

Проліферацію та диференціацію клітин багатоклітинних організмів регулюють гормони та поліпептидні фактори росту. Ці здатні до дифузії молекули дозволяють молекулам спілкуватися одна з одною і діяти спільно для утворення клітин та органів і для відновлення та регенерації пошкоджених тканин. Приклади гормонів та факторів росту охоплюють стероїдні гормони (наприклад, естроген, тестостерон), паратиреоїдні гормони, стимулюючі фолікули гормони, інтерлейкіни, похідний від тромбоцитів фактор росту (PDGF), епідермальний фактор росту (EGF), стимулюючий колонії гранулоцитів-макрофагів фактор (GM-CSF), еритропоєтин (EPO) та кальцитонін.

Гормони та фактори росту впливають на метаболізм клітин приєднанням до білків, які можуть бути інтегральними мембранними білками, що сполучені з сигнальними шляхами в клітинах, як-то вторинною передавальною системою. Інші класи білків представляють розчинні молекули.

Особливий інтерес представляють цитокіни, молекули яких викликають проліферацію та/або диференціацію клітин. Приклади цитокінів охоплюють еритропоєтин (EPO), що стимулює розвиток червоних кров'яних клітин, охоплюють тромбопоєтин (TPO), що стимулює розвиток клітин лінії мегакаріоцитів, та стимулюючий колонії гранулоцитів фактор (G-CSF), що стимулює розвиток нейтрофілів. Ці цитокіни корисні при відновленні нормального рівня кров'яних клітин у страждаючих від анемії чи отримуючих хіміотерапевтичне лікування від раку пацієнтів. Продемонстрована *in vivo* активність цих цитокінів ілюструє величезний клінічний потенціал інших цитокінів, їх агоністів та антагоністів та необхідність у них.

Винахід спрямовано на цю необхідність через створення нового поліпептиду і споріднених сполук, а також способів. Згідно з одним аспектом винаходу запропоновано виділений полінуклеотид, що кодує чотири-альфа-спіральный цитокін ссавців, позначений як Zcyto10. Zcyto10 людини охоплює послідовність зі 176 амінокислот з початковим Met, як показано в ПОСЛІДОВН.№№1 та 2. Можна думати, що амінокислотні залишки 1-24 є сигнальною послідовністю, а сформований поліпептид Zcyto10 представлено амінокислотою послідовністю, що охоплює залишки з 25, лейцину, до 176, глутамінового амінокислотного залишку, що визначено також у ПОСЛІДОВН.№12. Згідно з іншим втіленням винаходу запропоновано послідовності ПОСЛІДОВН.№№3 та 4. Поліпептид ПОСЛІДОВН.№4 охоплює 151 амінокислотний залишок, причому амінокислотні залишки 1-24 складають сигнальну послідовність, а сформована послідовність охоплює залишки з 25, лейцину, до 151, слутамінового амінокислотного залишку, що визначено також ПОСЛІДОВН.№13. Інший активний варіант охоплює залишки з 33, цистеїну, до 176 з ПОСЛІДОВН.№2. Цей варіант визначено також ПОСЛІДОВН.№26.

Мишачий Zcyto10 також є поліпептидом, що охоплює 176 амінокислотних залишків, що визначено також ПОСЛІДОВН.№№18 та 19. Мишачий Zcyto10 має сигнальну послідовність, що простягається від амінокислотного залишку 1, метіоніну, включаючи амінокислотний залишок 24, гліцину, з ПОСЛІДОВН.№19. Тому сформований мишачий Zcyto10 простягається від амінокислотного залишку 25, лейцину, до 176, лейцину, з ПОСЛІДОВН.№2. Інший активний варіант, можна думати, охоплює залишки з 33, цистеїну, до 176 з ПОСЛІДОВН.№19. Цей варіант визначено також ПОСЛІДОВН.№25. Згідно з додатковим втіленням винаходу поліпептид також включає афінне закінчення.

Варіант мишачого Zcyto10 визначено ПОСЛІДОВН.№№33 та. Цей варіант має у довжину 154 амінокислотних залишків і сигнальну послідовність, що простягається від амінокислотного залишку 1, метіоніну, включаючи амінокислотний залишок 24, гліцину, з ПОСЛІДОВН.№34. Тому 54, амінокислотний залишок лейцину, з ПОСЛІДОВН.№34. Інший активний варіант, можна думати, охоплює залишки з 33, цистеїну, до 176 з ПОСЛІДОВН.№19. Сформовану послідовність визначено також ПОСЛІДОВН.№35.

Згідно з другим аспектом винаходу запропоновано експресійний вектор, що включає (а) промотор транскрипції, (б) сегмент ДНК, що кодує Zcyto10, та (в) термінатор транскрипції, де промотор, сегмент ДНК та термінатор з'єднані операбельно.

Згідно з третім аспектом винаходу запропоновано культивовану клітину еукаріота чи прокаріоту, в яку введено вищевказаний експресійний вектор, при цьому вказана клітина експресує кодований сегментом ДНК поліпептид.

Згідно з подальшим аспектом винаходу запропоновано химерний поліпептид, що по суті складається з поєднаних пептидним зв'язком першої частини та другої частини. Перша частина химерного поліпептиду по суті складається з (а) показаного в ПОСЛІДОВН.№2 поліпептиду Zcyto10, (б) алейних варіантів ПОСЛІДОВН.№№2, 4, 12, 13, 19, 20, 25, 26, 34 чи 35, та (в) поліпептидів білку, що принаймні на 90% ідентичні (а) чи (б). Друга частина химерного поліпептиду по суті складається з такого іншого поліпептиду, як афінне закінчення. Згідно з першим втіленням винаходу афінне закінчення є поліпептидом імуноглобуліну F_c. Згідно з винаходом запропоновано також експресійні вектори, що кодують химерні поліпептиди, та клітини-хазяї, трансфektовані для виробництва химерних поліпептидів.

Згідно з додатковим аспектом винаходу запропоновано антитіло, яке специфічно зв'язує розглянутий вище поліпептид Zcyto10, а також антиідіотипічне антитіло, яке нейтралізує антитіло до поліпептиду Zcyto10.

Згідно з іншим аспектом винаходу запропоновано фармацевтичну композицію, що містить очищений поліпептид Zcyto10 у комбінації з фармацевтично прийнятним середовищем. Такі композиції можуть бути корисними для модуляції проліферації, диференціації клітин, або виробки цитокінів при попередженні чи лікуванні станів, що характеризуються некоректною проліферацією, диференціацією клітин, або виробкою цитокінів, що далі буде обговорено. Точніше, поліпептид Zcyto10 може бути корисним при попередженні чи лікуванні аутоімунних захворювань інгібуванням клітинної імунної реакції. Аутоімунні захворювання, що можуть піддаватися лікуванню Zcyto10, включають IPDM, розсіяний склероз, ревматоїдний артрит тощо. Також поліпептиди згідно з винаходом можуть бути корисними для інгібування росту чи проліферації ракових клітин.

Поліпептиди згідно з винаходом можуть також стимулювати імунну систему для кращої боротьби з мікробними чи вірусними інфекціями. Зокрема, Zcyto10 можна систематично застосовувати для посилення

виробки тромбоцитів особою. Більш того, поліпептиди Zcyto10 згідно з винаходом можуть бути корисними для специфічного трахеального чи трахеобронхіального застосування, як-то підтримка чи відновлення поранень трахеобронхіального епітелію чи клітин, що лежать в його основі, регулювання вироблення слизу чи вийчастої очистки від забруднень, або при лікуванні астми, бронхітів чи інших захворювань трахеобронхіального тракту. Вони можуть також посилювати загоювання ран та допомагати регенерації уражених тканин, що може бути особливо корисно при лікуванні хвороб зубів. Крім того, поліпептиди Zcyto10 можуть бути корисними при лікуванні таких уражень шкіри, як псоріаз, екзема та взагалі суха шкіра.

Згідно з додатковим аспектом винаходу запропоновано пептид чи поліпептид, що має амінокислотну послідовність утворюючої епітопи частини поліпептиду Zcyto10, що має описану вище амінокислотну послідовність. Пептиди чи поліпептиди, що мають амінокислотну послідовність утворюючої епітопи частини поліпептиду Zcyto10 згідно з винаходом, включають частини таких поліпептидів з принаймні 9, краще принаймні 15, ще краще принаймні 30-50 амінокислот, хоча утворюючі епітопи поліпептиди будь-якої довжини, аж до та включаючи повну амінокислоту послідовність описаного вище поліпептиду згідно з винаходом, також включено до рамок винаходу. Заявлено також будь-який з цих поліпептидів, що конденсований з молекулою іншого поліпептиду чи носія. Такі варіанти епітопів включають без обмеження ПОСЛІДОВН.№№25-32. Вироблені цими породжувачами епітопи частинами Zcyto10 можуть бути корисними при очистці Zcyto10 від середовища культури клітин.

Ці та інші аспекти винаходу стануть зрозумілими з наступного детального опису та доданих креслень.

Відомості з усіх цитованих тут посилань входять в їх спільність як посилання.

Перед детальним описом винаходу для допомоги його розумінню можна визначити деякі терміни:

"Афінне закінчення" означає сегмент поліпептиду, що може бути приєднаним до другого поліпептиду для забезпечення очистки чи виділення другого поліпептиду або забезпечення ділянки для приєднання другого поліпептиду до підкладки. В принципі, будь-який пептид чи білок, для якого є антитіло чи інші специфічний зв'язувальний засіб, можна використовувати як афінне закінчення. Афінні закінчення включають поліістидинову ділянку, протеїн A, Nilsson et al., EMBO J. 4:1075 (1985), Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3 (1991), глутатіон-S-трансфераза, Smith and Johnson, Gene, 67:31 (1988), Glu-Glu афінне закінчення, Grussmeyer et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82:7952-4 (1985), субстанція P, пептид Flag™, Norr et al., Biotechnology 6:1204-1210 (1988), стрептавідин-зв'язувальний пептид чи інший антигенний епітоп або зв'язувальний домен. Див. взагалі Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95-107 (1991). ДНК, що кодує афінне закінчення доступні від комерційних поставників (наприклад, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

"Алельний варіант" означає будь-яку з двох чи більше альтернативних форм гена, що займають однаковий хромосомний локус. Алельні варіації виникають в природі внаслідок мутацій і можуть призводити до фенотипічного поліморфізму в популяціях. Мутації генів можуть бути мовчазними (без змін в кодованому поліпептиді), або можуть кодувати поліпептиди зі зміненою амінокислотою послідовністю. "Алельний варіант" також використано для позначення кодованого алельним варіантом гена поліпептиду.

"Аміно-термінальний" та "карбокси-термінальний" означає положення в поліпептиді. Коли дозволяє контекст ці терміни використано з посиланням на конкретну послідовність чи частину поліпептиду для визначення близькості чи відповідності позицій. Наприклад, деяка послідовність, що розташована в поліпептиді відносно послідовності карбокси-термінально, локалізована ближче до карбоксильного закінчення послідовності, але необов'язково на карбоксильному закінченні повного поліпептиду.

"Пара комплемент/антикомплемента" означає неідентичні угруповання, що в прийнятних умовах створюють нековалентно сполучену стабільну пару. Наприклад, біотин та авідин (чи стрептавідин) є прототипічними членами пари комплемент/антикомплемента. Інші приклади пар комплемент/антикомплемента включають пари рецептор/ліганд, антитіло/антиген (або гаптен чи епі-топ), сенсорний/антисенсорний полінуклеотиди, тощо. Коли бажана наступна дисоціація пари комплемент/антикомплемента, ця пара переважно має спорідненість до зв'язування $<10^9 \text{ M}^{-1}$.

"Комплемента полінуклеотидної молекули" означає полінуклеотидну молекулу з комплементарною послідовністю основ та зворотною орієнтацією відносно послідовності. Наприклад, послідовність 5'-ATGCACGGG-3' комплементарна послідовності 5'-CCCGTGCAT-3'.

"Контіг" означає полінуклеотид, що має суміжний фрагмент ідентичної чи комплементарної послідовності до іншого полінуклеотиду. Вважають, що суміжна послідовність частково перекривається з певним фрагментом полінуклеотидної послідовності у їх повноті, або вздовж окремого фрагмента полінуклеотиду. Наприклад, представниками контігів полінуклеотидної послідовності 5'-ATGGCTTAGCTT-3' є 5'-TAGCTTgagtct-3' та 3'-gtcgacTACCGA-5'.

"Дегенерована нуклеотидна послідовність" означає послідовність нуклеотидів, що включає один чи більше дегенерованих кодонів (у порівнянні з послідовною полінуклеотидною молекулою, яка кодує поліпептид). Дегенеровані кодони містять відмінні триплети нуклеотидів, але кодує той же самий амінокислотний залишок (тобто триплети GAU та GAC обидва кодуєть Asp).

"Експресійний вектор" означає молекулу ДНК, лінійну чи кільцеву, що включає сегмент, який кодує потрібний поліпептид, що операбельно з'єднаний з додатковим сегментом, який забезпечує її транскрипцію. Такі додаткові сегменти включають промоторну та термінаційну послідовності і можуть також включати один чи більше реплікаторів, один чи більше селектуємих маркерів, ен-хансер, сигнал поліаденілування тощо. В основному експресійні вектори походять з плазмід чи вірусних ДНК, або можуть мати елементи обох.

"Виділений" відносно полінуклеотиду означає полінуклеотид, що виділений з його природного генетичного середовища, а тому позбавлений інших чужинних чи небажаних кодувальних послідовностей, і знаходиться у формі, придатній для використання в системах вироблення генно-інженерного білку. Такі виділені молекули відокремлені від їх природного середовища і включають кДНК та геномні клони.

Виділені молекули ДНК згідно з винаходом позбавлені інших генів, з якими вони звичайно асоційовані, але можуть включати природно існуючі 5' та 3' нетрансльовані регіони, як-то промотори та термінатори. Ідентифікація асоційованих регіонів відома пересічним фахівцям (див. наприклад, Dynan and Tijan, Nature 316:774-78, 1985).

"Виділений" поліпептид чи білок означає поліпептид чи білок, що одержаний у відмінному від природного стані, як-то виділений з крові чи тканини тварини. У кращій формі виділений поліпептид позбавлений по суті інших поліпептидів, особливо, інших поліпептидів тваринного походження. Краще одержувати поліпептид у високоочищеній формі, тобто з більшою за 95% чистотою. При використанні в такому контексті "виділений" не виключає наявності поліпептиду в іншій фізичній формі, як-то димери або альтернативно глікозиловані чи дериватизовані форми.

"Операбельно приєднаний", відносно сегментів ДНК, означає, що сегменти розташовані так, що функціонують у згоді з притаманними їм властивостями, наприклад, транскрипція починається з промотору і протікає через кодувальний сегмент до термінатору.

"Ортолог" означає поліпептид чи білок, що одержаний зі зразків, які є функціональними еквівалентами поліпептидів чи білків з відмінних зразків. Відмінності послідовностей серед ортологів є результатом видоутворення.

"Паралоги" є відмінними, але структурно подібними виробленими в організмі білками. Пара-логи, можна вважати, виникають внаслідок копіювання генів. Наприклад, α -глобін, β -глобін та міоглобін є один відносно одного паралогами.

"Полінуклеотид" - одно- чи дволанцюговий полімер дезоксирибонуклеотидних чи рибонуклеотидних основ, зчитуваний з 5' до 3'-закінчення. Полінуклеотиди включають ДНК та РНК і можуть бути виділеними з природних джерел, синтезованими *in vitro*, або виготовленими з комбінації природних та синтетичних молекул. Величину полінуклеотидів виражають через пари основ (по), нуклеотиди (нт) чи кілооснови (ко). Коли дозволяє контекст, останні два терміни можуть описувати полінуклеотиди, що є одноланцюговими та дволанцюговими. При застосуванні терміну до дволанцюгових молекул він позначає повну довжину і, треба розуміти, є еквівалентним терміну "пари основ". Фахівцям зрозуміло, що два ланцюги дволанцюгового полінуклеотиду можуть трохи різнитися за довжиною і що їх кінці можуть бути ступінчастими в результаті ферментного розщеплення, тому всі нуклеотиди у дволанцюговій полінуклеотидній молекулі можуть не бути спареними. Такі неспарені кінці в основному не перевищують у довжину 20 нт.

"Поліпептид" - полімер з амінокислотних залишків, сполучених пептидними зв'язками, утворені природно чи синтетично. Поліпептиди з менше 10 амінокислотних залишків звичайно називають "пептидами".

"Промотор" - частина гена, що містить послідовність ДНК, яка забезпечує приєднання РНК-полімерази та початок транскрипції. Промоторну послідовність звичайно, але не завжди, знаходять в 5' некодувальному регіоні гена.

"Білок" - макромолекула, що включає один чи більше поліпептидних ланцюгів. Білок може також включати непептидні компоненти, як-то вуглеводні групи. Вуглеводи та інші непептидні замісники можуть бути доданими до білку клітиною, в якій виробляється білок, і варіюватися з типом клітини. Білки визначено тут в термінах структур їх амінокислотних скелетів, замісники, як-то вуглеводні групи, звичайно не вказують, однак, вони можуть бути присутніми.

"Рецептор" - сполучений з клітиною білок, що приєднується до біоактивної молекули (тобто ліганду) та опосередковує дію ліганду на клітину. Зв'язані з мембранами рецептори характеризуються багатодоменною структурою, що включає зовнішньоклітинний домен, який приєднує ліганд, та внутрішньоклітинний ефекторний домен, який звичайно включено в передачу сигналу. Приєднання ліганду до рецептору призводить до конформаційних змін в рецепторі, які викликають взаємодію між ефекторним доменом іншою молекулою(ами) в клітині. Ця взаємодія далі призводить до змін в метаболізмі клітини. Метаболічні явища, що поєднані з взаємодією рецептор-ліганд, включають транскрипцію гена, фосфорилування, дефосфорилування, посилення виробництва циклічного аденозинмонофосфату (сAMP), мобілізацію клітинного кальцію, мобілізацію мембранних ліпідів, злипання клітин, гідроліз інозитоліпідів та гідроліз фосфоліпідів. Взагалі, рецептори ми (наприклад, рецептором PDGF, рецептором гормону росту, рецептором IL-3, рецептором GM-CSF, рецептором G-CSF, рецептором еритропоєтину та рецептором IL-6).

"Секреторна сигнальна послідовність" означає послідовність ДНК, що кодує поліпептид ("секреторний пептид"), який як компонент більшого поліпептиду спрямовує більший поліпептид через секреторний шлях клітини, в якій його синтезовано. Більший поліпептид звичайно розщеплюється для виділення секреторного пептиду при проходженні через секреторний шлях.

"Сплайсовий варіант" означає альтернативну форму транскрибованої з гена РНК. Сплайс-варіації природно виникають через використання альтернативних сплайсингових сайтів в окремих транскрибованих молекулах РНК, а рідше між ними, і можуть призводити до кількох транскрибованих форм мРНК з одного гена. Сплайсові варіанти можуть кодувати поліпептиди зі зміненою амінокислотною послідовністю. "Сплайсовий варіант" використовують також для позначення кодованого сплайсовим варіантом транскрибованої з гена мРНК білку.

Молекулярну масу та довжину полімерів визначали приблизними аналітичними способами (наприклад, гель-електрофорезом) і треба розуміти, що їх величини приблизні. При визначенні цих величин "приблизно X" слід розуміти, що відхилення може складати $\pm 10\%$.

Збережені амінокислоти в спіралі D Zcyto10 можна використовувати як засіб ідентифікації нових членів родини. Спіраль D має при найвищій збереженості приблизно 32% ідентичності зі спіраллю D IL-10. Наприклад, зворотну транскрипційно-полімеразну ланцюгову реакцію (RT-PCR) можна використати, щоб ампліфікувати послідовності, що кодують збережені (домен, регіон вищезазначеної сигнальної

послідовності) з отриманої з різних тканин чи ліній клітин РНК. Зокрема, для цієї мети корисні високодегенеровані праймери, сконструйовані з послідовностей Zcyto10.

Згідно з кращим втіленням винаходу виділені полінуклеотиди гібридизують з подібного розміру регіонами ПОСЛІДОВН.№№1, 3, 18, 33, або комплементарними їм послідовностями, в жорстких умовах. В основному жорсткі умови вибирають приблизно на 5°C нижчими за температуру плавлення конкретної послідовності при визначеній іонній силі та рН. Температура плавлення -температура (при визначеній іонній силі та рН), при якій 50% цільової послідовності гібридується з ідеально підібраним зондом. Типовими жорсткими умовами є такі, при яких концентрація солі приблизно 0,02 М чи менше, при рН 7, а температура щонайменше приблизно 60°C.

Як згадано раніше, виділені полінуклеотиди згідно з винаходом включають ДНК та РНК. Способи виділення ДНК та РНК фахівцям добре відомі. Повну РНК можна виготовити, використовуючи екстракцію гуанідіном з HCl, з наступним виділенням центрифугуванням в градієнтному CsCl (Chirgwin et al., Biochemistry, 18:52-94, 1979). Полі (A)⁺ РНК виготовляють з повної РНК способом Aviv and Leder, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 69:1408-1412 (1972). Комплементарну ДНК виготовляють з полі (A)⁺ РНК відомими способами. Полінуклеотиди, що кодують Zcyto10, далі ідентифікують та ізолюють, наприклад, гібридизацією чи полімеразною ланцюговою реакцією (PCR).

Крім того, полінуклеотиди згідно з винаходом можна синтезувати на синтезаторі ДНК. Зараз використовують спосіб фосфорамідування. Якщо хімічно синтезована дволанцюгова ДНК потрібна для такого застосування як синтез гена чи його фрагменту, тоді кожний комплементарний ланцюг синтезують окремо. Виготовлення коротких генів (60-80 по) технічно просте і може бути здійснене синтезом комплементарних ланцюгів, а потім їх гібридизацією. Для виготовлення довших генів (>80 по), однак, треба розробити спеціальну стратегію, оскільки ефективність сполучення в кожному циклі протягом хімічного синтезу ДНК рідко досягає 100%. Для розв'язання цієї проблеми синтетичні гени (дволанцюгові) збирають в модульній формі з одностанцюгових фрагментів довжиною 20-100 нуклеотидів. Див. Glick, R.Bernard та Jack J.Pasternac, Molecular Biotechnology, PrinciplesApplications of Recombinant DNA (Молекулярна біотехнологія, основи та застосовність рекомбінантної ДНК, ASM Press, Washington, D.C. 1994), K.Itakura et al., Synthesis and use of Synthetic oligonucleotides (Синтези та використання синтетичних олігонуклеотидів), Annu.Rev.Biochem., 53:323-356, 1994) та S.Climie et al., Chemical synthesis of the trymidylate synthase gene (Хімічні синтези гена тримідилат-синтази), Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87:633-637, 1990).

Фахівці розуміють, що розкриті в ПОСЛІДОВН.№№ 1, 2, 3 та 4 послідовності представляють дві алелі людини, а ПОСЛІДОВН.№№ 18, 19, 33 та 34 представляють дві алелі мишей. Додаткові алельні варіанти цих послідовностей, можна клонувати зондуванням кДНК чи геномних бібліотек з різних осіб стандартними способами. Алельні варіанти цих послідовностей можна клонувати зондуванням кДНК чи геномних бібліотек з різних осіб стандартними способами. Алельні варіанти показані в ПОСЛІДОВН.№1 послідовності ДНК, включаючи ті, що мають мовчазні мутації, та ті, в яких мутації призводять до змін в амінокислотній послідовності, знаходяться в рамках винаходу як і білки, що є алельними варіантами ПОСЛІДОВН.№2. Створені з альтернативно сплайсованих мРНК кДНК, які зберігають властивості поліпептиду Zcyto10, знаходяться в рамках винаходу, як і кодовані такими мРНК та кДНК поліпептиди. Алельні варіанти та сплайс-варіанти цих послідовностей можна клонувати зондуванням кДНК чи геномних бібліотек з різних осіб чи тканин стандартними, відомими фахівцям способами.

Згідно з винаходом запропоновано крім того еквівалентні білки та полінуклеотиди з інших видів (видові ортологи). Особливий інтерес представляють поліпептиди Zcyto10 з інших видів ссавців, включаючи мишей, свиней, овець, корів, собак, кішок, коней та інших приматів. Видові ортологи білку Zcyto10 людини можна клонувати, використовуючи запропоновані згідно з винаходом інформацію та композиції у комбінації зі звичайними способами клонування. Наприклад, кДНК можна клонувати, використовуючи отриману з типів тканин чи клітин, що експресують білок. Придатні джерела мРНК можна ідентифікувати зондуванням Норзерн-блотів створеними з розкритих тут послідовностей зондами. Бібліотеку далі виготовляють з мРНК лінії позитивної тканини чи клітини. кДНК, яка кодує білок, можна виділити різними способами, як-то зондуванням з повною чи частковою кДНК людини чи миші, або з одним чи більше наборами дегенерованих зондів на основі розкритих послідовностей. кДНК можна також клонувати, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію (PCR) (Міллс і інші, патент США № 4683202), використовуючи праймери, створені з розкритих тут послідовностей. В рамках додаткових способів для трансформування та трансфектування клітини-хазяїна можна використовувати бібліотеку кДНК, а експресію потрібної кДНК можна визначати антитілами до білку. Подібні способи можна також застосувати для виділення геномних клонів. Як використано та заявлено, вираз "виділений полінуклеотид, що кодує поліпептид", причому вказаний полінуклеотид визначено в ПОСЛІДОВН.№№2, 4, 12, 13, 19, 20, 25, 26, 34 та 35", включає всі алельні варіанти та видові ортологи цих поліпептидів.

Згідно з винаходом запропоновано також виділені поліпептиди білку, які по суті ідентичні поліпептидам білку ПОСЛІДОВН.№2 та їх видовим ортологам. "Ізолюваний" означає білок чи поліпептид, який знаходиться у відмінних від його природного середовища, як-то кров тканина тварини, умовах. У кращій формі виділений поліпептид по суті позбавлений інших поліпептидів, особливо, інших поліпептидів тваринного походження. Краще одержувати поліпептид у високоочищеній формі, тобто з більшою за 95% чистотою, а найкраще - з більшою за 99% чистотою. "По суті ідентичний" означає поліпептид, що має послідовність, яка ідентична послідовності ПОСЛІДОВН.№2, 4, 12, 13, 19, 20, 25, 26, 34 та 35 чи їх видовим ортологам на 50%, переважно 60%, краще щонайменше 80%. Такі поліпептиди будуть, краще, щонайменше на 90%, а найкраще на 95% чи більше ідентичні ПОСЛІДОВН.№2 чи її видовим ортологам. Див. наприклад, Altshul et al., Bull.Math.Bio. 48:603-616 (1986) Henikoff and Henikoff, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 89:10915-10919 (1992). Коротше, дві амінокислотні послідовності вирівнюють для оптимізації позначок вирівнювання, використовуючи штраф для початку розходження 10, штраф для подовження розходження

1, та матрицю підрахунку "blossom 62" від Henikoff and Henikoff (див. вище), як показано в таблиці 1 (амінокислоти позначено стандартним однолітерним кодом). Процент ідентичності далі розраховували як:

$$\frac{\text{загальне число збігів}}{\text{довжина довшої послідовності} + \text{розходження}} \times 100$$

що уведено у довшу послідовність для вирівнювання двох послідовностей

Таблиця 1																				
	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	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	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	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

Ідентичність послідовностей полінуклеотидних молекул розраховували аналогічно, використовують визначене вище співвідношення.

Варіантні поліпептиди Zcyto10 або по суті ідентичні білки та поліпептиди характеризуються як такі, що мають одне чи більше заміщень, делецій чи добавок. Ці зміни, які, переважно, мають другорядну природу, є заміщеннями консервативних амінокислот (див. таблицю 2) та іншими заміщеннями, що не впливають суттєво на укладку чи активність білків чи поліпептидів; невеликі делеції, типово, 1-30 амінокислот; та невеликі подовження аміно- чи карбокси-закінчень, як-то амінокінцевий метіоніновий залишок, невеликий лінкерний пептид з 20-25 залишків, або невелике подовження, що полегшує очистку (афінне закінчення), як-то поліістидинову ділянку, протеїн A, Nillsson et al., EMBO J. 4:1075 (1985), Nillsson et al., Methods Enzymol. 198:3 (1991), глутатіон-S-трансферазу, Smith and Johnson, Gene, 67:31 (1988), чи інший антигенний епітоп або зв'язувальний домен. Див. взагалі Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95-107 (1991). ДНК, що кодують афінне закінчення, доступні від комерційних поставників (наприклад, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Таблиця 2

Заміщення консервативних амінокислот

основні	аргінін лізин гістидин
кислотні	глутамінова кислота
полярні	аспарагінова кислота глутамін
гідрофобні	аспарагін лейцин
ароматичні	ізолейцин валін фенілаланін
малі	триптофан тирозин гліцин аланін серин
	треонін метіонін

Згідно з винаходом запропоновано також різні інші поліпептидні конденсати (та споріднені мультимерні білки, що включають один поліпептидний конденсат чи більше). Наприклад, поліпептид Zcyto10 можна виготовити конденсованим у димерний білок, як описано в патентах США №№

5155027 та 5567584. Кращі димеризовані білки в цьому відношенні включають домени незмінних регіонів імуноглобуліну. Поліпептидні конденсати імуноглобулін-Zcyto10 можна експресувати у генно-інженерно змінених клітинах (для створення різних мультимерних аналогів Zcyto10). Додаткові домени можна конденсувати з поліпептидами Zcyto10 з метою пристосування їх до конкретних клітин, тканин чи макромолекул -наприклад, колагену). Наприклад, поліпептид чи білок Zcyto10 можна націлювати до попередньо визначеного типу клітин конденсатом поліпептиду з лігандом, який специфічно приєднується до рецептору на поверхні потрібної клітини. За цим способом поліпептиди та білки можна спрямовувати для терапії чи діагностики. Поліпептид Zcyto10 можна конденсувати з такими двома угрупованнями чи більше, як афінне закінчення для очистки чи цільовий домен. Поліпептидні конденсати можуть також включати одну чи більше розщеплюваних ділянок, особливо, між доменами. Див. Tuan et al., Connective Tissue Research 34:1-9 (1996).

Білки згідно з винаходом можуть також включати неіснуючі в природі амінокислотні залишки. Неіснуючі в природі амінокислоти включають, без обмеження, транс-3-метилпролін, 2,4-метанпролін, цис-4-гідроксипролін, транс-4-гідроксипролін, N-метилгліцин, алотреонін, метилтреонін, гідроксietилцистеїн, гідроксietилгомоцистеїн, нітроглутамін, гомоглутамін, піпекілінову кислоту, тіазолідинкарбонову кислоту, дегідропролін, 3- та 4-метилпролін, 3,3-диметилпролін, трет-лейцин, норвалін, 2-азафенілаланін, 3-азафенілаланін, 4-азафенілаланін та 4-флуорфенілаланін. Для вбудови неіснуючих в природі амінокислотних залишків в білки відомо кілька способів. Наприклад, можна застосовувати системи *in vitro* при тому, що безглузді мутації пригнічують, використовуючи хімічно аміноацильовані супресорні tРНК. Способи синтезу амінокислот та аміноацильованої tРНК відомі в області техніки. Незамінні амінокислоти в поліпептидах згідно з винаходом можна ідентифікувати відомими фахівцям способами, як-то сайт-спрямований мутагенез або аланін-спрямований мутагенез (Cunningham and Wells, Science 244: 1083-1085, 1985, та Eass et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88:4498-4502, 1991). За останнім способом одиничні аланінові мутації уводять на кожний залишок в молекулі, а отриману мутантну молекулу тестують на її біологічну активність (тобто зв'язування ліганду та трансдукція сигналу) для ідентифікації амінокислотного залишку, критичного для активності молекули. Сайти взаємодії ліганд-білок також можна визначити аналізом кристалічної структури та такими способами, як ядерний магнітний резонанс, кристалографія чи фотоспоріднювальне мічення. Див., наприклад, de Vos et al., Science 255: 306-312, 1992. Smith et al., J.Mol.Biol. 224: 899-904, 1992, Wlodaver et al., FEBS Lett. 309: 59-64, 1992. Ідентичність незамінних амінокислот можна також визначити аналізом гомології зі спорідненими білками. Багатократне амінокислотне заміщення можна зробити та визначити відомими способами мутагенезу та скринінгу, як-то розкритими Reidhaar-Olson and Sauer, Science 241: 53-57, 1988, чи Bowie and Sauer, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86:2152-2156, 1989). Коротше, ці автори розкривають способи одночасної рандомізації двох чи більше позицій в поліпептиді, селекцію функціонального поліпептиду, а потім секвенсування мутагенізованого поліпептиду для визначення спектру дозволених заміщень у кожній позиції. Інші застосовні способи включають фа-гове виявлення (наприклад, Lowman et al., Biochem. 30: 10832-10837, 1991, Lander et al., патент США № 5223409, Huse, WO 92/06204) та регіон-спрямований мутагенез, Derbyshire et al., Gene, 46:145, 1986, Neret et al., DNA, 7:127, 1988.

Вищерозкриті способи мутагенезу можна комбінувати з високопродуктивними способами скринінгу для визначення активності клонованого мутагенізованого білку у клітині-хазяїні, кращий аналіз з огляду на це включає аналіз проліферації клітин та аналіз зв'язування ліганду на базі біо-сенсорів, що описано нижче. Мутагенізовані молекули ДНК, що кодують активні білки чи їх частини (наприклад, фрагменти для зв'язування ліганду), можна виділити з клітин-хазяїв і швидко секвенсувати, використовуючи сучасне обладнання. Ці способи дозволяють швидко визначення важливості конкретних амінокислотних залишків в корисному поліпептиді і їх можна застосовувати до поліпептидів невідомої структури.

Використовуючи розглянуті вище способи, пересічний фахівець зможе виготовити різноманітні поліпептиди, які ідентичні ПОСЛІДОВН. №№ 2, 4, 12, 13, 19, 20, 25, 26, 34 та 35, чи їх алельним варіантам, та залишити властивості природного білку. Як описано та заявлено тут, вираз "поліпептид, який визначено ПОСЛІДОВН. №2", включає всі алельні варіанти та видові ортологи поліпептиду.

Білкові поліпептиди згідно з винаходом, включаючи білки повної довжини, фрагменти білку (в т.ч. фрагменти для зв'язування ліганду) та конденсовані поліпептиди можна виробляти у генно-інженерно змінених клітинах звичайними способами. Придатними клітинами-хазяями є типи клітин, які можна трансформувати та трансфектувати екзогенною ДНК і вирощувати в культурі, вони включають клітини бактерій, грибів, а також культивовані клітини вищих еукаріотів. Клітини еукаріотів, особливо культивовані клітини багатоклітинних організмів, є кращими. Способи маніпуляції клонованими молекулами ДНК та введення екзогенної ДНК у різні клітини-хазяї розкрито Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), а також Ausubel et al., там же.

Полінуклеотиди, в основному послідовності кДНК, згідно з представленим винаходом кодують вищеописані поліпептиди. Послідовність ДНК, що кодує поліпептид згідно з представленим винаходом, включає серію кодонів, причому кожний амінокислотний залишок поліпептиду кодовано кодоном, а кожний кодон включає три нуклеотиди. Амінокислотні залишки кодовано такими кодонами, що їм відповідають:

Аланін (Ala) - GCA, GCC, GCG чи TCT,
Цистеїн (Cys) - TGC чи GCT,
Аспарагінова кислота (Asp) - GAC чи GAT,
Глутамінова кислота (Glu) - GAA чи GAG,
Фенілаланін (Phe) - TTC чи TTT,
Гліцин (Gly) - GGA, GGA, GGG чи GGT,
Гістидин (His) - CAC чи CAT,
Ізолейцин (Ile) - ATA, ATC чи ATT,
Лізин (Lys) - AAA чи AAG,
Лейцин (Leu) - TTA, TTG, CTA, CTC, CTG чи CTT,
Метіонін (Met) - ATG,
Аспарагін (Asn) - AAC чи AAT,
Пролін (Pro) - CCA, CCC, CCG чи CCT,
Глутамін (Gln) - CAA, CCC чи CAG,
Аргінін (Arg) - AGA, AGG, CGA, CGC, CGG чи CGT,
Серин (Ser) - AGC, AGT, TCA, TCC, TCG чи TCT,
Треонін (Thr) - ACA, ACC, ACG чи ACT,
Валін (Val) - GTA, GTC, GTG чи GTT,
Триптофан (Trp) - TGG, а

Тирозин (Тур) - Тур чи ТАТ.

Ясно, що згідно з винаходом, коли заявлено вищеописану кДНК, зрозуміло, що заявленими є як значеннєвий, так і антизначеннєвий ланцюги, які конденсовані разом за рахунок водневих зв'язків між ними. Заявлено також матричну РНК (мРНК), яка кодує поліпептиди згідно з винаходом, і яку кодовано вищеописаною кДНК. Матрична РНК (мРНК) кодуватиме поліпептиди, використовуючи такі кодони, як описано вище, за винятком того, що кожний тиміновий нуклеотид (Т) замінено урациловим нуклеотидом (У).

Взагалі, послідовність ДНК, що кодує поліпептид Zcyto10, операбельно з'єднана з іншими генетичними елементами, які потрібні для її експресії, включаючи в основному транскрипційний промотор та термінатор всередині експресійного вектора. Вектор також міститиме один чи більше придатних для селекції маркерів та одну чи більше зон початку реплікації, хоча фахівцям зрозуміло, що в деяких системах придатні для селекції маркери можна забезпечити окремими векторами, а реплікацію екзогенної ДНК можна забезпечити інтегруванням в геном. Селекція промоторів, термінаторів, придатних для селекції маркерів, векторів та інших елементів є предметом звичайної процедури в межах можливостей фахівців. Багато таких елементів описано в літературі і є у продажу.

Для спрямування поліпептиду Zcyto10 у шлях секреції клітини-хазяїна в експресійному векторі забезпечено послідовність секреторного сигналу (відому також як лідерна послідовність або первинна послідовність). Послідовність секреторного сигналу може бути з того ж білку, або походити від іншого секретованого білку (наприклад, t-PA), або синтезована *de novo*. Послідовність секреторного сигналу з'єднана з послідовністю ДНК Zcyto10 в коректній рамці зчитування. Послідовність секреторного сигналу звичайно розташована в позиції 5' відносно послідовності ДНК, що кодує потрібний поліпептид, хоча деякі послідовності секреторного сигналу можуть розташовуватися в іншій позиції потрібної послідовності ДНК (див. наприклад, Welch et al., патент США № 5037743, Holland et al., патент США № 514383000).

Способи введення екзогенної ДНК у клітини-хазяї ссавців включають опосередковану фосфатом кальцію трансфекцію, Wigler et al., Cell, 14:725 (1978), Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics, 7:603 (1981), Greham and Van der Eb, Virology, 52:456 (1973), електропорацію, Neumann et al., EMBO J. 1:841-845 (1982), опосередковану DEAE-декстраном трансфекцію, Ausbel et al., eds. Current Protocol in Molecular Biology, (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987) та опосередковану ліпосоною трансфекцію, Hawley-Nelson et al., Focus, 15:73 (1993), Ciccione et al., Focus, 15:80 (1993). Протрування 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 et al., патент США № 4656134. Придатні культивовані клітини ссавців включають лінії клітин COS-1 (ATCC № CRL 1650), COS-7 (ATCC № CRL 1651), BHK ATCC № CRL 1632), BHK570 ATCC № CRL 10314), 293 ATCC № CRL 1573), Graham et al., J.Gen.Virol., 36:59-72 (1977), клітини яєчника китайського хом'яка, (наприклад, CHO-K1, ATCC № CRL 61). Додаткові придатні лінії клітин відомі з літератури та доступні з такого загального сховища, як Американська колекція культур тканин (ATCC), Роквіл, Мериленд. В основному кращими є сильні промотори транскрипції, як-то промотори від SV-40 або цитомегаловірусу. Див., наприклад, патент США № 4956288. Інші придатні промотори включають промотори від металотіонеїно-вих генів (патенти США № 4578821 та 4601978) та останній головний промотор аденовірусу.

Селекцію лікарняних засобів в основному використовують для вибору культивованих клітин ссавців, в які було вставлено чужинну ДНК. Такі клітини звичайно називають трансфектантами. Клітини, що культивовані у присутності селективного засобу і здатні передавати потрібні гени своїм нащадкам, називають стабільними трансфектантами. Кращим придатним для селекції маркером є ген, що кодує стійкість до антибіотику неоміцину. Селекцію проводять у присутності ліків типу неоміцину, як-то G-418 або т.п. Селекційні системи також можна використовувати для збільшення рівня експресії потрібного гена, процес називають ампліфікацією. Ампліфікацію проводять культивуванням трансфектантів у присутності невеликої кількості селективного засобу, а потім збільшенням кількості селективного засобу для відбору клітин, які продукують багато продуктів уведених генів. Кращим придатним для селекції та ампліфікації маркером є дигідрофо-лат-редуктаза, що надає стійкості до метатрексату. Можна використовувати інші гени стійкості до ліків (наприклад, стійкості до гідроміцину, стійкості до багатьох ліків, пуроміцин-ацетилтрансферази). Альтернативні маркери, що представляють змінений фенотип, як-то білок зеленої флуоресценції, або такі білки поверхні клітин, як CD4, CD8, класу I MHC, плацентарної лужної фосфатази, можна використовувати для відокремлення трансфектованих клітин від нетрансфектованих клітин такими засобами, як FACS-сортування, або спосіб розділення магнітним бісером.

Можна також використовувати в якості хазяїв клітини інших вищих еукаріотів, включаючи клітини комах, рослин та птиць. Трансформацію клітин комах та протрування ними чужинних поліпептидів розкрито Guarino et al., патент США № 5162222, Bang et al., патент США № 4775624, міжнародна патентна публікація WO 94/06463. Використання Agrobacterium rhizogenes в якості вектору для експресування генів у клітинах рослин розглянуто Sinkar et al., J.Biosci. (Bangalore) 11:47-58 (1987). Клітини комах можна інфікувати рекомбінантними бакуловірусами, звичайно похідними від Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (ACNPV). Див., LA.King R.D.Possee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide / Бакуловірусна система експресії: лабораторний посібник (Chapman Hall, London), D.R.O'Reilly et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual / Бакуловірусні вектори експресії: лабораторний довідник (University Press., New York, Oxford, 1994) та C.D.Richardson, Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology / Протоколи експресії бакуловірусами. Методи в молекулярній біології (Humana Press, Totova, NJ, 1995). Другий спосіб створення рекомбінантного бакуловірусу Zcyto10 використовує описану V.A.Lukow et al., J.Virol., 67:4566-79 (1993) систему на базі транспозону. Цю систему, що використовує вектори переносу, продають в наборі Bac-to-Bac™ (Life Technologies, Rockville, MD). Ця система використовує вектор переносу pFastBac1™ (Life Technologies), що містить транспозон Tn7 для протрування ДНК, що кодує поліпептид Zcyto10, у підтримуваний E.Coli геном бакуловірусу, як велику

плазмиду, що називають бакмідою. Див., M.S.Hill-PeKkins R.D.Possee, J.Gen.Virol., 71:971-6 (1990), B.C.Bonning et al., J.Gen.Virol., 75:1551-6 (1994) та B.Rapoport, J.Biol.Chem. 270:1543-9, (1995). Крім того, вектори переносу можуть включати конденсат у рамці з ДНК, що кодує епітопну мітку на С- чи М-закінченні експресованого поліпептиду Zcyto10, наприклад, епітопну мітку Glu-Glu, Grussenmeyer et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82:7952-4 (1985). Використовуючи відомі в області техніки способи, вектор переносу, що включає Zcyto10, трансформують у *E.Coli* та скринують на бакміди, які включають переривчастий ген *lacZ*, що вказує на ре-комбінантний бакуловірус. Бакмідну ДНК, що включає геном рекомбінантного бакуловірусу, виділяють звичайними способами, та використовують для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*, наприклад, клітин Sf9. Далі продукують рекомбінантний вірус, що експресує Zcyto10. Штами ре-комбінантних вірусів виробляють загальновідомими в рівні техніки способами.

Рекомбінантні віруси використовують для інфікування клітин-хазяїв, звичайно ліній клітин, що походять з осінних похідних хробаків *Spodoptera frugiperda*. Див., в основному Glick та Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles Applications of Recombinant DNA (Молекулярна біо-технологія, основи та застосовність рекомбінантної ДНК, ASM Press, Washington, D.C. 1994). Іншою придатною лінією клітин є лінія клітин High FiveTM (Invitrogen), що походить від *Trichoplusia ni* (патент США № 53004. Для вирощування та підтримки клітин використовують комерційне доступні вільні від сироватки середовища. Придатними середовищами є Sf900 IITM (Life Technologies) чи ESF 921TM (Expression Systems) для клітин Sf9, та Ex-cell0405TM (JRH Biosciences, Lenexa, KS) чи Express FiveOTM (Life Technologies) для клітин T. пі. Клітини вирощують від інокуляційної густини приблизно $2.5 \cdot 10^5$ клітин до густини приблизно $1.2 \cdot 10^6$ клітин, при цьому додають рекомбінантний вірусний штам у множинності інфікування (MOI) 0,1-10, звичайно приблизно 3. Використовуваний спосіб в основному описано в наявних лабораторних довідниках (L.A.King R.D.Possee, вище, D.R.O'Reilly et al., вище, C.D.Richardson, вище). Подальшу очистку поліпептиду Zcyto10 від середовища можна провести описаними тут способами.

Клітини грибів, включаючи дріжджі, а особливо клітини виду *Saccaromyces*, згідно з винаходом також можна використовувати для продукування білкових фрагментів чи поліпептидних конденсатів. Способи трансформування клітин дріжджів екзогенною ДНК та продукування ними ре-комбінантних поліпептидів розкриті, наприклад, Kawasaki et al., патент США № 4931373, Brake, патент США № 4870008, Welch et al., патент США № 5037743, Murrey et al., патент США № 4845075. Трансформовані клітини селектують за фенотипом, визначеним селектувальним маркером, звичайно стійкістю до ліків чи здатності до зростання за відсутності окремої живильної речовини, наприклад, лейцину. Кращою векторною системою для дріжджів є розкрита Kawasaki et al., патент США № 4931373 векторна система РОЛ, яка дозволяє трансформувати клітини для селекції зростанням в глюкозовмісному середовищі. Придатні промотори та термінатори для дріжджів включають промотори та термінатори з генів гліколітичного ферменту (див., наприклад, Kawasaki et al., патент США № 4931373, Kingsman et al., патент США № 4615974, Bitter, патент США № 4977092 та генів алкогольдегідрогенази. Див. також патенти США №№ 4990446, 5063154, 5139936 та 4661454. Трансформаційні системи для інших дріжджів, включаючи *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccaromyces pombe*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia metanolica*, *Pichia quilleromondi* та *Candida maltosa* відомі в рівні техніки. Див., наприклад, Gleeson et al., J.Gen.Microbiol. 132: 3459-3465 (1986) та Cregg, патент США № 4882279. Клітини *Aspergillus* можна використовувати за 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.

Використання *Pichia metanolica* як хазяїна для продукування рекомбінантних білків розкрито у WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 та WO 98/02565. Молекули ДНК для використання при трансформуванні *P.metanolica* звичайно готують як дволанцюгові кільцеві плазмиди, які перед трансформуванням переважно лінеаризують. Для продукування в *P.metanolica* поліпептидів краще, щоб промотор та термінатор в плазміді були промотором та термінатором з гена *P.metanolica*, як-то ген утилізації спирту *P.metanolica* (AUG1 чи AUG2). Інші корисні промотори включають промотори генів дигідроксіацетон-синтази (DHAS), форміат-дегідрогенази (FMD) та каталази (CAT). Для полегшення інтегрування ДНК в хромосому хазяїна краще мати суцільний експресійний сегмент плазмиди фланкованим на обох кінцях послідовністю ДНК хазяїна. Кращим селектувальним маркером для використання в *Pichia metanolica* є ген *P.metanolica* ADE2, що кодує фосфорибозил-5-аміноімідазол-карбоксилазу (AIRK.EC 4.1.121), що дозволяє клітині-хазяїну *ade2* зростати за відсутності аденіну. Для високопродуктивного промислового виробництва, де бажано мінімізувати використання метанолу, краще використовувати клітини-хазяї, в яких обидва гени утилізації метанолу (AUG1 та AUG2) видалено. Для продукування секреторного білку кращими є клітини-хазяї з відсутніми генами вакулярної протеази (PRB1 та PER4). Для полегшення введення плазмиди з ДНК, що кодує потрібний поліпептид, у клітину *P.metanolica* використовують електропорацію. Краще трансформувати клітини *P.metanolica* електропорацією, використовуючи експоненціально затухаюче пульсуюче електричне поле з напругою 2,5-4,5 кВ/см, переважно приблизно 3,75 кВ/см, а константу часу (*t*) - 1-40 мс, найкраще 20 мс.

Прокаріотні клітини-хазяї, включаючи штами бактерії *E.Coli*, *Bacillus* та інших генерів згідно з винаходом є також корисними клітинами-хазяями. Способи трансформування цих клітин та експресування клонованих у них чужинних послідовностей ДНК добре відомі в рівні техніки (див., наприклад, Sambrook et al, вище). При експресуванні поліпептиду Zcyto10 у таких бактеріях, як *E.Coli* поліпептид може залишатися в цитоплазмі, звичайно, як нерозчинні гранули, або може бути спрямованим у периплазматичний проміжок послідовністю бактеріальної секреції. У попередньому випадку клітини лізують, а гранули збирають та денатурують, використовуючи, наприклад, ізотіоціанат гуанідину чи сечовину. Денатурований поліпептид можна далі відтворити та димеризувати розбавленням денатуранту, як-то діалізом проти буферованого сольового розчину. В останньому випадку поліпептид можна здобути з периплазматичного проміжку в розчинній та функціональній формі руйнуванням клітин (наприклад, ультразвуком або осмотичним шоком)

для вивільнення вмісту периплазматичного проміжку та одержання білку, уникаючи при цьому необхідності денатурації та відтворення.

Трансформовані чи трансфектовані клітини-хазяї культивують звичайними способами в культивативному середовищі з вмістом живильних речовин та інших потрібних для зростання вибраних клітин-хазяїв компонентів. У рівні техніки відомо багато різних придатних середовищ, включаючи визначені та комплексні середовища, які містять джерела карбону, нітрогену, незамінні амінокислоти, вітаміни та мінерали. Середовища можуть також, за потребою, включати такі компоненти, як фактори росту чи сироватку. Середовища для зростання звичайно вибирають для клітин з екзогенне доданою ДНК, наприклад, селекцією ліками чи нестачею незамінної живильної речовини, що доповнено наявним на експресійному векторі селективальним маркером чи співтрансфектуванням у клітину-хазяїна. Клітини *P. metanolica* культивують у середовищі, що містить адекватні джерела карбону, нітрогену, мікро-живильні речовини при температурі приблизно 25-35°C. Рідкі культури забезпечують достатньою аерацією звичайними засобами, як-то струшуванням невеликих склянок чи барботажем ферментеру. Кращим культивативним середовищем для *P. metanolica* є YEPD (2% глюкози, 2% Bacto™ Peptone (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1% дріжджового екстракту Bacto™ (Difco Laboratories), 0,004% аденіну та 0,006: лейцину.

Згідно з одним аспектом винаходу новий білок продукують в культивованих клітинах, а клітини використовують для скринування на рецептор чи рецептори білку, включаючи природний рецептор, а також агоністи та антагоністи природного ліганду.

Краще очищати поліпептид згідно з винаходом до чистоти $\geq 80\%$, краще $\geq 90\%$, ще краще $\geq 95\%$, а особливо кращим є фармацевтично чистий стан з чистотою до 99,9% з огляду на забруднювальні молекули, зокрема інші білки та нуклеїнові кислоти, та виключати його інфікування та наявність пірогенних чинників. Переважно, очищений поліпептид по суті позбавлений інших поліпептидів, особливо інших поліпептидів тваринного походження.

Експресовані рекомбінантні (або химерні) поліпептиди можна очищати фракціонуванням та/або звичайними способами очистки у звичайних середовищах. Для фракціонування зразків можна використовувати осадження сульфатом амонію та кислотну чи хаотропну екстракцію. Приклади операцій очистки включають гідроксіапатитну, виключення за розміром, рідинну експрес-хроматографію білків та високоефективну рідинну хроматографію з оберненими фазами. Придатні аніонообмінні середовища включають дериватизовані декстрини, агар, целюлозу, поліакри-ламід, особливі оксиди силіцію тощо. Кращими є PEI-, DEAE-, QAE- та Q-похідні, особливо кращим є середовище DEAE Fast-Flow Sepharose (Pharmacia Piscataway, NJ). Приклади хроматографічних середовищ, включають такі середовища, дериватизовані фенолом, бутилом чи октилом, як Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) тощо, або поліакрилові смоли, як-то Amberchrom CG 71 (Toso Haas) тощо. Придатні тверді підкладки включають скляні бусинки, силікатні смоли, целюлозні смоли, агарові бусинки, попереково зшиті агарові бусинки, полістирольні бусинки, попереково зшиті поліакриламідні смоли тощо. Такі підкладки можна модифікувати реакційноздатними групами, які дають змогу зв'язування білків аміногрупами, карбоксильними групами, сульфгідрильними групами, гідроксильними групами та/або вуглеводними угрупованнями. Приклади хімії сполучення включають активацію ціаногенбромідом, N-гідроксисукцинімідом, епоксидну, сульфгідрильну, гідразидну, та карбоксильні і амінопохідні для хімії карбодіімідного сполучення. Ці та інші тверді середовища добре відомі фахівцям, широко використовувані на практиці і доступні від комерційних поставників. Способи зв'язування рецепторних поліпептидів з середовищем підкладки добре відомі фахівцям. Вибір конкретних способів є предметом рутинного планування і зокрема визначається властивостями вибраної підкладки. Див., наприклад, Affinity Chromatography: Principles Methods (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988).

Поліпептиди згідно з винаходом можна виділити, використовуючи їх властивості. Наприклад, для очистки багатих гістидином білків можна використовувати абсорбційну хроматографію на іммобілізованих іонах металів. Коротше, гелі спочатку завантажують іонами двовалентного металу для утворення хелату (E.Sulkowski, Trynds in Biochem. 3:1-7, 1985). Багаті гістидином білки абсорбуються на цій матриці з різною спорідненістю, залежно від застосованого іона металу, і елюються конкурентним елюентом, зниженням рН чи використанням сильних хелатувальних засобів. Інші способи очистки включають очистку глікозилованих білків хроматографією за спорідненістю до лектину та іонообмінною хроматографією (Methods Enzymol. Vol.182, "Guide to Protein Purification" (Посібник з очистки білків), M, Deutscher, (ed.), 529-539 (Acad.Press, San Diego, 1990. Альтернативно, для полегшення очистки можна створити конденсати потрібного поліпептиду та афінного закінчення (наприклад, полігістидинової ділянки, мальтозу-зв'язувального білку, імуноглобулінового домену).

Поліпептид згідно з винаходом має структурну характеристику чотирьох-спірально-пучкового цитокіну. Білок в основному характеризується як цитокін в силу його розчинності та здатності діяти через рецептори поверхні клітини для подачі сигналу та модуляції проліферації клітин. Цитокіни відносяться до кількох третинних класів структурної укладки, включаючи збагачені цистеїном димери (наприклад, інсулін, PDGF), бета-трилисткові укладки (наприклад, FGF, IL-1) та усі повно-альфа-чотирьох-спіральні пучки. Для останніх характерні чотири спіралі, що позначено A, B, C та D, з унікальною топологією уверх-уверх-униз-униз, де два прості вузли зв'язують спіралі A та B і спіралі C та D. Див. наприклад, Manavalan et al., J. of Protein Chemistry, 11(3):

321-31, 1992. Чотирьох-спірально-пучкові цитокіни іноді крім того підрозділяють на коротколанцюгові (наприклад, IL-4, IL-2, GM-CSF) та довголанцюгові (наприклад, TPO, гормон росту, лептин, IL-10), де останні виявляють довші спіралі A та D і прості вузли. Далі термін цитокіни означатиме чотирьох-спірально-пучкові цитокіни. Спіраль A Zcyto10 включає амінокислотний залишок 35, ізолейцин, продовжуючись прямо до амінокислотного залишку 49, ізолейцину, що також позначено як ПОСЛІДОВН.№

14, спіраль В включає амінокислотний залишок 91, лейцин, продовжуючись прямо до амінокислотного залишку 105, треоніну, що також позначено як ПОСЛІДОВН.№ 15, спіраль С включає амінокислотний залишок 112, лейцин, продовжуючись прямо до амінокислотного залишку 126, цистеїну, що також позначено як ПОСЛІДОВН.№ 16, спіраль D включає амінокислотний залишок 158, валін, продовжуючись прямо до амінокислотного залишку 172, метіоніну, що також позначено як ПОСЛІДОВН.№ 17.

Zcyto10 людини має міжмолекулярний дисульфідний місток між Cys33 та Cys126. Інші 4 цистеїни, Cys80, Cys132, Cys81 та Cys134, як припускають, утворюють два міжмолекулярних дисульфідних містки з розташуванням Cys80-Cys132 та Cys81-Cys134. Припускають, що залишки які є вирішальними для структурної стабільності Zcyto10, включають Cys33, Cys126, Cys80, Cys132, Cys81 та Cys134. Мутації будь-якого з цих залишків на будь-який інший залишок, як припускають, інактивують Zcyto10. Структурна стабільність Zcyto10 також залежить від підтримки схованої гідрофобної поверхні чотирьох альфа-спіралей. Залишки Ile42, Phe46, Ile49, Leu91, Val94, Phe95, Tyr98, Leu112, Phe116, Ile119, Leu123, Val158, Leu162, Leu165, Leu168, Leu169 та Met17, вважають схованими в серцевині білку, і при їх заміні замісниками повинні бути гідрофобні амінокислоти.

Залишки, що як припускають, включено до приєднання Zcyto10 до рецептору поверхні клітини, включають Asp57 на простому вузлі між спіралями А та В, а також заряджені залишки Lys160 та Glu164, що як припускають, виходять на поверхню спіралі D. На поверхні білку, на вузлі АВ та зоні спіралі D існує гідрофобна зона поверхні, що включає залишки Ile62, Leu71, Ile167 та Tr171, які можуть взаємодіяти з гідрофобною зоною на рецепторі поверхні клітини. Поліпептид людини Zcyto10 згідно з винаходом має приблизно 28% ідентичності з інтерлейкіном-10 (IL-10). Поліпептид мишей Zcyto10 має приблизно 28% ідентичності з IL-10 людини та приблизно 72% ідентичності з IL-10 мишей. Поліпептид людини Zcyto10 має приблизно 76% ідентичності з поліпептидом Zcyto10 мишей.

Спіраль А поліпептиду Zcyto10 мишей включає амінокислотний залишок 35, ізолейцин, продовжуючись прямо до амінокислотного залишку 49, аргініну, ПОСЛІДОВН.№ 19, що також позначено як ПОСЛІДОВН.№ 21, спіраль В Zcyto10 мишей включає амінокислотний залишок 91, лейцин, продовжуючись прямо до амінокислотного залишку 105, треоніну, ПОСЛІДОВН.№ 19, що також позначено як ПОСЛІДОВН.№ 22, спіраль С Zcyto10 мишей включає амінокислотний залишок 112, лейцин, продовжуючись прямо до амінокислотного залишку 126, цистеїну, ПОСЛІДОВН.№ 19, що також позначено як ПОСЛІДОВН.№ 23, спіраль D Zcyto10 мишей включає амінокислотний залишок 158, валін, продовжуючись прямо до амінокислотного залишку 172, метіоніну, ПОСЛІДОВН.№ 19, що також позначено як ПОСЛІДОВН.№ 24.

IL-10 є цитокіном, що інгібує вироблення інших цитокінів, індукуює проліферацію та диференціацію активованих В-лімфоцитів, інгібує реплікацію ВІЛ-1 та виявляє антагоністичну дію на гаммаінтерферон. IL-10 існує як димер, утворений з двох альфа-спіральних ділянок поліпептиду, зв'язаних обертанням на 180°. Див., наприклад, Zdanov et al., Structure, 3(6):591-601 (1996). Повідомлено, що IL-10 є продуктом активованих Th2 Т-клітин, В-клітин, кератиноцитів та моноцитів/макрофагів, що здатні модулювати реакцію Th1 Т-клітин. Така модуляція може супроводжуватися інгібуванням синтезу цитокіну Т-клітинами Th1. Див., наприклад, Hus et al., Int.Immunol., 4:563 (1992), D'Andrea et al., J.Exp.Med., 178:1042 (1992). Повідомлено також, що IL-10 інгібує синтез цитокіну природними клітинами-кілерами та моноцитами/макрофагами. Див., наприклад, Hus et al., вище, Fiorentino et al., J.Immunol., 146:3444 (1991). Крім того, було знайдено, що IL-10 має захисну дію відносно інсулін-залежного цукрового діабету. В аналізі тканинного розподілу мРНК, що відповідає цій новій ДНК, спостерігали одиничний транскрипт при приблизно 1,2 к.б. Використовуючи Clontech Multiple Tissue Northern, транскрипт людини виявили в трахеї, плаценті, яєчках, шкірі, слинних залозах, простаті, щитовидній залозі, при меншій експресії, спостереженій в шлунку та підшлунковій залозі. Zcyto10 експресується в таких тканинах мишей: нирки, скелетні м'язи, слинні залози, печінка та шкіра. Тканинна специфічність експресії Zcyto10 підтримує можливість Zcyto10 бути фактором росту та/або підтримки в трахеях та слинних залозах, шлунку, підшлунковій залозі та м'язах, і важливим при локальній імунній реакції. Розташування гену Zcyto10 на хромосомі також свідчить, що Zcyto10 є фактором росту/диференціації чи важливим в регулюванні імунної реакції, як IL-10.

Згідно з винаходом запропоновано також реагенти для використання в діагностиці. Зонд, що включає ДНК чи РНК Zcyto10, або їх субпоследовність, можна використати для визначення, чи присутній ген Zcyto10 на хромосомі I, чи відбулася мутація.

Згідно з винаходом запропоновано також реагенти зі значною терапевтичною цінністю. Поліпептид Zcyto10 (природний чи рекомбінантний), його фрагменти, антитіла та антиідіотипічні антитіла до них, разом зі сполуками, для яких визначена спорідненість до приєднання поліпептиду Zcyto10, повинні бути корисними при лікуванні станів, асоційованих з порушеною фізіологією чи розвитком, включаючи аномальну проліферацію, наприклад, ракові стани, чи дегенеративні стани або змінений імунітет.

Антитіла до поліпептиду Zcyto10 можна очистити, а потім застосувати до пацієнта. Ці реагенти можна для терапевтичного користування комбінувати з додатковими активними чи інертними інгредієнтами, наприклад, у фармацевтично прийнятних носіях чи розріджувачах разом з фізіологічно нешкідливими стабілізаторами та екципієнтами. Ці комбінації можна стерильно фільтрувати та дозувати, як-то ліофілізацією в дозувальних склянках, чи зберігати у стабілізованих водних композиціях. Винахід також включає використання антитіл, їх зв'язувальних фрагментів чи однокланових антитіл з антитілом, включаючи форми, що не є зв'язувальними комплектами.

Кількість необхідного для ефективного лікування реагенту залежить від багатьох різних факторів, включаючи засоби застосування, цільову ділянку, фізіологічний стан пацієнта, а також інші застосовувані засоби лікування. Тому для оптимізації безпеки та ефективності лікувальні дози треба визначати. Звичайно, використані *in vitro* дози можуть бути корисними для визначення корисної при застосуванні *in vivo* кількості цих реагентів. Визначення ефективних доз на тваринах для лікування конкретних розладів забезпечить подальшу допомогу при передбачувальному визначенні дозування для людини. Способи застосування включають пероральний, внутрішньовенний, перитональний, внутрішньом'язовий,

трансдермальний, або застосування в легені чи трахею у розпиленій формі засобами розпилення чи пульверизації. Фармацевтично прийнятні носії включають воду, сольовий розчин, буфери кількох найменувань. Очікувані дози знаходяться звичайно в межах 1-1000 мг/кг маси тіла на добу. Однак, дози можуть бути вищими чи нижчими, що може визначити пересічний лікар. Для завершення обговорення лікарняних композицій та меж дозування див. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, Penn., 1996) та Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 9th Ed. (Pergamon Press, 1996).

Терапевтичне лікування на базі нуклеїнових кислот Якщо ссавець має мутований чи відсутній ген Zcyto10, ген Zcyto10 можна ввести у клітини ссавця. Згідно з одним втіленням винаходу запропоновано вводити *in vivo* ген, що кодує поліпептид Zcyto10, у вірусному векторі. Такі вектори включають такі послаблені чи пошкоджені ДНК-віруси, як, без обмеження, вірус герпесу (HSV), папіломавірус, вірус Епштейна-Барра (EBV), аденовірус, адено-асоційований вірус (AAV) тощо. Пошкоджені віруси, які повністю або майже повністю втратили вірусні гени, є кращими. Пошкоджений вірус після введення у клітину не є інфекційним. Використання пошкоджених вірусних векторів дозволяє застосування до клітин в певному локалізованому місці без небезпеки, що вектор може інфікувати інші клітини. Приклади конкретних векторів включають, не лімітуючи, пошкоджений вірус герпесу 1 (HSV1) (Karlitt et al., Molec.Cell.Neurosci., 2:320-330, 1991), послаблений аденовірусний вектор, як-то описаний Stratford-Perricaudet et al., J.Clin. Invest., 90:626-630, 1992, та послаблений аденоасоційований вірусний вектор (Samulski et al., J.Virol., 61:3096-3101, 1987, Samulski et al., J.Virol., 63:3822-3828, 1989).

Згідно з іншим втіленням винаходу ген можна ввести в ретровірусному векторі, наприклад, як описано (Anderson et al, патент США № 5399346, Mann et al., Cell, 33:153-330, 1983, 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, опубліковано 16.03.1995 Dougherty et al., та Blood, 82:845, 1993). Альтернативно, вектор можна *in vivo* ввести ліпоекцією, використовуючи ліпосоми, для виготовлення ліпосом для трансфектування *in vivo* гена, що кодує маркер, можна використовувати синтетичні катіонні ліпіди (Felgner et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84:7413-7417, 1987, див. Mackey et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85:8027-8031, 1988). Використання ліпосом для введення *in vivo* екзогенного гена в певні органи має деякі практичні переваги. Молекулярне націлювання ліпосом до певних клітин представляє одну область переваг. Ясно, що спрямована трансфекція до клітин певного типу матиме особливі переваги у тканинах з гетерогенністю клітин, як-то підшлункової залози, печінки, нирок, мозку. Ліпіди для націлювання можна хімічно поєднати з іншими молекулами. Націлювані поліпептиди, наприклад, гормони чи нейротрансмітери, та такі білки, як антитіла, або непептидні молекули можна поєднати з ліпосомами хімічно. Ці ліпосоми можна також застосовувати для розпилення у легені чи трахеї засобами розпилення чи пульверизації.

Можливо видалити клітини з тіла та ввести вектор як неізолювану плазмиду ДНК, а потім трансформовані клітини реімплантувати в тіло. Неізолюваний ДНК-вектор для генної терапії можна ввести в потрібні клітини хазяїна відомими фахівцям способами, наприклад, трансфекцією, електропорацією, мікроін'єкцією, трансдукцією, злиттям клітин, DEAE-декстраном, осадженням фосфату кальцію, використанням генного дробовика або використанням транспортеру ДНК-вектору (див. наприклад, Wu et al., J.Biol.Chem. 267: 963-967, 1992, Wu et al., J.Biol.Chem. 263:14621-14624, 1988).

Поліпептид Zcyto10 можна також використати для виготовлення антитіл, що специфічно зв'язують поліпептид Zcyto10. Ці антитіла можна далі використати для виробництва антидіотипічних антитіл. Використаний термін антитіла включає поліклональні антитіла, моноклональні антитіла, такі їх антиген-зв'язуючі фрагменти, як F(ab')₂ та Fab, тощо, включаючи створені генною інженерією антитіла. Антитіла визначають як специфічно зв'язуючі, якщо вони зв'язують поліпептид Zcyto10 з величиною K_d більшою чи рівною 10⁻⁷/M. Спорідненість моноклонального антитіла можна легко визначити пересічному фахівцю (див. наприклад, Scatchard, там же).

Способи виготовлення поліклональних та моноклональних антитіл добре відомі в рівні техніці (див. наприклад, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) та Hurrel, J.G.R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques/Applications (Моноклональні гібридомні антитіла: техніка та застосовність) (CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982), що надані як посилання. Як повинен знати пересічний фахівець, поліклональні антитіла можна генерувати в різних теплокровних тваринах, як-то коні, корови, кози, вівці, собаки, кури, кролі, миші та щури. Імуногенність поліпептиду Zcyto10 можна посилити використанням таких ад'ювантів, як повний чи неповний ад'ювант Фрейнда. Для визначення антитіл, що специфічно зв'язують поліпептид Zcyto10, можна використати різні відомі пересічним фахівцям аналізи, які описано детально в Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (Eds.), (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988).

Представницькі приклади таких аналізів включають протитоківий імуноелектрофорез, радіоімунний аналіз, радіоімунне осадження, твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), дотблотування, інгібувальний чи конкурентний аналіз та сендвіч-аналіз.

Антитіла до Zcyto10 можна використовувати для мічення клітин, що експресують білок, при афінній очистці в рамках діагностичного аналізу для визначення рівня циркуляції розчинних білкових поліпептидів та як антагоністи для блокування зв'язування лігандів і сигнальної трансдукції *in vitro* та *in vivo*.

Згідно з подальшим аспектом винаходу запропоновано фармацевтичну композицію, яка включає очищений поліпептид Zcyto10 у комбінації з фармацевтично прийнятним середовищем. Такі композиції можуть бути корисними для модуляції проліферації та диференціації клітин при попередженні чи лікуванні станів, що характеризуються некоректною проліферацією та диференціацією клітин, або виробленням цитокінів, що далі тут обговорено. Більш того, поліпептид Zcyto10 згідно з винаходом може бути корисним при трахео-специфічних чи трахеобронхо-специфічних застосуваннях, як-то при підтримці чи загоєнні поранень трахеобронхіального епітелію чи клітин, що знаходяться під ним, регулюванні виробки слизу або від частішої очистки від чужинних речовин, або при лікуванні астми, бронхітів та інших захворювань

трахеобронхіального тракту. Очікують, що поліпептид Zcyto10 застосовуватимуть в дозах від тих, що використовували для констракту Zcyto10-Fc вищих у 100 раз, в залежності від стабільності поліпептиду Zcyto10. Терапевтичні дози Zcyto10 знаходитимуться в межах 5-5000 мг/кг/добу.

Поліпептид Zcyto10 добре експресується в слинних залозах та трахеї, його було знайдено в слині Вестерн-блотуванням. Слинні залози синтезують і секретують ряд білків, що мають широкі біологічні функції. Такі білки полегшують змащування ротової порожнини (наприклад, муцини та багаті проліном білки), ремінералізацію (наприклад, статерин та іонні багаті проліном білки) та травлення (наприклад, амілаза, ліпаза та протеази) і забезпечують можливості, антибактеріальні (наприклад, багаті проліном білки, лізоцим, гістатини та лактопероксидаза) та підтримки цілісності слизової (наприклад, муцини). Крім того, слина є багатим джерелом синтезованими слинних залозами факторів росту. Наприклад, відомо, що слина містить епідермальний фактор росту (EGF), нервовий фактор росту (NGF), фактор-альфа трансформування росту (TGF- α), фактор-бета трансформування росту (TGF- β), інсулін, інсуліноподібні фактори росту 1 та II (IGF-1 та IGF-11) та фактор росту фібробластів (FGF). Див. наприклад, Zelles et al., J. Dental. Res. 74(12): 1826-32, 1995. Можна думати, що синтез слинними залозами факторів росту є андроген-залежним і необхідним для гігієни ротової порожнини та шлунково-кишкового тракту.

Тому поліпептиди Zcyto10, їх агоністи та антагоністи можуть бути терапевтично корисними для регенерації шлунково-кишкового тракту чи ротової порожнини. Для перевірки цієї здатності поліпептидів Zcyto10, агоністів та антагоністів згідно з винаходом такі поліпептиди Zcyto10, їх агоністи та антагоністи оцінювали з огляду на їх здатність руйнувати крохмаль згідно з відомим з рівня техніки способом. Поліпептиди Zcyto10, їх агоністи та антагоністи можуть бути корисними при лікуванні астми та інших захворювань трахеобронхіального тракту, як-то бронхіти тощо, втручання у перехресну регуляцію лімфоцитів Th1 та Th2, регуляції росту, диференціації та цитокінному продукуванні інших клітинних медіаторів запалення, як-то еозинофіли, мастоцити, базофіли, нейтрофіли та макрофаги. Поліпептиди Zcyto10, їх агоністи та антагоністи можуть також модулювати тонус м'язів в трахеобронхіальному тракті.

Поліпептиди Zcyto10 можуть також бути корисними при лікуванні ряду захворювань шкіри, системно чи локально, знаходячись в мазі чи кремі, наприклад, екземи, псоріазу та сухості шкіри взагалі чи при догляді за шкірою. Поліпептид Zcyto10 можна також безпосередньо ін'єктувати у м'язи для лікування атрофії м'язів у похилому віці, при хворобі чи постільному режимі.

Картування радіаційних гібридів є генетичною технікою соматичних клітин, що розроблена для створення безперервних карт хромосом ссавців з високим розділенням (Cox et al., Science 250: 245-250, 1999). Часткове чи повне знання генної послідовності дозволяє розробку PCR-праймерів, що придатні для користування панелями хромосомного картування радіаційних гібридів. Комерційно доступними є панелі хромосомного картування радіаційних гібридів, що перекривають суцільний геном людини, як-то Stanford G3 RH Panel та GeneDridge 4 RH Panel (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). Ці панелі полегшують швидку хромосомну локалізацію на базі PCR (полімеразної ланцюгової реакції) та розташування генів, ділянок мічених послідовностей (STS) та інших нонполіморфних та поліморфних маркерів в потрібному регіоні. Це включає встановлення прямо пропорціональної фізичної відстані між нещодавно відкритими потрібними генами та раніше картованими маркерами. Точне знання розташування гена може бути корисним в ряді випадків, включаючи: 1) визначення, чи є послідовність частиною існуючого контигу і отриманих додаткових сусідніх генетичних послідовностей у таких різних формах, як YAC-, BAC- чи кДНК-клони, 2) забезпечення можливо перспективного гена для спадкових хвороб, які виявляють зв'язок з тими ж регіонами хромосом. 3) для такого перехресно-посилального модельного організму, як миша, що може бути корисним для допомоги визначенню, яку функцію може мати окремий ген.

Результати свідчать, що ген Zcyto10 відображено на карті 889.26 CR_3000 від верху зв'язувальної групи хромосоми 1 людини на карті WICGR радіаційних гібридів. Близьким та дальнім структурними маркерами були D1S504 та WI-9641 (D1S2427), відповідно. Використання оточуючих маркерів позицій гена Zcyto10 в регіоні Iq32.2 на інтегрованій карті LDB хромосоми 1 (Genetic Location Database, University of Southampton, WWW server:

http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/). Ряд генів було картовано в регіоні Iq32.2 хромосоми 1. Зокрема, було встановлено, що мутація в цьому регіоні призводить до синдрому Ван дер Вуда, асоційованого з пороком розвитку нижньої губи, що іноді асоційовано з вовчою пащею. Тому ген Zcyto10, що експресується в слинних залозах, може бути корисним в генній терапії цього синдрому. Якщо ссавець має мутований чи втрачений ген Zcyto10, цей ген можна ввести у клітини ссавця.

Згідно з подальшим аспектом винаходу запропоновано антизначеннєві полінуклеотидні композиції, які комплементарні сегменту полінуклеотиду, представленого в ПОСЛІДОВН.№№1, 3, 18 та 33. Такі синтетичні антизначеннєві олігонуклеотиди призначені для приєднання до мРНК, що кодує поліпептиди Zcyto10, та інгібування трансляції такої мРНК. Такі антизначеннєві олігонуклеотиди корисні для інгібування експресії генів, що кодує поліпептид Zcyto10 в культурах клітин чи в суб'єкті.

Згідно з винаходом запропоновано також реагенти, які знайдуть використання в діагностиці. Наприклад, ген Zcyto10, зонд, що включає ДНК чи РНК Zcyto10 або їх послідовність, можна використовувати для визначення, чи присутній ген Zcyto10 на хромосомі 1, або відбулася мутація. Придатні для визначення хромосомні аберації на локусі гена Zcyto10 включають без обмеження анеуплоїдію, зміни числа копій гена, вставки, делеції, зміни рестрикційного сайту та перегрупування. Такі аберації можна визначати, використовуючи полінуклеотиди згідно з винаходом з застосуванням молекулярно-генетичних способів, як-то аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (RFLP), аналіз коротких тандемних повторів (STR) з застосуванням способу PCR, та інші способи аналізу генетичного зчеплення, відомі в рівні техніки (Sambrook et al., там же, Ausbel et al., там же, A.J.Marian, Chest. 108: 255-265, 1995).

Фахівці повинні знати, що послідовності, які розкрито в ПОСЛІДОВН.№№ 2, 3, 12, 13, 19, 20, 25, 26, 34 та 35 представляють одиничні алелі генів та поліпептидів Zcyto10 людини та миші, і що можна чекати

появи алельних варіацій та альтернативного сплайсингу. Алельні варіанти можна клонувати зондуванням кДНК чи геномних бібліотек від різних суб'єктів стандартними способами. Алельні варіанти послідовності ДНК, представленої в ПОСЛІДОВН.№№1, 3, 18 та 33, включаючи ті, що мають мовчазну мутацію, та ті, в яких мутація призводить до змін в амінокислотній послідовності, знаходяться в рамках винаходу.

Послідовність Zcyto10 має 7 сигнальних послідовностей непостійності передачі сигналу, на 3' нетрансляційному регіоні в позиціях 706, 813, 855, та 906 ПОСЛІДОВН.№ 1. Обробка клітин, що експресують Zcyto10, циклогексимідом може послабляти цю непостійність передачі сигналу. Див., G.Shaw et al., Cell, 46:659-667, 1986. Крім того, збагачений АТ 3' нетрансляційний регіон може бути генетично зміненим чи видаленим для подальшої підтримки постійності передачі сигналу.

Використання Zcyto10 для полегшення загоєння ран Дані з прикладу 4 свідчать, що Zcyto10 грає роль при загоєнні ран. Тому Zcyto10 можна застосовувати до поранення чи опіку для полегшення загоєння ран. Zcyto10 можна застосовувати систематично в дозах 1-100 мкг/кг маси тіла суб'єкта. Zcyto10 можна застосовувати також до поранення засобами заспокоєння чи як мазь, що містить від 1 нг до 1 мг Zcyto10 на г засобу заспокоєння чи мазі. Див., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, Penn., 1996). Zcyto10 треба наносити на очищену рану постійно, доки рана не загоїться.

Використання Zcyto10 для збільшення числа тромбоцитів Як можна побачити нижче з прикладу 7, ми відкрили, що Zcyto10 можна використовувати для збільшення числа тромбоцитів. Це особливо важливо для ракових пацієнтів, які відчувають обумовлену хіміотерапією чи радіаційною терапією тромбоцитопенію. Zcyto10 можна використовувати терапевтично з фармацевтичним прийнятним носієм.

Далі винахід ілюстровано необмежувальними прикладами.

Приклад 1 Клонування Zcyto10 Послідовність Zcyto10 \times 1 повної довжини (довша форма) та Zcyto10 \times 2 (коротша форма) висвітлювали використанням 3'-RACE[®] та піддаванням двох утворених фрагментів секвенсуванню (ПОСЛІДОВН.№10 та ПОСЛІДОВН.№11), потім штучному сплай-сингуванню разом з встановленою комп'ютером показаною в ПОСЛІДОВН.№5 послідовністю з послідовністю, що перекривається, з двох фрагментів 3'-гасе.

Оліго, zc15907 (ПОСЛІДОВН.№6), було створено для зони як раз вище (5') припущеного метіоніну для Zcyto10. Подалі, нижче, інший оліго, zc15906 (ПОСЛІДОВН.№7), було створено для зони як раз вище сайту сигнальної послідовності розщеплення. Ці оліго використовували в реакціях 3'-RACE на марафонній кДНК трахеї людини. ZC15907 використали в первинній реакції 3'-гасе, а ZC15906 використали в гніздовій реакції 3'-гасе. MARATHON кДНК виробили, використовуючи ампліфікаційний набір марафонної кДНК (Clontech, Palo Alto, CA) згідно з інструкціями виробника, починаючи з мРНК трахеї людини, придбаній в Clontech.

Полімеразну ланцюгову реакцію (PCR) провели згідно з інструкціями виробника в ампліфікаційному наборі марафонної кДНК з деякими змінами в параметрах термічного циклування. Використаними параметрами термічного циклування в первинній PCR були:

94°C, 1 хв.30с 1х

94°C, 15с68°C1хв. 30х

72°C,7хв. 1х.

Використаними параметрами термічного циклування в гніздовій PCR були:

94°C, 1 хв. 30 с 1х, 94°C, 15 с 68°C 1 хв. 20 с, 30х 72°C, 7 хв. 1х.

Утворені продукти пропускати через 1,2% агаровий гель (Gibco Agarose) і спостерігали дві головні смуги, приблизно на відстані 80 п.о. Смуги вирізали і гель очищали, використовуючи смола QIAEX[™] (Qiagen) згідно з інструкціями виробника. Далі ці фрагменти піддавали секвенсуванню, даючи змогу розпізнати послідовність Zcyto10 \times 1 повної довжини.

Приклад 2 Аналіз норзерн-блотуванням Блоти I, II, III набору тканин людини та RNA Master Dot Blot (Clontech) зондували для визначення розподілу Zcyto10 в тканинах. 45-мер антизначенневого оліго, ПОСЛІДОВН.№9, було створено, використовуючи встановлену послідовність (ПОСЛІДОВН.№5 п.о 100-145), та використано для зондування.

15pm ПОСЛІДОВН.№9 мітили на кінці ³²P, використовуючи полінуклеотидну кіназу T4 (Gibco-BRL). Реакція мічення складалася з 2 мкл 5X реакційного буферу прямої кінази (Gibco-BRL), 1 мкл кінази T4, 15 pm ПОСЛІДОВН.№9, 1 мкл 6000 Ки/ммоль ³²P-гама-АТФ (Amersham) та воду до 10 мкл, і інкубували 30 хвилин при 37°C. Невбудовану радіоактивність видаляли на колонці NucTrap Probe Purification Column (Stratagene). Набір норзернів тканин та RNA Master Dot Blot (Clontech) людини попередньо гібридизували при 50°C три години в 10 мл ExpressHyb (Clontech), що містив 1 мг ДНК сперми лосося та 0,3 мг ДНК cot1 людини (Gibco-BRL), які обидва кип'ятили 3 хвилини, охолоджували льодом 2 хвилини, а потім додавали до ExpressHyb. Гібридизацію проводили протягом ночі при 50°C Початковими умовами промивки були: 2X SSC (розчин хлориду та цитрату натрію), 0,1% SDS (додецилсульфат натрію), при кімнатній температурі протягом 40 хвилин, з кількома змінами промивного розчину, потім 1X SSC, 0,1% SDS при 64°C (Tm-10) протягом 30 хвилин. Фільтри далі експонували на плівці протягом 2 діб.

Експресію Zcyto10 на норзерн-блотах виявляли смугою приблизно 1,2 ко в трахеї, слабкою смугою приблизно 1,5 ко в шлунку та слабшими смугами обох розмірів в підшлунковій залозі. Дот-блоти показали присутність Zcyto10 в трахеї, слинних залозах, плаценті, яєчках, шкірі, простаті, наднирковій залозі та щитовидній залозі.

У мишей його було знайдено в нирках, скелетних м'язах, слинних залозах, печінці та шкірі.

Приклад 3 Хромосомне віднесення та розміщення Zcyto10 Zcyto10 картували до хромосоми 1, використовуючи комерційно доступну версію "Stanford G3 Radiation Hybrid Mapping Panel" (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). "Stanford G3 RH Panel" включає придатні для PCR ДНК від кожного з 83 радіаційних гібридних клонів суцільного геному людини, плюс дві контрольних ДНК (RM-донор та A3-реципієнт). Широко доступний сервер WWW <http://shgc-www.stanford.edu> дозволяє хромосомну локалізацію маркерів.

Для картування Zcyto10 зі "Stanford G3 RH Panel" 20 мкл реакційного середовища помістили в придатні для PCR 96-коміркові планшети для мікротитрування (Stratagene, La Jolla, CA) та використали в термоциклері RoboCycler Gradient 96" (Stratagene). Кожне з 85 середовищ PCR містило 2 мкл 10X реакційного буферу KlenTag PCR (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), 1,6 мкл суміші dNTP (2,5 мМ кожного, PERCIN-ELMER, Foster City, CA), 1 мкл значеннєвого праймеру, ПОСЛІДОВН.№6, 5' ATT CCT AGC TCC TGT GGT CTC CAG 3', 1 мкл антизначеннєвого праймеру, ПОСЛІДОВН.№8, 5' TTC CAA ATT GAG TGT CTT CAG T 3', 2 мкл "RediLoad" (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL), 0,4 мкл 50X Advantage KlenTag Polimerase Mix (Clontech Laboratories, Inc.), 25 нг ДНК з окремого гібридного клону чи контролю та x мкл ddH₂O до загального об'єму 20 мкл. Реакції покривали рівною кількістю мінерального масла та закривали. Умови PCR-циклеру були:

на початку 1 цикл 5 хв. денатурації при 95°C, 35 циклів по 1 хв. денатурації при 95°C, 1 хв. гібридизації при 66°C та 1,5 хв. продовження при 72°C, а потім кінцевий цикл 7 хв. продовження при 72°C. Реакційні середовища розділяли електрофорезом на 2% агаровому гелі (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Результати свідчать про приєднання Zcyto10 до виробника структури SHGC-36215 з LOD-позначкою >10 та на відстані 14,67cR_10000 від маркеру. Використання оточуючих маркерів розміщає Zcyto10 в регіоні Ig32.2 на інтегрованій карті LBD хромосоми 1 (Genetic Location Database, University of Southampton, WWW server: <http://cedar.genetics.soton.ac.uk/publicjtm1/>).

Приклад 4 Використання Zcyto10 для підтримки загоєння поранень Нормальні дорослі самиці мишей Balb/c використовували для представленого дослідю. Їх розмістили в обладнанні для утримання тварин з 12-годинним циклом світло-темрява, досхочу давали воду та лабораторний корм для гризунів. Від дня операції їх тримали окремо.

В цей день тварин анестезували кетаміном (Vetalar, Aveco Inc., Ft. Dodge, IA), 104 мг/кг, плюс ксилазин (Rompun, Mobey Corp., Shawnee, KS), 7 мг/кг, в стерильному (0,2 р-профільтрованому) буферованому фосфатом фізіологічному розчині (PBS) інтраперитональною ін'єкцією. Волосся на їх спині вистригали та видаляли зі шкіри за допомогою NAIR® (Carter-Walace, New York, NY), потім промивали водою. Для протидії опіку від обробки NAIR® наносили 100% гель алое, потім тварин розміщали на планшетах з водяним підігрівом до висихання шкіри та оточуючого міху.

Далі тварин анестезували метофаном (Pittman Moore, Mundelein, NJ) та спину без волосся змочували 70% етанолом. Через шкіру та верхній шар м'яса поверх паравертебральної артерії на рівні попереково-спинного хребця зробили 4 ексцизії по квадрату, кожну по 0,5 см. Рани та оточуючу шкіру без волосся покривали адгезивом, напівпроникним перев'язочним матеріалом, BIOCLUSIVE® (JohnsonJohnson, Arlington, TX). Розрізані краї ексцизії калькували за допомогою BIOCLUSIVE® на ацетатну прозору плівку для оцінки параметрів стягування.

Контрольну шкіру та поранену шкіру через різні відрізки часу (7,15 та 24 години) обробляли, використовуючи комплект Qiagen RNeasy Midi. Коротше, шкіру (контрольну та поранену зону) зважували та гомогенізували в прийнятному об'ємі лізисного буферу (RLT). Лізати центрифугували для видалення залишків тканини та додавали до лізату рівний об'єм 70% етанолу, добре перемішували та завантажували у колонку. Зразки центрифугували протягом 5 хвилин і промивали раз 3,8 мл буферу RW1, а потім двічі по 2,5 мл RPE. Спільні РНК елюювали позбавленою РНК-ази водою. Рівень експресії зразків шкіри вимірювали використанням PCR реального часу (Perkin Elmer ABI Prism 7700 Sequence Detector). Експеримент було призначено для нонтемплатного контролю комплекту стандарту та зразків шкіри. Загальну РНК нирок мишей використовували для побудови калібрувальної кривої. Три комплекти спільних РНК шкіри (25 нг) в цьому досліді використовували 7 годин (контрольні та поранені), 15 годин (контрольні та поранені), 24 години (контрольні та поранені). Кожний зразок трикратно піддавали одностадійній RT-PCR на детекторі послідовності 7700. Для експерименту використовували власний праймер ПОСЛІДОВН.№36, зворотний праймер ПОСЛІДОВН.№37 та зонд Perkin Elmer's TaqMan (ZG-7-FAM). Умови одностадійної RT-PCR були: (стадія RT) 48°C протягом 30 хв., (40 циклів етапу PCR) 95°C протягом 10 хв., 95°C протягом 15с, 60°C протягом 1 хв.

Рівень експресії Zcyto10 в контрольних зразках шкіри на 7-му та 15-у години був порівнюваним - 2,46 та 2,61 нг/мл, відповідно. Від контрольного зразку шкіри на 24-у годину рівень експресії Zcyto10 дорівнював 0. Рівень експресії Zcyto10 від пораненої шкіри на 15-у годину складав 14,45 нг/мл (зростання у 5,5 разів у порівнянні з контролем). Рівень експресії Zcyto10 від пораненої шкіри на 24-у годину складав 5,89 нг/мл. Повторний експеримент, що також включав негативний контроль (тРНК дріжджів) дав подібну зміну а результат для тРНК дріжджів був приблизно нульовим. Результати підтримують реальність ампліфікації та мише-специфічність.

Ці дані підтримують висновок, що Zcyto10 грає роль у загоєнні поранень, оскільки рівень експресії Zcyto10 від пораненої шкіри був вищим у порівнянні з контролем та зростав і зменшувався протягом часу. Тому Zcyto10 можна застосовувати для підтримки загоєння ран.

Приклад 5 Трансгенні миші Були створені трансгенні миші, які експресують Zcyto10 в альбуміновому або металопіаніновому промоторі. При народженні кілька мишей мали лиснячий вигляд і мали обмежену рухливість. Шкіра цих мишей була щільною та складковою, кілька мали також схоже на вуса волосся на нижній губі. Зони ніздрів та роту, кінцівки та хвіст були роздутими.

Одна трансгенна миша, в якій було використано альбуміновий промотор, залишалася живою до доби 3, вона мала суворе відставання у рості. Не розвивалися вуха, а розвиток пальців був послабленим. Усіх тварин умертвляли, коли вони помирали, на доби 1, 2 чи 3. Зразки хвоста та печінки збирали та фіксували їх в 10% нейтральному формаліні, заливали парафіном та розрізали на 3 мкм і красили HE. Усі миші цього фенотипу були трансгенними і мали експресію Zcyto10 від низької до високої.

У більшості тканин значних змін не спостерігали, за винятком шкіри. Шкіра мишенят, що експресують Zcyto10, особливо тих мишей, що мали високий рівень експресії Zcyto10, мала тенденцію бути товстішою, ніж у мишенят, що не експресують. Stratum granulosum у цих мишенят здається зменшеним за товщиною у

порівнянні з тими, що не експресують, в той час як Stratum spinosum був товщим, що обумовлено збільшенням шарів клітин та/або збільшенням діаметру клітин.

На додаток до змін в епідермісі дерма одної миші, що мала середню експресію Zcyto10 була фокально помірно розширена муциновим матеріалом.

Приклад 6 Очистка Zcyto10 від середовища культивованих клітин Вироблених клітинами CHO Zcyto10 виділили з середовища культивованих клітин, використовуючи двоетапний спосіб, що включає катіонообмінну хроматографію та хроматографію виключення за розміром.

А. Етап катіонообмінної хроматографії

Використані матеріали: Колонка (AMICON) діаметром (D) 2,2 см та висотою (H) 6 см, що містить катіонообмінну смолу з ковалентно приєднаними сульфопропільними (SP) групами.

Збирали 15 л культивативного середовища з клітин нирок дитинчати хом'яка (BHK), які були трансфектованими плазмідною, що містила Zcyto10. рН культивативного середовища 2 N HCl доводили до 5. Вищезгадану колонку урівноважували 50 mM ацетатом натрію з рН 5,0. Культивативне середовище завантажували в колонку зі швидкістю 20 об'ємів колонки (cv) на годину при приблизно 8 мл/хв. Після закінчення завантаження колонку промивали 10 cv 50 mM ацетату натрію з рН 5,0. Матеріал в колонці далі елюювали 20 cv 50 mM ацетату натрію з рН 5,0 з градієнтом хлориду натрію від 0 до 0,5 M. Це концентрувало матеріал у культивативному середовищі з 15 л до 170 мл.

Зібрані 170 мл далі концентрували до приблизно 5 мл за допомогою центрифужного концентратора з відсічкою (Millipore, Inc. Bedford, MA) при обертах 5000.

Б. Етап Виключення за розміром (S-100) Етап гель-фільтрації

Використані матеріали: Колонка діаметром 1,6 см та висотою 93 см, гель S-100 (Pharmacia Piscataway, NJ).

Зібрані 5 мл далі завантажували у вищезгадану колонку з гелем S-100. Колонку урівноважували 5X буферованим фосфатом фізіологічним розчином, доводячи рН колонки до 7,0. Zcyto10 відділяли від забруднень, використовуючи PBS при швидкості потоку 1,5 мл/хв. Фракції збирали з інкрементом 2 мл. Поліпептид Zcyto10 виходив у фракціях 52-64 через приблизно 90 хв. після початку елювання, як виявлено електрофорезом на поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS), забарвленому Кумасі блакитним. Гель вивільнив одну смугу з передбаченою молекулярною масою приблизно 14 кДа.

Приклад 7 Клонування мишачого Zcyto10 PCR-праймери праймерного комплексу 5' MARATHON RACE™ (Clontech, Palo Alto, CA) ПОСЛІДОВН.№38, приєднаної до адаптеру MARATHON™ AP1, складений з ПОСЛІДОВН.№39, приєднаною до адаптеру MARATHON RACE™ AP2, з праймерним комплектом 3' MARATHON RACE™ ПОСЛІДОВН.№40, приєднаної до адаптеру MARATHON RACE™ AP1, складений з ПОСЛІДОВН.№41, приєднаною до адаптеру MARATHON RACE™ AP2, та 5' і 3'-гасе виконали на MARATHON RACE™ кДНК шкіри мишей. Кілька фрагментів з цих реакцій були очищені на гелі та секвенсовані, що дало змогу висвітлити кодувальну послідовність мишачого Zcyto10 повної довжини плюс деяка 5' та 3' UTR послідовність. Було відкрито два варіанти мишачого Zcyto10 під назвами ПОСЛІДОВН.№№ 18 та 19 і ПОСЛІДОВН.№№ 33 та 34. Клони ампліфікували за допомогою PCR, використовуючи праймери ПОСЛІДОВН.№№ 42 та 43.

Приклад 8 Аденовірусне застосування Zcyto10 до нормальних мишей Zcyto10 застосовували за допомогою аденовірусу, що містив ген Zcyto10. Нижче описано три групи мишей. Аденовірус ін'єктували внутрішньовенне у самців та самиць мишей C57B1/6. Усі миші отримували бромдезоксіуридин (BrdU) у воді для пиття 3 доби до умертвіння. Це дало змогу визначити проліферацію клітин гістологічними способами. Виміряні параметри включають зміни маси, повний підрахунок крові, хімію сироватки, гістологію, масу органів та проліферацію клітин за допомогою BrdU. Схема експерименту

Група 1 Zcyto10 (ПОСЛІДОВН.№18)/pAC-CMV/Adv 1×10^{11} частинок/дозу (9 самиць, 9 самців умертвляли на добу 21) (2 самиці, 2 самці умертвляли на добу 11) загалом 22 миші. Група 2 нуль-CMV/Adv-контроль 1×10^{11} частинок/дозу

(10 самиць, 10 самців умертвляли на добу 21) (2 самиці, 2 самці умертвляли на добу 11) загалом 24 миші.

Група 3 без обробки

1×10^{11} частинок/дозу (5 самиць, 5 самців) загалом 10 мишей.

Результати Найпереконливішим ефектом було значне зростання числа тромбоцитів, що спостерігали у самців та самиць мишей, яких обробляли Zcyto10-аденовірусом, у порівнянні з контролем з тільки аденовірусом. У самців мишей це супроводжувалося зменшенням гематокриту та зростанням маси селезінки та печінки. За контрастом, оброблені Zcyto10 самиці показали значне зростання числа білих кров'яних клітин, що складається в першу чергу зі збільшення числа лімфоцитів та нейтрофілів у порівнянні з контролем з тільки аденовірусом.

Ці результати означають, що кровотворення посилюється обробкою Zcyto10, але за винятком зростання числа тромбоцитів, яке спостерігають для обох статей, інші впливи є статеві-специфічними.

Інші впливи включають нижченаведене.

Рівень глюкози у самиць був нижчим в обробленій групі, а у самців не показав помітних змін.

Кров'яний сечовинний нітроген (BUN) був вищим для обох груп оброблених самців та самиць.

Лужна фосфатаза у самиць була вищою в обробленій групі, а у самців не показала помітних змін.

Число тромбоцитів було вищим для обох груп оброблених самців та самиць.

Загальне число білих кров'яних клітин (WBC) у самиць було вищою в обробленій групі, а у самців не показала помітних змін.

Перелік послідовностей

<110> ЗимоГенетікс, Інк.

<120> ЦИТОКІН ССАВЦІВ-ТИПУ ПОЛІПЕПТИД-10

<130> 97-72РС

<160> 43

<170> FastSEQ для Windows Версія 3.0

<210> 1

<211> 926

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (45)...(572)

<400> 1

```
ctttgaattc ctagctcctg tggctctccag atttcaggcc taag atg aaa gcc tct      56
                                     Met Lys Ala Ser
                                     1
```

```
agt ctt gcc ttc agc ctt ctc tct gct gcg ttt tat ctc cta tgg act      104
Ser Leu Ala Phe Ser Leu Leu Ser Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Trp Thr
5          10          15          20
```

```
cct tcc act gga ctg aag aca ctc aat ttg gga agc tgt gtg atc gcc      152
Pro Ser Thr Gly Leu Lys Thr Leu Asn Leu Gly Ser Cys Val Ile Ala
          25          30          35
```

```
aca aac ctt cag gaa ata cga aat gga ttt tct gac ata cgg ggc agt      200
Thr Asn Leu Gln Glu Ile Arg Asn Gly Phe Ser Asp Ile Arg Gly Ser
          40          45          50
```

```
gtg caa gcc aaa gat gga aac att gac atc aga atc tta agg agg act      248
Val Gln Ala Lys Asp Gly Asn Ile Asp Ile Arg Ile Leu Arg Arg Thr
          55          60          65
```

```
gag tct ttg caa gac aca aag cct gcg aat cga tgc tgc ctc ctg cgc      296
Glu Ser Leu Gln Asp Thr Lys Pro Ala Asn Arg Cys Cys Leu Leu Arg
          70          75          80
```


cat	ttg	cta	aga	ctc	tat	ctg	gac	agg	gta	ttt	aaa	aac	tac	cag	acc	344
His	Leu	Leu	Arg	Leu	Tyr	Leu	Asp	Arg	Val	Phe	Lys	Asn	Tyr	Gln	Thr	
85					90					95					100	

cct	gac	cat	tat	act	ctc	cgg	aag	atc	agc	agc	ctc	gcc	aat	tcc	ttt	392
Pro	Asp	His	Tyr	Thr	Leu	Arg	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Ala	Asn	Ser	Phe	
				105					110					115		

ctt	acc	atc	aag	aag	gac	ctc	cgg	ctc	tgt	cat	gcc	cac	atg	aca	tgc	440
Leu	Thr	Ile	Lys	Lys	Asp	Leu	Arg	Leu	Cys	His	Ala	His	Met	Thr	Cys	
			120					125					130			

cat	tgt	ggg	gag	gaa	gca	atg	aag	aaa	tac	agc	cag	att	ctg	agt	cac	488
His	Cys	Gly	Glu	Glu	Ala	Met	Lys	Lys	Tyr	Ser	Gln	Ile	Leu	Ser	His	
		135					140						145			

ttt	gaa	aag	ctg	gaa	ctt	cag	gca	gca	gtt	gtg	aag	gct	ttg	ggg	gaa	536
Phe	Glu	Lys	Leu	Glu	Pro	Gln	Ala	Ala	Val	Val	Lys	Ala	Leu	Gly	Glu	
	150					155					160					

cta	gac	att	ctt	ctg	caa	tgg	atg	gag	gag	aca	gaa	taggagga	aaa			582
Leu	Asp	Ile	Leu	Leu	Gln	Trp	Met	Glu	Glu	Thr	Glu					
165					170					175						

gtgatgctgc	tgctaagaat	attcgaggtc	aagagctcca	gtcttcaata	cctgcagagg	642
aggcatgacc	ccaaaccacc	atctctttac	tgtactagtc	ttgtgctggt	cacagtgtat	702
cttatttatg	cattacttgc	ttccttgc	gattgtcttt	atgcatcccc	aatcttaatt	762
gagaccatac	ttgtataaga	tttttgta	atctttctgc	tattggatat	atttattagt	822
taatataatt	atttattttt	tgctatta	gtatttaatt	ttttacttgg	gcatgaaact	882
ttaaaaaaaa	ttcacaagat	tatatttata	acctgactag	agca		926

<210> 2

<211> 176

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

<210> 3
 <211> 793
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (45)...(497)

<400> 3

ctttgaattc ctagctcctg tggctctccag atttcaggcc taag atg aaa gcc tct	56
Met Lys Ala Ser	
1	
agc ctt gcc ttc agc ctt ctc tct gct gcg ttt tat ctc cta tgg act	104
Ser Leu Ala Phe Ser Leu Leu Ser Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Trp Thr	
5 10 15 20	
cct tcc act gga ctg aag aca ctc aat ttg gga agc tgt gtg atc gcc	152
Pro Ser Thr Gly Leu Lys Thr Leu Asn Leu Gly Ser Cys Val Ile Ala	
25 30 35	
aca aac ctt cag gaa ata cga aat gga ttt tct gac ata cgg ggc agt	200
Thr Asn Leu Gln Glu Ile Arg Asn Gly Phe Ser Asp Ile Arg Gly Ser	
40 45 50	
gtg caa gcc aaa gat gga aac att gac atc aga atc tta agg agg act	248
Val Gln Ala Lys Asp Gly Asn Ile Asp Ile Arg Ile Leu Arg Arg Thr	
55 60 65	

gag tct ttg caa gac aca aag cct gcg aat cga tgc tgc ctc ctg cgc	296
Glu Ser Leu Gln Asp Thr Lys Pro Ala Asn Arg Cys Cys Leu Leu Arg	
70 75 80	

cat ttg cta aga ctc tat ctg gac agg gta ttt aaa aac tac cag acc	344
His Leu Leu Arg Leu Tyr Leu Asp Arg Val Phe Lys Asn Tyr Gln Thr	
85 90 95 100	

cct gac cat tat act ctc cgg aag atc agc agc ctc gcc aat tcc ttt	392
Pro Asp His Tyr Thr Leu Arg Lys Ile Ser Ser Leu Ala Asn Ser Phe	
105 110 115	

ctt acc atc aag aag gac ctc cgg ctc tgt ctg gaa cct cag gca gca	440
Leu Thr Ile Lys Lys Asp Leu Arg Leu Cys Leu Glu Pro Gln Ala Ala	
120 125 130	

gtt gtg aag gct ttg ggg gaa cta gac att ctt ctg caa tgg atg gag	488
Val Val Lys Ala Leu Gly Glu Leu Asp Ile Leu Leu Gln Trp Met Glu	
135 140 145	

gag aca gaa taggaggaaa gtgatgctgc tgctaagaat attcgaggtc	537
Glu Thr Glu	
150	

aagagctcca gtcttcaata cctgcagagg aggcattgacc ccaaaccacc atctctttac	597
tgtactagtc ttgtgctggt cacagtgtat cttatttatg cattacttgc ttccttgcatt	657
gattgtcttt atgcatcccc aatcttaatt gagaccatac ttgtataaga tttttgtaat	717
atctttctgc tattggatat atttattagt taatatattt atttattttt tgctattaat	777
gtatttaatt ttttac	793

<210> 4

<211> 151

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Ala Ser Ser Leu Ala Phe Ser Leu Leu Ser Ala Ala Phe Tyr
1 5 10 15

Leu Leu Trp Thr Pro Ser Thr Gly Leu Lys Thr Leu Asn Leu Gly Ser
20 25 30

Cys Val Ile Ala Thr Asn Leu Gln Glu Ile Arg Asn Gly Phe Ser Asp
35 40 45

Ile Arg Gly Ser Val Gln Ala Lys Asp Gly Asn Ile Asp Ile Arg Ile
50 55 60

Leu Arg Arg Thr Glu Ser Leu Gln Asp Thr Lys Pro Ala Asn Arg Cys
65 70 75 80

Cys Leu Leu Arg His Leu Leu Arg Leu Tyr Leu Asp Arg Val Phe Lys
85 90 95

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

<210> 5
 <211> 253
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 5

ctttgaattc ctagctcctg tggctctccag atttcaggcc taagatgaaa gcctctagtc	60
ttgccttcag ccttctctct gctgcgtttt atctcctatg gactccttcc actggactga	120
agacactcaa tttgggaagc tgtgtgatcg ccacaaacct tcaggaaata cgaaatggat	180
tttctgagat acggggcagt gtgcaagcca aagatggaaa cattgacatc agaatcttaa	240
ggaggactga gtc	253

<210> 6
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 6

attcctagct cctgtggtct ccag	24
----------------------------	----

<210> 7
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 7

ctctgctgcg ttttatctcc tatgg	25
-----------------------------	----

<210> 8
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 8

tcccaaattg agtgtcttca gt	22
--------------------------	----

<210> 9
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 9

cacagcttcc caaattgagt gtcttcagtc cagtggaaagg agtcc 45

<210> 10
 <211> 747
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 10

ttttctgaca	tacggggcag	tgtgcaagcc	aaagatggaa	acattgacat	cagaatctta	60
aggaggactg	agtctttgca	agacacaaag	cctgcgaatc	gatgctgcct	cctgcgccat	120
ttgctaagac	tctatctgga	cagggatatt	aaaaactacc	agaccctga	ccattatact	180
ctccggaaga	tcagcagcct	cgccaattcc	tttcttacca	tcaagaagga	cctccggctc	240
tgtcatgccc	acatgacatg	ccattgtggg	gaggaagcaa	tgaagaaata	cagccagatt	300
ctgagtcact	ttgaaaagct	ggaacctcag	gcagcagttg	tgaaggcttt	gggggaacta	360
gacattcttc	tgcaatggat	ggaggagaca	gaataggagg	aaagtgatgc	tgctgctaag	420
aatattcgag	gtcaagagct	ccagtcttca	atacctgcag	aggaggcatg	accccaaacc	480
accatctctt	tactgtacta	gtcttgtgct	ggtcacagtg	tatcttattt	atgcattact	540
tgcttccttg	catgattgtc	tttatgcac	cccaatctta	attgagacca	tacttgtata	600
agatttttgt	aatatctttc	tgctattgga	tatatattatt	agttaataata	tttattttatt	660
ttttgctatt	aatgtattta	atTTTTTact	tgggcatgaa	actttaaaaa	aaattcacia	720
gattatattt	ataacctgac	tagagca				747

<210> 11
 <211> 614
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 11

ttttctgaca	tacggggcag	tgtgcaagcc	aaagatggaa	acattgacat	cagaatctta	60
aggaggactg	agtctttgca	agacacaaag	cctgcgaatc	gatgctgcct	cctgcgccat	120
ttgctaagac	tctatctgga	cagggatatt	aaaaactacc	agaccctga	ccattatact	180
ctccggaaga	tcagcagcct	cgccaattcc	tttcttacca	tcaagaagga	cctccggctc	240
tgtctggaac	ctcaggcagc	agttgtgaag	gctttggggg	aactagacat	tcttctgcaa	300
tggatggagg	agacagaata	ggaggaaagt	gatgctgctg	ctaagaatat	tcgaggtaaa	360
gagctccagt	cttcaatacc	tgagaggagg	gcatgacccc	aaaccacat	ctctttactg	420
tactagtctt	gtgctgggtc	cagtgtatct	tatttatgca	ttacttgctt	ccttgcatga	480
ttgtctttat	gcatcccaa	tcttaattga	gaccatactt	gtataagatt	tttgtaatat	540
ctttctgcta	ttggatatat	ttattagtta	atatatttat	ttattttttg	ctattaatgt	600
atttaatttt	ttac					614

<210> 12
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

```

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

```

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

```

Ile Ala Thr Asn Leu Gln Glu Ile Arg Asn Gly Phe Ser Asp Ile
 1           5           10          15

```

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

<400> 15

Leu Asp Arg Val Phe Lys Asn Tyr Gln Thr Pro Asp His Tyr Thr
1 5 10 15

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Leu Ala Asn Ser Phe Leu Thr Ile Lys Lys Asp Leu Arg Leu Cys
1 5 10 15

<210>	17
<211>	15
<212>	PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Val Val Lys Ala Leu Gly Glu Leu Asp Ile Leu Leu Gln Trp Met
1 5 10 15

<210> 18
<211> 824
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (71)...(598)

<400> 18

```

tgggagacat cgatagccct gattgatctc tttgaatfff cgcttctggt ctccaggatc    60
taggtgtaag atg aaa ggc ttt ggt ctt gcc ttt gga ctg ttc tcc gct    109
      Met Lys Gly Phe Gly Leu Ala Phe Gly Leu Phe Ser Ala
          1             5             10

```

gtg ggt ttt ctt ctc tgg act cct tta act ggg ctc aag acc ctc cat 157
Val Gly Phe Leu Leu Trp Thr Pro Leu Thr Gly Leu Lys Thr Leu His
15 20 25

ttg gga agc tgt gtg att act gca aac cta cag gca ata caa aag gaa Leu Gly Ser Cys Val Ile Thr Ala Asn Leu Gln Ala Ile Gln Lys Glu 30 35 40 45	205
ttt tct gag att cgg gat agt gtg caa gct gaa gat aca aat att gac Phe Ser Glu Ile Arg-Asp Ser Val Gln Ala Glu Asp Thr Asn Ile Asp 50 55 60	253
atc aga att tta agg acg act gag tct ttg aaa gac ata aag tct ttg Ile Arg Ile Leu Arg Thr Thr Glu Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ser Leu 65 70 75	301
gat agg tgc tgc ttc ctt cgt cat cta gtg aga ttc tat ctg gac agg Asp Arg Cys Cys Phe Leu Arg His Leu Val Arg Phe Tyr Leu Asp Arg 80 85 90	349
gta ttc aaa gtc tac cag acc cct gac cac cat acc ctg aga aag atc Val Phe Lys Val Tyr Gln Thr Pro Asp His His Thr Leu Arg Lys Ile 95 100 105	397
agc agc ctc gcc aac tcc ttt ctt atc atc aag aag gac ctc tca gtc Ser Ser Leu Ala Asn Ser Phe Leu Ile Ile Lys Lys Asp Leu Ser Val 110 115 120 125	445
tgt cat tct cac atg gca tgt cat tgt ggg gaa gaa gca atg gag aaa Cys His Ser His Met Ala Cys His Cys Gly Glu Glu Ala Met Glu Lys 130 135 140	493
tac aac caa att ctg agt cac ttc ata gag ttg gaa ctt cag gca gcg Tyr Asn Gln Ile Leu Ser His Phe Ile Glu Leu Glu Leu Gln Ala Ala 145 150 155	541
gtg gta aag gct ttg gga gaa cta ggc att ctt ctg aga tgg atg gag Val Val Lys Ala Leu Gly Glu Leu Gly Ile Leu Leu Arg Trp Met Glu 160 165 170	589
gag atg cta tagatgaaag tggagaggct gctgagaaca ctctgtcca Glu Met Leu 175	638
agaatctcag acctcagcac catgaagaca tggccccagg tgctggcatt tctactcaag agttccagtc ctcagcacca cgaagatggc ctcaaaccac caccctttg tgatataact tagtgctagc tatgtgtata ttatttctac attattggct cccttatgtg aatgccttca tgtgtc	698 758 818 824

<210> 19

<211> 176

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

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

Ala Asn Ser Phe Leu Ile Ile Lys Lys Asp Leu Ser Val Cys His Ser
 115 120 125
 His Met Ala Cys His Cys Gly Glu Glu Ala Met Glu Lys Tyr Asn Gln
 130 135 140
 Ile Leu Ser His Phe Ile Glu Leu Glu Leu Gln Ala Ala Val Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Glu Leu Gly Ile Leu Leu Arg Trp Met Glu Glu Met Leu
 165 170 175

<210> 20

<211> 152

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

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

Glu	Leu	Gln	Ala	Ala	Val	Val	Lys	Ala	Leu	Gly	Glu	Leu	Gly	Ile	Leu
	130						135					140			
Leu	Arg	Trp	Met	Glu	Glu	Met	Leu								
145						150									

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 22

Leu	Asp	Arg	Val	Phe	Lys	Val	Tyr	Gln	Thr	Pro	Asp	His	His	Thr
1				5					10					15

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 23

Leu	Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Ile	Ile	Lys	Lys	Asp	Leu	Ser	Val	Cys
1				5					10					15

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 24

Val	Val	Lys	Ala	Leu	Gly	Glu	Leu	Gly	Ile	Leu	Leu	Arg	Trp	Met
1				5					10					15

<210> 25
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 25

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

ttg gga agc tgt gtg att act gca aac cta cag gca ata caa aag gaa	205
Leu Gly Ser Cys Val Ile Thr Ala Asn Leu Gln Ala Ile Gln Lys Glu	
30 35 40 45	
ttt tct gag att cgg gat agt gtg tct ttg gat agg tgc tgc ttc ctt	253
Phe Ser Glu Ile Arg Asp Ser Val Ser Leu Asp Arg Cys Cys Phe Leu	
50 55 60	
cgt cat cta gtg aga ttc tat ctg gac agg gta ttc aaa gtc tac cag	301
Arg His Leu Val Arg Phe Tyr Leu Asp Arg Val Phe Lys Val Tyr Gln	
65 70 75	
acc cct gac cac cat acc ctg aga aag atc agc agc ctc gcc aac tcc	349
Thr Pro Asp His His Thr Leu Arg Lys Ile Ser Ser Leu Ala Asn Ser	
80 85 90	
ttt ctt atc atc aag aag gac ctc tca gtc tgt cat tct cac atg gca	397
Phe Leu Ile Ile Lys Lys Asp Leu Ser Val Cys His Ser His Met Ala	
95 100 105	
tgt cat tgt ggg gaa gaa gca atg gag aaa tac aac caa att ctg agt	445
Cys His Cys Gly Glu Glu Ala Met Glu Lys Tyr Asn Gln Ile Leu Ser	
110 115 120 125	
cac ttc ata gag ttg gaa ctt cag gca gcg gtg gta aag gct ttg gga	493
His Phe Ile Glu Leu Glu Leu Gln Ala Ala Val Val Lys Ala Leu Gly	
130 135 140	
gaa cta ggc att ctt ctg aga tgg atg gag gag atg cta tagatgaaag	542
Glu Leu Gly Ile Leu Leu Arg Trp Met Glu Glu Met Leu	
145 150	
tggataggct gctgagaaca ctctgtcca agaattctcag acctcagcac catgaagaca	602
tggccccagg tgctggcatt tctactcaag agttccagtc ctcagcacca cgaagatggc	662
ctcaaaccac caccctttg tgatataact tagtgctagc tatgtgtata ttatttctac	722
attattggct cccttatgtg aatgccttca tgtg	756

<210> 34

<211> 154

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

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

Val Arg Phe Tyr Leu Asp Arg Val Phe Lys Val Tyr Gln Thr Pro Asp
 65 70 75 80
 His His Thr Leu Arg Lys Ile Ser Ser Leu Ala Asn Ser Phe Leu Ile
 85 90 95
 Ile Lys Lys Asp Leu Ser Val Cys His Ser His Met Ala Cys His Cys
 100 105 110
 Gly Glu Glu Ala Met Glu Lys Tyr Asn Gln Ile Leu Ser His Phe Ile
 115 120 125
 Glu Leu Glu Leu Gln Ala Ala Val Val Lys Ala Leu Gly Glu Leu Gly
 130 135 140
 Ile Leu Leu Arg Trp Met Glu Glu Met Leu
 145 150

<210> 35

<211> 130

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

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

<210> 36

<211> 27

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 36

agattctatc tggacagggt attcaaa

<210> 37
<211> 17
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 37

gcgaggctga tctttct 17

<210> 38
<211> 25
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 38

tggcgaggct gctgatcttt ctcag 25

<210> 39
<211> 25
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 39

ctttatgtct ttcaaagact cagtc 25

<210> 40
<211> 26
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 40

catcagaatt ttaaggacga ctgagt 26

<210> 41
<211> 25
<212> ДНК
<213> Mus musculus .

<400> 41

ggtggtcagg ggtctggtag acttt 25

<210> 42
<211> 23
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 42

ggtgcatatt cctggtggct aga

23

<210> 43
<211> 25
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 43

attgcagtgt aagggaatac agaga

25