485 490 495  
agc acc agt gct ggg gga acc aac ggg acc agc ata aat ttc aag aca 1536  
Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr  
500 505 510  
ttg tca ttc agt gtc ttt gag 1557  
Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu  
515

<210> 71  
<211> 519  
<212> PRT  
<213> Людина

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

## 217

Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr  
100 105 110  
Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Lys Ile Phe  
115 120 125  
Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp  
130 135 140  
Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu  
145 150 155 160  
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala  
165 170 175  
Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln  
180 185 190  
Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser  
195 200 205  
Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu  
210 215 220  
Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu  
225 230 235 240  
Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly  
245 250 255  
Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Pro  
260 265 270  
Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln  
275 280 285  
Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser  
290 295 300  
Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala  
305 310 315 320  
Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val  
325 330 335  
Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val  
340 345 350  
Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr  
355 360 365  
Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln  
370 375 380  
Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro  
385 390 395 400  
Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala  
405 410 415  
Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile  
420 425 430  
Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Олігонуклеотидний праймер ZC41557

&lt;400&gt; 74

ttatagatct cagaggagtgt tcatccggag t 31

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 65

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Олігонуклеотидний праймер ZC29232

&lt;400&gt; 75

cgactgactc gactcagtga tggatgatgt gatggccacc tgatccttta cccggagaca 60  
ggagag 65

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 3196

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; М'язи миші

&lt;400&gt; 76

tgtatgtctg cacagtttgt gtatgcctgg tgcccacaga ggctcgaag tgtcagattc 60  
cccccaaac tggagttaca gttttgagcc gccccatgct tgaatgaat caaacctggg 120  
tcctctgaaa gagcatccag tgcattgaac cactgaacca tctctcaaaa ccatgaacat 180  
cactttaatt ttttttaata gttaaaggat attttgattc taaagatgta aaagaactgc 240  
tcacctattt tgaattttgg taataaatgt ttcttcaaa cttaaaaaaa ttagtccagg 300  
tttttttttt ttttcagta gtgatttgtc aagtcgacca aactggctta gaatttgtga 360  
ccctctgtgc tcagcatact gagtgtaaag attacaagtg cacccectac ccagttccca 420  
taattaaactg atccaccccc acccccctac caccceactc ccatgtgctg ggcaagtaac 480  
tcttgagccc catctctggtt ctgagatctg aagtcacaaa ggtgcaggtg aagaacgaag 540  
gacaagggca ggccctggag cacagatgcc ttctcttat gccctccctg tgttccactag 600  
agccatcccc ctgcccggg aattccacaa gatggatcgc tctgtgctt cttaaaaactt 660  
ccctgcaggg cactgacctc cagcccctct aagtcacttc ttcccagatt attgtacttt 720  
tcaatcgagg tcaaacattf cctctcatta aatcagcaag cactttccaa gaaaaggagag 780  
atgctcaaga tgccttctgt tgtgtatgt gtatgcgttt gtgtgtgtgc acgcattgtg 840  
gtgcattgga ctcaactctt gccttgctc tgagggtaac ctacagcatt ccttccagcc 900  
ctgcttctcc caggccgagc cagggctggc aaccttttga aaatgttttc tggagaaaag 960  
ctgagcaatg gttttgccat ggccgggctt ttgactgtct tcctcatgac aaccttttat 1020  
atattgctgt gtggccatgt cgaacacacc aggcctccaga gaccacaggc aaagcgggcc 1080

## 84540

## 218

435 440 445  
Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly  
450 455 460  
Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly  
465 470 475 480  
Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala  
485 490 495  
Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr  
500 505 510  
Leu Ser Phe Ser Val Phe Glu  
515

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; С-термінальний пептидний придаток His

&lt;400&gt; 72

Gly Ser Gly Gly His His His His His His  
1 5 10

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Gly-Ser спейсер 12 амінокислот

&lt;400&gt; 73

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Pro Arg Ser  
1 5 10

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

ttctcactc tcttaccgtc gccatgatct tccacacagg taccgctggc tccacacgca 1140  
gctcagcatg gcttcagctc catggctctt atcatgttag gggaaaggagc cgggaatggc 1200  
tgctcagatg ggttgctgga cagaggctgt tgtaactgaa gctgggatgg gcaggggcat 1260  
ctgacctatc agctccatgg tatctcttct tttctccagg aacaacgaag cctaccctgg 1320  
tgcgtcttgg ctgtatagga acctggctgg ccacctgcag cttgtccttc ggtgcccaca 1380  
tatcgaaagg agacttaaga actacaattg acctcttgaa acaagagtct caggatcttt 1440  
ataacaacta tgtaagtgc cttgagattg tttttctta accatttctt taaaatgctt 1500  
tattttgeta tctaagcaca gctatccttt ctgatataa agccagctat ggaagccaga 1560  
gaggcatggg gaacattgg aattcggtt gggtgaaatg tttccaagg ggttaaatgca 1620  
ctagcagaag agcgagaggc agactggtcc agggactgaa acctggcag cttacgaaac 1680  
actacaggat gtatgctccc tgaattcttt atctcaaatc caccggctc acagtcccta 1740  
ctaaccgagc attcttgctg aaaggcctc cttagagaag gggcagctg attcaggaat 1800  
cccccaagag caatgagagc cagtttcagc agccaagat gtctagtgg aagcagggtg 1860  
tgaggatctt cctttgggtc tccgtgact aactaggcaa ctgtctgtgt gttcttgag 1920  
catctctggg ggccctctgc ctggccagag cctggcacag gtacagcaca ggaccagaa 1980  
agtgtgaata ctctatttc ttgggaccgc ttagataact tcagttgag caagtaaac 2040  
ggaaactgat ggagacacag ataacctccc tgccctctc acttcagta ctgagctcc 2100  
gagaacaggt tgcagatggc taaggggcagc ctacgcaga taggcggagg cagactgggt 2160  
agaagcatcc ttaggaaaca cggccaacct ggggtgggtat gccatgtct ctgactcata 2220  
agccaactag accttcgatt cctgtagaca cagagttagt gatggcccaa gcttcagaag 2280  
gtgtgtgac caattagata aggtctgagg caggctagac acagaggag ccttggaaat 2340  
gagctgttct gagctgtagg gttgttaca atgtctctct tacaatattt caaacctct 2400  
ctttctacag agcataaagc aggcactgg gatgtcagca gacgaatcaa tacagtgcc 2460  
gtgtttcagc ctggaccggg aagcattaac caacatctcg gtcactatag cacatctgga 2520  
gaaagtcaaa gtgttgagcg agaacacagt agatactct tgggtgataa gatggctaac 2580  
aaacatcagc tgtttcaacc cactgaattt aaacatttct gtgcttgtaa atactgatga 2640  
atcctatgat tgtaaatgt tctgtcttac ggttttaag cagttctcaa actgcatggc 2700  
agaactgcag gctaaggaca atactcatg ctgagtgatg gggggggggg ggtgcagttg 2760  
cctcagcagt gctgtctctt cgaggcgcta gcttgcaacc caggacttaa ctccaaaggg 2820  
actgtcggt cattactagt catgttattt atgttttat ttgtccact gaaatcttgt 2880  
tctgtaccc ttagaggact ggaagtggca gctatatta ttattattat tactgagtt 2940  
gttaacgctc catggaggag ccttcagagt ctatttaata aattatattg acatgatac 3000  
ataactagt ttggaatttg tgatggggtt gaaatcaag attaggaatg tcttggaaat 3060  
agtttatgct acctctccc tccattagac agactcatga gcaataatc ccacagcat 3120  
cacgtgcatg ataacatct ttgttccagg tcaatagtc aatcactgtc cttttggtat 3180  
tgaggctgga aactaa 3196

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

## 219

<223> Олігонуклеотидний праймер ZC28575

<400> 77  
ccaggaaagg aaaccagtta tacc

<210> 78  
<211> 23  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC21195

<400> 78  
gaggagacca taacssccga cag

<210> 79  
<211> 23  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC21196

<400> 79  
catagctccc accacacgat ttt

<210> 80  
<211> 25  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC26358

<400> 80  
aaaassaas gtасаасѣс асggg

<210> 81  
<211> 25  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC28918

<400> 85  
tcacagagtc atcagactcc

<210> 86  
<211> 18  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC41498

<400> 86  
ggctccagag accacagg

<210> 87  
<211> 22  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC41496

<400> 87  
atgactagta atgaccgcac ag

<210> 88  
<211> 39  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC41583

<400> 88  
cgtacgggcc ggccaccatg atcttcaca caggaaaca

<210> 89  
<211> 36  
<212> ДНК

## 84540

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC26359

<400> 81  
gagcagccat acaccagagc agaca

<210> 82  
<211> 19  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC29179

<400> 82  
gcagggttg gaacggtgg

<210> 83  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC28917

<400> 83  
tgcaagatgc tggattgac

<210> 84  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC28916

<400> 84  
agtcaattcc agcatctgc

<210> 85  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Штучна послідовність

<400> 89 Олігонуклеотидний праймер ZC41584  
tgacgaggcg cgcctcagca ttagtattg tcctta

<210> 90  
<211> 650  
<212>  
<213> ДНК  
М'язи миші

<220>  
<221> CDS  
<222> (53)...(542)

<400> 90  
ggctccagag accacaggca aagcgggct tctcaactct cttaccgtcg cc atg atc 58  
Met Ile  
1

ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc tgt ata 106  
Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys Cys Ile  
5 10 15

gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca ata tcg 154  
Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro Ile Ser  
20 25 30

aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag tct cag 202  
Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu Ser Gln  
35 40 45 50

gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg tca gca 250  
Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met Ser Ala  
55 60 65

gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa gca tta 298  
Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu Ala Leu  
70 75 80

acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa gtg ttg 346

## 220

## 221

Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys Val Leu  
85 90 95

agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta aca aac 394  
Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu Thr Asn  
100 105 110

atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct gga aat 442  
Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro Gly Asn  
115 120 125 130

act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt tta aag 490  
Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val Leu Lys  
135 140 145

cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat act aca 538  
Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn Thr Thr  
150 155 160

tgc t gactgatggg ggggggggtgc agtgcctca gcagtgccgt tccttcgagg 592  
Cys

gctgagcttg caaccaggca cttaactcca aagggactgt gcggtcatta ctatgcat 650

<210> 91  
<211> 163  
<212> PRT  
<213> М'язи миші

<400> 91  
Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys  
1 5 10 15  
Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro  
20 25 30  
Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu  
35 40 45  
Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met  
50 55 60  
Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu  
65 70 75 80  
Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys  
85 90 95  
gccatggcct ctactcagg c 21

<210> 94  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC41437

<400> 94  
ccagggaagca ttgacaactc ttag 24

<210> 95  
<211> 516  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Полінуклеотид zCytot17Lig-СБЕ людини

<221> CDS  
<222> (1)...(516)

<400> 95  
atg gcc tct cac tca ggc ccc tgc acg tct gtg ctc ttt ctg ttc tgc 48  
Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys  
1 5 10 15

tgc ctg gga ggc tgg ctg gcc tcc cac acg ttg ccc gtc cgt tta cta 96  
Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu  
20 25 30

cga cca agt gat gat gta cag aaa ata gtc gag gaa tta cag tcc ctc 144  
Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu  
35 40 45

tgc aag atg ctt ttg aaa gat gtg gag gaa gag aag ggc gtg ctc gtg 192  
Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu Glu Glu Lys Gly Val Leu Val  
50 55 60

tcc cag aat tac acg ctg ccg tgt ctc agc cct gac gcc cag ccg cca 240  
Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro Cys Leu Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro

## 84540

## 222

Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu  
100 105 110

Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro  
115 120 125

Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val  
130 135 140

Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn  
145 150 155 160

Thr Thr Cys

<210> 92  
<211> 511  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Рестрикційний сайт w/FseI та Ascl клонованої послідовності  
кДНК миші та часткова KOZAK-послідовність до відкритої  
рамки читування mcytor17lig та термінальний кодон

<400> 92  
ggccggccac catgatcttc cacacaggaa caacgaagcc taccttggt ctgctttgct 60  
gtataggaac ctggctggcc acctgcagct tgccttcgg tgccccaata tcgaaggaag 120  
acttaagaac tacaattgac ctcttgaac aagagtctca ggatctttat aacaactata 180  
gcataaagca ggcacttggg atgtcagcag acgaatcaat acagctgcgg tgtttcagcc 240  
tggaccggga agcattaacc aacatctcgg tcatcatagc acatctggag aaagtcgaag 300  
tgttgagcga gaacacagta gatacttctt ggggtgataag atggctaaca aacatcagct 360  
gtttcaaccc actgaattta aacatttctg tgccctgaaa tactgatgaa tcctatgatt 420  
gtaaagtgtt cgtgcttacg gttttaagc agttctcaaa ctgcattggca gaactgcagg 480  
ctaaggacaa tactacatgc tgaggcgcgc c 511

<210> 93  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC41438

<400> 93  
65 70 75 80

aac aac atc cac agc cca gcc atc cgg gca tat ctc aag aca atc aga 288  
Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg  
85 90 95

cag cta gac aac aaa tct gtt att gat gag atc ata gag cac ctc gac 336  
Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp Glu Ile Ile Glu His Leu Asp  
100 105 110

aaa ctc ata ttt caa gat gca cca gaa aca aac att tct gtg cca aca 384  
Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr  
115 120 125

gac acc cat gaa tgt aaa cgc ttc atc ctg act att tct caa cag ttt 432  
Asp Thr His Glu Cys Lys Arg Phe Ile Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe  
130 135 140

tca gag tgc atg gac ctc gca cta aaa tca ttg acc tct gga gcc caa 430  
Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln  
145 150 155 160

cag gcc acc act gaa gaa tac atg ccg atg gaa taa 516  
Gln Ala Thr Thr Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu \*  
165 170

<210> 96  
<211> 171  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Полінуклеотид zCytot17Lig-СБЕ людини

<400> 96  
Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys  
1 5 10 15  
Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu  
20 25 30  
Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu  
35 40 45  
Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu Glu Glu Lys Gly Val Leu Val

## 223

50 55 60  
 Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro Cys Leu Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro  
 65 70 75 80  
 Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg  
 85 90 95  
 Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp Glu Ile Ile Glu His Leu Asp  
 100 105 110  
 Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr  
 115 120 125  
 Asp Thr His Glu Cys Lys Arg Phe Ile Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe  
 130 135 140  
 Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln  
 145 150 155 160  
 Gln Ala Thr Thr Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu  
 165 170

<210> 97  
 <211> 49  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZCZC41607

<400> 97  
 tccagggaat tcatataggc cgccaccat ggcctctcac tcaggcccc 49

<210> 98  
 <211> 82  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Олігонуклеотидний праймер ZCZC41605

<400> 98  
 caaccccaga gctgttttaa ggcgcgctc tagattatta ttccatcggc atgtattctt 60  
 cagtgtggc ctgttggct cc 62

<210> 99  
 <211> 629  
 <212> ДНК  
 ctt aac gat ctg gag aca gtg cta acc tct aga cca cct cag ccc gca 486  
 Leu Asn Asp Leu Glu Thr Val Leu Thr Ser Arg Pro Pro Gln Pro Ala  
 140 145 150

tct ggc tcc gtc tct cct aac cgt gga acc gtg gaa tgt taa 528  
 Ser Gly Ser Val Ser Pro Asn Arg Gly Thr Val Glu Cys \*  
 155 160 165

aacagcaggc agagcaccta aagtctgaat gtctctcatg gccatggc aaaaggattt 588  
 tacattcctt tatgccatca aatgtcttat caatttatct a 629

<210> 100  
 <211> 166  
 <212> PRT  
 <213> М'язи миші

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

<210> 101  
 <211> 674

## 84540

<213> М'язи миші

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (28)...(528)

<400> 99  
 aaccccttgg aggaccagaa cgagaca atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc 54  
 Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser  
 1 5

atc cac acc atg ctg ctc ctg ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc 102  
 Ile His Thr Met Leu Leu Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu  
 10 15 20 25

caa gct tca atc agt ggc cgg gat acc cac cgt tta acc aga acg ttg 150  
 Gln Ala Ser Ile Ser Gly Arg Asp Thr His Arg Leu Thr Arg Thr Leu  
 30 35 40

aat tgc agc tct att gtc aag gag att ata ggg aag ctc cca gaa cct 198  
 Asn Cys Ser Ser Ile Val Lys Glu Ile Ile Gly Lys Leu Pro Glu Pro  
 45 50 55

gaa ctc aaa act gat gat gaa gga ccc tct ctg agg aat aag agc ttt 246  
 Glu Leu Lys Thr Asp Asp Glu Gly Pro Ser Leu Arg Asn Lys Ser Phe  
 60 65 70

cgg aga gta aac ctg tcc aaa ttc gtg gaa agc caa gga gaa gtg gat 294  
 Arg Arg Val Asn Leu Ser Lys Phe Val Glu Ser Gln Gly Glu Val Asp  
 75 80 85

cct gag gac aga tac gtt atc aag tcc aat ctt cag aaa ctt aac tgt 342  
 Pro Glu Asp Arg Tyr Val Ile Lys Ser Asn Leu Gln Lys Leu Asn Cys  
 90 95 100 105

tgc ctg cct aca tct gcg aat gac tct gcg ctg cca ggg gtc ttc att 390  
 Cys Leu Pro Thr Ser Ala Asn Asp Ser Ala Leu Pro Gly Val Phe Ile  
 110 115 120

cga gat ctg gat gac ttt cgg aag aaa ctg aga ttc tac atg gtc cac 438  
 Arg Asp Leu Asp Asp Phe Arg Lys Lys Leu Arg Phe Tyr Met Val His  
 125 130 135

<212> ДНК  
 <213> Людина

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (10)...(464)

<400> 101  
 gatccaaac atg agc cgc ctg ccc gtc ctg ctc ctg ctc caa ctc ctg gtc 51  
 Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val  
 1 5 10

cgc ccc gga ctc caa gct ccc atg acc cag aca acg tcc ttg aag aca 99  
 Arg Pro Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Ser Leu Lys Thr  
 15 20 25 30

agc tgg gtt aac tgc tct aac atg atc gat gaa att ata aca cac tta 147  
 Ser Trp Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu  
 35 40 45

aag cag cca cct ttg cct ttg ctg gac ttc aac aac ctc aat ggg gaa 195  
 Lys Gln Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu  
 50 55 60

gac caa gac att ctg atg gaa aat aac ctt cga agg cca aac ctg gag 243  
 Asp Gln Asp Ile Leu Met Glu Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu  
 65 70 75

gca ttc aac agg gct gtc aag agt tta cag aac gca tca gca att gag 291  
 Ala Phe Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu  
 80 85 90

agc att ctt aaa aat ctc ctg cca tgt ctg ccc ctg gcc acg gcc gca 339  
 Ser Ile Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala  
 95 100 105 110

ccc acg cga cat cca atc cat atc aag gac ggt gac tgg aat gaa ttc 387  
 Pro Thr Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe  
 115 120 125

cgg agg aaa ctg acg ttc tat ctg aaa acc ctt gag aat gcg cag gct 435  
 Arg Arg Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala  
 130 135 140

## 225

caa cag acg act ttg agc ctc gcg atc tt ttagtccaac gtccagctcg 484  
Gln Gln Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile  
145 150

ttctctgggc cttctacca cagcgctcg ggacatcaaa aacagcagaa cttctgaaac 544  
ctctgggtca tctctcacac attccaggac cagaagcatt tcaccttttc ctgcggcatc 604  
agatgaattg ttaattatct aattttcgaa atgtgcagct cccatttggc cttgtgcggt 664  
tgtgttctca 674

<210> 102  
<211> 151  
<212> PRT  
<213> Людина

<400> 102  
Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val Arg Pro  
1 5 10 15  
Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Ser Leu Lys Thr Ser Trp  
20 25 30  
Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln  
35 40 45  
Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln  
50 55 60  
Asp Ile Leu Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe  
65 70 75 80  
Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile  
85 90 95  
Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr  
100 105 110  
Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg  
115 120 125  
Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln  
130 135 140  
Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile  
145 150

<210> 103  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

85 90 95  
gtg ttg agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta 336  
Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu  
100 105 110  
aca aac atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct 384  
Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro  
115 120 125  
gga aat act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt 432  
Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val  
130 135 140  
tta aag cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat 480  
Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn  
145 150 155 160  
act aca tgc gaa gaa tac atg ccg atg gaa tga 513  
Thr Thr Cys Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu \*  
165 170

<210> 105  
<211> 170  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Полінуклеотид zCytot17Lig(m) -СБЕ людини

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

## 84540

<220>  
<223> Альтернативний пептидний придаток Glu-Glu  
(CEE) без пари залишків Gly-Ser

<400> 103  
Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu  
1 5

<210> 104  
<211> 513  
<212> DMA  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Полінуклеотид zCytot17Lig-СБЕ людини

<221> CDS  
<222> (1)...(513)

<400> 104  
atg atc ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc 48  
Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys  
1 5 10 15  
tgt ata gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca 96  
Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro  
20 25 30  
ata tgc aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag 144  
Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu  
35 40 45  
tct cag gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg 192  
Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met  
50 55 60  
tca gca gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa 240  
Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu  
65 70 75 80

gca tta acc aac atc tgc gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa 288  
Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys  
85 90 95  
Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu  
100 105 110  
Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro  
115 120 125  
Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val  
130 135 140  
Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn  
145 150 155 160  
Thr Thr Cys Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu  
165 170

<210> 106  
<211> 49  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC41643

<400> 106  
tccagggaat tcatataggc cggccaccat gatcttccac acaggaaca 49

<210> 107  
<211> 85  
<212> DNA  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC41641

<400> 107  
caaccccaaga gctgttttaa ggcgcgcctc tagattatca ttccatcggc atgtattctt 60  
cgcatgtagt attgtcctta gcctg 85

<210> 108  
<211> 19  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC38,239

227

<400> 108  
gcccgaactaag ccaagaagaac

<210> 109  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC38,245

<400> 109  
ctgttgacag ttctgaaccg

<210> 110  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер ZC38,238

<400> 110  
cgcggtttcc attgtatctg

<210> 111  
<211> 2748  
<212> ДНК  
<213> М'язи миші

<220>  
<221> CDS  
<222> (237)...(2222)

<400> 111  
gatggggccc tgaatgttga tctgacagaa ttccagacca acctgggtgtg tattgtcctt 60  
ttcatctggg catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaagggtgct gctgtccggg 120  
ctctcagaga aggcagtgct ggaggcgttc ctggcccggg tctctctcta ctgttctctg 180  
tagccagacc ttctcggggg ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg 239  
Met 1

cgg ttc aga act gtc aac agt agc cgc tgg acg gaa gtc aat ttt gaa 815  
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe Glu  
180 185 190

aac tgt aaa cag gtc tgc aac ctc aca gga ctt cag gct ttc aca gaa 863  
Asn Cys Lys Glu Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Glu Ala Phe Thr Glu  
195 200 205

tat gtc ctg gct cta cga ttc agg ttc aat gac tca aga tat tgg agc 911  
Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp Ser  
210 215 220 225

aag tgg agc aaa gaa gaa acc aga gtc act atg gag gaa gtt cca cat 959  
Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro His  
230 235 240

gtc ctg gac ctg tgg aga att ctg gaa cca gca gac atg aac gga gac 1007  
Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly Asp  
245 250 255

agg aag gtg cga ttg ctg tgg aag aag gca aga gga gcc ccc gtc ttg 1055  
Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val Leu  
260 265 270

gag aaa aca ttt ggc tac cac ata cag tac ttt gca gag aac agc act 1103  
Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser Thr  
275 280 285

aac ctc aca gag ata aac aac atc acc acc cag cag tat gaa ctg ctt 1151  
Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu Leu  
290 295 300 305

ctg atg agc cag gca cac tct gtc tcc gtc act tct ttt aat tct ctt 1199  
Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser Leu  
310 315 320

ggc aag tcc caa gag acc atc ctg agg atc cca gat gtc cat gag aag 1247  
Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu Lys  
325 330 335

acc ttc cag tac att aag agc atg cag gcc tac ata gcc gag ccc ctg 1295  
Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro Leu

84540

228

ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac 287  
Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala His  
5 10 15

gtc cag cct ctg ggt gtg aac gct gga ata atg tgg acc ttg gca ctg 335  
Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala Leu  
20 25 30

tgg gca ttc tct ttc ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gtc ctg ccg act 383  
Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro Thr  
35 40 45

aag cca gag aac att tcc tgc gtc ttt tac ttc gac aga aat ctg act 431  
Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu Thr  
50 55 60 65

tgc act tgg aga cca gag aag gaa acc aat gat acc agc tac att gtg 479  
Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile Val  
70 75 80

act ttg act tac tcc tat gga aaa agc aat tat agt gac aat gct aca 527  
Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala Thr  
85 90 95

gag gct tca tat tct ttt ccc cgt tcc tgt gca atg ccc cca gac atc 575  
Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp Ile  
100 105 110

tgc agt gtt gaa gta caa gct caa aat gga gat ggt aaa gtt aaa tct 623  
Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Val Lys Ser  
115 120 125

gac atc aca tat tgg cat tta atc tcc ata gca aaa acc gaa cca cct 671  
Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro  
130 135 140 145

ata att tta agt gtg aat cca att tgt aat aga atg ttc cag ata caa 719  
Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile Gln  
150 155 160

tgg aaa ccg cgt gaa aag act cgt ggg ttt cct tta gta tgc atg ctt 767  
Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met Leu  
165 170 175  
340 345 350

ttg gtg gtg aac tgg caa agc tcc att cct gcg gtg gac act tgg ata 1343  
Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp Ile  
355 360 365

gtg gag tgg ctc cca gaa gct gcc atg tgc aag ttc cct gcc ctt tcc 1391  
Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu Ser  
370 375 380 385

tgg gaa tct gtg tct cag gtc acg aac tgg acc atc gag caa gat aaa 1439  
Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp Lys  
390 395 400

cta aaa cct ttc aca tgc tat aat ata tca gtg tat cca gtg ttg gga 1487  
Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu Gly  
405 410 415

cac cga gtt gga gag ccg tat tca atc caa gct tat gcc aaa gaa gga 1535  
His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly  
420 425 430

act cca tta aaa ggt cct gag acc agg gtg gag aac atc ggt ctg agg 1583  
Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu Arg  
435 440 445

aca gcc acg atc aca tgg aag gag att cct aag agt gct agg aat gga 1631  
Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn Gly  
450 455 460 465

ttt atc aac aat tac act gta ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gaa 1679  
Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Glu  
470 475 480

ctc tcc aag act gtt aac tct cat gcc ctg cag tgt gac ctg gag tct 1727  
Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu Ser  
485 490 495

ctg aca cga agg acc tct tat act gtt tgg gtc atg gcc agc acc aga 1775  
Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr Arg  
500 505 510

gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc 1823

## 229

Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile  
515 520 525

agt gtg ttt gaa att gtc ctt cta aca tct cta gtt gga gga ggc ctt 1871  
Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly Leu  
530 535 540 545

ctt cta ctt agc atc aaa aca gtg act ttt ggc ctc aga aag cca aac 1919  
Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro Asn  
550 555 560

cgg ttg act ccc ctg tgt tgt cct gat gtt ccc aac cct gct gaa agt 1967  
Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser  
565 570 575

agt tta gcc aca tgg ctc gga gat ggt ttc aag aag tca aat atg aag 2015  
Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Lys Ser Asn Met Lys  
580 585 590

gag act gga aac tct ggg aac aca gaa gac gtg gtc cta aaa cca tgt 2063  
Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Leu Lys Pro Cys  
595 600 605

ccc gtc ccc gcg gat ctc att gac aag ctg gta gtg aac ttt gag aat 2111  
Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Glu Asn  
610 615 620 625

ttt ctg gaa gta gtt ttg aca gag gaa gct gga aag ggt cag gcg agc 2159  
Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala Gly Lys Gly Gln Ala Ser  
630 635 640

att ttg gga gga gaa gcg aat gag tat atc tta tcc cag gaa cca agc 2207  
Ile Leu Gly Gly Glu Ala Asn Glu Thr Ile Leu Ser Gln Glu Pro Ser  
645 650 655

tgt cct ggc cat tgc tgaagctacc ctcagggtcc aggacagctg tctgtgtggc 2262  
Cys Pro Gly His Cys  
660

acttgactct ggcaggaacc tgactctac tttctctctc cctgtctcgc gacactttct 2322  
ctccttcagc cagagaccag gactagagcg gattctctcat ggtttgccag gctcctcagt 2382  
ccttgctcgg gctcaggatc tcaacaatg cctcttctgg gacactccat catccactta 2442  
tatttatatt ttgcaacatt gtggattgaa cccagggtact tgttatgcg cgcacttca 2502  
245 250 255

Asp Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val  
260 265 270

Leu Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser  
275 280 285

Thr Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu  
290 295 300

Leu Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser  
305 310 315 320

Leu Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu  
325 330 335

Lys Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro  
340 345 350

Leu Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp  
355 360 365

Ile Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu  
370 375 380

Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp  
385 390 395 400

Lys Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu  
405 410 415

Gly His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu  
420 425 430

Gly Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu  
435 440 445

Arg Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn  
450 455 460

Gly Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys  
465 470 475 480

Glu Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu  
485 490 495

Ser Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr  
500 505 510

Arg Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser  
515 520 525

Ile Ser Val Phe Glu Ile Val Leu Leu Thr Ser Leu Val Gly Gly Gly  
530 535 540

Leu Leu Leu Leu Ser Ile Lys Thr Val Thr Phe Gly Leu Arg Lys Pro  
545 550 555 560

Asn Arg Leu Thr Pro Leu Cys Cys Pro Asp Val Pro Asn Pro Ala Glu  
565 570 575

Ser Ser Leu Ala Thr Trp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Lys Ser Asn Met  
580 585 590

## 84540

## 230

gtaactgtgg cagagactta ggaatggaga tctgacctt tgcagaaggt tcttgacat 2562  
cctgacctgt gtgagcctca gacagcattg tctttacttt gaatcagctt ccaagttaat 2622  
aaaagaaaaa cagagaggtg gcataacagc tctgtcttc tgacctgttt gagttccagt 2682  
tctgacttcc ttgtgtgatg aacagcaatg tgggaagtgt aagctgaata aaccctttcc 2742  
tcccca 2748

<210> 112  
<211> 662  
<212> PRT  
<213> М'язи миші

<400> 112  
Met Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala  
1 5 10 15  
His Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala  
20 25 30  
Leu Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro  
35 40 45  
Thr Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu  
50 55 60  
Thr Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile  
65 70 75 80  
Val Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala  
85 90 95  
Thr Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp  
100 105 110  
Ile Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys  
115 120 125  
Ser Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro  
130 135 140  
Pro Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile  
145 150 155 160  
Gln Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met  
165 170 175  
Leu Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe  
180 185 190  
Glu Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr  
195 200 205  
Glu Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp  
210 215 220  
Ser Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro  
225 230 235 240  
His Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly

Lys Glu Thr Gly Asn Ser Gly Asn Thr Glu Asp Val Val Leu Lys Pro  
595 600 605  
Cys Pro Val Pro Ala Asp Leu Ile Asp Lys Leu Val Val Asn Phe Glu  
610 615 620  
Asn Phe Leu Glu Val Val Leu Thr Glu Glu Ala Gly Lys Gly Gln Ala  
625 630 635 640  
Ser Ile Leu Gly Gly Glu Ala Asn Glu Tyr Ile Leu Ser Gln Glu Pro  
645 650 655  
Ser Cys Pro Gly His Cys  
660

<210> 113  
<211> 2728  
<212> ДНК  
<213> М'язи миші

<220>  
<221> CDS  
<222> (237)...(1877)

<400> 113  
gatggggccc tgaatgttga tctgacagaa ttccagacca acctgggtgt tattgtcctt 60  
ttcatctggt catgctgaat atactctcaa gatgtgctgg agaaggtgct gctgtccggg 120  
ctctcagaga aggcagtgtc ggaggcgttc ctggcccggg tctctccta ctgttccctg 180  
tagccagacc ttctcggggt ggaaggagaa gctggccagg tgagctctga ggaagc atg 239  
Met  
1

ctg agc agc cag aag gga tcc tgc agc cag gaa cca ggg gca gcc cac 287  
Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala His  
5 10 15

gtc cag cct ctg ggt gtg aac gct gga ata atg tgg acc ttg gca ctg 335  
Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala Leu  
20 25 30

tgg gca ttc tct ttc ctc tgc aaa ttc agc ctg gca gtc ctg ccg act 383  
Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro Thr  
35 40 45

aag cca gag aac att tcc tgc gtc ttt tac ttc gac aga aat ctg act 431  
Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu Thr

231

50 55 60 65

tgc act tgg aga cca gag aag gaa acc aat gat acc agc tac att gtg 479  
Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile Val  
70 75 80

act ttg act tac tcc tat gga aaa agc aat tat agt gac aat gct aca 527  
Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala Thr  
85 90 95

gag gct tca tat tct ttt ccc cgt tcc tgt gca atg ccc cca gac atc 575  
Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp Ile  
100 105 110

tgc agt gtt gaa gta caa gct caa aat gga gat ggt aaa gtt aaa tct 623  
Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys Ser  
115 120 125

gac atc aca tat tgg cat tta atc tcc ata gca aaa acc gaa cca cct 671  
Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro  
130 135 140 145

ata att tta agt gtg aat cca att tgt aat aga atg ttc cag ata caa 719  
Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile Gln  
150 155 160

tgg aaa ccg cgt gaa aag act cgt ggg ttt cct tta gta tgc atg ctt 767  
Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met Leu  
165 170 175

cgg ttc aga act gtc aac agt agc cgc tgg acg gaa gtc aat ttt gaa 815  
Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe Glu  
180 185 190

aac tgt aaa cag gtc tgc aac ctc aca gga ctt cag gct ttc aca gaa 863  
Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr Glu  
195 200 205

tat gtc ctg gct cta cga ttc agt ttc aat gac tca aga tat tgg agc 911  
Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp Ser  
210 215 220 225

aag tgg agc aaa gaa gaa acc aga gtg act atg gag gaa gtt cca cat 959

cta aaa cct ttc aca tgc tat aat ata tca gtg tat cca gtg ttg gga 1487  
Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu Gly  
405 410 415

cac cga gtt gga gag ccg tat tca atc caa gct tat gcc aaa gaa gga 1535  
His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly  
420 425 430

act cca tta aaa ggt cct gag acc agt gtg gag aac atc ggt ctg agt 1583  
Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu Arg  
435 440 445

aca gcc acg atc aca tgg aag gag att cct aag agt gct agt aat gga 1631  
Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn Gly  
450 455 460 465

ttt atc aac aat tac act gta ttt tac caa gct gaa ggt gga aaa gaa 1679  
Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Glu  
470 475 480

ctc tcc aag act gtt aac tct cat gcc ctg cag tgt gac ctg gag tct 1727  
Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu Ser  
485 490 495

ctg aca cga agg acc tct tat act gtt tgg gtc atg gcc agc acc aga 1775  
Leu Thr Arg Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr Arg  
500 505 510

gct gga ggt acc aac ggg gtg aga ata aac ttc aag aca ttg tca atc 1823  
Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Ile  
515 520 525

agt gag tac tgg ctt cag gcc tca ttc tgg agt tta ctt cgg gtt gga 1871  
Ser Glu Tyr Trp Leu Gln Ala Ser Phe Trp Ser Leu Leu Arg Val Gly  
530 535 540 545

aat gtt tgacaggagc aaggagagcc agcagagggc agcagagcat ggcttctctt 1927  
Asn Val

gctctctctg gctcactcac ctcccaggag ttactgagga gctggcaaa ggagggtga 1987  
gttagaccac caggccattt tgatcctgc tggtaagcag ccacaaataa tcttaagatg 2047  
aagcaagcaa catccacttc agcctcagcc agtcaaaagg ctgttgccctg agctcacact 2107

84540

Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro His 230 235 240

gtc ctg gac ctg tgg aga att ctg gaa cca gca gac atg aac gga gac 1007  
Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly Asp  
245 250 255

agg aag gtg cga ttg ctg tgg aag aag gca aga gga gcc ccc gtc ttg 1055  
Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val Leu  
260 265 270

gag aaa aca ttt ggc tac cac ata cag tac ttt gca gag aac agc act 1103  
Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser Thr  
275 280 285

aac ctc aca gag ata aac aac atc acc acc cag cag tat gaa ctg ctt 1151  
Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu Leu  
290 295 300 305

ctg atg agc cag gca cac tct gtg tcc gtg act tct ttt aat tct ctt 1199  
Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser Leu  
310 315 320

ggc aag tcc caa gag acc atc ctg agg atc cca gat gtc cat gag aag 1247  
Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu Lys  
325 330 335

acc ttc cag tac att aag agc atg cag gcc tac ata gcc gag ccc ctg 1295  
Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro Leu  
340 345 350

ttg gtg gtg aac tgg caa agc tcc att cct cgc gtg gac act tgg ata 1343  
Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp Ile  
355 360 365

gtg gag tgg ctc cca gaa gct gcc atg tgg aag ttc cct gcc ctt tcc 1391  
Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu Ser  
370 375 380 385

tgg gaa tct gtg tct cag gtc acg aac tgg acc atc gag caa gat aaa 1439  
Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp Lys  
390 395 400

ggccagttcc taaatgtcag gagttgtgca atagaacctg ggaaggaaca actggtgat 2167  
cagaggtcac tgacaaggga cttaagtta ccatctgcgg tggggctttt gtttcgtttt 2227  
gtttgtttgt tatgtgtatt caacttatca gcttttacct tgaatacatg aaaagcaaga 2287  
caaatgtgtt agatacacata tataatgtga aatataatg tttataattt gactagga 2347  
gctgagggca tgtaatatag agagggaata gaagaggaaa gccagttcgg tctacaagt 2407  
gagttccagg acagccagg cracatggag aaacctgtgc tcaatcaatc aatcaatcaa 2467  
tcaatcagtc aatcaatcaa aattcaagca gcattgacaa gttttgcaat aactactata 2527  
aaccacaaaa gtcactttga tgtatctcag aagcccttgg ttatttatgt tcttgaagac 2587  
taaagttagac cgtggctctg agaaccatga gcaagataac acgttctgtc ctgcagcccta 2647  
acaatgcctt cttggtattc tttttgatac aacttctaaa ataacttttt tttacaaaaa 2707  
ataaaaatca tgttacagct a 2728

<210> 114  
<211> 547  
<212> PRT  
<213> М'язи миші

<400> 114  
Met Leu Ser Ser Gln Lys Gly Ser Cys Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ala  
1 5 10 15  
His Val Gln Pro Leu Gly Val Asn Ala Gly Ile Met Trp Thr Leu Ala  
20 25 30  
Leu Trp Ala Phe Ser Phe Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala Val Leu Pro  
35 40 45  
Thr Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Phe Tyr Phe Asp Arg Asn Leu  
50 55 60  
Thr Cys Thr Trp Arg Pro Glu Lys Glu Thr Asn Asp Thr Ser Tyr Ile  
65 70 75 80  
Val Thr Leu Thr Tyr Ser Tyr Gly Lys Ser Asn Tyr Ser Asp Asn Ala  
85 90 95  
Thr Glu Ala Ser Tyr Ser Phe Pro Arg Ser Cys Ala Met Pro Pro Asp  
100 105 110  
Ile Cys Ser Val Glu Val Gln Ala Gln Asn Gly Asp Gly Lys Val Lys  
115 120 125  
Ser Asp Ile Thr Tyr Trp His Leu Ile Ser Ile Ala Lys Thr Glu Pro  
130 135 140  
Pro Ile Ile Leu Ser Val Asn Pro Ile Cys Asn Arg Met Phe Gln Ile  
145 150 155 160  
Gln Trp Lys Pro Arg Glu Lys Thr Arg Gly Phe Pro Leu Val Cys Met  
165 170 175  
Leu Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Ser Arg Trp Thr Glu Val Asn Phe  
180 185 190  
Glu Asn Cys Lys Gln Val Cys Asn Leu Thr Gly Leu Gln Ala Phe Thr

233

195 200 205  
 Glu Tyr Val Leu Ala Leu Arg Phe Arg Phe Asn Asp Ser Arg Tyr Trp  
 210 215 220  
 Ser Lys Trp Ser Lys Glu Glu Thr Arg Val Thr Met Glu Glu Val Pro  
 225 230 235 240  
 His Val Leu Asp Leu Trp Arg Ile Leu Glu Pro Ala Asp Met Asn Gly  
 245 250 255  
 Asp Arg Lys Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val  
 260 265 270  
 Leu Glu Lys Thr Phe Gly Tyr His Ile Gln Tyr Phe Ala Glu Asn Ser  
 275 280 285  
 Thr Asn Leu Thr Glu Ile Asn Asn Ile Thr Thr Gln Gln Tyr Glu Leu  
 290 295 300  
 Leu Leu Met Ser Gln Ala His Ser Val Ser Val Thr Ser Phe Asn Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Lys Ser Gln Glu Thr Ile Leu Arg Ile Pro Asp Val His Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Phe Gln Tyr Ile Lys Ser Met Gln Ala Tyr Ile Ala Glu Pro  
 340 345 350  
 Leu Leu Val Val Asn Trp Gln Ser Ser Ile Pro Ala Val Asp Thr Trp  
 355 360 365  
 Ile Val Glu Trp Leu Pro Glu Ala Ala Met Ser Lys Phe Pro Ala Leu  
 370 375 380  
 Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Val Thr Asn Trp Thr Ile Glu Gln Asp  
 385 390 395 400  
 Lys Leu Lys Pro Phe Thr Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Val Leu  
 405 410 415  
 Gly His Arg Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu  
 420 425 430  
 Gly Thr Pro Leu Lys Gly Pro Glu Thr Arg Val Glu Asn Ile Gly Leu  
 435 440 445  
 Arg Thr Ala Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Asn  
 450 455 460  
 Gly Phe Ile Asn Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys  
 465 470 475 480  
 Glu Leu Ser Lys Thr Val Asn Ser His Ala Leu Gln Cys Asp Leu Glu  
 485 490 495  
 Ser Leu Thr Arg Thr Ser Tyr Thr Val Trp Val Met Ala Ser Thr  
 500 505 510  
 Arg Ala Gly Gly Thr Asn Gly Val Arg Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser  
 515 520 525  
 Ile Ser Glu Tyr Trp Leu Gln Ala Ser Phe Trp Ser Leu Leu Arg Val  
 530 535 540  
 <223> Праймер ZC41.766  
 <400> 118  
 atctctagat gtttactgtt caccttg 27  
 <210> 119  
 <211> 4026  
 <212> ДНК  
 <213> М'язи миші  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (780)...(3692)  
 <400> 119  
 ctgtggacat ttaccatgc agccataaag agaggtcaaa aatgtcttcc aagtgcccg 60  
 ttagtaaga tctgatggcg ttctaaggag agaaaggaac ttgatcttcc gtgacaaag 120  
 aattcagggtc ttagatgcaa ggagggcgtgg ccacacaggg cgtttccagg tctgttagag 180  
 gaagcacagt tcatagatct ctgttctaac acgtctgtct tgccttgaac gccgaagtc 240  
 aactcgatca caagtttgat ccaacagttt gacatttcag gtaattttca gacggagcgc 300  
 tggggtttga tctcccaagc aacacaattg gctctgtgca ggaacactgg cagggggcac 360  
 tgggtgcgag ctggtccctc ctccctccag gaacaacgat gctcaaggac cagcttttcc 420  
 tcccaggcct ctccacactc cttctcacc ggtgtgccc gcccggtccc gggaaccgcg 480  
 cccgtgcgag ggtcccgatc gttccccccta catccttgg gaccaggagc aaattcctgt 540  
 ggggtccagg agtgccaaaa gtgtcagcg agacgggaaa ttgcaacagt acttggccct 600  
 tcggccctcc cccggcgctt tcccgtaact cccgccctg gacacttgtc cgtagttaga 660  
 ttcatactcg gggcgcgggg ccgcctccac acgcttgag agacgtccgc gcccgttccc 720  
 ctgtgagccc gaggaccggc aaggctccgg agcaggtcgc caggcgggta atcagacca 779  
 atg gct ttc tct gtg gtc ctt cat cca gcc ttc ctc ctg gca gtg ctg 827  
 Met Ala Phe Ser Val Val Leu His Pro Ala Phe Leu Leu Ala Val Leu  
 1 5 10 15  
 tcc ctg agg gca tcc cga agc gaa gtc ttg gag gag cct tta cca ttg 875  
 Ser Leu Arg Ala Ser Arg Ser Glu Val Leu Glu Glu Pro Leu Pro Leu  
 20 25 30  
 act cct gag ata cat aag gtt tct ttt caa ttg aaa ctt caa gaa gtg 923  
 Thr Pro Glu Ile His Lys Val Ser Phe Gln Leu Lys Leu Gln Glu Val  
 35 40 45  
 aat tta gaa tgg act gtc cca gcc ctt act cat gaa gaa tta aac atg 971  
 Asn Leu Glu Trp Thr Val Pro Ala Leu Thr His Glu Glu Leu Asn Met  
 50 55 60

84540

234

Gly Asn Val  
 545  
 <210> 115  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Праймер ZC41.764  
 <400> 115  
 atcgattca gaccaatggc tttctctgtg 30  
 <210> 116  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Праймер ZC41.598  
 <400> 116  
 acagtagtgt tctgactcag ttgg 24  
 <210> 117  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Праймер ZC41.948  
 <400> 117  
 ggtactgttc tctttgtctc g 21  
 <210> 118  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 ata ttt cag ata gag atc agt aga ctg aac ata tcc aac acc atc tgg 1019  
 Ile Phe Gln Ile Glu Ile Ser Arg Leu Asn Ile Ser Asn Thr Ile Trp  
 65 70 75 80  
 gtg gag aat tat agc acc act gtg aag cgt gaa gaa gct gtg cgt tgg 1067  
 Val Glu Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Arg Glu Glu Ala Val Arg Trp  
 85 90 95  
 aac tgg acg tct gat atc cct ttg gag tgt gtc aaa cat ttc ata aga 1115  
 Asn Trp Thr Ser Asp Ile Pro Leu Glu Cys Val Lys His Phe Ile Arg  
 100 105 110  
 atc agg gct ctg gta gat gac acc aag tcc ctt cca cag agt tcc tgg 1163  
 Ile Arg Ala Leu Val Asp Asp Thr Lys Ser Leu Pro Gln Ser Ser Trp  
 115 120 125  
 ggc aac tgg agt tcc tgg aaa gaa gtt aat gca aag gtt tcc gtt gaa 1211  
 Gly Asn Trp Ser Ser Trp Lys Glu Val Asn Ala Lys Val Ser Val Glu  
 130 135 140  
 cct gat aaa tca tta ata ttt cct aaa gac aaa gtg ttg gaa gaa ggc 1259  
 Pro Asp Lys Ser Leu Ile Phe Pro Lys Asp Lys Val Leu Glu Glu Gly  
 145 150 155 160  
 tcc aat gtc acc atc tgt ctg atg tat ggg cag aat gta tat aat gta 1307  
 Ser Asn Val Thr Ile Cys Leu Met Tyr Gly Gln Asn Val Tyr Asn Val  
 165 170 175  
 tcc tgt aag ttg caa gat gag cca atc cat gga gaa caa ctt gat tcc 1355  
 Ser Cys Lys Leu Gln Asp Glu Pro Ile His Gly Glu Gln Leu Asp Ser  
 180 185 190  
 cac gtg tca tta tta aaa ttg aac aat gta gtt ttc ctt agt gac aca 1403  
 His Val Ser Leu Leu Lys Leu Asn Asn Val Val Phe Leu Ser Asp Thr  
 195 200 205  
 ggg aca aac atc aat tgt caa gcc acg aag ggt cct aaa aga ata ttt 1451  
 Gly Thr Asn Ile Asn Cys Gln Ala Thr Lys Gly Pro Lys Arg Ile Phe  
 210 215 220  
 ggt act gtt ctc ttt gtc tgc aaa gtg ctc gag gaa cct aag aat gtt 1499  
 Gly Thr Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro Lys Asn Val

235

225 230 235 240

tcc tgt gaa acc cga gac ttt aag act ttg gac tgt tca tgg gaa cct 1547  
 Ser Cys Glu Thr Arg Asp Phe Lys Thr Leu Asp Cys Ser Trp Glu Pro  
 245 250 255

ggg gta gat acg act ttg act tgg cgt aaa caa aga ttc caa aac tac 1595  
 Gly Val Asp Thr Thr Leu Thr Trp Arg Lys Gln Arg Phe Gln Asn Tyr  
 260 265 270

act tta tgt gaa tgg ttc tct aag aga tgt gag gtt tct aac tac agg 1643  
 Thr Leu Cys Glu Ser Phe Ser Lys Arg Cys Glu Val Ser Asn Tyr Arg  
 275 280 285

aac tcc tat acc tgg caa atc act gaa ggc tca cag gaa atg tat aac 1691  
 Asn Ser Tyr Thr Trp Gln Ile Thr Glu Gly Ser Gln Glu Met Tyr Asn  
 290 295 300

ttt act ctc aca gct gaa aac caa cta agg aaa aga agt gtc aac att 1739  
 Phe Thr Leu Thr Thr Ala Glu Asn Gln Leu Arg Lys Arg Ser Val Asn Ile  
 305 310 315 320

aat ttt aac ctg acc cat aga gtt cat cca aag gct ccg cag gac gtc 1787  
 Asn Phe Asn Leu Thr His Arg Val His Pro Lys Ala Pro Gln Asp Val  
 325 330 335

acc ctt aaa att ata ggt gct aca aaa gcc aac atg act tgg aag gtt 1835  
 Thr Leu Lys Ile Ile Gly Ala Thr Lys Ala Asn Met Thr Trp Lys Val  
 340 345 350

cac tcc cat gga aac aac tac aca ctt ttg tgt cag gtt aaa ctc caa 1883  
 His Ser His Gly Asn Asn Tyr Thr Leu Leu Cys Gln Val Lys Leu Gln  
 355 360 365

tat gga gaa tgg att cat gag cac aat gtt tct gtc cac atg agc gca 1931  
 Tyr Gly Glu Val Ile His Glu His Asn Val Ser Val His Met Ser Ala  
 370 375 380

aac tac ctc ttc agt gat ctg gat cca gac aca aag tac aag gct ttt 1979  
 Asn Tyr Leu Phe Ser Asp Leu Asp Pro Asp Thr Lys Tyr Lys Ala Phe  
 385 390 395 400

gtg cgc tgt gca agt gcc aac cac ttc tgg aaa tgg agc gac tgg acc 2027  
 acc aca agc acc acc atc acc tca gat gat ttt aaa cca ggc gtc cgt 2555  
 Thr Thr Ser Thr Thr Ile Thr Ser Asp Asp Phe Lys Pro Gly Val Arg  
 580 585 590

tac aac ttc aga att ttt gaa agg tct gtg gaa cac aaa gct cgg tta 2603  
 Tyr Asn Phe Arg Ile Phe Glu Arg Ser Val Glu His Lys Ala Arg Leu  
 595 600 605

gta gag aaa caa aga gga tac acc cag gaa ctg gct cct ttg gtg aat 2651  
 Val Glu Lys Gln Arg Gly Tyr Thr Gln Glu Leu Ala Pro Leu Val Asn  
 610 615 620

cca aaa gtg gag att cct tac tgg acc cct aac tcc ttc gtt cta aga 2699  
 Pro Lys Val Glu Ile Pro Tyr Ser Thr Pro Asn Ser Phe Val Leu Arg  
 625 630 635 640

tgg cca gat tat gac agc gac ttc cag gct ggt ttt ata aaa ggg tac 2747  
 Trp Pro Asp Tyr Asp Ser Asp Phe Gln Ala Gly Phe Ile Lys Gly Tyr  
 645 650 655

ctc gtg tat gtg aaa tcc aag gag atg cag tgc aac caa ccc tgg gaa 2795  
 Leu Val Tyr Val Lys Ser Lys Glu Met Gln Cys Asn Gln Pro Trp Glu  
 660 665 670

agg acc ctc ctt cca gat aat tca gtc ctc tgt aaa tac gac atc aat 2843  
 Arg Thr Leu Leu Pro Asp Asn Ser Val Leu Cys Lys Tyr Asp Ile Asn  
 675 680 685

ggc tca gag aca aag aca ctc acc gtg gaa aac ctt cag cca gag tcc 2891  
 Gly Ser Glu Thr Lys Thr Leu Thr Val Glu Asn Leu Gln Pro Glu Ser  
 690 695 700

ctc tat gag ttt ttc gtc act ccg tac acc agc gct ggc cca gga ccc 2939  
 Leu Tyr Glu Phe Phe Val Thr Pro Tyr Thr Ser Ala Gly Pro Gly Pro  
 705 710 715 720

aat gaa acg ttc aca aag gtc aca act cca gat gca cgc tcc cac atg 2987  
 Asn Glu Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Ala Arg Ser His Met  
 725 730 735

ctg ctg cag atc ata cta ccc atg acc ctc tgc gtc ttg ctc agc atc 3035  
 Leu Leu Gln Ile Ile Leu Pro Met Thr Leu Cys Val Leu Leu Ser Ile  
 740 745 750

84540

236

Val Arg Cys Ala Ser Ala Asn His Phe Trp Lys Trp Ser Asp Trp Thr  
 405 410 415

caa aaa gag ttc agc aca ccc gag act gct ccc tca cag gct ctt gat 2075  
 Gln Lys Glu Phe Ser Thr Pro Glu Thr Ala Pro Ser Gln Ala Leu Asp  
 420 425 430

gta tgg aga caa gtg tgg tgg gag aat gga aga cgc att gtg act tta 2123  
 Val Trp Arg Gln Val Trp Ser Glu Asp Gly Arg Arg Ile Val Thr Leu  
 435 440 445

ttc tgg aag cca cta tta aaa tca cag gcc aat ggc aaa atc ata tcc 2171  
 Phe Trp Lys Pro Leu Leu Lys Ser Gln Ala Asn Gly Lys Ile Ile Ser  
 450 455 460

tat aat ata gtt gta gaa aat gaa gcc aaa cca act gag tca gaa cac 2219  
 Tyr Asn Ile Val Val Glu Asn Glu Ala Lys Pro Thr Glu Ser Glu His  
 465 470 475 480

tac tgt gtc tgg gca cca gcc ctc agc aca aac ctg agc ctt gac ctg 2267  
 Tyr Cys Val Trp Ala Pro Ala Leu Ser Thr Asn Leu Ser Leu Asp Leu  
 485 490 495

caa cct tac aag att cgc atc aca gcc aac aac agc atg ggg gca tct 2315  
 Gln Pro Tyr Lys Ile Arg Ile Thr Ala Asn Asn Ser Met Gly Ala Ser  
 500 505 510

cct gag tcc ttg atg gtc ctt tct aat gat tct gga cac gag gtc aag 2363  
 Pro Glu Ser Leu Met Val Leu Ser Asn Asp Ser Gly His Glu Val Lys  
 515 520 525

gaa aag aca att aaa ggt ata aag gat gca ttc aat att tct tgg gag 2411  
 Glu Lys Thr Ile Lys Gly Ile Lys Asp Ala Phe Asn Ile Ser Trp Glu  
 530 535 540

ccc gta tct gga gac acg atg ggc tat gtt gtg gac tgg tgt gca cat 2459  
 Pro Val Ser Gly Asp Thr Met Gly Tyr Val Val Asp Trp Cys Ala His  
 545 550 555 560

tcc cag gac caa cgc tgt gat ttg cag tgg aag aac ctt ggt ccc aat 2507  
 Ser Gln Asp Gln Arg Cys Asp Leu Gln Trp Lys Asn Leu Gly Pro Asn  
 565 570 575

att gtc tgc tac tgg aaa agt cag tgg gtg aag gag aag tgc tac cct 3083  
 Ile Val Cys Tyr Trp Lys Ser Gln Trp Val Lys Glu Lys Cys Tyr Pro  
 755 760 765

gac att ccc aat ccg tac aag agc agc att ctg tca ctc ata aaa tcc 3131  
 Asp Ile Pro Asn Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser Leu Ile Lys Ser  
 770 775 780

aag aag aat cct cac tta ata atg aat gtc aaa gac tgc att cca gat 3179  
 Lys Lys Asn Pro His Leu Ile Met Asn Val Lys Asp Cys Ile Pro Asp  
 785 790 795 800

gtc ctt gaa gtg ata aac aaa gca gaa ggc agc aag aca cag tgt gta 3227  
 Val Leu Glu Val Ile Asn Lys Ala Glu Gly Ser Lys Thr Gln Cys Val  
 805 810 815

ggc tct ggg aaa ctt cac att gaa gat gta ccc act aag ccg cca atc 3275  
 Gly Ser Gly Lys Leu His Ile Glu Asp Val Pro Thr Lys Pro Pro Ile  
 820 825 830

gtg cca aca gaa aag gat tcc tca ggg cct gtg ccc tgc atc ttc ttt 3323  
 Val Pro Thr Glu Lys Asp Ser Ser Gly Pro Val Pro Cys Ile Phe Phe  
 835 840 845

gag aat ttt act tac gat cag tca gct ttt gac tct ggt tcc cat ggc 3371  
 Glu Asn Phe Thr Tyr Asp Gln Ser Ala Phe Asp Ser Gly Ser His Gly  
 850 855 860

ctc att cca ggt ccc cta aaa gac aca gca cac caa ctt gga cta ttg 3419  
 Leu Ile Pro Gly Pro Leu Lys Asp Thr Ala His Gln Leu Gly Leu Leu  
 865 870 875 880

gct cca cct aac aag ttc cag aac gta tta aaa aat gac tac atg aag 3467  
 Ala Pro Pro Asn Lys Phe Gln Asn Val Leu Lys Asn Asp Tyr Met Lys  
 885 890 895

ccc ctg gtc gaa agt cca act gaa gaa act agc ttg att tat gtg tca 3515  
 Pro Leu Val Glu Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ser Leu Ile Tyr Val Ser  
 900 905 910

cag ctg gct tca ccc atg tgc gga gac aag gac acg ctt gcc aca gaa 3563  
 Gln Leu Ala Ser Pro Met Cys Gly Asp Lys Asp Thr Leu Ala Thr Glu

## 237

915 920 925  
cca ccc gtg cca gtg cat ggt tca gag tat aaa agg caa atg gta gtt 3611  
Pro Pro Val Pro Val His Gly Ser Glu Tyr Lys Arg Gln Met Val Val  
930 935 940  
ccc ggg agc ctc gca tca cct tct ctg aag gag gat aac agc ttg acc 3659  
Pro Gly Ser Leu Ala Ser Pro Ser Leu Lys Glu Asp Asn Ser Leu Thr  
945 950 955 960  
tca acg gtc ctc tta ggc caa ggt gaa cag taa acaccacgca gcacaaataa 3712  
Ser Thr Val Leu Leu Gly Gln Gly Glu Gln \*  
965 970  
atgcactcca cacatatag gcactttggg agatgtagct gttaccatgc caacaccacg 3772  
tgccctggtt ggttcacagg gtgggggttg aggggagact cattatctgc agtgcgtgatt 3832  
tatcaacgat cactacagac caacagactt aaggaccata taatatgggtg ttccacctga 3892  
aggcgttccc tagaaatggc agatccgaga gcattgtgac ctgtctatta ttgggtcag 3952  
gtccaccctt attgcagtag ctgacatag ggtgtacacc agtcatttgc cagagcttac 4012  
ctactcaaaa ctac 4026

<210> 120  
<211> 970  
<212> PRT  
<213> М'язи миші

<400> 120  
Met Ala Phe Ser Val Val Leu His Pro Ala Phe Leu Leu Ala Val Leu  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Ala Ser Arg Ser Glu Val Leu Glu Glu Pro Leu Pro Leu  
20 25 30  
Thr Pro Glu Ile His Lys Val Ser Phe Gln Leu Lys Leu Gln Glu Val  
35 40 45  
Asn Leu Glu Trp Thr Val Pro Ala Leu Thr His Glu Glu Leu Asn Met  
50 55 60  
Ile Phe Gln Ile Glu Ile Ser Arg Leu Asn Ile Ser Asn Thr Ile Trp  
65 70 75 80  
Val Glu Asn Tyr Ser Thr Thr Val Lys Arg Glu Glu Ala Val Arg Trp  
85 90 95  
Asn Trp Thr Ser Asp Ile Pro Leu Glu Cys Val Lys His Phe Ile Arg  
100 105 110  
Ile Arg Ala Leu Val Asp Asp Thr Lys Ser Leu Pro Gln Ser Ser Trp  
115 120 125  
465 470 475 480  
Tyr Cys Val Trp Ala Pro Ala Leu Ser Thr Asn Leu Ser Leu Asp Leu  
485 490 495  
Gln Pro Tyr Lys Ile Arg Ile Thr Ala Asn Asn Ser Met Gly Ala Ser  
500 505 510  
Pro Glu Ser Leu Met Val Leu Ser Asn Asp Ser Gly His Glu Val Lys  
515 520 525  
Glu Lys Thr Ile Lys Gly Ile Lys Asp Ala Phe Asn Ile Ser Trp Glu  
530 535 540  
Pro Val Ser Gly Asp Thr Met Gly Tyr Val Val Asp Trp Cys Ala His  
545 550 555 560  
Ser Gln Asp Gln Arg Cys Asp Leu Gln Trp Lys Asn Leu Gly Pro Asn  
565 570 575  
Thr Thr Ser Thr Thr Ile Thr Ser Asp Phe Lys Pro Gly Val Arg  
580 585 590  
Tyr Asn Phe Arg Ile Phe Glu Arg Ser Val Glu His Lys Ala Arg Leu  
595 600 605  
Val Glu Lys Gln Arg Gly Tyr Thr Gln Glu Leu Ala Pro Leu Val Asn  
610 615 620  
Pro Lys Val Glu Ile Pro Tyr Ser Thr Pro Asn Ser Phe Val Leu Arg  
625 630 635 640  
Trp Pro Asp Tyr Asp Ser Asp Phe Gln Ala Gly Phe Ile Lys Gly Tyr  
645 650 655  
Leu Val Tyr Val Lys Ser Lys Glu Met Gln Cys Asn Gln Pro Trp Glu  
660 665 670  
Arg Thr Leu Leu Pro Asp Asn Ser Val Leu Cys Lys Tyr Asp Ile Asn  
675 680 685  
Gly Ser Glu Thr Lys Thr Leu Thr Val Glu Asn Leu Gln Pro Glu Ser  
690 695 700  
Leu Tyr Glu Phe Phe Val Thr Pro Tyr Thr Ser Ala Gly Pro Gly Pro  
705 710 715 720  
Asn Glu Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Ala Arg Ser His Met  
725 730 735  
Leu Leu Gln Ile Ile Leu Pro Met Thr Leu Cys Val Leu Leu Ser Ile  
740 745 750  
Ile Val Cys Tyr Trp Lys Ser Gln Trp Val Lys Glu Lys Cys Tyr Pro  
755 760 765  
Asp Ile Pro Asn Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser Leu Ile Lys Ser  
770 775 780  
Lys Lys Asn Pro His Leu Ile Met Asn Val Lys Asp Cys Ile Pro Asp  
785 790 795 800  
Val Leu Glu Val Ile Asn Lys Ala Glu Gly Ser Lys Thr Gln Cys Val  
805 810 815

## 84540

## 238

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

Gly Ser Gly Lys Leu His Ile Glu Asp Val Pro Thr Lys Pro Pro Ile  
820 825 830  
Val Pro Thr Glu Lys Asp Ser Ser Gly Pro Val Pro Cys Ile Phe Phe  
835 840 845  
Glu Asn Phe Thr Tyr Asp Gln Ser Ala Phe Asp Ser Gly Ser His Gly  
850 855 860  
Leu Ile Pro Gly Pro Leu Lys Asp Thr Ala His Gln Leu Gly Leu Leu  
865 870 875 880  
Ala Pro Pro Asn Lys Phe Gln Asn Val Leu Lys Asn Asp Tyr Met Lys  
885 890 895  
Pro Leu Val Glu Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ser Leu Ile Tyr Val Ser  
900 905 910  
Gln Leu Ala Ser Pro Met Cys Gly Asp Lys Asp Thr Leu Ala Thr Glu  
915 920 925  
Pro Pro Val Pro Val His Gly Ser Glu Tyr Lys Arg Gln Met Val Val  
930 935 940  
Pro Gly Ser Leu Ala Ser Pro Ser Leu Lys Glu Asp Asn Ser Leu Thr  
945 950 955 960  
Ser Thr Val Leu Leu Gly Gln Gly Glu Gln  
965 970

<210> 121  
<211> 2910  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Вироджений полінуклеотид, що кодує полінуклеотид SEQ ID NO:120

<221> Пізнаючі ознаки  
<222> (1)...(2910)  
<223> N = A, T, G, або C  
  
<221> Пізнаючі ознаки  
<222> (1) (2910)  
<223> n = A,T,C або G

<400> 121  
atggccttyw sngtngtnt nyccayccngcn tyytyntng cngtntnws nytmngncn 60  
wsrnmngswg arngtntnga rgarcncnytn ccnythacnc cngarathca yaargtnwsn 120  
ttcarytna arytnarga rgtnaaytn gartggacng tncngcnytn nacncaygar 180

239		
garytnaaya tgathttyca rathgarath wsmngnytna ayathwsnaa yacnathigg 240		
gtngaraayt aywsnacnac ngtnaamgn gargargcng trmngtggaa ytggaacnwsn 300		
gayathccny tngartgygt naarcaytty athmgnathm gngcnytngt ngaygayacn 360		
aarwsnytn cncarwsnws ntgggnaay tggwsnwsnt ggaargargt naaygcnaar 420		
gtwnsngtn arccngayaa rwsnytnath ttyccnaarg ayaargtnyt ngargarggn 480		
wsnaaygtna cnathtgyyt natgtayggn caraaygtnt ayaaygtnws ntgyaarytn 540		
cargaygar cnathcaygg ngarcarytn gaywsncayg twnsnytnyt naarytnaay 600		
aaygtngnt tytwnsnga yacngnagn aayathaayt gycargcnac naargngcn 660		
aarmgnatht tyggncngt nynttygtn wsnargtny tngargarcc naaraaygt 720		
wsntgygara crmgngaytt yaaracnytn ghytgywsnt gggargcng ngtngayacn 780		
acnytnacnt gmgnaarcc rmgnattyar aaytayacny tntgygarws ntywsnaar 840		
mgntgygar twnsnaayta ymnaaywsn tayacntggc arathacnga rgnwsncar 900		
garatgtaya ayttyacny nacngcngar aaycarytnm gnaarmgnws ngtnaayath 960		
aaytyaayy tnaacnaymg ngtnayccn aargcncnc argaygtnac nytnaarath 1020		
athgngcna cnaargcnaa yatgacntgg aargtncayw snayggnaa yaaytayacn 1080		
ytntntgyc argtnaaryt ncartayggn gargtnathc aygarcaaya ygtwnsngtn 1140		
cayatgwsng cnaaytayt ntywsngay ytngayccng ayacnaarta yaargcnty 1200		
gtmngntgy cwnsngcnaa ycayttytg aartggwsng aytgacnca raargarty 1260		
wsnacncng aracngcnc nwsncargcn ytngaygtnt gmgncargt ntggwsngar 1320		
aayggmgnm gnathgtnac nynttytg aarccnytny tnaarwsnca rgcnaayggn 1380		
aarathathw sntayaayt hgtngtnar aaygargcna arccnacnga rwsngarccay 1440		
taytgygtnt gggcncngc nytnwsnacn aaytnwsny tngaytnca rccntayaar 1500		
athmgnatha cngcnaayaa ywsnatgggn gcwnsncng arwsnytnat ggtntnwsn 1560		
aaygaywsng ncaygargt naargaraar acnatharg gnatharga ygcnttyaay 1620		
athwsntgg arccngtnws ngngayacn atggntayg tngtnaytg gtygncay 1680		
wsncargayc amngntayga yntcartgg aaraaytng gncnaayac nacnwsnacn 1740		
acnathacnw sngaygayt yaarccnggn gtnmgtaya aytymgnat httygarngn 1800		
wsngtnargc ayaargcngm nytngtngar aarcamngn gntayacnca rgarytnngn 1860		
ccnytngtna aycnaargt ngarathccn taywsnacnc cnaaywsntt ygtntmgn 1920		
tgccngayt aygaywsnga yttycargcn gnttyatha argntayt ngntaygt 1980		
aarwsnaarg aratgcargt yaaycarccn tgggarmgna cnytnytncc ngayaaywsn 2040		
gtnytngtga artaygayt haayggwns garacnaara cnytnacngt ngaraaytn 2100		
carccngarw snyntayga rtytygtnt acncntaya cwnsngcng nccngncn 2160		
aaygaracnt tyacnaargt nacnacncn gaycngmgnw snayatygt nytnarath 2220		
athytnccna tgacnytnyt ygtntnytn wsnathathg tntgytaytg gaarwsncar 2280		
tggttnaarg araartyta yccngayath ccnaayccnt ayaarwsnws nathytnwsn 2340		
ytathaarw snaaraaraa yccncaytn athatgaayg tnaargaytg yathccngay 2400		
gtnytnarg tnatayaay rccngarggn wsnaracnc artgytgng rwsnggnar 2460		
ytnayathg argaygtnc nacnaarccn ccnathgtnc cnacngaraa rgaywsnwsn 2520		
ggncngtncc cntgyathtt ytygaraay ttyacntayg aycarwsngc ntygaywsn 2580		
ggwsncayg gnytnathcc ngncnytn aargayacng cncaycaryt nggnytnytn 2640		
gcncncnca ayaartyca raaytnytn aaraaygayt ayatgaarcc nytngtngar 2700		
wsncncng argaracnws nytnathay gtnwsncary tngcwnscc natgtgyggn 2760		
<223> Праймер ZC43280		
<400> 125		
gagcacgccc ttctcttctt	20	
<210> 126		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер ZC43281		
<400> 126		
cggtgccgt ccgtttacta	20	
<210> 127		
<211> 40		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Зонд zcytor17lig ZC43275		
<400> 127		
ctgtaattcc tgcactattt tctgtacatc atcacttggt	40	
<210> 128		
<211> 22		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер ZC40574		
<400> 128		
ctcatttgga attttgccga tt	22	
<210> 129		
<211> 22		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		

## 84540

## 240

gayaargaya cnytnccnac ngarccncn gtnccngtnc ayggwnsnga rtaayarmgn 2820		
caratggtng tncncngnws nytnccnwsn ccwnsnytna argargayaa ywsnytnacn 2880		
wsnacngtny tnytnngnca rggngarcar 2910		
<210> 122		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер ZC43891		
<400> 122		
gggcagtagg atatgaatca gcac	24	
<210> 123		
<211> 19		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер ZC43900		
<400> 123		
gaaggcccca gtgctacgt	19	
<210> 124		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Зонд OSMRbeta ZC43896		
<400> 124		
tcacccgag tcgtgacctt cggt	24	
<210> 125		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Зонд GUS ZC43017		
<400> 130		
tgaacagtca ccgacgagag tgctgg	26	
<210> 131		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер ZC28480		
<400> 131		
cgattcagga cagtcaacag tacc	24	
<210> 132		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер ZC41653		
<400> 132		
cccttcgtgaa cgtgacctg g	21	
<210> 133		
<211> 19		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		

241

<220>  
<223> Праймер ZC41655

<400> 133  
ctgaaatcca aggcgaggc

<210> 134  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ZC41703

<400> 134  
tgaagctggc ctgtctctct

<210> 135  
<211> 19  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ZC41704

<400> 135  
gagatatgcc cggatggct

<210> 136  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ZC43272

<400> 136  
gcgtggtatca ttggtttcct tctc

<210> 137  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Зонд zcytor17lig ZC43276

<400> 141  
taaagcaggc atctgggatg tcagca

<210> 142  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ZC43045

<400> 142  
aaacatgata ttctcagatag agatcagtag act

<210> 143  
<211> 26  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ZC43046

<400> 143  
cttatgaaat gtttgacaca ctccaa

<210> 144  
<211> 29  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Зонд OSMRbeta probe ZC43141

<400> 144  
ctgtgcgttg gaactggacg tctgatatc

<210> 145

84540

<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ZC43273

19

<400> 137  
cattctcttt cctctgcaaa ttca

<210> 138  
<211> 34  
<212> ДНК  
<213> Штучна

<220>  
<223> Зонд zcytor17 ZC43478

20

<400> 138  
tagagaacat ttctgcgtc ttttactcg acag

<210> 139  
<211> 30  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ZC43278

19

<400> 139  
aaacaagagt ctacagatct ttataacaac

<210> 140  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Primer ZC43279

24

<400> 140  
acggcagctg tattgattcg t

<210> 141  
<211> 26

<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ZC43004

26

<400> 145  
gaaaccgcc gcatattact t

<210> 146  
<211> 19  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ZC43005

33

<400> 146  
tgccgttgct cacaaaggt

<210> 147  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Зонд GUSмиші ZC43018

26

<400> 147  
accsacassa aagccctgga cctc

<210> 148  
<211> 23  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер ZC40269

29

<400> 148  
gccagtttca cacactcctc ttt

242

24

34

30

21

21

19

24

24

23

243	84540	244
<p>&lt;210&gt; 149 &lt;211&gt; 26 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Праймер ZC40268</p> <p>&lt;400&gt; 149 gcagctattg cactagtcatt ttcttt</p> <p>&lt;210&gt; 150 &lt;211&gt; 29 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Зонд трансферинового рецептору ZC40298</p> <p>&lt;400&gt; 150 cccaggtagc cactcatgaa tccaatcaa</p> <p>&lt;210&gt; 151 &lt;211&gt; 20 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Праймер ZC43140</p> <p>&lt;400&gt; 151 ttcttcacaa gcaatcgac</p> <p>&lt;210&gt; 152 &lt;211&gt; 21 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Праймер ZC43139</p> <p>&lt;400&gt; 152 atgcacgtctt cgggttcagaa c ggacaaaata aaaacataaa taac</p> <p>&lt;210&gt; 157 &lt;211&gt; 40 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Лінкер</p> <p>&lt;400&gt; 157 tgtcgatgaa gccctgaaaag acgcgcagac taattcgagc</p> <p>&lt;210&gt; 158 &lt;211&gt; 60 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Лінкер</p> <p>&lt;400&gt; 158 acgcgcagac taattcgagc tccaccatc accatcacca cgcgaattcg gtaccgctgg 60</p> <p>&lt;210&gt; 159 &lt;211&gt; 60 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Лінкер</p> <p>&lt;400&gt; 159 actcactata gggcgaattg cccgggggat ccacgcgaa ccagcggtag cgaattcgcg 60</p> <p>&lt;210&gt; 160 &lt;211&gt; 42 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt;</p>	<p>26</p> <p>29</p> <p>20</p> <p>21 24</p> <p>40</p>	<p>           &lt;210&gt; 153 &lt;211&gt; 24 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Штучна послідовність         </p> <p>           &lt;220&gt; &lt;223&gt; Праймер ZC41608         </p> <p>           &lt;400&gt; 153 gcagacaatg atgctgagca agac         </p> <p>           &lt;210&gt; 154 &lt;211&gt; 24 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Штучна послідовність         </p> <p>           &lt;220&gt; &lt;223&gt; Праймер ZC41509         </p> <p>           &lt;400&gt; 154 caacgctgtg atttgcagtg gaag         </p> <p>           &lt;210&gt; 155 &lt;211&gt; 18 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Штучна послідовність         </p> <p>           &lt;220&gt; &lt;223&gt; Праймер ZC41502         </p> <p>           &lt;400&gt; 155 agcgggcctt cctcactc         </p> <p>           &lt;210&gt; 156 &lt;211&gt; 24 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Штучна         </p> <p>           &lt;220&gt; &lt;223&gt; Праймер ZC41500         </p> <p>           &lt;400&gt; 156 &lt;223&gt; Лінкер         </p> <p>           &lt;400&gt; 160 acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tg         </p> <p>           &lt;210&gt; 161 &lt;211&gt; 825 &lt;212&gt; ДНК &lt;213&gt; Людина         </p> <p>           &lt;220&gt; &lt;221&gt; CDS &lt;222&gt; (48)...(518)         </p> <p>           &lt;400&gt; 161 atcactctct ttaactacta ctcacattaa cctcaactcc tgccaca atg tac agg Met Tyr Arg 1         </p> <p>           atg caa ctc ctg tct tgc att gca cta att ctt gca ctt gtc aca aac Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu Val Thr Asn 5 10 15         </p> <p>           agt gca cct act tca agt tgc aca aag aaa aca aag aaa aca cag cta Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Lys Lys Thr Gln Leu 20 25 30 35         </p> <p>           caa ctg gag cat tta ctg ctg gat tta cag atg att ttg aat gga att Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile 40 45 50         </p> <p>           aat aat tac aag aat ccc aaa ctc acc agg atg ctc aca ttt aag ttt Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe 55 60 65         </p> <p>           tac atg ccc aag aag gcc aca gaa ctg aaa cag ctt cag tgt cta gaa Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Cys Leu Glu 70 75 80         </p> <p>           gaa gaa ctc aaa cct ctg gag gaa gtg ctg aat tta gct caa agc aaa Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys 85 90 95         </p> <p>24</p> <p>24</p> <p>18</p> <p>42</p> <p>56</p> <p>104</p> <p>152</p> <p>200</p> <p>248</p> <p>296</p> <p>344</p>

## 245

aac ttt cac tta aga ccc agg gac tta atc agc aat atc aac gta ata 392  
 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile  
 100 105 110 115

gtt ctg gaa cta aag gga tct gaa aca aca ttc atg tgt gaa tat gca 440  
 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala  
 120 125 130

gat gag aca gca acc att gta gaa ttt ctg aac aga tgg att acc ttt 488  
 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe  
 135 140 145

tgt caa agc atc atc tca aca cta act tga taattaagtg cttcccactt 538  
 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr \*  
 150 155

aaaacataac aggccttcta tttattttat taaatatta aattttatat ttattgtga 598  
 atgtatgggt gctacctatt gtaactatta ttctaatct taaactata aatatggatc 658  
 ttttatgatt cttttgttaa gccctagggg ctctaaatg gtttacctta tttatcccaa 718  
 aaatatttat tattatgttg aatgttaaat atagtatcta tgtagattgg ttagtaaac 778  
 tatttaataa atttgataaa tataaaaaaa aaaaacaaaa aaaaaaa 825

<210> 162  
 <211> 156  
 <212> PRT  
 <213> Людина

<400> 162  
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Lys Lys  
 20 25 30  
 Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu  
 35 40 45  
 Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr  
 50 55 60  
 Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala  
 85 90 95  
 Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile  
 100 105 110  
 Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys  
 Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp  
 100 105 110

agg aac ctc tgg ggc ctg gcg ggc ttg aat tcc tgt cct gtg aag gaa 444  
 Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu  
 115 120 125

gcc aac cag agt acg ttg gaa aac ttc ttg gaa agg cta aag acg atc 492  
 Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile  
 130 135 140

atg aga gag aaa tat tca aag tgt tgg agc tga atatattaat ttatgagttt 545  
 Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser \*  
 145 150

ttgatagctt tatttttttaa gtatttatat atttataact catcataaaa taaagtatat 605  
 atagaatct 614

<210> 164  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Людина

<400> 164  
 Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln  
 20 25 30  
 Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys  
 35 40 45  
 Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr  
 50 55 60  
 Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr  
 65 70 75 80  
 Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln  
 85 90 95  
 Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg  
 100 105 110  
 Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala  
 115 120 125  
 Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met  
 130 135 140  
 Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser

## 84540

115 120 125  
 Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp  
 130 135 140  
 Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr  
 145 150 155

<210> 163  
 <211> 614  
 <212> ДНК  
 <213> Людина

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (64)...(525)

<400> 163  
 gatcgttagc ttctcctgat aaactaattg cctcacattg tcaactgcaa tcgacaccta 60  
 tta atg ggt ctc acc tcc caa ctg ctt ccc cct ctg ttc ttc ctg cta 108  
 Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Leu Phe Phe Leu Leu  
 1 5 10 15

gca tgt gcc ggc aac ttt gtc cac gga cac aag tgc gat atc acc tta 156  
 Ala Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Ile Thr Leu  
 20 25 30

cag gag atc atc aaa act ttg aac agc ctc aca gag cag aag act ctg 204  
 Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu  
 35 40 45

tgc acc gag ttg acc gta aca gac atc ttt gct gcc tcc aag aac aca 252  
 Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr  
 50 55 60

act gag aag gaa acc ttc tgc agg gct gcg act gtg ctc cgg cag ttc 300  
 Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe  
 65 70 75

tac agc cac cat gag aag gac act cgc tgc ctg ggt gcg act gca cag 348  
 Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln  
 80 85 90 95

cag ttc cac agg cac aag cag ctg atc cga ttc ctg aaa cgg ctc gac 396  
 145 150

<210> 165  
 <211> 756  
 <212> ДНК  
 <213> Людина

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (9) ..(443)

<400> 165  
 gctggagg atg tgg ctg cag agc ctg ctg ctc ttg ggc act gtg gcc tgc 50  
 Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Thr Val Ala Cys  
 1 5 10

agc atc tct gca ccc gcc cgc tgg ccc agc ccc agc acg cag ccc tgg 98  
 Ser Ile Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp  
 15 20 25 30

gag cat gtg aat gcc atc cag gag gcc cgg cgt ctc ctg aac ctg agt 146  
 Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser  
 35 40 45

aga gac act gct gct gag atg aat gaa aca gta gaa gtc atc tca gaa 194  
 Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu  
 50 55 60

atg ttt gac ctc cag gag ccg acc tgc cta cag acc cgc ctg gag ctg 242  
 Met Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu  
 65 70 75

tac aag cag gcc ctg cgg gcc agc ctc acc aag ctc aag gcc ccc ttg 290  
 Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu  
 80 85 90

acc atg atg gcc agc cac tac aag cag cac tgc cct cca acc ccg gaa 338  
 Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu  
 95 100 105 110

act tcc tgt gca acc cag act atc acc ttt gaa agt ttc aaa gag aac 386  
 Thr Ser Cys Ala Thr Gln Thr Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn

	115	120	125	
ctg aag gac ttt ctg ctt gtc atc ccc ttt gac tgc tgg gag cca gtc				434
Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val				
	130	135	140	

cag gag tga gaccggccag atgagctg ccaagccggg gagctgctct 483  
Gln Glu \*

ctatgataac aagagctaga aactcaggat ggtcatcttg gagggacca ggggtgggcc 543  
 acagccatgg tgggaagtgc ctggacctgc cctgggccac actgaccttg atacaggcat 603  
 ggcagaagaat tgggaatatt ttatctactg agaatacagt aatatttata tatttatatt 663  
 ttttaaaataa tttttttttt attttattta gttcatattc catattttat caagatgttt 723  
 taccataata attatttata aaatatgcct tct 756

<210> 166  
<211> 144  
<212> PRT  
<213> Людина

<400> 166																			
Met	Trp	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Val	Ala	Cys	Ser	Ile				
				5					10					15					
Ser	Ala	Pro	Ala	Arg	Ser	Pro	Ser	Pro	Ser	Thr	Gln	Pro	Trp	Glu	His				
			20						25				30						
Val	Asn	Ala	Ile	Gln	Glu	Ala	Arg	Arg	Leu	Leu	Asn	Leu	Ser	Arg	Asp				
		35					40					45							
Thr	Ala	Ala	Glu	Met	Asn	Glu	Thr	Val	Glu	Val	Ile	Ser	Glu	Met	Phe				
	50					55					60								
Asp	Leu	Gln	Glu	Pro	Thr	Cys	Leu	Gln	Thr	Arg	Leu	Glu	Leu	Tyr	Lys				
65					70					75				80					
Gln	Gly	Leu	Arg	Gly	Ser	Leu	Thr	Lys	Leu	Lys	Gly	Pro	Leu	Thr	Met				
				85					90					95					
Met	Ala	Ser	His	Tyr	Lys	Gln	His	Cys	Pro	Pro	Thr	Pro	Glu	Thr	Ser				
			100					105					110						
Cys	Ala	Thr	Gln	Thr	Ile	Thr	Phe	Glu	Ser	Phe	Lys	Glu	Asn	Leu	Lys				
	115						120					125							
Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Ile	Pro	Phe	Asp	Cys	Trp	Glu	Pro	Val	Gln	Glu				
	130					135					140								

<210> 167

Leu Glu Glu Val  
20

	1	15	16	30	31	45	
1	zcycor17lig	--ASHTLPVRLRP	SDOVQKIVEELQSL	KMLKD--VEEEKGV			40
2	mzcycor17lig	---ATCSLFGAPIS	KEDLRTTIDLLKQES	QDLNNYSIKQASGM			35
3	mIL-3	ASISGRDTHRLTRL	NCS-SIVKEIIGLK	--PEP----	ELKT-		42
4	hIL-3	APMTOTPLKTSW	NCS-NMIDEIITHL	OPPLP--LLDNFNLI			41

	46	60	61	75	76	90	
1 zcytor171ig	LVSQNYTLPCLS	SPDA	QPPNNIHS	PAIRAYL	KTIRQLDN	KSVIDEI	85
2 mzcycor171ig	SADESIQLPCF	SLDR	EALNTISVI	IAHLEK	VKVLSE--	NTVDTSWV	86
3 mL-3	DDEGPSLRNKS	----	----	FRRVNLSKF	ESOGVDP	EDERYIK	87
4 hIL-3	GEDQDILMENN	----	----	LRRPNLEAF	RAVSKL--	QNASATIE	75

	91	105	106	120	121	135	
1	zcycotr17lig	IEHLDKLIQDAPET	NISVPTDTH	--CK	RFILTISQF	SECMD	127
2	mzcycotr17lig	IRWLTNISCFNPLN	NISVPNGTDES	YDCK	VFVLTVLKQF	SNCMA	131
3	mIL-3	SNLQKNLCPLTSAN	DSALPGVFI	RIRD--	DFRKKLFY	MWH-LN	131
4	hIL-3	SILKNLLPLCLPAT	ADPRHPIHKD	GDWN	EFRRKLTFY	----LK	116

	136	150 151	165 166	180
1 zcytor17lig	LALKSLTSGAQQATT			142
2 mzcycor17lig	ELQAQKNTTC			141
3 mIL-3	DLETVLTSRPPQPAS	GSVSPNRGTVEC		140
4 hIL-3	TLENA----QAQQT	LSLAIF		133

Φ17.1

<211> 60  
<212> DMA  
<213> Людина

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)...(60)

<221> Зміна  
<222> (25)...(30)  
<223> n = A, G, C, або T

<221> Різноманітні ознаки  
<222> (1)...(60)  
<223> n = A,T,C або G

<400> 167  
aca gaa ctg aaa cag ctt cag nnn nnn gaa gaa gaa ctc aaa cct 48  
Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Xaa Xaa Glu Glu Glu Leu Lys Pro  
5 10 15

ctg gag gaa gtg 60  
Leu Glu Glu Val  
20

<210> 168  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Людина

<220>  
<221> Варіант  
<222> (9)...(10)  
<223> Any ami no acid

<221> Варіант  
<222> (1)...(20)  
<223> Будь-яка аміно кислота

<400> 168  
Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln Xaa Xaa Glu Glu Glu Leu Lys Pro  
1 5 10 15

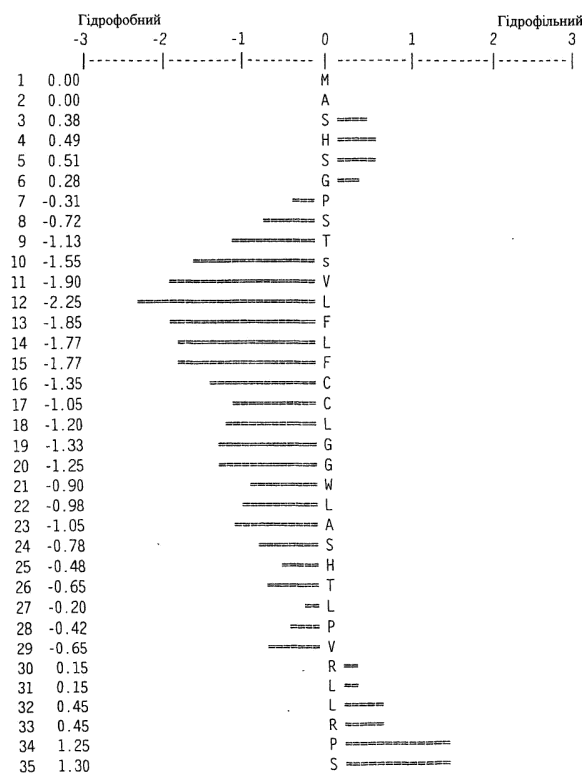
10 20 30 40 50  
 ZCYTOR MASHSGPSTSVLFLFCLGGWLASHTLPRVRLRPSDDVQKIVEELQSLSKMLKD--VEE  
 M17RL- MIFHTGTTKPTLVLLCCIGTWLATCSLFGAPISKEDLRITTDLLKQESQDLWNYSIKQ  
 10 20 30 40 50 60

60 70 80 90 100 110  
ZCYTOR EKGVLVSONYTLPLCLSPDAQPPNNIHSPAIRAYLKTIRQLDNKSVIDE-ITIEHLDKLIFQ  
.....  
M17RL- ASGMSADEIQLPCFSLDREALTNI-SVITIAHLEKVKVLSENTVDTSWVIRWLTNISCF  
70 80 90 100 110

120 130 140 150 160  
ZCYTOR DAPETNISVPTDHE---CKRFILTSIQFSECM-DLALKSLTSGAQQATT  
.....X:.....X.....  
M17RL- NPLNLNISVPGNTDSEYDCKVFVLTVLKQFSNCMAELQAKDNTTC  
120 130 140 150 160

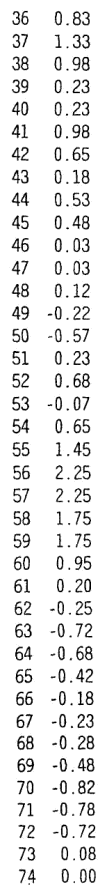
Φ17.2

249



ФІГ.3А

84540



250



ФІГ.3В

251

84540

252

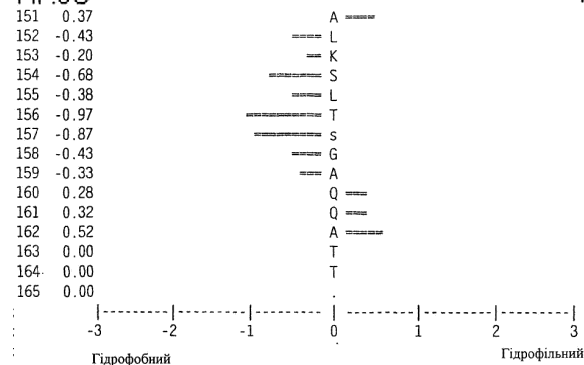
75 0.20  
76 0.50  
77 0.45  
78 0.48  
79 0.02  
80 -0.20  
81 -0.32  
82 -0.27  
83 -0.27  
84 -0.38  
85 -0.72  
86 0.08  
87 0.08  
88 -0.35  
89 -0.65  
90 -0.07  
91 0.17  
92 -0.63  
93 -0.05  
94 0.37  
95 0.37  
96 0.37  
97 0.47  
98 1.27  
99 0.82  
100 0.53  
101 0.53  
102 0.53  
103 1.00  
104 0.20  
105 -0.15  
106 0.60  
107 0.82  
108 0.02  
109 0.02  
110 0.82  
111 0.82  
112 0.02

P	==	113	-0.32
D	=====	114	0.02
A	=====	115	0.02
Q	=====	116	-0.57
P		117	-0.27
== P		118	0.53
== N		119	0.88
== N		120	0.88
== I		121	0.08
== H		122	0.22
== S		123	-0.03
P =		124	-0.53
A =		125	-0.53
I	=====	126	-0.07
R	=====	127	0.17
= A		128	0.43
Y	=====	129	1.18
L	=====	130	1.02
K		131	1.58
T	=====	132	1.58
I	=====	133	1.23
R	=====	134	0.62
Q	=====	135	-0.18
L	=====	136	-0.58
D	=====	137	-1.38
N	=====	138	-1.83
K	=====	139	-1.38
S	=====	140	-1.05
V	=====	141	-1.17
I	=====	142	-0.55
= D		143	0.25
E	=====	144	0.03
I	=====	145	-0.22
I	=====	146	0.25
E	=====	147	0.37
H	=====	148	0.23
L	=====	149	-0.57
D		150	0.10

== K	
L	
I	
===== F	
== Q	
D	=====
A	=====
P	=====
E	=====
T	=====
N	
I	=====
S	=====
V	=====
P	=====
T	=====
D	=====
T	=====
h	=====
E	=====
C	=====
K	=====
R	=====
F	=====
I	=====
L	=====
t	=====
I	=====
S	=====
Q	=====
Q	=====
F	=====
S	=====
E	=====
C	=====
M	=====
D	=====
L	=====

ФІГ.3С

151 0.37  
152 -0.43  
153 -0.20  
154 -0.68  
155 -0.38  
156 -0.97  
157 -0.87  
158 -0.43  
159 -0.33  
160 0.28  
161 0.32  
162 0.52  
163 0.00  
164 0.00  
165 0.00



ФІГ.3D

ФІГ.3Е