



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96122 (13) C2
(51) МПК (2011.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АНТИТІЛО АБО ЙОГО АНТИГЕНЗВ'ЯЗУЮЧИЙ ФРАГМЕНТ, ЯКЕ СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З IL-22RA, ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

1

(21) a200705409
(22) 21.10.2005
(24) 10.10.2011
(86) PCT/US2005/037821, 21.10.2005
(31) 60/621,553
(32) 22.10.2004
(33) US
(46) 10.10.2011, Бюл.№ 19, 2011 р.
(72) СЮЙ ВЕНЬФЕН, US, КІНДСФОГЕЛЬ УЕЙН Р., US, ЧАНДРАСЕХЕР ДЖАСМІН А., US, ДІЛЛОН СТЕЙСІ Р., US, ЛЕНЕР ДЖОЙС М., US, СЯДАК ЕНТОНІ У., US, СІВАКУМАР ПАЛАВУР В., US, МУР МАРГАРЕТ Д., US
(73) ЗАЙМОДЖЕНЕТИКС, ІНК., US
(56) WO A 2004085476, 07.10.2004.
WO A 2004085475, 07.10.2004.
WO A 0212345, 14.02.2002.
WO A 9907848, 18.02.1999.
WO A 02072607, 19.09.2002.
(57) 1. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, яке специфічно зв'язується з людським IL-22RA і експресується гібридомним клоном 280.46.3.4, депонованим в Американській колекції культур ATCC під номером РТА-6284.
2. Людське антитіло, отримане з антитіла за п.1, яке специфічно зв'язується з людським IL-22RA.
3. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за п. 1 або 2, яке або який є пегільованим.
4. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за п. 1 або 2, яке або який додатково включає радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуорес-

2

центний маркер, хемілюмінесцентний маркер, пептидну мітку, магнітну частинку, лікарський засіб або токсин.
5. Фармацевтична композиція, що включає антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за п. 2.
6. Імунокон'югат, який включає антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент за п. 1 або 2 і терапевтичний агент або виявну мітку.
7. Гібридомний клон 280.46.3.4, депонований в ATCC під номером РТА-6284, який продукує моноклональне антитіло, яке специфічно зв'язується з IL-22RA.
8. Спосіб лікування ссавця, ураженого запальною хворобою, в якій певну роль відіграє IL-22RA, що передбачає введення антитіла за п. 2, яке зменшує запалення.
9. Спосіб за п. 8, в якому хворобою є хронічна запальна хвороба.
10. Спосіб за п. 9, при якому хворобою є хронічна запальна хвороба із групи: запальна хвороба кишечника, виразковий коліт, хвороба Крона, артрит, псоріатичний артрит, ревматоїдний артрит і псоріаз.
11. Спосіб за п. 8, при якому хворобою є гостра запальна хвороба.
12. Спосіб за п. 11, в якому хворобою є гостра запальна хвороба із групи: ендотоксикоз, сепсис, токсичний шок та інфекційна хвороба.
13. Спосіб за будь-яким з пп. 8-12, в якому ссавцем є людина.

В цій заявці просять установити пріоритет за більш ранньою попередньою заявкою № 60/621553, поданою 22 жовтня 2004 року і включеною тут як посилання.

Відомий рівень

Цитокини являють собою розчинні малі білки, які опосередковують різноманітні біологічні процеси, в тому числі регуляцію росту та диференціацію багатьох типів клітин (див., наприклад, Arai et al., Annu. Rev. Biochem. 59:783 (1990); Mosmann, Curr.

Opin. Immunol. 3:311 (1991); Paul and Seder, Cell 76:241 (1994)). Білки, що складають групу цитокінів, включають інтерлейкіни, інтерферони, колонієстимулюючі фактори (КСФ), фактори некрозу пухлин та інші регуляторні молекули. Наприклад, інтерлейкін-17 людини являє собою цитокин, що стимулює експресію інтерлейкіну-6, молекули 1 внутрішньоклітинної адгезії, інтерлейкіну-8, гранулоцито-макрофаго-колонієстимулюючого фактора (ГМКСФ) та експресію простагландину E2, і відіг-

(13) C2

(11) 96122

(19) UA

рає певну роль у вибіркового визріванні кровотворних клітин-попередників CD34+ у нейтрофіли (Yao et al., J. Immunol. 155:5483 (1995); Fossiez et al., J. Exp. Med. 183:2593 (1996)).

Рецептори, що зв'язують цитокіни, зазвичай складаються з одного або більшої кількості інтегральних білків мембрани, які зв'язують високоафінний цитокін і трансдукують цей акт зв'язування в клітину через цитоплазматичні ділянки певних субодиниць рецептора. Рецептори цитокіну згруповані в декілька класів на основі подібності їхніх позаклітинних лігандзв'язуючих доменів. Наприклад, ланцюги рецепторів, відповідальні за зв'язування та/або трансдукцію цього акту інтерферонів, є членами сімейства рецепторів цитокінів класу II на основі характерного позаклітинного домену залишку 200.

Виявлювана *in vivo* активність цитокінів та їхніх рецепторів показує клінічний потенціал інших цитокінів, рецепторів цитокінів, агоністів цитокінів і антагоністів цитокінів та потребу в них. Наприклад, виявлювана *in vivo* активність сімейства прозапальних цитокінів показує величезний клінічний потенціал антагоністів прозапальних молекул та потребу в них. Даний винахід задовольняє ці потреби, пропонуючи антагоністи прозапальним цитокінам IL-20 та IL-22. Запропоновані антагоністи, які можуть блокувати, інгібувати, зменшувати, протидіяти або нейтралізувати активність IL-22, IL-20 або їх обох, включають розчинні рецептори IL-22RA та нейтралізуючі антитіла anti-IL-22RA. Винахід також пропонує їх використання при лікуванні запальної хвороби, а також відповідні состави і способи застосування.

Детальний опис винаходу

1. Огляд

Серед інших винаходів даний винахід пропонує нові способи використання розчинного рецептора, що має позначення "Zcytor11" або "IL-22RA", та нейтралізуючих антитіл до рецепторів цитокіну IL-22RA. Даний винахід також пропонує поліпептидні фрагменти розчинного IL-22RA та злиті білки для використання при запальних і аутоімунних хворобах людини. Запропоновані антитіла anti-IL-22RA і розчинні рецептори IL-22RA, в тому числі запропоновані нейтралізуючі антитіла anti-IL-22RA, можна застосовувати для блокування, інгібування, зменшення, протидії або нейтралізації активності або IL-22, або IL-20, або їх обох при лікуванні специфічних хвороб людини, таких як псоріаз, псоріатичний артрит, артрит, ендотоксикоз, запальна хвороба кишечника (ЗХК), коліт та інші описувані тут запальні стани.

Нуклеотидна послідовність, що кодує Zcytor11 (IL-22RA) людини, ілюструється послідовністю SEQ ID NO:1; кодований поліпептид представлено послідовністю SEQ ID NO:2. IL-22RA являє собою рецепторну субодиницю і для IL-20, і для IL-22. Zcytor11 (IL-22RA) описаний у пат. США № 5965704, міжнародних патентних заявках WO 02/12345 і WO 02/072607. Аналіз клону кДНК людини, що кодує IL-22RA (SEQ ID NO:1), виявив відкриту рамку читування, що кодує 574 амінокислоти (SEQ ID NO:2), яка включає позаклітинний лігандзв'язуючий домен із приблизно 211 амінокис-

лотного залишку (амінокислотні залишки 18-228 послідовності SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3), трансмембранний домен із приблизно 23 амінокислотних залишків (амінокислотні залишки 229-251 послідовності SEQ ID NO:2) та внутрішньоклітинний домен із приблизно 313 амінокислотних залишків (амінокислотні залишки 252-574 послідовності SEQ ID NO:2). Таким чином, запропоновані молекули включають поліпептиди, які включають цитокінзв'язуючий домен, що складається з амінокислотних залишків 18-228 послідовності SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3. В одному варіанті запропонований розчинний рецептор, розчинний IL-22R зливають з константною зоною важкого ланцюга (показано у послідовності SEQ ID NO:4). Фахівці розуміють, що ці границі доменів є приблизними. Можлива також делеція залишків з кінців цих доменів.

Як вже зазначалось, даний винахід пропонує виділені поліпептиди, що містять амінокислотну послідовність, яка принаймні на 70%, принаймні на 80% або принаймні на 90%, або більше ніж на 95%, наприклад на 96%, 97%, 98%, або більше ніж на 99% і навіть більше є ідентичною еталонній амінокислотній послідовності, що складається з амінокислотних залишків 18-228 послідовності SEQ ID NO:2, яка також ілюструється SEQ ID NO:3, в якій згаданий виділений поліпептид специфічно зв'язується з антитілом, яке специфічно зв'язується з поліпептидом, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3. Ілюстративні поліпептиди включають поліпептиди, що містять амінокислотні залишки послідовності SEQ ID NO:3. Крім того, даний винахід також пропонує виділені поліпептиди, що зв'язують IL-22 (наприклад, поліпептидну послідовність людського IL-22, показану у послідовності SEQ ID NO:6). Поліпептидну послідовність людського IL-22 представлена у послідовності SEQ ID NO:5. Поліпептидну послідовність IL-22 миши представлена у послідовності SEQ ID NO:10, відповідний поліпептид - у послідовності SEQ ID NO:11. Даний винахід також пропонує виділені поліпептиди, що зв'язують IL-20 (наприклад, поліпептидну послідовність людського IL-20, показану у послідовності SEQ ID NO:8; міжнародна пат. заявка № WO 99/27103). Поліпептидну послідовність людського IL-20 представлена у послідовності SEQ ID NO:7.

Даний винахід також пропонує виділені поліпептиди та епітопи, що містять принаймні 15 замінних амінокислотних залишків амінокислотної послідовності SEQ ID NO:3. Репрезентативні поліпептиди включають поліпептиди, які містять або складаються з послідовності SEQ ID NO:3, її антигенного епітопу або її фрагменту, що зв'язує функціонально активний IL-20 або IL-22. Крім того, даний винахід також пропонує виділені поліпептиди, які зв'язують, блокують, інгібують, зменшують, протидіють або нейтралізують активність IL-22 або IL-20.

Винахід також включає поліпептиди варіантного IL-22RA, в яких амінокислотна послідовність варіантного поліпептиду ідентична з амінокислотними залишками послідовності SEQ ID NO:3, вибраної з групи, що складається з амінокислотних

послідовностей, які мають принаймні 70%, принаймні 80%, принаймні 90%, принаймні 95% або більше ніж 95%, наприклад 96%, 97%, 98%, або більше ніж 99% і навіть більше ідентичності і в яких будь-яка різниця між амінокислотною послідовністю варіантного поліпептиду та відповідною амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:3 обумовлена одним або більшою кількістю консервативних заміщень амінокислот. Даний винахід описує такі консервативні заміщення амінокислот. Крім того, винахід пропонує також виділені поліпептиди, що зв'язують, блокують, інгібують, зменшують, протидіють або нейтралізують активність IL-22 або IL-20.

Винахід крім того пропонує антитіла та фрагменти антитіл, які специфічно зв'язуються з такими поліпептидами. Прикладами таких антитіл є нейтралізуючі антитіла, поліклональні антитіла, моноклональні антитіла мишей, гуманізовані антитіла, синтезовані з моноклональних антитіл мишей, та моноклональні антитіла людини. Прикладами фрагментів антитіл є F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv та мінімальні розпізнавальні одиниці. Нейтралізуючі антитіла у кращому варіанті зв'язують IL-22RA, так що взаємодія IL-20 та IL-22 з IL-22RA блокується, інгібуються, зменшується, зазнає протидії або нейтралізується; даний винахід також включає антитіла, що нейтралізують anti-IL-22RA, так що зв'язування будь-якого з IL-20 або IL-22 з IL-22RA блокується, інгібуються, зменшується, зазнає протидії або нейтралізується. Тобто запропоновані нейтралізуючі anti-IL-22RA антитіла можуть або зв'язувати, блокувати, інгібувати, зменшувати, протидіяти або нейтралізувати кожний з IL-20 або IL-22 окремо, або зв'язувати, блокувати, інгібувати, зменшувати, протидіяти або нейтралізувати IL-20 та IL-22 разом. Даний винахід крім того включає композиції, що містять носій і описані тут пептид, поліпептид або антитіло.

Крім того, винахід пропонує фармацевтичні композиції, що містять фармацевтично прийнятний носій і принаймні один такий експресуючий вектор або рекомбінантний вірус, що містить такі експресуючі вектори. Даний винахід включає також фармацевтичні композиції, що містять фармацевтично прийнятний носій і описаний тут поліпептид або антитіло.

Даний винахід також розглядає антиідіотипічні антитіла або фрагменти антиідіотипічних антитіл, які специфічно зв'язуються з антитілом або фрагментом антитіла, яке специфічно зв'язується з поліпептидом, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3 або її фрагмент. Показове антиідіотипічне антитіло зв'язується з антитілом, яке специфічно зв'язується з поліпептидом, що складається з послідовності SEQ ID NO:3.

Даний винахід також пропонує злиті білки, що містять поліпептид IL-22RA та імуноглобуліновий фрагмент. В таких злитих білках імуноглобуліновий фрагмент може являти собою С-сегмент важкого ланцюга імуноглобуліну, наприклад Fc-фрагмент людини. Винахід також включає виділені молекули нуклеїнової кислоти, що кодують такі злиті білки.

Даний винахід пропонує також поліклональні та моноклональні антитіла, які зв'язуються з поліпептидами, що містять позаклітинний домен IL-22RA, наприклад мономерні, гомодимерні, гетеродимерні та мультимерні рецептори, в тому числі розчинні рецептори. Більш того, такі антитіла можна застосовувати, щоб протидіяти зв'язуванню лігандів IL-22RA, IL-22 (SEQ ID NO:6) та IL-20 (SEQ ID NO:8), окремо або разом, з рецептором IL-22RA.

Більш того, надекспресію або підвищення функціональної активності IL-22 та IL-20 виявили в людських осередках псоріатичного ураження та зразках шкіри людини з atopічним дерматитом, що дає можливість припустити, що IL-22, як і IL-20, також беруть участь в таких запальних хворобах людей, як псоріаз, atopічний дерматит, та інших запальних хворобах шкіри та епітеліальних тканин. Крім того, надекспресія IL-20 або IL-22 у трансгенних мишей показала епідермальне потовщення і залучення імунокомпетентних клітин, що є показником псоріатичного фенотипу; а додаткова ін'єкція IL-22 нормальним мишам проявилась у епідермальному потовщенні і залученні імунокомпетентних клітин, що є показником псоріатичного фенотипу, що усувається антагоністом розчинного рецептора IL-22RA (zcytor16; WO 01/40467). Такі дані, отримані in vivo, також дають можливість припустити, що прозапальний IL-22 бере участь у псоріазі, atopічному дерматиті або інших запальних хворобах шкіри та епітеліальних тканин. А якщо так, антагоністи активності IL-22 та IL-20, наприклад розчинні рецептори IL-22RA і антитіла до них, в тому числі запропоновані моноклональні та нейтралізуючі антитіла anti-IL-22RA людини, є корисними при лікуванні запальних хвороб, зокрема антагоністи і до IL-22, і до IL-20, окремо або разом, при лікуванні псоріазу. Крім того, антагоністи активності IL-22, наприклад розчинні рецептори IL-22RA і антитіла до них, в тому числі запропоновані моноклональні та нейтралізуючі антитіла anti-IL-22RA людини, є корисними, наприклад, для зв'язування, блокування, інгібуювання, зменшення, протидії або нейтралізації IL-22 та IL-20 (окремо або разом), при лікуванні atopічного дерматиту, ЗХК, коліту, ендотоксикозу, артриту, ревматоїдного артриту і псоріатичного артриту, респіраторного захворювання дорослих (РЗД), септичного шоку, поліорганної недостатності, запального ураження легенів, наприклад астми або бронхіту, бактеріальної пневмонії, псоріазу, екземи, atopічного і контактного дерматиту і запальної хвороби кишечника, наприклад виразкового коліту та хвороби Крона.

Ці та інші аспекти винаходу стануть очевидними з наступного детального опису. Крім того, як посилання наведені джерела інформації.

2. Термінологія

В наступному описі застосовується ряд термінів. Нижче наведені визначення, що полегшать розуміння винаходу.

Термін «нуклеїнова кислота» або «молекула нуклеїнової кислоти» відноситься до полінуклеотидів, наприклад деоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) або рибонуклеїнової кислоти (РНК), олігону-

клеотиднуклеотидів, фрагментів, синтезованих полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР), та фрагментів, синтезованих шляхом лігування, розривання, дії ендонуклеази або дії екзонуклеази. Молекули нуклеїнової кислоти можуть складатися з мономерів, які являють собою нуклеотиди, що зустрічаються у природі (наприклад, ДНК і РНК), або аналоги нуклеотидів, що зустрічаються у природі (наприклад, α -енантіомерні форми нуклеотидів, що зустрічаються у природі), або комбінацію обох. Модифіковані нуклеотиди можуть мати зміни в компонентах цукрів та/або компонентах піримідинової або пуринової основи. Модифікації цукрів включають, наприклад, заміну однієї або більше гідроксильних груп галогенами, алкільними групами, амінами та азидогрупами, або цукри можна функціоналізувати як прості або складні ефіри. Більш того, весь компонент цукрів можна замінити просторово або електронно аналогічними структурами, наприклад аза-цукрами або карбоциклічними аналогами цукрів. Приклади модифікацій в основному компоненті включають алкіловані пурини та піримідини, алкіловані пурини або піримідини, або інші добре відомі гетероциклічні замішувачі. Мономери нуклеїнової кислоти можуть зв'язуватись фосфодієфірними зв'язками або аналогами таких зв'язків. Аналоги фосфодієфірних зв'язків включають фосфоротіоат, фосфородітіоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанілотіоат, фосфоранілідат, фосфорамідат тощо. Термін «молекула нуклеїнової кислоти» також включає так звані «пептидні нуклеїнові кислоти», які містять природні або модифіковані основи нуклеїнових кислот, прикріплені до поліамідного каркаса. Нуклеїнові кислоти можуть бути або односпіральними, або двоспіральними.

Термін «комплемент молекули нуклеїнової кислоти» відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, що має комплементарну нуклеотидну послідовність і зворотну орієнтацію порівняно з еталонною нуклеотидною послідовністю. Наприклад, послідовність 5' ATGCACGGG 3' є комплементарною до послідовності 5' CCCGTGCAT 3'.

Термін «вироджена нуклеотидна послідовність» означає послідовність нуклеотидів, яка включає один або більше вироджених кодонів порівняно з еталонною молекулою нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид. Вироджені кодони містять різні триплети нуклеотидів, але кодують один і той самий амінокислотний залишок (тобто і GAU, і GAC кодує Asp).

Термін «структурний ген» відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, яка транскрибується у матричну РНК (мРНК), яка потім трансліується у послідовність амінокислот, характерних для конкретного поліпептиду.

«Виділена молекула нуклеїнової кислоти» являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, неінтегровану в геномну ДНК організму. Наприклад, молекула ДНК, що кодує фактор росту, який було виділено з геномної ДНК клітини, є виділеною молекулою ДНК. Іншим прикладом виділеної молекули нуклеїнової кислоти є молекула хімічно синтезованої нуклеїнової кислоти, яка не є інтегрованою в геном організму. Молекула нуклеїнової кислоти,

яку було виділено з конкретного зразка, є меншою, ніж повна молекула ДНК хромосоми з цього зразка.

«Структурний компонент молекули нуклеїнової кислоти» - це молекула нуклеїнової кислоти, одно- або двоспіральної, яку модифікували шляхом втручання людини, щоб утримувати сегменти нуклеїнової кислоти об'єднаними та розміщеними у порядку, якого не існує у природі.

«Лінійна ДНК» позначає молекули не кільцевої ДНК, що мають вільні 5'- та 3'-кінці. Лінійну ДНК можна скласти із молекул замкненої кільцевої ДНК, наприклад плазмід, шляхом ферментативного перетравлювання або фізичного розривання.

«Комплементарна ДНК (кДНК)» - це молекула односпіральної ДНК, яка утворилася з матриці мРНК за допомогою ферменту зворотної транскриптази. Для ініціювання зворотної транскриптази, як правило, застосовують затравку, комплементарну до ділянок мРНК. Фахівці в цій галузі також застосовують термін «кДНК» для позначення молекули двоспіральної ДНК, що складається з молекули односпіральної ДНК та спіралі її комплементарної ДНК. Термін «кДНК» також відноситься до клону молекули кДНК, синтезованої з матриці РНК.

«Промотор» - це нуклеотидна послідовність, яка спрямовує транскрипцію структурного гена. Зазвичай промотор знаходиться в некодуючій зоні 5' гена, близько до сайту ініціації транскрипції структурного гена. Елементи послідовності в межах промоторів, які функціонують при ініціації транскрипції, часто характеризуються консенсусними нуклеотидними послідовностями. Ці елементи промоторів включають сайти зв'язування РНК-полімерази, послідовності TATA, послідовності CAAT, специфічні до диференціювання елементи (DSEs; McGehee et al., *Mol. Endocrinol.* 7:551 (1993)), елементи, чутливі до циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) (CREs), елементи, чутливі до сироватки (SREs; Treisman, *Seminars in Cancer Biol.* 1:47 (1990)), елементи, чутливі до глюкокортикоїдів (GREs), і сайти зв'язування для інших транскрипційних факторів, наприклад CRE/ATF (O'Reilly et al., *J. Biol. Chem.* 267:19938 (1992)), AP2 (Ye et al., *J. Biol. Chem.* 269:25128 (1994)), SP1, білок, що зв'язує чутливий до цАМФ елемент (CREB; Loeken, *Gene Expr.* 3:253 (1993)), та октамерні фактори (див., взагалі, Watson et al., eds., *Molecular Biology of the Gene*, 4th ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), та Lemaigre and Rousseau, *Biochem. J.* 303:1 (1994)). Якщо промотор є індукованим, то швидкість транскрипції зростає під дією індукуючого агента. На відміну від цього, швидкість транскрипції не регулюється індукуючим агентом, якщо промотор є конститутивним. Також відомі репресибельні промотори.

«Коровий промотор» включає незамінні нуклеотидні послідовності для функції промотування, в тому числі TATA-блок і ініціацію транскрипції. Згідно з цим визначенням коровий промотор може мати, а може і не мати очевидної активності при відсутності конкретних послідовностей, які можуть підсилювати активність або надавати тканинспецифічної активності.

«Регуляторний елемент» - це нуклеотидна послідовність, що модулює активність корового промотора. Наприклад, регуляторний елемент може включати нуклеотидну послідовність, що зв'язується з клітинними факторами, що дає можливість здійснювати транскрипцію виключно або переважно в конкретних клітинах, тканинах або органелах. Ці типи регуляторних елементів зазвичай асоціюють з генами, що експресуються в «клітиноспецифічній», «тканиноспецифічній» або «органелоспецифічній» манері.

«Енхансер» - це тип регуляторного елемента, який може підвищувати ефективність транскрипції незалежно від відстані або орієнтації енхансера відносно сайту ініціації транскрипції.

«Гетерологічна ДНК» відноситься до молекули ДНК або сукупності молекул ДНК, яка не існує природно в даній клітині-хазяїні. Молекули ДНК, гетерологічні конкретній клітині-хазяїну, можуть містити ДНК, отриману з цього виду клітини-хазяїна (тобто ендогенну ДНК), доти, доки ДНК цього хазяїна поєднана з ДНК нехазяїна (тобто екзогенною ДНК). Наприклад, молекула ДНК, що містить сегмент ДНК нехазяїна, який кодує поліпептид, операційно зв'язаний з сегментом ДНК хазяїна, що містить промотор транскрипції, вважають молекулою гетерологічної ДНК. І навпаки, молекула гетерологічної ДНК може включати ендогенний ген, операційно зв'язаний з екзогенним промотором. Інший приклад: молекулу ДНК, яка містить ген, отриманий з клітини дикого типу, вважають гетерологічною, якщо ця молекула ДНК є введеною в мутантну клітину, яка немає гена дикого типу.

«Поліпептид» - це полімер амінокислотних залишків, з'єднаних пептидними зв'язками, створений природним шляхом або синтетично. Поліпептиди, що складаються з менш ніж 10 амінокислотних залишків, називають «пептидами».

«Білок» - це макромолекула, що включає один або більше поліпептидних ланцюгів. Білок може також включати непептидні компоненти, наприклад вуглеводні групи. Вуглеводи та інші непептидні замішувачі можна додавати у білок через клітину, в якій цей білок продукується, і вони будуть різними в залежності від типу клітини. Білки в даному описі визначені на основі їхніх амінокислотних каркасних структур; замішувачі, наприклад вуглеводні групи, як правило, не описуються, але, тим не менш, можуть бути присутніми.

Пептид або поліпептид, кодований молекулою ДНК нехазяїна, є «гетерологічним» пептидом або поліпептидом.

«Клонуючий вектор» - це молекула нуклеїнової кислоти, наприклад плазміда, косміда або бактеріофага, яка має здатність автономно реплікуватися (репліцироваться) в клітині-хазяїні. Клонуючі вектори зазвичай містять один або невелику кількість сайтів розпізнавання ендонуклеази рестрикції, які дають можливість вставляти молекулу нуклеїнової кислоти чітко визначеним методом без втрати необхідної біологічної функції вектора, а також нуклеотидні послідовності, що кодують маркерний ген, придатний для використання при ідентифікації та селекції клітин, трансформованих за

допомогою клонуючого вектора. Маркерні гени, як правило, включають гени, що забезпечують стійкість до тетрацикліну або стійкість до ампіциліну.

«Експресуючий вектор» - це молекула нуклеїнової кислоти, що кодує ген, експресований в клітині-хазяїні. Експресуючий вектор зазвичай включає промотор транскрипції, ген і термінатор транскрипції. Експресія гена, як правило, контролюється промотором, і про такий ген кажуть, що він «операційно зв'язаний» з промотором. Аналогічним чином, регуляторний елемент і коровий промотор є операційно зв'язаними, якщо регуляторний елемент модулює активність корового промотора.

«Рекомбінантний хазяїн» - це клітина, яка містить молекулу гетерологічної нуклеїнової кислоти, наприклад клонуючий вектор або експресуючий вектор. В даному контексті прикладом рекомбінантного хазяїна є клітина, яка продукує IL-22RA з експресуючого вектора. На відміну від цього, IL-22RA може бути продукований клітиною, яка є «природним джерелом» IL-22RA і яка не має експресуючого вектора.

«Інтегративні трансформанти» - це рекомбінантні клітини-хазяї, в яких гетерологічну ДНК було інтегровано в геномну ДНК цих клітин.

«Злитий білок» являє собою гібридний білок, експресований молекулою нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидні послідовності принаймні двох генів. Злитий білок, наприклад, може містити принаймні частину поліпептиду IL-22RA, злитого з поліпептидом, який зв'язує афінну матрицю. Такий злитий білок забезпечує засіб виділення великих кількостей IL-22RA за допомогою афінної хроматографії.

Термін «рецептор» позначає клітинно-асоційований білок, який зв'язується з біоактивною молекулою, що має назву «ліганд». Ця взаємодія опосередковує вплив ліганду на клітину. Рецептори можуть бути мембранозв'язаними, цитозольними або нуклеарними; мономерними (наприклад, рецептор тиреостимулюючого гормону, бета-адренергічний рецептор) або мультимерними (наприклад, рецептор PDGF, рецептор гормону росту, рецептор IL-3, рецептор GM-CSF, рецептор G-CSF, рецептор еритропоєтину та рецептор IL-6). Мембранозв'язані рецептори характеризуються мультидоменною структурою, що включає позаклітинний лігандзв'язуючий домен і внутрішньоклітинний домен-ефектор, який, як правило, бере участь у сигнальній трансдукції. В деяких мембранозв'язаних рецепторах позаклітинний лігандзв'язуючий домен і внутрішньоклітинний домен-ефектор знаходяться в окремих поліпептидах, який включає повний функціональний рецептор.

Як правило, зв'язування ліганду з рецептором дає в результаті конформаційну зміну в рецепторі, що викликає взаємодію між доменом-ефектором та іншою молекулою (молекулами) в клітині, що, в свою чергу, веде до зміни в метаболізмі клітини. Метаболічні акти, які часто пов'язані з взаємодіями рецептор-ліганд, включають транскрипцію гена, фосфорилювання, дефосфорилювання, збільшення продукування циклічного АМФ, мобілізацію клітинного кальцію, мобілізацію мембранних ліпідів,

клітинну адгезію, гідроліз ліпідів, що містять інозит, і гідроліз фосфоліпідів.

«Розчинний рецептор» - це поліпептид рецептора, не зв'язаний з клітинною мембраною. Розчинні рецептори найчастіше являють собою поліпептиди лігандзв'язуючого рецептора, в яких немає трансмембранних і цитоплазматичних доменів та іншого з'єднання з клітинною мембраною, наприклад за допомогою глікофосфоінозиту (gpi). Розчинні рецептори можуть включати додаткові амінокислотні залишки, наприклад афінні мітки, які забезпечують очищення поліпептиду або створюють сайти для прикріплення поліпептиду до субстрату, або можуть включати послідовності константної зони імуноглобуліну. Багато рецепторів клітинної поверхні зустрічаються у природі, розчинні еквіваленти, утворені в результаті протеолізу або трансльовані з іншим чином сплайсованих мРНК. Розчинні рецептори можуть бути мономерними, гетодимерними, гетеродимерними або мультимерними, причому мультимерні рецептори, як правило, містять не більше 9 субодиниць, краще не більше 6 субодиниць, а ще краще - не більше 3 субодиниць. Вважають, що поліпептиди рецепторів здебільшого не мають трансмембранних та внутрішньоклітинних сегментів поліпептидів, коли вони не мають достатніх ділянок цих сегментів для забезпечення прикріплення мембрани або сигнальної трансдукції відповідно. Розчинні рецептори класу I і класу II цитокінових рецепторів зазвичай включають позаклітинний цитокінзв'язуючий домен, який не містить трансмембранного домену та внутрішньоклітинного домену. Наприклад, репрезентативні розчинні рецептори включають розчинні рецептори для CRF2-4 (відомі також як IL-10RB) (Genbank Accession No. Z17227), як показано у послідовностях SEQ ID NO:44 і SEQ ID NO:45; розчинний рецептор для IL-10RA (Genbank Accession Nos. U00672 і NM_001558), як показано у послідовності SEQ ID NO:46; розчинний рецептор для pDIRS1 (відомий також як IL-20RB) (Genbank Accession No. AY358305), як показано у послідовності SEQ ID NO:47, і розчинний рецептор для IL-22RA (пат. США № 5965704), як показано у послідовності SEQ ID NO:3. Будь-який фахівець в цій галузі може визначити, які послідовності відомого класу I або класу II цитокінових послідовностей включають позаклітинний цитокінзв'язуючий домен без трансмембранного домену та внутрішньоклітинного домену. Більш того, будь-який фахівець в цій галузі може за допомогою генетичного коду легко визначити полінуклеотиди, які кодують такі поліпептиди розчинних рецепторів.

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

«Виділений поліпептид» - це поліпептид, здебільшого вільний від забруднюючих клітинних компонентів, наприклад вуглеводних, ліпідних або інших білкових домішок, за характером асоціюва-

них із згаданим поліпептидом. Як правило, препарат виділеного поліпептиду містить цей поліпептид у дуже чистій формі, тобто чистота становить принаймні 80%, принаймні 90%, принаймні 95%, більше ніж 95%, наприклад 96%, 97% або 98% і навіть більше або більше ніж 99%. Одним із способів показати, що конкретний білковий препарат містить виділений поліпептид, є поява простої спектральної смуги після електрофорезу даного білкового препарату у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію та фарбування гелю барвником кумасі бриліантовим блакитним. Однак термін «виділений» не виключає присутності цього самого поліпептиду в інших фізичних формах, наприклад у вигляді димерів або іншим чином глікозильованих або синтезованих форм.

Терміни «амінокінцевий» та «карбоксикінцевий» застосовані в даному описі для позначення позицій всередині поліпептидів. Там, де контекст дозволяє, ці терміни застосовані з посиланням на конкретну послідовність або ділянку поліпептиду для позначення близького або відносного положення. Наприклад, певна послідовність, розташована на карбоксикінці відносно еталонної послідовності всередині поліпептиду, знаходиться поблизу карбоксильного кінця еталонної послідовності, але необов'язково на карбоксильному кінці повного поліпептиду.

Терміном «експресія» називають біосинтез генного продукту. Наприклад, якщо це структурний ген, то експресія включає транскрипцію цього структурного гена в мРНК і трансляцію мРНК в один або більше поліпептидів.

Термін «сплайс-варіант» застосований тут для позначення інших форм РНК, транскрибованої з гена. Сплайс-варіація природно виникає завдяки використанню різних сплайсуючих сайтів у молекулі транскрибованої РНК або не так часто між молекулами окремо транскрибованих РНК, і може дати в результаті декілька мРНК, транскрибованих з того ж самого гена. Сплайс-варіанти можуть кодувати поліпептиди, що мають змінену амінокислотну послідовність. Термін «сплайс-варіант» в даному описі також застосовують для позначення поліпептиду, кодованого сплайс-варіантом мРНК, транскрибованої з гена.

Застосований тут термін «імуномодулятор» включає цитокіни, фактори росту стовбурових клітин, лімфотоксини, костимуляторні молекули, кровотворні фактори і т.п., а також синтетичні аналоги цих молекул.

Термін «пара комплемент/антикомплемента» означає неідентичні компоненти, які за певних умов утворюють нековалентно зв'язану стабільну пару. Наприклад, біотин і авідин (або стрептовідин) є прототипічними елементами пари комплемент/антикомплемента. Інші приклади пар комплемент/антикомплемента включають пари рецептор/ліганд, пари антитіло/антиген (або гаптен, або епітоп), пари змстовий полінуклеотид/безглуздий полінуклеотид тощо. Якщо необхідна наступна дисоціація пари комплемент/антикомплемента, ця пара компле-

мент/антикомплемента у кращому варіанті повинна мати спорідненість до зв'язування менше 10^9M^{-1} .

«Антиідіотипічне антитіло» - це антитіло, яке зв'язується з доменом варіабельної зони імуноглобуліну. В даному контексті антиідіотипічне антитіло зв'язується з варіабельною зоною антитіла anti-IL-22RA, і, таким чином, антиідіотипічне антитіло імітує епітоп IL-22RA.

«Фрагмент антитіла» - це ділянка антитіла, наприклад $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab і т.п. Незалежно від структури фрагмент антитіла зв'язується з тим антигеном, який розпізнаний інтактним антитілом. Наприклад, фрагмент моноклонального антитіла anti-IL-22RA зв'язується з епітопом IL-22RA.

Термін «фрагмент антитіла» також включає синтетичний або генетично модифікований поліпептид, який зв'язується з конкретним антигеном, наприклад поліпептиди, що складаються з варіабельної зони легкого ланцюга, Fv-фрагменти, що складаються з варіабельних зон важкого та легкого ланцюгів, молекули рекомбінантних одноланцюгових поліпептидів, в яких важкі та легкі варіабельні зони з'єднані пептидним лінкером («scFv-білки») та мінімальні розпізнавальні одиниці, що складаються з амінокислотних залишків, які імітують гіперваріабельну зону.

«Химерне антитіло» являє собою рекомбінантний білок, який містить варіабельні домени і зони, що визначають комплементарність, отримані з антитіла гризуна, тоді як решта молекули антитіла є отриманою з антитіла людини.

«Гуманізовані антитіла» - це рекомбінантні білки, в яких зони, що визначають комплементарність, моноклонального антитіла мишей були перенесені з важкого та легкого варіабельних ланцюгів імуноглобуліну мишей у варіабельний домен людини. Фахівцям відомий спосіб конструювання гуманізованих антитіл, отриманих з антитіл мишей, наприклад таких, які зв'язуються з білком людини або нейтралізують його, для терапевтичного застосування для людей.

Застосований тут термін «терапевтичний агент» являє собою молекулу або атом, який з'єднується з компонентом антитіла і утворює кон'югат, корисний для терапії. Прикладами терапевтичних агентів є лікарські засоби, токсини, імуномодулятори, хелатори, сполуки бору, фотоактивні агенти або барвники та радіоізотопи.

«Виявна мітка» - це молекула або атом, який з'єднується з компонентом антитіла і утворює молекулу, корисну для діагнозу. Прикладами виявних міток є хелатори, фотоактивні агенти, радіоізотопи, флуоресцентні агенти, парамагнітні іони або інші маркери.

Термін «афінна мітка» в даному описі позначає сегмент поліпептиду, який можна прикріплювати до другого поліпептиду для забезпечення очищення або виявлення згаданого другого поліпептиду, або створення сайтів для прикріплення другого поліпептиду до субстрату. В принципі, як афінну мітку можна використовувати будь-який пептид або білок, для якого є антитіло або інший конкретний зв'язуючий агент. Афінні мітки включають полігістидиновий тракт, білок A (Nilsson et al., EMBO J. 4:1075 (1985); Nilsson et al., Methods

Enzymol 198:3 (1991)), глутатіон-S-трансферазу (Smith and Johnson, Gene 67:31 (1988)), афінну мітку Glu-Glu (Grassenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952 (1985)), субстанцію P, пептид FLAG (Hopp et al., Biotechnology 6:1204 (1988)), стрептовідинзв'язуючий пептид або інший антигенний епітоп або зв'язуючий домен. Див. взагалі Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95 (1991). Молекули ДНК, що кодують афінні мітки, можна придбати у комерційних постачальників (наприклад, фірми «Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ»).

«Оголене антитіло» - це ціле антитіло, на відміну від фрагмента антитіла, яке не з'єднується з терапевтичним агентом. Оголені антитіла включають і поліклональні, і моноклональні антитіла, а також певні рекомбінантні антитіла, наприклад химерні та гуманізовані антитіла.

Застосований тут термін «компонент антитіла» включає і ціле антитіло, і фрагмент антитіла.

«Імунокон'югат» - це кон'югат компонента антитіла з терапевтичним агентом або виявною міткою.

Термін «злитий білок антитіла» відноситься до рекомбінантної молекули, яка включає компонент антитіла і компонент поліпептиду IL-22RA. Приклади злитого білка антитіла включають білок, що містить позаклітинний домен IL-22RA та або Fc-домен, або антигензв'язуючу зону.

«Поліпептид-мішень» або «пептид-мішень» - це амінокислотна послідовність, яка містить принаймні один епітоп і яку експресовано на клітині-мішені, наприклад пухлинній клітині, або клітині, що несе антиген інфекційного агента. Т-клітини виявляють приналежність пептидних епітопів, представлених молекулою головного комплексу гістосумісності (ГКГС), поліпептиду-мішені або пептиду-мішені і зазвичай лізують клітину-мішень або набирають інші імунні клітини на сайт клітини-мішені, таким чином вбиваючи клітину-мішень.

«Антигенний пептид» - це пептид, який зв'язується з молекулою ГКГС і утворює комплекс ГКГС-пептид, який розпізнається Т-клітиною, в результаті чого після представлення Т-клітині викликається реакція цитотоксичних лімфоцитів. Таким чином, антигенні пептиди здатні зв'язуватися з відповідною молекулою ГКГС і викликати реакцію цитотоксичних Т-клітин, наприклад лізис клітин або вивільнення конкретного цитокіну напроти клітини-мішені, яка зв'язує або експресує антиген. Антигенний пептид можна зв'язувати в межах молекули ГКГС класу I або класу II, на антигенпрезентуючій клітині або на клітині-мішені.

В еукаріотах РНК-полімераза II прискорює транскрипцію структурного гена для утворення мРНК. Молекулу нуклеїнової кислоти можна сконструювати таким чином, щоб вона містила матрицю РНК-полімерази II, в якій РНК-транскрипт має послідовність, що є комплементарною до послідовності конкретної мРНК. РНК-транскрипт називають «анти-змістовною РНК», а молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує цю антизмістовну РНК, називають «антизмістовним геном». Молекули антизмістовної РНК здатні зв'язуватися з молекулами

мРНК, в результаті чого інгібуються трансляція мРНК.

«Антизмистовний олігонуклеотид, специфічний до IL-22RA» або «IL-22RA-антизмистовний олігонуклеотид» - це олігонуклеотид, що має послідовність, яка (а) здатна утворювати стабільний триплекс з ділянкою гена IL-22RA або (б) здатна утворювати стабільну подвійну спіраль з ділянкою мРНК-транскрипту гена IL-22RA.

«Рибозим» - це молекула нуклеїнової кислоти, яка містить каталітичний центр. Цей термін включає РНК-ензими, самосплайсуючі рибонуклеїнові кислоти, самовідщеплюючі рибонуклеїнові кислоти та молекули нуклеїнових кислот, які здійснюють ці каталітичні функції. Молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує рибозим, називається «ген рибозиму».

«Зовнішня допоміжна послідовність» - це молекула нуклеїнової кислоти, яка спрямовує ендогенний рибозим, RNase P, в конкретний вид внутрішньоклітинної мРНК, в результаті чого відбувається розщеплення мРНК під дією RNase P. Молекула нуклеїнової кислоти, що кодує зовнішню допоміжну послідовність, називається «ген зовнішньої допоміжної послідовності».

Термін «варіантний ген IL-22RA» відноситься до молекул нуклеїнових кислот, які кодують поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка є модифікацією послідовності SEQ ID NO:3. Такі варіанти включають поліморфізми генів IL-22RA, що зустрічаються у природі, а також синтетичні гени, що містять заміни консервативних амінокислот амінокислотної послідовності SEQ ID NO:3. Додатковими варіантними формами генів IL-22RA є молекули нуклеїнових кислот, які містять вставки або делеції описаних тут нуклеотидних послідовностей. Варіантний ген IL-22RA можна ідентифікувати, наприклад, визначаючи, чи цей ген створює гібрид за допомогою молекули нуклеїнової кислоти, яка має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1, або будь-який з їхніх комплементів, за жорстких умов.

З іншого боку, варіантні гени IL-22RA можна ідентифікувати порівнянням послідовностей. Дві амінокислотні послідовності мають «100%-ву ідентичність амінокислотних послідовностей», якщо амінокислотні залишки цих двох амінокислотних послідовностей є однаковими при вирівненні для максимальної відповідності. Аналогічним чином, дві нуклеотидні послідовності мають «100%-ву ідентичність нуклеотидних послідовностей», якщо нуклеотидні залишки цих двох нуклеотидних послідовностей є однаковими при вирівненні для максимальної відповідності. Порівняння послідовностей можна здійснити за допомогою стандартних комп'ютерних програм, наприклад таких, що включені в програмний комплекс з біоінформатики LASERGENE, створений фірмою DNASTAR (Madison, Wisconsin). В галузі відомі інші методи порівняння двох нуклеотидних або амінокислотних послідовностей шляхом визначення оптимального вирівнення (див., наприклад, Peruski and Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997), Wu et al., (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins",

in Methods in Gene Biotechnology, pages 123-151 (CRC Press, Inc. 1997) та Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing, 2nd Edition (Academic Press, Inc. 1998)). Конкретні методи визначення ідентичності послідовностей описані нижче.

Незалежно від конкретного застосованого методу ідентифікування варіантного гена IL-22RA або варіантного поліпептиду IL-22RA варіантний ген або поліпептид, кодований варіантним геном, може бути функціонально охарактеризований здатністю специфічно зв'язуватися з антитілом anti-IL-22RA. Варіантний ген IL-22RA або варіантний поліпептид IL-22RA може також бути функціонально охарактеризований здатністю специфічно зв'язуватися з його лігандом, наприклад, IL-22, методом описаного тут біологічного або біохімічного аналізу.

Термін «алельний варіант» застосовано для позначення будь-якої з двох або більше альтернативних форм гена, що займає той самий хромосомний локус. Алельна варіація природно виникає через мутацію і може привести в результаті до фенотипічного поліморфізму в межах популяцій. Генні мутації можуть бути такими, що мовчать (немає зміни в кодованому поліпептиді), або можуть кодувати поліпептиди, що мають змінену амінокислотну послідовність. Термін «алельний варіант» в даному описі також застосований для позначення білка, кодованого алельним варіантом гена.

Термін «ортолог» означає поліпептид або білок, отриманий з одного виду, який є функціональним еквівалентом поліпептиду або білка, отриманого з іншого виду. Відмінності у послідовностях серед ортологів є результатом видоутворення.

«Паралоги» - це різні, але структурно споріднені білки, створені організмом. Вважають, що паралоги виникають внаслідок дуплікації генів. Наприклад, α -глобін, β -глобін і міоглобін є паралогами один одного.

Даний винахід включає функціональні фрагменти генів IL-22RA. В межах контексту даного винаходу термін «функціональний фрагмент» гена IL-22RA відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує ділянку поліпептиду IL-22RA, яка є описаним тут доменом або принаймні специфічно зв'язується з антитілом anti-IL-22RA.

Через неточність стандартних аналітичних методів, молекулярні маси та довжини полімерів слід розглядати як приблизні величини. Коли така величина визначена як «приблизно» X, це означає, що зазначена величина X має похибку точності $\pm 10\%$.

3. Продуктування полінуклеотидів або генів IL-22RA

Молекули нуклеїнових кислот, які кодують ген IL-22RA людини, можна отримати скринінгом кДНК людини або геномної бібліотеки, використовуючи полінуклеотидні зонди, основані на послідовності SEQ ID NO:1. Це стандартні та загальноприйняті методи, які можна здійснювати за допомогою наборів для клонування, які можна придбати у комерційних постачальників. Див., наприклад, Ausubel et al. (eds.), Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition, John Wiley & Sons 1995; Wu et

al., *Methods in Gene Biotechnology*, CRC Press, Inc. 1997; Aviv and Leder, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:1408 (1972); Huynh et al., "Constructing and Screening cDNA Libraries in λ gt11", in *DNA Cloning: A Practical Approach Vol. I*, Glover (ed.), page 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) at pages 47-52.

Молекули нуклеїнових кислот, що кодують ген IL-22RA людини, можна також отримати за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з олігонуклеотидними праймерами, що мають нуклеотидні послідовності, які базуються на нуклеотидних послідовностях гена IL-22RA або κ ДНК. Загальні методи скринінгу бібліотек за допомогою ПЛР описані, наприклад, Yu et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries", in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15:PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), Humana Press, Inc., 1993. Крім того, методики застосування ПЛР для виділення споріднених генів описані, наприклад, Preston, "Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members", in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15:PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), Humana Press, Inc., 1993. Як варіант ген IL-22RA можна отримати, синтезуючи молекули нуклеїнових кислот за допомогою взаємно прямих довгих олігонуклеотиднуклеотидів або описаних тут нуклеотидних послідовностей (див., наприклад, Ausubel (1995)). Традиційні методики із застосуванням ПЛР дають можливість синтезувати молекули ДНК довжиною принаймні дві тисячі пар нуклеотидів (т.п.н.) (Adang et al., *Plant Molec. Biol.* 21:1131 (1993), Bambot et al., *PCR Methods and Applications* 2:266 (1993), Dillon et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid

Construction of Synthetic Genes", in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15:PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), pages 263-268, (Humana Press, Inc., 1993), and Holowachuk et al., *PCR Methods Appl.* 4:299 (1995)). Для огляду по синтезу полінуклеотидів див., наприклад, Glick and Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press 1994), Itakura et al., *Annu. Rev. Biochem.* 55:323 (1984), and Climie et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:633 (1990).

4. Продукування варіантів гена IL-22RA

Даний винахід пропонує ряд молекул нуклеїнових кислот, в тому числі молекул ДНК і РНК, які кодують описані тут поліпептиди IL-22RA. Фахівці легко визнають, що внаслідок виродженості генетичного коду серед згаданих молекул полінуклеотидів можлива значна варіація послідовностей. Даний винахід також пропонує виділені розчинні мономерні, гомодимерні, гетеродимерні та мільтимерні поліпептиди рецепторів, що містять принаймні одну субодиницю рецептора IL-22RA, яка є здебільшого гомологічною поліпептиду згаданого рецептора послідовності SEQ ID NO:3. Таким чином, даний винахід розглядає молекули нуклеїнових кислот, які кодують поліпептид IL-22RA і які містять вироджені нуклеотиди послідовностей SEQ ID NO:1 та еквіваленти їхніх РНК.

В Таблиці 1 наведені однобуквені коди, що позначають позиції вироджених нуклеотидів. «Розкладання» - це нуклеотиди, позначені кодовою літерою. «Комплемент» показує код для комплементарного нуклеотида (нуклеотидів). Наприклад, код Y позначає або C, або T, а його комплемент R позначає A або G, при цьому A є комплементарною до T, а G є комплементарною до C.

Таблиця 1

Нуклеотид	Розкладання	Комплемент	Розкладання
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T

B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

В Таблиці 2 наведені вироджені кодони, які включають всі можливі кодони для даної амінокислоти.

Таблиця 2

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

Фахівці розуміють, що привноситься певна неоднозначність при визначенні виродженого кодону, який представляє всі можливі кодони, що кодують амінокислоту. Наприклад, вироджений кодон для серину (WSN) може, за деяких обставин, кодувати аргінін (AGR), а вироджений кодон для аргініну

(MGN) може, за деяких обставин, кодувати серин (AGY). Аналогічні взаємовідношення існують між кодонами, що кодують фенілаланін і лейцин. Отже, деякі полінуклеотиди, охоплені виродженою послідовністю, можуть кодувати варіантні амінокислотні послідовності, але фахівець в цій галузі

може легко ідентифікувати такі варіантні послідовності за амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:3. Варіантні послідовності можна легко перевірити на функціональність, як тут було описано.

Різні види можуть виявляти «застосування переважних кодонів». Див., взагалі, Grantham et al., *Nucl. Acids Res.* 8:1893 (1980), Haas et al., *Curr. Biol.* 6:315 (1996), Wain-Hobson et al., *Gene* 13:355 (1981), Grosjean and Fiers, *Gene* 18:199 (1982), Holm, *Nucl. Acids Res.* 14:3075 (1986), Ikemura, *J. Mol. Biol.* 158:573 (1982), Sharp and Matassi, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:851 (1994), Kane, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:494 (1995), and Makrides, *Microbiol. Rev.* 60:512 (1996). Використаний тут термін «застосування переважних кодонів» або «переважний кодон» є галузевим терміном, що відноситься до білок-трансляційних кодонів, які найчастіше застосовуються в клітинах конкретного виду, таким чином віддаючи перевагу одному або більшій кількості представників тих можливих кодонів, що кодують кожну амінокислоту (див. Таблицю 2). Наприклад, амінокислота треонін (Thr) може кодуватися кодономі ACA, ACC, ACG або ACT, але в клітинах ссавців кодон ACC є найбільш застосовуваним; в інших видах, наприклад, в клітинах, дріжджах, вірусах або бактеріях комах можуть бути переважними різні кодони Thr. Переважні кодони для конкретного виду можна вводити в запропоновані полінуклеотиди різними відомими способами. Введення послідовностей переважних кодонів у рекомбінантну ДНК може, наприклад, підсилити продукування білка в результаті підвищення ефективності трансляції білка в конкретному типі або виді клітин. Тому описані тут послідовності вироджених кодонів служать матрицею для оптимізації експресії полінуклеотидів в різних типах і видах клітин, описуваних тут і найчастіше застосовуваних в галузі. Послідовності, що містять переважні кодони, можна перевіряти на експресію та оптимізувати останню в різних видах, а також перевіряти на функціональність, як тут описується.

кДНК, що кодує IL-22RA, можна виділяти багатьма методами, наприклад зондуванням за допомогою повної або часткової кДНК або за допомогою одного або більшої кількості комплексів вироджених зондів на основі описуваних послідовностей. Також можна клонувати кДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із застосуванням праймерів, синтезованих з описаних тут представницьких послідовностей IL-22RA людини. Крім того, для трансформації або трансфекції клітин-хазяїв можна використовувати кДНК-бібліотеку, а експресію кДНК, що становить інтерес, можна виявити за допомогою антитіла до поліпептиду IL-22RA.

Фахівцям відомо, що послідовність, описана в SEQ ID NO:1, представляє один алель IL-22RA людини, і що можна очікувати виникнення алельної варіації та альтернативного сплайсингу. Алельні варіанти цієї послідовності можна клонувати зондуванням кДНК-бібліотеки або геномної бібліотеки від різних індивідумів за стандартними процедурами. Алельні варіанти описаних тут нуклеотидних послідовностей, в тому числі варіанти, які містять мутації, що мовчать, або варіанти, в яких

мутації є результатом змін амінокислотних послідовностей, входять в об'єм даного винаходу, як і білки, що є алельними варіантами описаних тут амінокислотних послідовностей. Молекули кДНК, генеровані з альтернативно сплайсованих мРНК, які зберігають властивості поліпептиду IL-22RA, включені в об'єм даного винаходу, як і поліпептиди, кодовані такими кДНК і мРНК. Алельні варіанти і сплайс-варіанти цих послідовностей можна клонувати зондуванням кДНК-бібліотеки або геномної бібліотеки від різних індивідумів або тканин за відомими стандартними процедурами.

За допомогою зазначених методів фахівець може синтезувати ряд поліпептидів, які містять субодиницю розчинного рецептора IL-22RA, яка є головним чином гомологічною послідовністю SEQ ID NO:1, або кодує амінокислоти послідовності SEQ ID NO:3, або містять їх алельні варіанти і зберігають лігандзв'язуючі властивості рецептора IL-22RA дикого типу. Такі поліпептиди можуть також включати додаткові поліпептидні сегменти, про які вже згадувалося.

В деяких варіантах даного винаходу виділені молекули нуклеїнових кислот можуть гібридизуватися, в жорстких умовах, в молекули нуклеїнових кислот, що містять описані нуклеотидні послідовності. Наприклад, такі молекули нуклеїнових кислот можуть гібридизуватися, в жорстких умовах, в молекули нуклеїнових кислот, що містять нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1, або молекули нуклеїнових кислот, що містять нуклеотидну послідовність, комплементарну послідовності SEQ ID NO:1, або їх фрагменти.

Взагалі, жорсткі умови вибирають такими: приблизно на 5°C нижче термальної точки плавлення (T_m) для конкретної послідовності при визначених іонній силі та pH. T_m - це температура (при визначених іонній силі та pH), при якій 50% послідовності-мішені гібридизується в ідеально сумісний зонд. Після гібридизації молекули нуклеїнових кислот можна промити для видалення молекул нуклеїнових кислот, що не гібридизувалися в жорстких умовах або в дуже жорстких умовах. Див., наприклад, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger and Kimmel (eds.), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, (Academic Press, Inc. 1987); and Wetmur, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:221 (1990)). Програмне забезпечення аналізу послідовностей, наприклад OLIGO 6.0 (LSR; Long Lake, MN) and Primer Premier 4.0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), а також Інтернет-сайти є доступними інструментами для аналізу заданої послідовності та обчислення T_m на основі визначених користувачем критеріїв. Фахівець в цій галузі також зможе адаптувати умови гібридизації та промивання для застосування для конкретного полінуклеотидного гібриду.

Даний винахід також пропонує виділені поліпептиди IL-22RA, які мають майже аналогічну ідентичність послідовностей поліпептидам SEQ ID NO:3 або їхніх ортологів. Термін «майже аналогічна ідентичність послідовностей» в даному описі

позначає поліпептиди, що мають принаймні 70%, принаймні 80%, принаймні 90%, принаймні 95% або більше ніж 95%, наприклад 96%, 97%, 98%, ідентичності послідовностям, представленим в послідовності SEQ ID NO:3 або їхніх ортологів. Наприклад, варіантні та ортологічні рецептори IL-22RA можна застосовувати, щоб викликати імунну реакцію та індукувати перехреснореагуючі антитіла до IL-22RA людини. Такі антитіла можна гуманізувати або модифікувати, як тут описано, та використовувати терапевтично для лікування псоріазу, псоріатичного артриту, запальної хвороби кишечника (ЗХК), коліту, ендотоксикозу, а також для іншого описаного тут терапевтичного застосування.

Даний винахід також розглядає варіантні молекули нуклеїнових кислот IL-22RA, які можна ідентифікувати за двома критеріями: визначенню подібності між кодованим поліпептидом та амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:3 та тестом на гібридизацію. Такі варіанти IL-22RA включають молекули нуклеїнових кислот, які (1) залишаються гібридизованими з молекулою нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1 (або її комплементу) в жорстких умовах промивання, ступінь жорсткості яких еквівалентний 0,5x - 2x SSC з 0,1% SDS при 55-65°C, і (2) кодують поліпептид, що має принаймні 70%, принаймні 80%, принаймні 90%, принаймні 95% або більше ніж 95%, наприклад 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності амінокислотній послідовності SEQ ID

NO:3. З іншого боку, варіанти IL-22RA можна охарактеризувати як молекули нуклеїнових кислот, що (1) залишаються гібридизованими з молекулою нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1 (або її комплементу) в дуже жорстких умовах промивання, ступінь жорсткості яких еквівалентний 0,1x - 0,2x SSC з 0,1% SDS при 50-65°C, і (2) кодують поліпептид, що має принаймні 70%, принаймні 80%, принаймні 90%, принаймні 95% або більше ніж 95%, наприклад 96%, 97%, 98% або 99%, або більше ідентичності амінокислотній послідовності SEQ ID NO:3.

Виражену у відсотках ідентичність послідовностей визначають традиційними методами. Див., наприклад, Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48:603 (1986), and Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992). Стисло, дві амінокислотні послідовності вирівнюють (комп'ютерно) для оптимізації схем підрахування при вирівнюванні, застосовуючи штраф у 10 балів за відкриття гена, штраф в 1 бал за розширення гена і матрицю підрахування "BLOSUM62" Henikoff and Henikoff (там же), як показано в Таблиці 3 (амінокислоти позначені стандартними однобуквеними кодами). Ідентичність у відсотках потім обчислюють як: ([Загальна кількість ідентичних сумісностей]/[довжина довшої послідовності плюс кількість генів, уведених в цю довшу послідовність для вирівнювання двох згаданих послідовностей])(100).

Таблиця 3

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

Фахівцям відомо, що існує багато установлених алгоритмів для вирівнювання двох амінокислотних послідовностей. Алгоритм "FASTA" пошуку подібності (Pearson and Lipman) є відповідним методом вирівнювання білків для визначення рівня ідентичності між описуваною тут амінокислотною послідовністю та амінокислотною послідовністю

передбачуваного варіанта IL-22RA. Алгоритм FASTA описано Pearson and Lipman, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), and Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990). Стисло, FASTA спочатку характеризує подібність послідовностей, ідентифікуючи ділянки, що є загальними для запитуваної послідовності (наприклад, SEQ ID NO:2 або SEQ

чаються у природі, відомо декілька методів. Наприклад, можна застосувати систем *in vitro*, в якій безглузді мутації пригнічують за допомогою хімічно аміноацильованих супресорних тРНК. Способи синтезу амінокислот і аміноацильованих тРНК відомі. Транскрипцію і трансляцію плазмід, що містять безглузді мутації, здійснюють, як правило, у безклітинній системі, що містить екстракт *E. coli* S30, комерційно доступні ферменти та інші реагенти. Білки очищають хроматографією. Див., наприклад, Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722 (1991), Ellman et al., *Methods Enzymol.* 202:301 (1991), Chung et al., *Science* 259:806 (1993), and Chung et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:10145 (1993).

В іншому способі трансляцію здійснюють в ооцитах *Xenopus* шляхом мікроін'єкції мутованої мРНК і хімічно аміноацильованих супресорних тРНК (Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* 271:19991 (1996)). В ще одному способі клітини *E. coli* культивують при відсутності природної амінокислоти, яку треба замінити (наприклад, фенілаланін), і у присутності заданої амінокислоти (амінокислот), що не зустрічається у природі (наприклад, 2-азафенілаланін, 3-азафенілаланін, 4-азафенілаланін і 4-фторфенілаланін). Амінокислоту, яка не зустрічається у природі, вводять у білок замість її природного еквівалента. Див., Koide et al., *Biochem.* 33:7470 (1994). Природні амінокислотні залишки можна конвертувати у види, які не зустрічаються у природі, хімічною модифікацією *in vitro*. Хімічну модифікацію можна поєднувати з сайтнаправленим мутагенезом для подальшого розширення діапазону заміщень (Wynn and Richards, *Protein Sci* 2:395 (1993)).

Амінокислотні залишки IL-22RA можна замінювати обмеженою кількістю неконсервативних амінокислот, амінокислот, що не кодуються генетичним кодом, амінокислот, які не зустрічаються у природі, і неприродних амінокислот.

Незамінні амінокислоти в запропонованих поліпептидах можна ідентифікувати відомими процедурами, наприклад сайтнаправленим мутагенезом або скануючим аланіном мутагенезом (Cunningham and Wells, *Science* 244:1081 (1989), Bass et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:4498 (1991), Coombs and Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering", in *Proteins: Analysis and Design*, Angeletti (ed.), pages 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)). В останньому способі окремі аланін-мутації вводять в кожний залишок в молекулі, і отримані в результаті мутантні молекули тестують на біологічну активність для ідентифікування амінокислотних залишків, необхідних для активності даної молекули. Див. також Hilton et al., *J. Biol. Chem.* 271:4699 (1996).

Хоча для подальшого визначення лігандзв'язуючої зони IL-22RA можна застосовувати аналіз послідовностей, амінокислоти, які відіграють роль у зв'язуючій активності IL-22RA (наприклад, зв'язування IL-22RA з лігандом IL-22 або з антитілом anti-IL-22RA), можна також визначити фізичним аналізом структури, наприклад ядерним магнітним резонансом (ЯМР), кристалографією, електронографією або фотоафінним міченням, у поєднанні з мутацією амінокислот на сайті потенціального кон-

такту. Див., наприклад, de Vos et al., *Science* 255:306 (1992), Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899 (1992), and Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59 (1992).

Ряд амінокислотних заміщень можна провести і тестувати відомими методами мутагенезу та скринінгу, описаними, наприклад, Reidhaar-Olson and Sauer (*Science* 241:53 (1988)) або Bowie and Sauer (*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:2151 (1989)). Стисло, ці автори описують методи одночасної рандомізації двох або більше позицій в поліпептиді, вибираючи функціональний поліпептид, і наступного секвенування поліпептидів, що мутували, для визначення спектра допустимих заміщень в кожній позиції. До інших методів відносяться фоговий дисплей (наприклад, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832 (1991), Ladner et al., *US Patent No.* 5,223,409, Huse, international publication No. WO 92/06204), і мутагенез, характерний для даної зони (Derbyshire et al., *Gene* 46:145 (1986), and Ner et al., *DNA* 7:127 (1988)). Крім того, для клонування експресії лігандів IL-22RA можна застосовувати IL-22RA, мічений біотином або флуоресцинізотіоціанатом (ФІТЦ).

Варіанти описуваних нуклеатидних і поліпептидних послідовностей IL-22RA можна також формувати методом перестановки ДНК, як описано у Stemmer, *Nature* 370:389 (1994), Stemmer, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91:10747 (1994), and international publication No. WO 97/20078. Стисло, варіантні молекули ДНК формують гомологічну рекомбінацією *in vitro* шляхом довільної фрагментації материнської ДНК з наступним повторним складанням за допомогою ПЛР, в результаті чого досягають довільно введених точкових мутацій. Цей метод можна модифікувати, використовуючи сімейство молекул материнської ДНК, наприклад алейні варіанти або молекули ДНК з різних видів, щоб надати процесу додаткової варіабельності. Відбір або скринінг на необхідну активність з наступними додатковими ітераціями мутагенезу і аналізом забезпечує швидку «еволюцію» послідовностей в результаті відбору необхідних мутацій при одночасному відкиданні шкідливих змін.

Описані методи мутагенезу можна поєднувати з методами високопродуктивного автоматичного скринінгу для виявлення і клітинах клонованих поліпептидів, що мутували. Молекули ДНК, що мутували, які кодують біологічно активні поліпептиди або поліпептиди, що зв'язуються з антитілами anti-IL-22RA, можна вилучити з клітин-хазяїв і швидко секвенувати за допомогою сучасного обладнання. Ці методи дають можливість швидкого визначення важливості окремих амінокислотних залишків у поліпептиді, що становить інтерес, і їх можна застосовувати для поліпептидів невідомої структури.

Даний винахід також включає «функціональні фрагменти» поліпептидів IL-22RA і молекули нуклеїнових кислот, що кодують такі функціональні фрагменти. Для отримання функціональних фрагментів молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид IL-22RA, можна провести звичайний делеційний аналіз молекул нуклеїнових кислот. Як приклад: молекули ДНК, які мають нуклеотидну

послідовність SEQ ID NO:1, можна переварити за допомогою Bal31-нуклеази для отримання ряду гніздових делецій. Ці фрагменти потім вставляють в експресуючі вектори у відповідну рамку зчитування, і експресовані поліпептиди виділяють і тестують на здатність зв'язувати антитіла anti-IL-22RA. Альтернативою переварювання за допомогою екзонуклеази є застосування сайтнаправленого мутагенезу з використанням олігонуклеотиднуклеотидів для введення делецій або стоп-кодонів для вимовлення продукування заданого фрагмента. З іншого боку, конкретні фрагменти гена IL-22RA можна синтезувати за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Прикладом цього загального підходу можуть служити дослідження з відсікання на кінцях, на будь-якому з двох або на обох разом, інтерферонів, викладені Horisberger and DiMarco, *Pharmac. Ther.* 66:507 (1995). Стандартні методики функціонального аналізу білків описані, наприклад, Treuter et al., *Molec. Gen. Genet.* 240:113 (1993), Content et al., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon", in *Biological Interferon Systems*, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (ed.), pages 65-72 (Nijhoff 1987), Herschman, "The EGF Receptor", in *Control of Animal Cell Proliferation*, Vol. 1, Boynton et al., (eds.) pages 169-199 (Academic Press 1985), Coumilleau et al., *J. Biol. Chem.* 270:29270 (1995); Fukunaga et al., *J. Biol. Chem.* 270:25291 (1995); Yamaguchi et al., *Biochem. Pharmacol.* 50:1295 (1995), and Meisel et al., *Plant Molec. Biol.* 30:1 (1996).

Аналіз конкретних описаних тут послідовностей дав набір ілюстративних функціональних фрагментів, представлених в таблиці 4. Нуклеотиди, що кодують додаткові функціональні варіантні домени людського IL-22RA, в Таблиці 4 не наведені, але їх можна визначити, посилаючись на послідовність SEQ ID NO:1. Такі функціональні фрагменти включають, наприклад, наступні нуклеотидні послідовності SEQ ID NO:1: нуклеотиди 85-381, 206-717 і 85-717 послідовності SEQ ID NO:1, а кодовані ними відповідні амінокислотні послідовності показані відповідно у послідовностях SEQ ID NO:2 та SEQ ID NO:3.

Таблиця 4

Ознака IL-22RA	Амінокислотні залишки (SEQ ID NO:2)	Нуклеотиди (SEQ ID NO:1)
Перший Ig-домен	18-116	85-381
Другий Ig-домен	125-228	206-717
Обидва Ig-домени	18-228	85-717

Даний винахід також розглядає функціональні фрагменти гена IL-22RA, що має амінокислотні зміни, порівняно з описуваною тут амінокислотною послідовністю. Варіантний ген IL-22RA можна ідентифікувати на основі структури, визначаючи рівень ідентичності з описуваними нуклеотидною та амінокислотною послідовностями. Іншим варіантом ідентифікування варіантного гена на основі структури є визначення того, чи може молекула

нуклеїнової кислоти, що кодує потенціальний варіантний ген IL-22RA, гібридизуватися в молекулу нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, наприклад SEQ ID NO:1.

Даний винахід також включає функціональні фрагменти поліпептидів IL-22RA, антигенні епітопи, епітоп-несучі ділянки поліпептидів IL-22RA та молекули нуклеїнових кислот, що кодують такі функціональні фрагменти, антигенні епітопи, епітоп-несучі ділянки поліпептидів IL-22RA. Ці фрагменти використовують для утворення поліпептидів для застосування при генеруванні антитіл і партнерів зв'язування, які зв'язують, блокують, інгібують, зменшують, протидіють або нейтралізують активність IL-22 або і IL-20, і IL-22. «Функціональний» поліпептид IL-22RA або його фрагмент характеризується своєю здатністю блокувати, інгібувати, зменшувати, протидіяти або нейтралізувати запальну, проліферативну або диференціюючу активність IL-20 або IL-22, своєю активністю індукувати або інгібувати спеціалізовані клітинні функції або своєю активністю специфічно зв'язуватися з anti-IL-22RA антитілом, клітиною або IL-20 або IL-22. Як описувалось раніше, IL-22RA характеризується структурою та доменами рецепторів цитокінів класу II. Отже, даний винахід додатково розглядає використання злитих білків, які охоплюють: (а) поліпептидні молекули, що містять один або більше вищеописаних доменів і (б) функціональні фрагменти, що містять один або більше цих доменів. Інша поліпептидна ділянка злитого білка може бути залучена іншим рецептором цитокіну класу II, наприклад IL-10R, IL-13R, IL-20RA, IL-20RB, IL-10RB (CRF2-4), IL-22RA2, або ненативним та/або неспорідненим секреторним сигнальним пептидом, який сприяє виділенню цього злитого білка.

Даний винахід також пропонує поліпептидні фрагменти або пептиди, що містять епітоп-несучу ділянку описуваного тут поліпептиду IL-22RA. Такі фрагменти або пептиди можуть включати «імуногенний епітоп», що є частиною білка, яка викликає утворення антитіл, якщо весь білок використовується як імуноген. Імуногенні епітоп-несучі пептиди можна ідентифікувати стандартними методами (див., наприклад, Geysen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81:3998 (1983)).

На відміну від цього, поліпептидні фрагменти або пептиди можуть включати «антигенний епітоп», що являє собою зону молекули білка, з якою антитіло може специфічно зв'язуватися. Певні епітопи складаються з лінійного або безперервного фрагмента амінокислот, і антигенність такого епітопу не переривається денатуруючими агентами. Відомо, що відносно короткі синтетичні пептиди, які можуть імітувати епітопи білка, можна застосовувати для стимуляції продукування антитіл проти цього білка (див., наприклад, Sutcliffe et al., *Science* 219:660 (1983)). В зв'язку з цим, запропоновані антигенні епітоп-несучі пептиди, антигенні пептиди, епітопи та поліпептиди є корисними для індукування антитіл, що зв'язуються з описуваними тут поліпептидами, а також для ідентифікування та скринінгу моноклональних антитіл anti-IL-22RA, які є нейтралізуючими і які можуть зв'язувати, інгібувати, зменшувати, протидіяти або ней-

ралізувати активність IL-22 та IL-20 (окремо або разом). Запропоновані нейтралізуючі моноклональні антитіла можуть зв'язуватись з антигенним епітопом IL-22RA. Для визначення зон, що мають найбільший антигенний потенціал в послідовності SEQ ID NO:3, можна використовувати профілі гідروفільності Hopp/Woods (Hopp et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 78:3824-3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88:1-18, 1986 and Triquier et al., Protein Engineering 11:153-169, 1998). Цей профіль оснований на ковзному вікні з шести залишків. Замасковані залишки G, S і T та відкриті залишки H, Y і W не враховували. Ці зони в IL-22RA може визначити фахівець. Крім того, антигенні епітопи IL-22RA в послідовності SEQ ID NO:3, що визначено графіком Jameson-Wolf, наприклад за допомогою програми Protean DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI) виступають як кращі антигенні епітопи, і їх може визначити фахівець. Такі антигенні епітопи включають: (1) амінокислотні залишки 1 (Pro) - 6 (Asp) послідовності SEQ ID NO:3; (2) амінокислотні залишки 26 (Ser) - 32 (Pro) послідовності SEQ ID NO:3; (3) амінокислотні залишки 41 (Lys) - 47 (Asp) послідовності SEQ ID NO:3; (4) амінокислотні залишки 49 (Val) - 62 (Cys) послідовності SEQ ID NO:3; (5) амінокислотні залишки 41 (Lys) - 62 (Cys) послідовності SEQ ID NO:3; (6) амінокислотні залишки 84 (Ala) - 97 (Ser) послідовності SEQ ID NO:3; (7) амінокислотні залишки 103 (Thr) - 108 (Asp) послідовності SEQ ID NO:3; (8) амінокислотні залишки 130 (Arg) - 135 (His) послідовності SEQ ID NO:3; (9) амінокислотні залишки 164 (Gly) - 166 (Lys) послідовності SEQ ID NO:3; (10) амінокислотні залишки 175 (Tyr) - 179 (Glu) послідовності SEQ ID NO:3; (11) амінокислотні залишки 193 (Lys) - 196 (Ala) послідовності SEQ ID NO:3; (12) амінокислотні залишки 203 (Lys) - 209 (Thr) послідовності SEQ ID NO:3. Додаткові епітопи включають наступні пептиди, які можна потенційно синтезувати з незменшеного повнорозмірного людського IL-22RA, розщепленого за допомогою CnBr: пептид 6 (SEQ ID NO:56), пептид 7 (SEQ ID NO:57), пептид 8 (SEQ ID NO:58), пептид 9 (SEQ ID NO:59), пептид 10 (SEQ ID NO:60) та пептид 11 (SEQ ID NO:61). Цистеїни з'єднуються дисульфідним зв'язком, в результаті чого є можливим зв'язок між пептидами 7 (SEQ ID NO:57) і 10 (SEQ ID NO:60). Конкретно, послідовність SEQ ID NO:56 відповідає амінокислотним залишкам 1 (Pro) - 92 (Met) послідовності SEQ ID NO:3; послідовність SEQ ID NO:57 відповідає амінокислотним залишкам 93 (Thr) - 120 (Met) послідовності SEQ ID NO:3; послідовність SEQ ID NO:58 відповідає амінокислотним залишкам 121 (Ile) - 160 (Met) послідовності SEQ ID NO:3; послідовність SEQ ID NO:59 відповідає амінокислотним залишкам 161 (His) - 185 (Met) послідовності SEQ ID NO:3; послідовність SEQ ID NO:60 відповідає амінокислотним залишкам 186 (Ile) - 199 (Met) послідовності SEQ ID NO:3 і послідовність SEQ ID NO:61 відповідає амінокислотним залишкам 200 (Cys) - 211 (Thr) послідовності SEQ ID NO:3. Крім того, залишки послідовності SEQ ID NO:2 (і відповідні залишки послідовності SEQ ID NO:3), які є важливими для зв'язування ліганд-рецептор, включають Tyr-60, Phe-164, Tyr-

93, Arg-112, Lys-210 та Glu-211 послідовності SEQ ID NO:2 (і відповідні залишки послідовності SEQ ID NO:3). Більш того, первинні залишки послідовності SEQ ID NO:2 (і відповідні залишки послідовності SEQ ID NO:3), які є важливими для спрямування зв'язування ліганд-рецептор, включають Tyr-60 і Phe-164 послідовності SEQ ID NO:2 (і відповідні залишки послідовності SEQ ID NO:3), а вторинні залишки включають залишки Tyr-93, Arg-112, Lys-210 і Glu-211 послідовності SEQ ID NO:2 (і відповідні залишки послідовності SEQ ID NO:3). У кращих варіантах антигенні епітопи, з якими зв'язуються запропоновані нейтралізуючі антитіла, містять залишки послідовності SEQ ID NO:2 (і відповідні залишки послідовності SEQ ID NO:3), які є важливими для зв'язування ліганд-рецептор, наприклад з IL-22RA та IL-22 (окремо або разом).

Антигенні епітоп-несучі пептиди і поліпептиди можуть містити принаймні 4-10 амінокислот, принаймні 10-15 амінокислот або принаймні 15-30 амінокислот описуваної тут амінокислотної послідовності. Такі епітоп-несучі пептиди і поліпептиди можна продукувати фрагментуванням поліпептиду IL-22RA або хімічним синтезом пептидів. Крім того, епітопи можна селектувати методом фагового дисплея рандомізованих пептидних бібліотек (див., наприклад, Lane and Stephen, Curr. Opin. Immunol. 5:268 (1993), and Cortese et al., Curr. Opin. Biotechnol. 7:616 (1996)). Стандартні методи ідентифікування епітопів і продукування антитіл із малих пептидів описані, наприклад, Mole, "Epitope Mapping", in Methods in Molecular Biology, Vol. 10, Manson (ed.), Pages 105-116 (The Humana Press, Inc. 1992), Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application, Ritter and Ladyman (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995), and Coligan et al., (eds.), Current Protocols in Immunology, pages 9.3.1-9.3.5 and pages 9.4.1-9.4.11 (John Wiley & Sons 1997).

Для будь-якого поліпептиду IL-22RA, в тому числі варіантів і злитих білків, фахівець може легко синтезувати повністю вироджену полінуклеотидну послідовність, що кодує цей варіант, за допомогою інформації, наведеної в Таблицях 1 і 2. Крім того, для конструювання варіантів IL-22RA на основі описуваних нуклеотидних та амінокислотних послідовностей можна застосовувати стандартні програмні засоби.

5. Продукування поліпептидів IL-22RA

Запропоновані поліпептиди, в тому числі непроцесовані поліпептиди, розчинні мономерні, гомодимерні, гетеродимерні та мультимерні рецептори; непроцесовані рецептори; фрагменти рецепторів (наприклад, лігандзв'язуючі фрагменти і антигенні епітопи), функціональні фрагменти і злиті білки, можна продукувати в рекомбінантних клітинах-хазяях за наступними традиційними методами. Для експресування гена IL-22RA молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує згаданий поліпептид, слід операційно зв'язати з регуляторними послідовностями, які контролюють транскрипційною експресією в експресуючому векторі, і потім вводити в клітину-хазяїн. Крім транскрипційних регу-

ляторних послідовностей, наприклад промоторів і енхансерів, експресуючі вектори можуть включати трансляційні регуляторні послідовності і ген-маркер, що підходить для відбору клітин, які несуть експресуючий вектор.

Експресуючі вектори, що підходять для продукування стороннього білка в еукаріотних клітинах, зазвичай містять (1) елементи прокаріотної ДНК, які кодують бактеріальний реплікатор і маркер стійкості до антибіотиків для забезпечення росту і селекції експресуючого вектора у бактеріальному хазяїні; (2) елементи прокаріотної ДНК, які контролюють ініціацію транскрипції, наприклад промотор; і (3) елементи ДНК, які контролюють процесінг транскриптів, наприклад послідовність термінація транскрипції/поліаденілування. Як вже говорилося, експресуючі вектори можуть також включати нуклеотидні послідовності, що кодують секреторну послідовність, яка спрямовує гетерологічний поліпептид в секреторну реакцію клітини-хазяїна. Наприклад, експресуючий вектор IL-22RA може включати ген IL-22RA і секреторну послідовність, синтезовану з будь-якого секретованого гена.

Запропоновані білки IL-22RA можна експресувати в клітинах ссавців. Приклади відповідних клітин-хазяїв ссавців включають клітини нирки африканської зеленої мавпи (Vero; ATCC CRL 1587), клітини первинної нирки людини (293-HEK; ATCC CRL 1573), клітини нирки дитинчати хом'яка (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), клітини нирки псячих (MDCK; ATCC CCL 34), клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin et al., *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555, 1986)), пітійцити щурів (GH1; ATCC CCL82), клітини HeLa S3 (ATCC CCL2.2), клітини гепатоми щурів (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), 8Y40-трансформовані клітини нирки мавпи (COS-1; ATCC CRL 1650) та ембріональні клітини мишей (NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

Для хазяїна ссавців транскрипційні та трансляційні регуляторні сигнали можна синтезувати з вірусного джерела ссавців, наприклад аденовірусу, вірусу папіломи крупної рогатої худоби, мавп'ячого вірусу або т.п., в якому регуляторні сигнали асоціюються з конкретним геном, що має високий рівень експресії. Відповідні транскрипційні та трансляційні регуляторні послідовності також можна отримати з генів ссавців, наприклад генів актину, колагену, міозину та металотіонеїну.

Транскрипційні регуляторні послідовності включають зону промотора, достатню для спрмування ініціації синтезу РНК. Відповідні еукаріотні промотори включають промотор гена металотіонеїну I миши (Hamer et al., *J. Molec. Appl. Genet.* 1:273 (1982)), промотор ТК вірусу герпесу (McKnight, *Cell* 31:355 (1982)), ранній промотор SV40 (Benoist et al., *Nature* 290:304 (1981)), промотор вірусу саркоми Раяса (Gorman et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 79:6777 (1982)), промотор цитомегаловірусу (Foecking et al., *Gene* 45:101 (1980)) і промотор вірусу пухлини молочної залози мишей (див. Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al., (eds.), pages 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

З іншого боку, в клітинах ссавців для контролювання експресії гена IL-22RA можна застосовувати прокаріотний промотор, наприклад промотор РНК-полімерази бактеріофага Т3, якщо цей прокаріотний промотор регулюється еукаріотним промотором (Zhou et al., *Mol. Cell. Biol.* 10:4529 (1990), and Kaufman et al., *Nucl. Acids Res.* 19:4485 (1991)).

В деяких варіантах послідовність ДНК, що кодує поліпептид розчинного рецептора IL-22RA або фрагмент поліпептиду IL-22RA, операційно з'язана з іншими генетичними елементами, необхідними для її експресії, які, як правило, включають промотор і термінатор транскрипції, в межах експресуючого вектора. Цей вектор також часто містить один або більше селектованих маркерів і один або більше джерел реплікації, хоча фахівцям відомо, що в певних системах селектовані маркери можна забезпечити на окремих векторах, а реплікацію екзогенної ДНК можна здійснити шляхом інтеграції в геном клітини-хазяїна. Вибір промоторів, термінаторів, селектованих маркерів, векторів та інших елементів - справа звичайного розрахунку для фахівця. В спеціальній літературі описано багато таких елементів, які можна придбати у комерційних постачальників. Множинні компоненти комплексу розчинного рецептора можна котрансфектувати на окремі експресуючі вектори або утримувати в одному експресуючому векторі. Такі методики експресування множинних компонентів білкових комплексів добре відомі.

Експресуючий вектор можна вводити в клітини-хазяї багатьма стандартними способами, в тому числі трансфекцією фосфату кальцію, ліпосоомопосередкованою трансфекцією, доставкою за допомогою бомбардуєчої мікрочастинки, електропорацією тощо. Трансфіковані клітини можна селектувати і розповсюдити для отримання рекомбінантних клітин-хазяїв, що містять експресуючий вектор, стабільно інтегрований в геном клітини-хазяїна. Методи введення векторів в еукаріотні клітини і методи відбору таких стабільних трансформантів за допомогою селектованого маркера описані, наприклад, Ausubel (1995) та Murray (ed.), *Gene Transfer and Expression Protocols* (Humana Press 1991).

Наприклад, один відповідний селектований маркер являє собою ген, який забезпечує стійкість до антибіотичного неоміцину. В цьому випадку відбір здійснюють у присутності лікарського засобу типу неоміцину, наприклад G-418 або йому подібному. Системи відбору можна також застосовувати для підвищення рівня експресії гена, що становить інтерес, і цей процес називається ампліфікацією. Ампліфікацію здійснюють культивуванням трансфектантів у присутності невеликої кількості селективного агента з наступним збільшенням кількості селективного агента для відбору клітин, що забезпечує високі рівні продуктів уведених генів. Відповідним селектованим маркером, здатним до ампліфікації, є дигідрофолатредуктаза (ДФР), який надає стійкості до метотрексату. Можна також застосовувати інші гени лікарської стійкості (наприклад, стійкості до гігromіцину, множинної лікарської стійкості,

пуроміцинацетилтрансферази). Як варіант, для відсортування трансфікованих клітин від нетрансфікованих клітин такими методами, як сортування за допомогою клітинного сортера з активацією флуоресценції або методом сепарації гранул у магнітному полі, можна застосовувати маркери, що вводять змінений фенотип, наприклад зелений флуоресцентний білок, або білки клітинної поверхні, наприклад CD4, CD8, MHC класу I, плацентарну лужну фосфатазу.

Поліпептиди IL-22RA можна також отримати за допомогою культивованих клітин ссавців, використовуючи вірусну систему доставки. Прикладами вірусів, придатних для цього, є аденовірус, ретровіруси, герпесвірус, вірус осповакцини та аденоасоційований вірус (AAV). Аденовірус, вірус двоспиральної ДНК, на сьогодні є найкраще дослідженим вектором переносу генів для доставки гетерологічної нуклеїнової кислоти (для огляду див. Becker et al., *Meth. Cell Biol.* 43:161 (1994), and Douglas and Curiel, *Science & Medicine* 4:44 (1997)). Перевагами аденовірусної системи є розміщення відносно великих ДНК-вставок, здатність рости до високого титру, здатність інфікувати широке коло типів клітин ссавців і гнучкість, яка дає можливість використовувати цю систему з великою кількістю доступних векторів, що містять різні промотори.

Шляхом делеції ділянок аденовірусного геному можна розмістити дільші вставки (до 7 т.п.н.). Ці вставки можна включати у вірусну ДНК прямим лігуванням або шляхом гомологічної рекомбінації за допомогою котрансфікованої плазміди. Як варіант, можна виключити незамінний ген E1 з вірусного вектора, що призведе до неможливості реплікувати, доки клітина-хазяїн не надасть ген E1. Людські клітини 293, інфіковані аденовірусним вектором (ATCC №№ CRL-1573, 45504, 45505), наприклад, можна вирощувати як адгезивні клітини або в суспензійній культурі при відносно високій щільності клітин для продукування значних кількостей білка (див. Garnier et al., *Cytotechnol.* 15:145 (1994)).

IL-22RA можна також експресувати в інших вищих еукаріотних клітинах, наприклад клітинах птахів, грибів, комах, дріжджів або рослин. Бакуловірусна система забезпечує ефективний засіб введення клонуваних генів IL-22RA в клітини комах. Відповідні експресуючі вектори базуються на вірусі множинного ядерного поліедрозу *Autographa californica* (AcMNPV) і містять відомі промотори, наприклад промотор 70 білка теплового шоку (hsp) *Drosophila*, промотор негайно раннього гена вірусу множинного ядерного поліедрозу *Autographa californica* (ie-1) та промотор затримано раннього 39K, промотор бакуловірусу p10 і промотор *Drosophila* metallothionein. Другий спосіб створення рекомбінантного бакуловірусу використовує систему, основану на транспозоні і описану Luckow (Luckow et al., *J. Virol.* 67:4566 (1993)). Ця система, в якій використовують сектори переносу, продається в наборі BAC-to-BAC (Life Technologies, Rockville, MD). В цій системі застосовують вектор переносу, PFASTBAC (Life Technologies), що містить транспозон Tn7, для перенесення ДНК, яка кодує поліпептид IL-22RA в бакуловірусний геном,

що зберігається в *E. Coli* як велика плазміда, яку називають «бакмідою». Див., Hill-Perkins and Possee, *J. Gen. Virol.* 77:971 (1990), Bonning et al., *J. Gen. Virol.* 75:1551 (1994) and Chazenbalk and Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270:1543 (1995). Крім того, вектори переносу можуть включати всередині рамки зчитування злиття з ДНК, що кодує мітку епітопу на C- або N-кінці експресованого поліпептиду IL-22RA, наприклад мітку епітопу Glu-Glu (Grussenmeyer et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 82:1952 (1985)). За відомою методикою вектор переносу, що містить ген IL-22RA, трансформують в *E. coli* та ретельно відбирають бакміди, що містять розірваний ген lacZ, що є показником рекомбінантного бакуловірусу. ДНК бакміди, яка містить геном рекомбінантного бакуловірусу, потім виділяють традиційним методом.

Ілюстративний вектор PFASTBAC можна значною мірою модифікувати. Наприклад, можна видалити промотор поліедрину і замінити його промотором основного білка бакуловірусу (відомим також як Pcof, р6.9 або MP-промотор), який експресується раніше в бакуловірусній інфекції і, як виявили, є ефективним для експресування секретованих білків (див., наприклад, Hill-Perkins and Possee, *J. Gen. Virol.* 71:971 (1990), Bonning et al., *J. Gen. Virol.* 75:1551 (1994) and Chazenbalk and Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270:1543 (1995)). В таких структурних компонентах вектора переносу можна застосовувати короткий або довгий варіант промотора основного білка. Більш того, вектори переносу можна конструювати, замінюючи нативні секреторні сигнальні послідовності IL-22RA секреторними сигнальними послідовностями, отриманими з білив комах. Наприклад, секреторну сигнальну послідовність, отриману з екдистероїд-глюкозилтрансферази (EGT), мелітину медоносної бджоли (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA) або бакуловірусу gp67 (PharMingen; San Diego, CA), можна застосовувати в структурних компонентах для заміни нативної секреторної сигнальної послідовності IL-22RA.

Рекомбінантний вірус або бакміду використовують для трансфекції клітин-хазяїв. Відповідні клітини-хазяї комах включають клітинні лінії, отримані з IPLB-Sf-21, клітинну лінію яєчника лялечки *Spodoptera frugiperda*, наприклад Sf9 (ATCC CRL 1711), Sf21AE та Sf21 (Invitrogen Corporation; San Diego, CA), а також клітини Schneider-2 *Drosophila* та клітинну лінію HIGH FIVEO (Invitrogen), отриману з *Trichoplusia ni* (патент США № 5300435). Для вирощування та підтримання клітин можна використовувати комерційно доступні безсироваткові середовища. Відповідними середовищами є Sf900 II™ (Life Technologies) або ESF 921™ (Expression Systems) для клітин Sf9 та Ex-cello405™ (JRH Biosciences, Lenexa, KS) або Express FiveO™ (Life Technologies) для клітин T. ni. При застосуванні рекомбінантного вірусу клітини зазвичай вирощують від щільності посіву приблизно $2-5 \times 10^5$ клітин до щільності $1-2 \times 10^6$ клітин, і в цей час додають рекомбінантну вірусну культуру при множинності зараження 0,1-10, частіше приблизно 3.

Загальноприйняті методики продукування рекомбінантних білків у бакуловірусних системах

описані Bailey et al., "Manipulation of Baculovirus Vectors", in *Methods in Molecular Biology*, Volume 7: Gene Transfer and Expression Protocols, Murray (ed.), pages 147-168 (The Humana Press, Inc. 1991), Patel et al., "The baculovirus expression system", in *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2nd Edition, Glover et al., (eds.), pages 205-244 (Oxford University Press 1995); Ausubel (1995) на стор. 16-37 - 16-57; Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995); Luckow, "Insect Cell Expression Technology", in *Protein Engineering: Principles and Practice*; Cleland et al., (eds.), pages 183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996).

Для експресії описуваних генів можна також використовувати клітини грибів, в тому числі клітини дріжджів. Види дріжджів, які в цьому сенсі становлять особливий інтерес, включають *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* та *Pichia methanolica*. Відповідні промотори для експресії у дріжджах включають промотори з GAL1 (галактози), PGK (фосфогліцераткінази), ADH (алкогольдегідрогенази), AOX1 (алкогольоксидази), HIS4 (гістидиндегідрогенази) тощо. Багато клонуючих векторів дріжджів уже сконструйовано, і їх можна легко придбати. Такі вектори включають вектори на основі YIp, наприклад YIp5, вектори YRp, наприклад YRp17, вектори YEp, наприклад YEp13, і вектори YCp, наприклад YCp19. Методи трансформування клітин *S. cerevisiae* за допомогою екзогенної ДНК і продукування із них рекомбінантних поліпептидів описані, наприклад, Kawasaki et al., US Patent No. 4,599,311, Kawasaki et al., US Patent No. 4,931,373, Brake, US Patent No. 4,870,008, Wekch et al., US Patent No. 5,037,743 and Murray et al., US Patent No. 4,845,075. Трансформовані клітини відбирають за фенотипом, визначеним селективним маркером, частіше за стійкістю до лікарських засобів або за здатністю рости при відсутності конкретного живильного середовища (наприклад, лейцина). Відповідною векторною системою для використання в *Saccharomyces cerevisiae* є векторна система POT1, описана Kawasaki et al. (US Patent No. 4,931,373), яка дає можливість відбирати трансформовані клітини за здатністю рости в середовищах, що містять глюкозу. Додаткові відповідні промотори і термінатори для використання в дріжджах включають промотори і термінатори, отримані з генів гліколітичних ферментів (див., наприклад, Kawasaki, US Patent No. 4,599,311, Kingsman et al., US Patent No. 4,615,974 and Bitter, US Patent No. 4,977,092) і генів алкогольдегідрогенази. Див. також патенти США №№ 4990446, 5063154, 5139936 і 4661454.

Відомі також системи трансформації для інших дріжджів, в тому числі *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* та *Candida maltosa*. Див., наприклад, Gleeson et al., J. Gen. Microbiol 132:3459 (1986), and Cregg, US Patent No. 4,882,279. Клітини *Aspergillus* можна використовувати за методами, описаними McKnight et al., US Patent No. 4,935,349. Методи трансформування *Acremonium chrysogenum* опи-

сані Sumino et al., US Patent No. 5,162,228. Методи трансформування *Neurospora* описані Lambowitz, US Patent No. 4,486,533.

Використання *Pichia methanolica* як хазяя для продукування рекомбінантних білків описане, наприклад, Raymond, US Patent No. 5,716,808, Raymond, US Patent No. 5,736,383, Raymond et al., Yeast 14:11-23 (1998) та у міжнародних публікаціях №№ WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 і WO 98/02565. Молекули ДНК для використання при трансформуванні *P. methanolica* найчастіше отримують у вигляді двоспіральних кільцевих плазмід, які перед трансформацією краще лінеаризувати. Для продукування поліпептиду в *P. methanolica* промотор і термінатор в плазміді можуть являти собою промотор і термінатор гена *P. methanolica*, наприклад спиртулізуючого гена *P. methanolica* (AUG1 або AUG2). До інших корисних промоторів відносяться промотори генів дигідроксиацетонсинтази (DHAS), форміатдегідрогенази (FMD) і каталази (CAT). Для полегшення інтеграції ДНК в хромосому-хазяїн краще мати сегмент повної експресії плазмиди, фланкованої на обох кінцях послідовностями ДНК-хазяїна. Відповідним селективним маркером для використання в *Pichia methanolica* є ген ADE2 *P. methanolica*, який кодує фосфорибозил-5-аміноімідазолкарбоксилазу (AIRC; EC 4.1.1.21), і який дає можливість клітинам-хазяям *ade2* рости за відсутності аденіну. Для широкомасштабних промислових процесів, де необхідно мінімізувати використання метанолу, можна застосовувати клітини-хазяї, в яких обидва метанолутилізуючі гени (AUG1 та AUG2) делетують. Для продукування секретованих білків клітини-хазяї можуть бути відсутні в генах вакуолярної протеази IPEP4 і PRB1). Для полегшення введення в клітини *P. methanolica* ДНК, яка містить плазмиду і яка кодує поліпептид, що становить інтерес, застосовують електропорацію. Клітини *P. methanolica* можна трансформувати електропорацією, використовуючи експоненціально загасаюче, імпульсне електричне поле з інтенсивністю поля 2,5-4,5 кВ/см, краще приблизно 3,75 кВ/см, і часом константою (t) 1-40 мілісекунд, найкраще ж - приблизно 20 мілісекунд.

Експресуючі вектори можна також вводити у фотопласти рослин, тканини інтактних рослин або виділені клітини рослин. Методи введення експресуючих векторів у тканину рослин включають пряме зараження або кокультивацію рослинної тканини разом з *Agrobacterium tumefaciens*, доставку за допомогою бомбардуючих мікрочастинок, ін'єкцію ДНК, електропорацію тощо. Див., наприклад, Horsch et al., Science 227:1229 (1985), Klein et al., Biotechnology 10:268 (1992), and Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants", in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick et al., (eds.), pages 67-88 (CRC Press, 1993).

Як варіант, гени IL-22RA можна експресувати у прокаріотних клітинах-хазяях. Відповідні промотори, які можна використовувати для експресування поліпептидів IL-22RA у прокаріотному хазяїні, добре відомі фахівцям і включають промотори, здатні розпізнавати T4-, T3-, Sp6- і T7-полімерази, P_R- та

P_L-промотори бактеріофага лямбда, промотори trp, recA, теплового шоку, lacUV5, tac, lpp-lacSpr, rhoA та lacZ *E. coli*, промотори *B. subtilis*, промотори бактеріофагів *Bacillus*, промотори *Streptomyces*, int-промотор бактеріофага лямбда, bla-промотор pBR322 та CAT-промотор гена хлорамфеніколацетилтрансферази. Прокаріотні промотори описані Glick, J. Ind. Microbiol. 1:277 (1987), Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 4th Ed. (Benjamin Cummins 1987), and Ausubel et al. (1995).

Відповідні прокаріотні хазяї включають *E. coli* та *Bacillus subtilis*. Відповідні штами *E. coli* включають BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF', DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER2151 та ER1647 (див., наприклад, Brown (ed.), Molecular Biology Labfax (Academic Press 1991)). Відповідні штами *Bacillus subtilis* включають BR151, YB886, MI119, MI120 та B170 (див., наприклад, Hardy, "Bacillus Cloning Methods", in DNA Cloning: A Practical Approach, Glover (ed.) (IRL Press 1985)).

При експресуванні поліпептиду IL-22RA в бактеріях, наприклад *E. coli*, цей поліпептид можна утримувати в цитоплазмі, зазвичай у вигляді нерозчинних гранул, або можна спрямувати у периплазматичний простір за допомогою бактеріальної секреторної послідовності. У першому випадку клітини лізують, гранули вилучають і денатурують, наприклад гуанідинізоціанатом або сечовиною. Денатурований поліпептид можна потім «перезгорнути» (рефолдінг) і димеризувати шляхом розбавлення денатурату, наприклад діалізом напроти розчину сечовини та комбінації відновленого та окисленого глутатіону, наступним діалізом напроти забуференого фізіологічного розчину. У другому випадку поліпептид можна вилучити з периплазматичного простору в розчинній і функціональній формі шляхом розривання клітин (наприклад, обробкою ультразвуком або осмотичним шоком) для вивільнення вмісту периплазматичного простору та вилучення білка, таким чином усуваючи необхідність денатурування та рефолдінгу.

Способи експресування білків у прокаріотних хазяях добре відомі (див., наприклад, Williams et al., "Expression of foreign proteins in *E. Coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies", in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al., (eds.), page 15 (Oxford University Press 1995), Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, page 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995), and "Expression of Proteins in Bacteria", in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al., (eds.), page 101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Стандартні способи введення експресуючих векторів у бактеріальні клітини, клітини дріжджів, комах і рослин описані, наприклад, Ausubel (1995).

Загальні методи експресування та вилучення стороннього білка, продукованого клітинною системою ссавців, описані, наприклад, у Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", in Protein Engineering: Principles and

Practice, Cleland et al., (eds.), page 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996). Стандартні методики вилучення білка, продукованого бактеріальною системою, описані, наприклад, Grishammer et al., "Purification of over-produced proteins from *E. coli* cells", in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al., (eds.), pages 59-92 (Oxford University Press 1995). Загальноприйняті методи виділення рекомбінантних білків з бакуловірусної системи описані Richardson (ed.), Baculovirus Expression Protocols (The Humana Press, Inc. 1995).

Як варіант, запропоновані поліпептиди можна синтезувати методом виключного твердофазного синтезу, частковими твердофазними способами, конденсацією фрагментів або класичним синтезом в рідкій фазі. Ці методи синтезу добре відомі (див., наприклад, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963), Stewart et al., "Solid Phase Peptide Synthesis" (2nd Edition), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer and Rapp, Chem. Pept. Prof. 3:3 (1986), Atherton et al., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press 1989), Fields and Colowick, "Solid-Phase Peptide Synthesis", Methods in Enzymology Volume 289 (Academic Press 1997), and Lloyd-Williams et al., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (CRC Press, Inc. 1997)). Варіації в загальній стратегії хімічного синтезу, наприклад «нативне хімічне лігування» та «лігування експресованого білка» є також стандартними (див., наприклад, Dawson et al., Science 266:776 (1994), Hackeng et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94:1S45 (1997), Dawson, Methods Enzymol 287:34 (1997), Muir et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:6705 (1998), and Severinov and Muir, J. Biol. Chem. 273:16205 (1998)).

Запропоновані пептиди і поліпептиди включають принаймні шість, принаймні дев'ять або принаймні 15 замінних амінокислотних залишків послідовності SEQ ID NO:3. Як приклад, поліпептиди можуть включати принаймні шість, принаймні дев'ять або принаймні 15 замінних амінокислотних залишків послідовності SEQ ID NO:3. В деяких варіантах даного винаходу поліпептиди містять 20, 30, 40, 50, 100 або більше замінних залишків цих амінокислотних послідовностей. Молекули нуклеїнових кислот, що кодують такі пептиди і поліпептиди, корисні як праймери і зонди полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Крім того, поліпептиди IL-22RA та їхні фрагменти можна експресувати як мономери, гомодимери, гетеродимери або мультимери вередині вищих еукаріотних клітин. Такі клітини можна використовувати для продукування поліпептидів мономерних, гомодимерних, гетеродимерних і мультимерних рецепторів IL-22RA, які включають принаймні один поліпептид IL-22RA («IL-22RA-вмісні рецептори» або «поліпептиди IL-22RA-вмісних рецепторів»), або їх можна застосовувати як аналітичні клітини в скринінгових системах. Згідно з одним аспектом даного винаходу запропонований поліпептид, що містить позаклітинний домен IL-22RA, продукується культивованою клітиною, і цю клітину використовують для тестування на ліганди для рецептора, в тому числі на природний ліганд, IL-22, а також агоністи і антагоністи природного ліга-

нду. Як висновок цього підходу: кДНК або ген, що кодує рецептор, поєднують з іншими генетичними елементами, необхідними для його експресії (наприклад, промотором транскрипції), і отриманий в результаті експресуючий вектор вставляють в клітину-хазяїн. Клітини, що експресують ДНК і продукують функціональний рецептор, відбирають і використовують в ряді скринінгових систем. Кожен компонент мономерного, гомодимерного, гетеродимерного або мультимерного рецепторного комплексу можна експресувати в одній і тій самій клітині. Крім того, компоненти мономерного, гомодимерного, гетеродимерного або мультимерного рецепторного комплексу можна також зливати з трансмембранним доменом або іншим компонентом мембранного злиття, щоб дати можливість утворитися комплексу і провести скринінг трансфектантів, як описувалось вище.

Для аналізу запропонованих поліпептидів антагоністів і антитіл проти IL-20 та IL-22 підходять клітини ссавців, придатні для використання при експресуванні IL-22RA-вмісних рецепторів або інших рецепторів, про які відомо, що вони зв'язують IL-20 або IL-22 (наприклад, клітини, що експресують IL-22RA/CRF2-4; та IL-20RA, IL-20RB, IL-22RA/IL-20RB або IL-20RA/IL-20RB), і трансдукції рецепторопосередкованого сигналу, і ці клітини включають клітини, що експресують інші субодиниці рецептора, які можуть утворювати функціональний комплекс з IL-22RA (або IL-20RA). Ці субодиниці можуть включати субодиниці сімейства рецепторів інтерферонів або рецепторів інших цитокінів класу I або класу II, наприклад CRF2-4 (Genbank Accession No. Z17227), IL-10R (Genbank Accession Nos. U00672 і NM_001558), IL-22RA (пат. США № 5965704), *zcytor7* (IL-20RA) (пат. США № 5945511), IL-20RA/IL-20RB (Міжнародна пат. заявка № WO 01/46232) та IL-9R. Краще також використовувати клітину від того самого виду, що і рецептор, який треба експресувати. У кращому варіанті винаходу ця клітина є залежною від екзогенно доставленого кровотворного фактора росту для її проліферації. Найкращими клітинними лініями цього типу є клітинна лінія TF-1 людини (ATCC номер CRL-2003) і клітинна лінія AML-193 (ATCC номер CRL-9589), які є GM-CSF-залежними лейкоцими клітинними лініями людини, і BaF3 (Palacios and Steinmetz, Cell 41:727-734, (1985)), яка є IL-3-залежною клітинною лінією pre-B мишей. Інші клітинні лінії включають клітини BHK, COS-1 та CHO. Для продукування необхідних субодиниць рецептора або іншого клітинного компонента, необхідно для заданої клітинної реакції, можна створити відповідні клітини-хазяї. Цей метод вигідний тим, що можна створювати клітинні лінії для експресії субодиниць рецептора від будь-яких видів, таким чином долаючи потенціальні обмеження, обумовлені видоспецифічністю. Видові ортологи кДНК рецептора людини можна клонувати і використовувати в клітинних лініях від тих самих видів, наприклад кДНК миши в клітинній лінії BaF3. Клітинні лінії, залежні від одного кровотворного фактора росту, наприклад GM-CSF або IL-3, можна створити таким чином, щоб вони стали залежними від

іншого цитокіну, який діє через рецептор IL-22RA, наприклад IL-22.

Клітини, що експресують функціональний рецептор, застосовують у скринінг-аналізах. Відомо багато відповідних аналізів. Ці аналізи базуються на виявленні біологічної реакції в клітині-мішені. Одним з таких аналізів є аналіз на проліферацію клітин. Клітини культивують у присутності або за відсутності аналізуючої сполуки, і проліферацію клітин виявляють, наприклад, вимірюванням включення міченого тритієм тимідину або колориметричним аналізом, що базується на метаболічному розщепленні броміду 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію (MTT) (Mosman, J. Immunol. Meth. 65:55-63, (1983)). В іншому аналізі використовують клітини, які додатково створюють для експресії репортерного гена. Репортерний ген з'єднується з елементом промотора, який реагує на пов'язаний з рецептором каскад реакцій, цей аналіз виявляє активацію транскрипції репортерного гена. Кращим у цьому сенсі елементом промотора є промотор, що реагує на сироватку. Див., наприклад, Shaw et al., Cell 56:563-572 (1989). Кращим репортерним геном є ген люциферази (de Wet et al., Mol. Cell. Biol. 7:725, (1987)). Експресію гена люциферази виявляють за люмінесценцією, застосовуючи відомі методи (наприклад, Baumgartner et al., J. Biol. Chem. 259:29094-29101, (1994); Schenborn and Goiffin, Promega Notes 41:11, 1993). Комплекти для тестування на активність люциферази комерційно доступні, їх можна придбати, наприклад, у ф. «Promega Corp.», Madison, WI. Клітинні лінії-мішені цього типу можна застосовувати для скринінгу бібліотек хімікатів, кондиціонованих клітинами культурних середовищ, грибних бульйонів, проб ґрунту, проб води тощо. Наприклад, банк зразків кондиціонованих клітинами середовищ можна протестувати на клітинні-мішені для ідентифікації клітин, що продукують ліганд. Позитивні клітини потім використовують для продукування бібліотеки кДНК в експресуючому векторі ссавців, який розділяють на пули, трансфектують в клітини-хазяї та експресують. Зразки середовищ з трансфікованих клітин потім аналізують, з наступним розділенням пулів, повторно трансфектують, субкультивують і знову аналізують позитивні клітини для виділення клонованої кДНК, що кодує ліганд.

Відомо декілька клітинних ліній, що реагують на IL-20, або які можна синтезувати, наприклад клітинна лінія BaF3/DIRS1/cytoR11 (міжнародна пат. заявка № WO 02/072607). Крім того, відомо декілька клітинних ліній, що реагують на IL-22 (Dumontier et al., J. Immunol. 164:1814-1819, 2000; Dumontier, L. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000; Xie MH et al., J. Biol. Chem. 275:31335-31339, 2000; Kotento SV et al., J. Biol. Chem. 276:2725-2732, 2001), а також клітинні лінії, що експресують IL-22RA субодиниці рецептора IL-22. Наприклад, на IL-22 реагують такі клітини: TK-10 (Xie MH et al., supra) (рак нирки людини); SW480 (ATCC No. CCL-228) (аденокарцинома товстої кишки людини); HepG2 (ATCC No. HB-8065) (гепатома людини); PC12 (ATCC No. CRL-1721) (модель нейронної клітини миши; феохромоцито-

ма щура) та MES13 (ATCC No. CRL-1927) (мезангіальна клітинна лінія нирки миши). Крім того, сюди відносяться деякі клітинні лінії, що експресують IL-22RA (рецептор IL-22): A549 (ATCC No. CCL-185) (карцинома легені людини); G-361 (ATCC No. CRL-1424) (меланома людини) і Saki-1 (ATCC No. HTB-46) (рак нирки людини). Крім того, клітинні лінії, що реагують на IL-22, можна синтезувати, наприклад клітинну лінію Baf3/cytoR11/CRF2-4 (WO 02/12345). Ці клітини можна застосовувати в аналізах, для визначення функціональності IL-22RA як антагоніста IL-20 або IL-22, або протизапального фактора.

Ще один запропонований даним винаходом метод скринінгу передбачає використання гібридних поліпептидів рецепторів. Ці гібридні поліпептиди поділяють на два загальні класи. В першому класі внутрішньоклітинний домен IL-22RA з'єднують з лігандзв'язуючим доменом другого рецептора. Другий клас гібридних поліпептидів рецепторів включає позаклітинний (ліганд-зв'язуючий) домен IL-22RA (SEQ ID NO:3) з внутрішньоклітинним доменом другого рецептора, краще рецептора кровотворного цитокіну, і трансмембранний домен. Гібридні мономери, гомодимери, гетеродимери і мультимери запропонованих рецепторів IL-22RA згаданого другого класу експресуються в клітинах, про які відомо, що вони здатні реагувати на сигнали, трансдуковані другим рецептором. Разом ці два класи гібридних рецепторів дають можливість ідентифікувати тип чутливих клітин для проведення аналізу на виявлення IL-22 або IL-20. Більш того, такі клітини можна використовувати у присутності IL-22 або IL-20 для виявлення розчинних антагоністів рецепторів у конкурентному аналізі. В такому аналізі зменшення проліферації або активності сигнальної трансдукції IL-22 або IL-20 у присутності запропонованого розчинного рецептора демонструє антагоністичну активність. Більш того, аналізи на зв'язування розчинного рецептора IL-22RA і клітинні аналізи можна також застосовувати для визначення того, чи зв'язує, блокує, інгібує, зменшує, протидіє або нейтралізує активність IL-22 або IL-20 розчинний рецептор.

6. Синтез злитих білків і кон'югатів IL-22RA

Один загальний клас аналогів IL-22RA складають варіанти, що мають амінокислотну послідовність, яка є мутацією описуваної тут амінокислотної послідовності. До іншого загального класу аналогів IL-22RA входять антиідіотипічні антитіла та їхні фрагменти, про що йтиметься далі. Крім того, як аналоги можна застосовувати рекомбінантні антитіла, що містять антиідіотипічні варіабельні домени (див., наприклад, Monfardini et al., Proc. Assoc. Am. Physicians 108:420 (1996)). Оскільки згадані варіабельні домени антиідіотипічних антитіл IL-22RA імітують IL-22RA, ці домени можуть забезпечити зв'язуючу активність IL-22RA. Способи синтезу антиідіотипічних каталітичних антитіл відомі (див., наприклад, Joron et al., Ann. N Y Acad. Sci. 672:216 (1992), Friboulet et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 47:229 (1994), and Avalle et al., Ann. N Y Acad. Sci. 864:11S (1998)).

Інший метод ідентифікування аналогів IL-22RA передбачає використання комбінаторних бібліотек. Способи конструювання і скринінгу фагового дис-

плея та інших комбінаторних бібліотек описані, наприклад, Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press 1996), Verdine, US Patent No. 5,783,384, Kay et al., US Patent No. 5,747,334, and Kauffman et al., US Patent No. 5,723,323.

Поліпептиди IL-22RA застосовують як *in vivo*, так і *in vitro*. Наприклад, для інгібування впливів ліганду рецептора IL-22RA, продукованого культивованими клітинами, до клітинного культурного середовища можна додавати розчинну форму IL-22RA.

Злиті білки IL-22RA можна застосовувати для експресії IL-22RA в рекомбінантному хазяїні і для виділення синтезованого IL-22RA. Конкретні злиті білки IL-22RA також знаходять застосування в діагностиці та терапії, про що йтиметься далі. Один тип злитого білка включає пептид, що спрямовує поліпептид IL-22RA від рекомбінантної клітини-хазяїна. Для спрямування поліпептиду IL-22RA в секреторний шлях еукаріотної клітини-хазяїна в експресуючому векторі IL-22RA створюють секреторну сигнальну послідовність (також відому як сигнальний пептид, лідерна послідовність, препослідовність або препослідовність). Хоча секреторну сигнальну послідовність можна отримати з IL-22RA, відповідну сигнальну послідовність можна також отримати з іншого секретованого білка або синтезувати *de novo*. Секреторну сигнальну послідовність операційно зв'язують з послідовністю, що кодує IL-22RA, так що ці дві послідовності є з'єднаними у відповідній рамці читування і розташованими так, щоб спрямовувати цей зано синтезований поліпептид у секреторний шлях клітини-хазяїна. Секреторні сигнальні послідовності зазвичай розміщують на кінці 5' нуклеотидної послідовності, яка кодує поліпептид, що становить інтерес, хоча певні секреторні сигнальні послідовності можна розміщувати будь-де в нуклеотидній послідовності, що становить інтерес (див., наприклад, Welch et al., US Patent No. 5,037,743; Holland et al., US Patent No. 5,143,830).

Хоча секреторна сигнальна послідовність IL-22RA або іншого білка, продукованого клітинами ссавців (наприклад, сигнальна послідовність тканинного активатора плазміногена, описана, наприклад, у пат. США № 5641655), є ефективною для експресії IL-22RA в рекомбінантних хазяях ссавців, для експресії в клітинах дріжджів краще застосовувати дріжджову сигнальну послідовність. Прикладами відповідних дріжджових сигнальних послідовностей є послідовності, отримані з α -фактора сумісного з дріжджами феромона (кодованого геном MF α 1), інвертази (кодованої геном SUC2) або кислої фосфатази (кодованої геном PHO5). Див., наприклад, Romanos et al., "Expression of Cloned Genes in Yeast", in DNA Cloning 2: A Practical Approach, 2nd Edition, Glover and Hames (eds.), pages 123-167 (Oxford University Press 1995).

Поліпептиди розчинних рецепторів IL-22RA можна отримувати експресуванням процесованої ДНК, що кодує позаклітинний домен, наприклад поліпептид, що містить послідовність SEQ ID NO:3 або відповідну зону нелюдського рецептора. Поліпептиди позаклітинного домену краще синтезувати у формі, що практично не містить сегментів тран-

слюнотканних і внутрішньоклітинних поліпептидів. Для спрямування виведення домену рецептора з клітини-хазіяна ДНК рецептора зв'язують з сегментом другої ДНК, що кодує секреторний пептид, наприклад секреторний пептид t-PA. Для полегшення очищення секретованого домену рецептора можна зі згаданим поліпептидом рецептора зливати С-кінцевий подовжуючий сегмент, наприклад поліістидинову мітку, субстанцію Р, пептид FlagTM (Hopp et al., *Biotechnology* 6:1204-1210, (1988) від ф. «Eastman Kodak Co.», New Haven, CT) або інший поліпептид або білок, для якого існує антитіло або інший специфічно зв'язуючий агент. Вищеописаним способом синтезують з позаклітинних цитокінзв'язуючих доменів і антигенні епітопи IL-22RA.

В іншому методі позаклітинний домен рецептора IL-22RA або інший компонент рецептора цитокіну класу I або класу II можна експресувати шляхом злиття з константними зонами важкого ланцюга імуноглобуліну, зазвичай Fc-фрагментом, який містить два домени константної зони і шарнірну зону, але не має варіабельної зони (див. Sledziewski, AZ et al., US Patent Nos. 6,018,026 and 5,750,375). Запропоновані розчинні поліпептиди IL-22RA включають такі злиті білки. Один такий злитий білок показаний у послідовностях SEQ ID NO:4. Такі злиті білки зазвичай секретуються у вигляді мультимерних молекул, в яких Fc-ділянки дисульфідно зв'язані одна з одною, а поліпептиди двох рецепторів розміщені дуже близько один до одного. Злиті білки такого типу можна використовувати для афінного очищення когнатного ліганду від розчину як інструмент аналізу *in vitro* для блокування, інгібування або зменшення сигналів *in vitro* шляхом специфічного титрування ліганду, і як антагоністи *in vivo* шляхом введення їх парентерально для зв'язування циркулюючого ліганду і виведення його з кровообігу. Для очищення ліганду до проби, що містить цей ліганд (наприклад, кондиціонованих клітинами культурних середовищ або екстрактів тканин), додають химеру IL-22RA-Ig в умовах, які сприяють зв'язуванню рецептор-ліганд (зазвичай майже нормальні температура, рН та іонна сила). Комплекс химера-ліганд потім розділяють за допомогою суміші, в якій використано білок А, який іммобілізують на твердому субстраті (наприклад, гранулах нерозчинної смоли). Ліганд потім елюють звичайними хімічними методами, наприклад за допомогою солі або рН-градієнта. Як варіант, власне химеру можна з'єднати з твердим субстратом, а зв'язування та елювання здійснювати, як описано вище. Химери можна використовувати *in vivo* для регуляції запальних реакцій, в тому числі гострофазових реакцій, наприклад сироватковий амیلлоїд А (SAA), С-реактивний білок (CRP) тощо. Химери з високою спорідненістю до зв'язування вводять парентерально (наприклад, внутрішньом'язовою, підшкірною або внутрішньовенною ін'єкцією). Циркулюючі молекули зв'язують ліганд і видаляються з кровообігу в результаті нормальних фізіологічних процесів. Для застосування в аналізах химери з'єднують з твердим субстратом за допомогою Fc-ділянки і використовують у твердофазному імуноферментному аналізі (ELISA).

Для полегшення виділення запропонованих anti-IL-22RA і партнерів зв'язування можна успішно застосовувати аналітичну систему, в якій використовують лігандзв'язуючий рецептор (або антитіло, один елемент пари комплемент/антикомплемента) або його зв'язуючий фрагмент і комерційно доступний біосенсор (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Такий рецептор, антитіло, елемент пари комплемент/антикомплемента або фрагмент іммобілізують на поверхні рецепторного чіпа. Застосування такого приладу описано Karlsson, J. *Immunol. Methods* 145:229-40, 1991 and Cunningham and Wells, J. *Mol. Biol.* 234:554-63, 1993. Рецептор, антитіло, елемент або фрагмент ковалентно прикріплюють, за допомогою аміних або сульфгідрильних реагентів, до декстранових волоконних білків, прикріплених до шару золота у проточній кюветі. Досліджувану пробу пропускають через комірку. Якщо ліганд, епітоп або протилежний елемент пари комплемент/антикомплемента присутній в цій пробі, він буде зв'язуватися з іммобілізованим рецептором, антитілом або елементом, відповідно, що викличе зміну у коефіцієнті заломлення середовища, яка виявляється як зміна у поверхневому плазмонному резонансі золотого шару. Ця система дає можливість визначати швидкість асоціації і швидкість дисоціації, на базі яких можна обчислювати спорідненість до зв'язування, і оцінювати стехіометрію зв'язування. Як варіант, зв'язування ліганд-рецептор можна аналізувати за технологією SELDI(TM) (Ciphergen, Inc., Palo Alto, CA). Крім того, в конкурентних експериментах можна застосовувати вищеописану технологію BIACORE для визначення того, чи різні моноклональні антитіла зв'язують ті самі або різні епітопи на поліпептиді IL-22RA, і як таку цю технологію можна використовувати при картуванні епітопів запропонованих нейтралізуючих антитіл, які зв'язують, блокують, інгібують, зменшують, протидіють або нейтралізують IL-22 або і IL-20, і IL-22.

Поліпептиди лігандзв'язуючих рецепторів можна також застосовувати в інших відомих аналітичних системах. Такі системи включають аналіз Скетчарда (Scatchard) для визначення спорідненості до зв'язування (див. Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660-72, 1949) і калориметричні аналізи (Cunningham et al., *Science* 253:545-48, 1991; Cunningham et al., *Science* 245:821-25, 1991).

Даний винахід також пропонує ряд інших поліпептидних злитих білків і споріднених мультимерних білків, які містять один або більше поліпептидних злитих білків. Наприклад, розчинний рецептор IL-22RA можна синтезувати у вигляді злиття з білком, що димеризується, як описано у патентах США №№ 5155027 та 5567584. Кращі білки, що димеризуються, включають домени константних зон імуноглобуліну, наприклад IgG γ 1, і легкий ланцюг κ людини. Злитий білок імуноглобулін-розчинний IL-22RA можна експресувати в генно-інженерних клітинах для продукування ряду аналогів мультимерного рецептора IL-22RA. З розчинним рецептором IL-22RA можна зливати допоміжні домени для спрямування їх в задані клітини, тканини або макромолекули (наприклад, колаген

або клітини, що експресують ліганди IL-22RA, IL-22 або IL-20). Поліпептид IL-22RA можна зливати з двома або більше компонентами, наприклад афінною міткою для очищення, та орієнтуючим доменом. Поліпептидні злиття можуть також включати один або більше сайтів розщеплення, особливо між доменами. Див. Tuan et al., *Connective Tissue Research* 34:1-9, 1996.

В бактеріальних клітинах часто необхідно експресувати гетерологічний білок у вигляді злитого білка для зменшення токсичності, підвищення стабільності та збільшення виходу експресованого білка. Наприклад, IL-22RA можна експресувати у вигляді злитого білка, що містить поліпептид глутатіон-8-трансферази. Злиті білки з глутатіон-S-трансферазою зазвичай розчинні, їх легко очищати від лізатів *E. coli* на імобілізованих глутатіонових колонках. В аналогічних методах злитий білок IL-22RA, що містить поліпептид мальтозав'язуючого білка, можна виділяти за допомогою хроматографічної колонки з амілозною смолою, тоді як злитий білок, що містить С-кінець гена процесованого білка А, можна очищати за допомогою IgG-сефарози. Загальноприйняті методики експресування гетерологічного поліпептиду у вигляді злитого білка в бактеріальній клітині описані, наприклад, Williams et al., "Expression of Foreign Proteins in *E. coli* Using Plasmid Vectors and Purification of Specific Polyclonal Antibodies", in *DNA Cloning 2: A Practical Approach*, 2nd Edition, Glover and Hames (eds.), pages 15-58 (Oxford University Press 1995). Крім того, експресуючі системи є комерційно доступними. Наприклад, система PINPOINT очищення білка Xa (Promega Corporation; Madison, WI) дає можливість виділяти злитий білок, що містить поліпептид, який під час експресії з використанням смоли, що містить авідин, стає біотинілованим.

Пептидні мітки, які є ефективними для виділення гетерологічних поліпептидів, експресованих або прокаріотними, або еукаріотними клітинами, включають полігістидинові мітки (що мають спорідненість до нікель-хелатної смоли), мітки с-тус, кальмодулін-зв'язуючий білок (виділений афінною хроматографією на кальмодуліні), субстанцію Р, мітку RYIRS (яка зв'язується з антитілами anti-RYIRS), мітку Glu-Glu і мітку FLAG (яка зв'язується з антитілами anti-FLAG). Див., наприклад, Luo et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 329:215 (1996), Morganti et al., *Biotechnol Appl. Biochem.* 23:67 (1996), and Zheng et al., *Gene* 186:55 (1997). Молекули нуклеїнових кислот, що кодують такі пептидні мітки, можна придбати, наприклад у ф. «Sigma-Aldrich Corporation» (St. Louis, MO).

Інша форма злитого білка включає поліпептид IL-22RA і константну зону важкого ланцюга імуноглобуліну, зазвичай Fc-фрагмент, який містить два або три домени константної зони і шарнірну зону, але не має варіабельної зони. Наприклад, у пат. США № 5723125 (Chang et al.) описується злитий білок, що включає інтерферон людини і Fc-фрагмент імуноглобуліну людини. С-кінець інтерферону з'єднаний з N-кінцем Fc-фрагмента компонентом пептидного лінкера. Прикладом пептидного лінкера є пептид, що містить здебільшого інертну послідовність Т-клітини і яка є імунологічно

інертною. Ілюстративний пептидний лінкер має амінокислотну послідовність: GGSGG SGGGG SGGGG S (SEQ ID NO:9). В цьому злитому білку Fc-компонент являє собою γ4-ланцюг людини, який є стійким у розчині і має невелику активність або не має здатності активувати комплемент. У зв'язку з цим даний винахід розглядає злитий білок IL-22RA, який включає компонент IL-22RA і Fc-фрагмент людини, причому С-кінець компонента IL-22RA з'єднаний з N-кінцем Fc-фрагмента за допомогою пептидного лінкера, наприклад пептида, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4. Компонентом IL-22RA може бути молекула IL-22RA або її фрагмент. Наприклад, злитий білок може містити амінокислоту послідовності SEQ ID NO:3 і Fc-фрагмент (наприклад, Fc-фрагмент людини) (SEQ ID NO:4).

Ще в одному варіанті злитий білок IL-22RA включає IgG-послідовність, IL-22RA-компонент, ковалентно з'єднаний з амінокінцем цієї IgG-послідовності, і сигнальний пептид, ковалентно з'єднаний з амінокінцем IL-22RA-компонента, причому IgG-послідовність складається з наступних елементів у наступному порядку: шарнірної зони, домену CH₂ і домену CH₃. Тобто IgG-послідовність не має домену CH₁. IL-22RA-компонент виявляє активність IL-22RA, наприклад здатність зв'язуватись з лагіндом IL-22RA. Цей загальний метод продукування злитих білків, що містять і частку антитіла, і частку неантитіла, описано LaRochelle et al., EP 742830 (WO 95/21258).

Злиті білки, що містять IL-22RA-компонент і Fc-компонент, можна використовувати, наприклад як інструмент в аналізах *in vitro*. Наприклад, присутність ліганду IL-22RA у біологічній пробі можна виявити за допомогою злитого білка IL-22RA-імуноглобулін, в якому IL-22RA-компонент застосований для зв'язування з лігандом, а макромолекула, наприклад білок А або антитіло anti-Fc, застосована для зв'язування цього злитого білка з твердим субстратом. Такі системи можна використовувати для ідентифікації агоністів і антагоністів, які перешкоджають зв'язуванню лігандів IL-22RA, наприклад IL-22 або і IL-20, і IL-22, з його рецептором.

Інші приклади злитих білків антитіл включають поліпептиди, що містять антигензв'язуючий домен і IL-22RA-фрагмент, що містить позаклітинний домен IL-22RA. Такі молекули можна використовувати для націлювання на конкретні тканини, що сприяє зв'язуючій активності IL-22RA.

Даний винахід також пропонує ряд інших поліпептидних злиттів. Наприклад, частину домена (доменів) або весь домен (все домени), що надає біологічну функцію, можна міняти місцями між запропонованим IL-22RA і функціонально еквівалентним доменом (доменами) від іншого члена сімейства цитокінових рецепторів. Для продукування ряду злитих аналогів IL-22RA поліпептидні злиті білки можна експресувати в рекомбінантних клітинах-хазяях. Поліпептид IL-22RA можна зливати з двома або більше компонентами або доменами, наприклад афінною міткою для очищення, та орієнтуючим доменом. Поліпептидні злиті білки можуть також включати один або більше сайтів роз-

щеплення, особливо між доменами. Див. Tuan et al., *Connective Tissue Research* 34:1, 1996.

Злиті білки можна отримувати відомими методами, створюючи кожний компонент злитого білка і хімічно поєднуючи їх. Як варіант, застосовуючи відомі методики і методи експресування, можна генерувати поліпептиди, що кодують обидва компоненти злитого білка у відповідній рамці зчитування. Загальні методи ферментативного та хімічного розщеплення злитих білків описані, наприклад, Ausubel (1995), на стор. 16-19 до 25-25.

IL-22RA-зв'язуючі домени можна додатково охарактеризувати фізичним аналізом структури, визначеної такими методами, як ядерний магнітний резонанс, кристалографія, електронографія або фотоафінне мічення, у поєднанні з мутацією амінокислот на сайті потенціального контакту агоністів ліганду IL-22RA. Див., наприклад, de Vos et al., *Science* 255:306 (1992), Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899 (1992), and Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59 (1992).

Даний винахід також розглядає хімічно модифіковані комозиції IL-22RA, в яких поліпептид IL-22RA з'єднаний з полімером. Ілюстративні поліпептиди IL-22RA є розчинними поліпептидами, що не містять функціонального трансмембранного домену, наприклад поліпептид, який містить амінокислотні залишки послідовності SEQ ID NO:3. Як правило, згаданий полімер є водорозчинним, так що кон'югат IL-22RA не осідає у водному середовищі, наприклад фізіологічному. Прикладом відповідного полімера є полімер, модифікований таким чином, що має реакційноздатну групу, наприклад активний складний ефір для ацилювання або альдегід для алкілювання. Таким чином, ступінь полімеризації можна регулювати. Прикладом реакційноздатного альдегіду є поліетиленгліколь-пропіональдегід або моно-(C1-C10)алкокси, або його арилокси-дериват (див., наприклад, Harris et al., *US Patent No. 5,252,714*). Полімер може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Крім того, суміш полімерів можна використовувати для отримання кон'югатів IL-22RA.

Кон'югати IL-22RA, застосовувані в терапії, можуть містити компоненти фармацевтично прийнятних водорозчинних полімерів. Відповідні водорозчинні полімери включають поліетиленгліколь (ПЕГ), монометокси-ПЕГ, моно-(C1-C10)алкокси-ПЕГ, арилокси-ПЕГ, полі-(N-вінілпіролідін)ПЕГ, трезилмонометокси-ПЕГ, ПЕГ-пропіональдегід, bis-сукцинімідилкарбонат-ПЕГ, гомополімери пропіленгліколю, співполімер поліпропіленоксид/етиленоксид, поліоксиетиловані поліолі (наприклад, гліцерин), полівініловий спирт, декстран, целюлозу або інші полімери на основі вуглеводів. Відповідний ПЕГ може мати молекулярну масу від 600 до 60000, в тому числі, наприклад, 5000, 12000, 20000 і 25000. Кон'югат IL-22RA може також містити суміш таких водорозчинних полімерів.

Один приклад кон'югата IL-22RA включає IL-22RA-компонент і компонент поліалкілоксиду, прикріплений до N-кінця IL-22RA-компонента. ПЕГ є одним відповідним поліалкілоксидом. Наприклад, IL-22RA можна модифікувати за допомогою ПЕГ, цей процес відомий як «пегілювання». Пегілювання

IL-22RA можна здійснювати будь-якою з відомих реакцій пегілювання (див., наприклад, EP 0154316, Delgado et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9:249 (1992), Duncan and Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* 27:290 (1994), and Francis et al., *Int J Hematol* 68:1 (1998)). Наприклад, пегілювання можна здійснювати реакцією ацилювання або реакцією алкілювання за допомогою реакційноздатної молекули поліетиленгліколю. В іншому способі кон'югати IL-22RA утворюють конденсацією активованого ПЕГ, в якому кінцева гідроксильна або аміногрупа ПЕГ заміщена активованим лінкером (див., наприклад, Karasiewicz et al., *US Patent No. 5,382,657*).

Пегілювання ацилюванням зазвичай потребує взаємодії деривату активного складного ефіру ПЕГ з поліпептидом IL-22RA. Прикладом складного ефіру активованого ПЕГ є ПЕГ, етерифікований в N-гідроксисукцинімід. Застосований в даному описі термін «ацилювання» включає наступні типи зв'язків між IL-22RA і водорозчинним полімером: амідний, карбаматний, уретановий і т.п. Способи отримання пегілюваного IL-22RA ацилюванням зазвичай передбачають етапи: а) взаємодію поліпептиду IL-22RA з ПЕГ (наприклад, реакційноздатним ефіром альдегідного деривату ПЕГ) в умовах, за яких одна або більше груп ПЕГ прикріплюються до IL-22RA, і б) отримання продукту(продуктів) реакції. Взагалі, оптимальні умови для реакцій ацилювання визначають на основі відомих параметрів і заданих результатів. Наприклад, чим більше співвідношення ПЕГ:IL-22RA, тим більше процентний вміст продукту «поліпегілований IL-22RA».

Продуктом пегілювання ацилюванням, як правило, є поліпегілований IL-22RA, в якому ε-аміногрупи лізинових залишків пегіловані за допомогою ацильної з'єднувальної групи. Прикладом з'єднувального зв'язку є амід. Як правило, отриманий в результаті IL-22RA буде принаймні на 95% моно-, ди- або трипегілованим, хоча можна утворювати деякі види з більш високими ступенями пегілювання в залежності від реакційних умов. Пегіловані види можна відокремлювати від поліпептидів IL-22RA, що не прокон'югували, стандартними методами очищення, наприклад діалізом, ультрафільтрацією, іонообмінною хроматографією, афінною хроматографією тощо.

Пегілювання алкілюванням, як правило, включає взаємодію деривату кінцевого альдегіду ПЕГ з IL-22RA у присутності відновлювача. ПЕГ-групи можна прикріплювати до поліпептиду за допомогою -CH₂NH-групи.

Крім того, запропоновані антитіла anti-IL-22RA або фрагменти антитіла можна пегілювати відомими і описаними тут методами.

При синтезі шляхом відновлювального алкілювання для створення монопегілованого продукту користуються диференціальною реакційною здатністю різних типів найпростіших аміногруп, придатних для отримання дериватів. Як правило, реакцію проводять при рН, який дає можливість використати рКа-різницю між ε-аміногрупами лізинових залишків і α-аміногрупою N-кінцевого залишку білка. В результаті такого селективного отримання

мання дериватів контролюється прикріплення водорозчинного полімеру, що містить реакційноздатну групу, наприклад альдегід, до білка. Кон'югація з полімером відбувається переважно на N-кінці білка без значної модифікації інших реакційноздатних груп, наприклад аміногруп бічного ланцюга лізину. Даний винахід пропонує переважно гомогенне утворення монополімерних кон'югатів IL-22RA.

Відновлювальне алкілювання для утворення переважно гомогенної популяції молекул монополімерного кон'югата IL-22RA може передбачати такі етапи: а) взаємодію поліпептиду IL-22RA з реакційноздатним ПЕГ в умовах відновлювального алкілювання при рН, придатному для здійснення селективної модифікації α -аміногрупи на амінокінці IL-22RA і б) отримання продукту(продуктів) реакції. Відновлювач, застосовуваний для відновлювального алкілювання, має бути стійким у водному розчині і здатним відновлювати тільки шифрову основу, утворену в початковому процесі відновлювального алкілювання. Ілюстративні відновлювачі включають борогідрат натрію, ціаноборогідрат натрію, диметиламінборан, триметиламінборан і піридинборан.

Для отримання переважно гомогенної популяції монополімерних кон'югатів IL-22RA реакційні умови відновлювального алкілювання повинні забезпечувати можливість селективного прикріплення компонента водорозчинного полімера до N-кінця IL-22RA. Такі реакційні умови, як правило, передбачають рКа-різницю між аміногрупами лізинових залишків і α -аміногрупою на N-кінці. На співвідношення полімеру і білка, який треба застосувати, також впливає рН. Як правило, якщо рН низький, знадобиться більший надлишок полімеру відносно білка, бо чим менше реакційна здатність N-кінцевої α -аміногрупи, тим більше полімеру буде потрібно для досягнення оптимальних умов. Якщо рН високий, співвідношення полімер: IL-22RA не повинно бути великим, оскільки існує більше реакційноздатних груп. Зазвичай рН знаходиться в межах 3-9 або 3-6. Цей метод можна застосовувати для створення IL-22RA-вмісних гомодимерних, гетеродимерних або мультимерних кон'югатів розчинного рецептора.

Іншим фактором, який слід враховувати, є молекулярна маса водорозчинного полімеру. Як правило, чим вище молекулярна маса полімеру, тим меншу кількість молекул полімеру можна прикріпити до білка. Для реакцій пегілювання типова молекулярна маса становить приблизно 2-100 кДа, 5-50 кДа або 12-25 кДа. Молярне співвідношення водорозчинного полімеру та IL-22RA, як правило, знаходиться в діапазоні 1:1 - 100:1. Зазвичай молярне співвідношення водорозчинного полімеру та IL-22RA становитиме 1:1-20:1 для пегілювання і 1:1 - 5:1 для монопегілювання.

Загальні методи продукування кон'югатів, що містять компоненти поліпептиду і водорозчинного полімеру, відомі. Див., наприклад, Karasiewicz et al., US Patent No. 5,382,657, Greenwald et al., US Patent No. 5,738,846, Nieforth et al., Clin. Pharmacol. Ther. 59:626 (1996), Monkars et al., Anal. Biochem. 247:434 (1997)). Цей метод можна застосовувати

для створення IL-22RA-вмісних гомодимерних, гетеродимерних або мультимерних кон'югатів розчинного рецептора.

Даний винахід розглядає композиції, що містять пептид або поліпептид, наприклад описаний тут розчинний рецептор або антитіло. Такі композиції можуть додатково містити носій. Носій може бути звичайним органічним або неорганічним носієм. Приклади носіїв включають воду, буферний розчин, спирт, пропіленгліколь, макрогол, кунжутну олію, кукурудзяну олію тощо.

7. Виділення поліпептидів IL-22RA

Запропоновані поліпептиди можна очищати принаймні до 80% чистоти, принаймні до 90%, принаймні до 95% або більше 95%, наприклад 96%, 97%, 98% або більше 99% чистоти відносно забруднюючих макромолекул, а саме інших білків і нуклеїнових кислот, а також відносно інфекційних і пірогенних речовин. Запропоновані поліпептиди можна також очищати до фармацевтично чистого стану, що становить більше 99,9% чистоти. В певних препаратах очищений поліпептид практично не містить інших поліпептидів, а саме інших поліпептидів тваринного походження.

Для отримання препаратів IL-22RA, очищених від природних джерел (наприклад, тканинних джерел людини), синтетичних поліпептидів IL-22RA, рекомбінантних поліпептидів IL-22RA і злитих поліпептидів IL-22RA, очищених від рекомбінантних клітин-хазяїв, можна застосовувати фракціонування та/або традиційні методи очищення. Як правило, для фракціонування зразків можна застосовувати фракціонування сульфатом амонію та екстрагування кислотою або хаотропами. Етапи очищення можуть, наприклад, включати гідроксипатітну хроматографію, гель-фільтрацію, рідинну хроматографію швидкого розділення (ПХШР) та зворотнофазну високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ). Відповідні хроматографічні середовища включають синтезовані декстрини, агарозу, целюлозу, поліакриламід, кремнезем спеціального призначення тощо. Придатними є деривати PEI (поліетиленіміну), DEAE (діетиламіноетилю), QAE і Q. Прикладами хроматографічних середовищ є середовища, синтезовані за допомогою фенілових, бутилових або октилових груп, наприклад фенілсефароза FF (Pharmacia), сорбент Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), октилсефароза (Pharmacia) і т.п.; або поліакрилові смоли, наприклад Amberchrom CG 71 (Toso Haas) і т.п. Відповідні тверді субстрати включають скляні гранули, смоли на основі кремнезему, целюлозні смоли, агарозні гранули, перехреснозшиті агарозні гранули, полістирольні гранули, перехреснозшиті поліакриламідні смоли і т.п., які є нерозчинними в умовах, в яких їх планують використовувати. Ці підкладки можна модифікувати за допомогою реакційноздатних груп, які дають можливість прикріплювати білки аміногрупами, карбоксильними, сульфгідрильними, гідроксильними групами та/або вуглеводними компонентами.

Приклади методів хімічного зв'язування включають активацію ціаністим бромідом, активацію N-гідроксисукцинімідом, активацію епоксидом,

сульфгідрильну активацію, активацію гадразидом, і карбоксильні та амінодеривати для карбодіімідного хімічного зв'язування. Ці та інші тверді середовища добре відомі, широко застосовуються в галузі і комерційно доступні. Вибір конкретного способу виділення поліпептиду і очищення є справою звичайного розрахунку, і його частково визначають за властивостями вибраного субстрату. Див., наприклад, *Affinity Chromatography: Principles & Methods* (Pharmacia LKB Biotechnology 1988), and Doonan, *Protein Purification Protocols* (The Humana Press 1996).

Фахівці можуть розробити й інші варіанти виділення та очищення IL-22RA. Наприклад, антитіла anti-IL-22RA, отримані як описано нижче, можна застосовувати для виділення великих кількостей білків методом імуноафінного очищення.

Запропоновані поліпептиди можна також виділяти, використовуючи конкретні властивості. Наприклад, для очищення багатих на гістидин білків, в тому числі білків, що містять гістидинову мітку, можна застосовувати адсорбційну хроматографію з використанням іммобілізованих іонів металів. Стисло, спочатку для утворення хелату заряджають гелі іонами двовалентного металу (Sulkowski, *Trends in Biochem.* 3:1 (1985)). Багаті на гістидин білки будуть адсорбуватися в цю матрицю з різними афінностями в залежності від застосованих іонів металів, і будуть елююватися в результаті конкурентного елюювання, знижуючи pH, або використання сильних хелатуючих агентів. Інші методи очищення включають очищення глікозилованих білків афінною хроматографією на лектині та іонообмінною хроматографією (M. Deutscher, (ed.), *Meth. Enzymol.* 182:529 (1990)). В інших варіантах винаходу для полегшення очищення можна здійснити злиття поліпептиду, що становить інтерес, з афінною міткою (наприклад, мальтозазв'язуючим білком, доменом імуноглобуліну). Крім того, ліганд зв'язуючі властивості позаклітинного домену IL-22RA можна використати для очищення, наприклад, IL-22RA-вмісних розчинних рецепторів; наприклад методом афінної хроматографії, при якій ліганд IL-22 зв'язується з колонкою, а IL-22RA-вмісний рецептор зв'язується і практично елюється стандартними хроматографічними методами.

Поліпептиди IL-22RA або їхні фрагменти можна також хімічно синтезувати, як описано вище. Поліпептиди IL-22RA можуть бути мономерами або мультимерами; глікозилованими або неглікозилованими; пегілованими або непегілованими; і можуть включати або не включати первинний амінокислотний залишок метіонін.

8. Отримання антитіл до білків IL-22RA

Антитіла до IL-22RA можна отримати, наприклад, використовуючи продукт експресуючого вектора IL-22RA або IL-22RA, виділений з природного джерела, як антиген. Надзвичайно ефективні антитіла anti-IL-22RA «специфічно зв'язуються» з IL-22RA. Антитіла вважають такими, що специфічно зв'язуються, якщо ці антитіла виявляють принаймні одну з наступних двох властивостей: 1) антитіла зв'язуються з IL-22RA з пороговим рівнем зв'язуючої активності, і 2) антитіла не дають значної пере-

хресної реакції з поліпептидами, спорідненими з IL-22RA.

Щодо першої характеристики, антитіла специфічно зв'язуються, якщо вони зв'язуються з поліпептидом IL-22RA, пептидом або епітопом зі спорідненістю до зв'язування (K_a) $10^6 M^{-1}$ або більше, краще $10^7 M^{-1}$ або більше, ще краще $10^8 M^{-1}$ або більше, а найкраще $10^9 M^{-1}$ або більше. Фахівець легко визначить спорідненість антитіла до зв'язування, наприклад аналізом Скетчарда (Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51:660 (1949)). Щодо другої характеристики, антитіла не дають значної перехресної реакції з молекулами споріднених поліпептидів, якщо вони виявляють IL-22RA, за винятком невідомих на сьогодні поліпептидів, стандартним вестерн-блотингом. До відомих споріднених поліпептидів відносяться, наприклад, відомі рецептори цитокінів.

Антитіла anti-IL-22RA можна отримати за допомогою антигенних епітопвмісних пептидів і поліпептидів IL-22RA. Запропоновані антигенні епітопвмісні пептиди і поліпептиди включають послідовність із принаймні 9 або 15-30 амінокислот, що містяться в послідовності SEQ ID NO:3 або іншій описаній тут амінокислотній послідовності. Однак пептиди або поліпептиди, що містять більшу ділянку запропонованої амінокислотної послідовності, із 30-50 амінокислот, або будь-якої довжини аж до (і включно) повної амінокислотної послідовності запропонованого поліпептиду, також придатні для створення антитіл, що зв'язуються з IL-22RA. Краще вибирати таку амінокислотну послідовність епітопвмісного пептиду, яка практично розчиняється у водних розчинниках (тобто щоб послідовність включала відносно гідрофільні залишки і, як правило, не містила гідрофобних залишків). Більш того, для утворення антитіл також підходять амінокислотні послідовності, що містять залишки проліну.

Наприклад, за допомогою програми PROTEAN (версія 3.14) ф. «LASERGENE (DNASTAR; Madison, WI) методом Джеймсона-Вульфа (Jameson-Wolf method), Jameson and Wolf, *CABIOS* 4:181, (1988), в IL-22RA ідентифікували потенціально антигенні сайти. В цьому аналізі застосовували значення параметрів за замовчуванням.

Метод Джеймсона-Вульфа передбачає потенціально антигенні детермінанти в результаті поєднання шести головних підпрограм для обчислення вірогідної структури білка. Стисло, першим для ідентифікації амінокислотних послідовностей, що представляють зони найбільшої локальної гідрофільності (параметр: сім залишків в середньому), застосовували метод Хоппа-Вудса (Hopp-Woods method), Hopp et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 78:3824 (1981). На наступному етапі аналізу застосовували метод Еміні (Emini's method), Emini et al., *J. Virology* 55:836 (1985), для обчислення поверхневих вірогідностей (параметр: поріг прийняття рішення для поверхні (0,6) = 1). Потім для обчислення гнучкості головного ланцюга (параметр: поріг гнучкості (0,2) = 1) застосовували метод Карплуса-Шульца (Karplus-Schultz method), Karplus and Schultz, *Naturwissenschaften* 72:212 (1985). На четвертому і п'ятому етапах аналізу до отриманих

даних додавали обчислення вірогідної вторинної структури, застосовуючи методи Чоу-Фасмана (Chou-Fasman method), Chou, "Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition", in *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Fasman (ed.), pages 549-586 (Plenum Press 1990), та Гарн'є-Робсона (Garnier-Robson method), Garnier et al., *J. Mol. Biol.* 120:97 (1978) (параметри Чоу-Фасмана: конформаційна таблиця = 64 білки; поріг для зони α = 103; поріг для зони β = 105; параметри Гарн'є-Робсона: константи прийняття рішень для α і β = 0). В шостій підпрограмі параметри гнучкості та фактори доступності гідрофобності/розчинника поєднували для визначення значення контура поверхні, позначеного як «антигенний індекс». І нарешті, до антигенного індексу додавали функцію розширення піків, яка розширює головні поверхневі піки, додаючи 20, 40, 60 або 80% величини відповідного піку для підрахування додаткової вільної енергії, отриманої від рухливості поверхневих ділянок відносно внутрішніх ділянок. Це обчислення, однак, є неприйнятним для будь-якого головного піку, розташованого у спіральній ділянці, оскільки спіральні ділянки мають тенденцію ставати менш гнучкими.

Результати цього аналізу показали, що наступні амінокислотні послідовності SEQ ID NO:3 забезпечили б придатні антигенні пептиди: профілі гідрофобності Хоппа-Вудса можна використовувати для визначення ділянок з найбільшим антигенним потенціалом у послідовності SEQ ID NO:3 (Hopp et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 75:3824-3828, 1981; Hopp, *J. Immun. Meth.* 88:1-18, 1986 and Triquier et al., *Protein Engineering* 77:153-169, 1998). Цей профіль базується на ковзному шести-залишковому вікні. Замасковані залишки G, S і T та відкриті залишки H, Y і W ігнорували. Більш того, антигенні епітопи IL-22RA у послідовності SEQ ID NO:3, як і передбачено графіком Джеймсона-Вульфа, наприклад, складеним за допомогою програми Protean DNASAR (DNASAR, Inc., Madison, WI), служать кращими антигенними епітопами і можуть бути обчислені фахівцями. Такі антигенні епітопи включають: (1) амінокислотні залишки 1 (Pro) - 6 (Asp) послідовності SEQ ID NO:3; (2) амінокислотні залишки 26 (Ser) - 32 (Pro) послідовності SEQ ID NO:3; (3) амінокислотні залишки 41 (Lys) - 47 (Asp) послідовності SEQ ID NO:3; (4) амінокислотні залишки 49 (Val) - 62 (Cys) послідовності SEQ ID NO:3; (5) амінокислотні залишки 41 (Lys) - 62 (Cys) послідовності SEQ ID NO:3; (6) амінокислотні залишки 84 (Ala) - 97 (Ser) послідовності SEQ ID NO:3; (7) амінокислотні залишки 103 (Thr) - 108 (Asp) послідовності SEQ ID NO:3; (8) амінокислотні залишки 130 (Arg) - 135 (His) послідовності SEQ ID NO:3; (9) амінокислотні залишки 164 (Gly) - 166 (Lys) послідовності SEQ ID NO:3; (10) амінокислотні залишки 175 (Tyr) - 179 (Glu) послідовності SEQ ID NO:3; (11) амінокислотні залишки 193 (Lys) - 196 (Ala) послідовності SEQ ID NO:3; (12) амінокислотні залишки 203 (Lys) - 209 (Thr) послідовності SEQ ID NO:3. Даний винахід розглядає застосування будь-якого з антигенних пептидів 1-12 для створення антитіл до IL-22RA або як інструмента для скринінгу або ідентифікації

запропонованих нейтралізуючих моноклональних антитіл. Даний винахід також розглядає поліпептиди, що містять принаймні один з антигенних пептидів 1-10. Даний винахід розглядає застосування будь-якого з антигенних пептидів або епітопів, описаних тут, для створення антитіл до IL-22RA, а також для скринінгу та ідентифікації нейтралізуючих моноклональних антитіл anti-IL-22RA, які можуть зв'язувати, блокувати, інгібувати, зменшувати, протидіяти або нейтралізувати активність IL-22 та IL-20 (окремо або разом).

Крім того, відповідні антигени також включають поліпептиди IL-22RA, що містять цитокінзв'язуючий або позаклітинний домен IL-22RA у поєднанні з іншим позаклітинним доменом рецепторів цитокіну класу I або II, наприклад такими, що здатні утворювати розчинні гетеродимерні або мультимерні поліпептиди IL-22RA, наприклад розчинний IL-22RA/CRF2-4, IL-22RA/zcytor11, IL-22RA/zcytor7 тощо.

Поліклональні антитіла до рекомбінантного білка IL-22RA або до IL-22RA, виділеного з природних джерел, можна синтезувати добре відомими методами. Див., наприклад, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera", in *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), pages 1-5 (Humana Press 1992), and Williams et al., "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies", in *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2nd Edition, Glover et al., (eds.), page 15 (Oxford University Press 1995). Імуногенність поліпептиду IL-22RA можна підвищити, використовуючи ад'ювант, наприклад галун (гідроксид алюмінію) або повний або неповний ад'ювант Фрейнда (Freund). Поліпептиди, корисні для імунізації, також включають злиті поліпептиди, наприклад злиття IL-22RA або його ділянки з поліпептидом імуноглобуліну або з мальтозозв'язуючим білком. Поліпептидний імуноген може бути повнорозмірною молекулою або її часткою. Якщо поліпептидна ділянка «гаптеноподібна», таку ділянку можна успішно приєднувати до макромолекулярного носія (наприклад, гемоціаніну лімфи равлика (KLH), альбуміну бичачої сироватки (BSA) або правцевою токсину) для імунізації.

Хоча поліклональні антитіла, як правило, індукуються у тваринах, наприклад конях, коровах, собаках, курчатах, щурах, мишах, кроликах, морських свинках, козах або вівцях, запропоноване антитіло anti-IL-22RA можна також синтезувати з антитіла людиноподібних мавп. Загальні методи індуквання діагностично і терапевтично корисних антитіл у бабуїнів можна знайти, наприклад, у Goldenberg et al., international patent publication No. WO 91/11465, and Losman et al., *Int. J. Cancer* 46:310 (1990).

З іншого боку, можна синтезувати моноклональні антитіла anti-IL-22RA. Моноклональні антитіла гризунів до специфічних антигенів можна отримати відомими методами (див., наприклад, Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), Coligan et al., (eds.), *Current Protocols in Immunology*, Vol. I, pages 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) ["Coligan"], Picklesley et al., *Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli** in *DNA Cloning 2:*

Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al., (eds.), page 93 (Oxford University Press 1995)).

Стисло, моноклональні антитіла можна отримати, вводючи мишам ін'єкції з композицією, що містить генний продукт IL-22RA, перевіряючи факт присутності антитіла шляхом видалення проби сироватки, видаляючи селезінку для отримання В-лімфоцитів, зливаючи ці В-лімфоцити з клітинами мієломи для утворення гібридів, клонуючи ці гібриди, відбираючи позитивні клони, які продукують антитіла до антигену, культивуючи клони, що продукують антитіла до антигену, і виділяючи ці антитіла з гібридомних культур.

Крім того, запропоноване антиіло anti-IL-22RA можна також синтезувати з моноклонального антитіла людини. Людські моноклональні антитіла отримують від трансгенних мишей, яких створили для продукування специфічних антитіл людини у відповідь на введення дозволяючої дози антигену. При цьому методи елементи локусу важкого та легкого ланцюгів людини вводять в клітинні лінії мишей, синтезовані з ембріонних стовбурових клітинних ліній, які містять направлені руйнування ендегенних локусів важкого і легкого ланцюгів. Трансгенні миші можуть синтезувати людські антитіла, специфічні до людських антигенів, і цих мишей можна використовувати для продукування антитілосекретуючих гібридом. Методи отримання людських антитіл від трансгенних мишей описані, наприклад, Green et al., *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg et al., *Nature* 368:856 (1994), and Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579 (1994).

Моноклональні антитіла можна виділяти і очищати від гібридомних культур багатьма загальноприйнятими методами. Такі методи виділення включають афінну хроматографію з білок-А-сефарозою, гель-фільтрацію та іонообмінну хроматографію (див., наприклад, Coligan на стор. 2.7.1-2.7.12 і стор. 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, pages 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)).

Для конкретних цілей може бути необхідним створення фрагментів антитіл anti-IL-22RA. Такі фрагменти антитіл можна отримати, наприклад, протеолітичним гідролізом антитіла. Фрагменти антитіл можна можна отримати в результаті пепсинового або папаїнового переварювання цілих антитіл традиційними методами. Наприклад, фрагменти антитіл можна отримати ферментативним розщепленням антитіл пепсином для отримання 5S-фрагменту, позначеного F(ab')₂. Цей фрагмент можна додатково розщепити за допомогою відновлювача тіолу для створення моновалентних фрагментів 3.5S Fab'. Необов'язково, реакцію розщеплення можна проводити за допомогою блокуючої групи для сульфгідрильних груп, які виникають в результаті розщеплення дисульфідних зв'язків. Як варіант, ферментативне розщеплення з використанням пепсину дає безпосередньо два моновалентні Fab-фрагменти і один Fc-фрагмент. Ці методи описані, наприклад, Goldenberg, US Patent No. 4,331,647, Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230 (1960), Poter, *Biochem. J.* 73:119 (1959), Edelman et al., in *Methods in Enzymology*,

Vol. 1, page 422 (Academic Press 1967), and Coligan at pages 2.8.1-2.8.10 and 2.10-2.10.4.

Можна також застосовувати інші методи розщеплення антитіл, наприклад відокремлення важких ланцюгів для утворення моновалентних фрагментів легкого-важкого ланцюга, подальше розщеплення фрагментів або інші ферментативні, хімічні або генетичні методи, доки фрагменти не зв'яжуться з антигеном, який розпізнається інтактним антитілом.

Наприклад, Fv-фрагменти включають зв'язок ланцюгів V_H і V_L. Цей зв'язок може бути нековалентним, як описано Inbar et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:2659 (1972). Як варіант, варіабельні ланцюги можна з'єднувати міжмолекулярним дисульфідним зв'язком або поперечно зв'язувати хімічними речовинами, наприклад глутаральдегідом (див., наприклад, Sandhu et al., *Crit. Rev. Biotech.* 12:137 (1992)).

Fv-фрагменти можуть включати V_H- і V_L-ланцюги, з'єднані пептидним лінкером. Ці одноланцюгові антигензв'язуючі білки (scFv) синтезують, конструюючи структурний ген, що містить ДНК-послідовності, які кодують V_H- і V_L-домени, з'єднані олігонуклеотиднуклеотидом. Цей структурний ген вставляють в експресуючий вектор, який потім вводять в клітину-хазяїн, наприклад *E. coli*. Отримані рекомбінантні клітини-хазяї синтезують один поліпептидний ланцюг з лінкерним пептидом, що утворює місток між двома згаданими V-доменами. Методи синтезу білків scFv описані, наприклад, Whitlow et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97 (1991) (див. також Bird et al., *Science* 242:432 (1988), Ladner et al., US Patent No. 4,946,778, Pack et al., *Biotechnology* 77:1271 (1993), and Sandhu, supra).

Білок scFv можна, наприклад, синтезувати, піддаючи лімфоцити дії поліпептиду IL-22RA *in vitro*, і селектувати бібліотеки відображення антитіл у фагу або аналогічних векторах (наприклад, за допомогою іммобілізованого або міченого білка або пептиду IL-22RA). Гени, що кодують поліпептиди і мають потенційні IL-22RA-поліпептидзв'язуючі домени, можна отримати скринінгом бібліотек випадкових пептидів, відображених у фагу (фаговий дисплей), або в бактеріях, наприклад *E. coli*. Нуклеотидні послідовності, що кодують поліпептиди, можна отримати багатьма способами, наприклад неспецифічним мутагенезом і випадковим синтезом полінуклеотидів. Ці бібліотеки відображення випадкових пептидів можна застосовувати для скринінгу пептидів, що взаємодіють з відомою мішенню, якою може бути білок або поліпептид, наприклад ліганд або рецептор, біологічна або синтетична макромолекула, органічні або неорганічні субстанції. Методи створення і скринінгу таких бібліотек відображення випадкових пептидів відомі (Ladner et al., US Patent No. 5,223,409, Ladner et al., US Patent No. 4,946,778, Ladner et al., US Patent No. 5,403,484, Ladner et al., US Patent No. 5,571,698, and Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins* (Academic Press, Inc. 1996)), і бібліотеки відображення випадкових пептидів, і набори для скринінгу таких бібліотек є комерційно доступними, їх можна придбати, наприклад, у ф.

«CLONTECH Laboratories, Inc.» (Palo Alto, CA), ф. «Invitrogen Inc.» (San Diego, CA), ф. «New England Biolabs, Inc.» (Beverly, MA) і ф. «Pharmacia LKB Biotechnology Inc.» (Piscataway, NJ). Для ідентифікації білків, що зв'язуються з IL-22RA, бібліотеки відображення випадкових пептидів можна скринувати за допомогою описаних тут послідовностей IL-22RA.

Іншою формою фрагмента антитіла є пептид, що кодує одну зону, яка визначає комплементарність (CDR). CDR-пептиди («мінімальні розпізнавальні одиниці») можна синтезувати, конструюючи гени, які кодують CDR-антитіла, що становлять інтерес. Такі гени створюють, наприклад, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), щоб синтезувати варіабельну зону з РНК антитіло-продукуючих клітин (див., наприклад, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106 (1991), Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al., (eds.), page 166 (Cambridge University Press 1995), and Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al., (eds.), page 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

Як варіант, антитіло anti-IL-22RA можна синтезувати з «гуманізованого» моноклонального антитіла. Гуманізовані моноклональні антитіла створюють, переносючи визначаючи комплементарність зону миши з важкого та легкого варіабельних лінцюгів імуноглобуліну миши у варіабельний домен людини. Типові залишки людських антитіл потім заміщають у каркасних зонах мишиних еквівалентів. Використання компонентів антитіл, синтезованих з гуманізованих моноклональних антитіл, усуває потенційні проблеми, пов'язані з імуногенністю мишиних константних зон. Загальні методи клонування варіабельних доменів імуноглобуліну мишей описані, наприклад, Orlandi et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:3833 (1989). Методи продукування гуманізованих моноклональних антитіл описані, наприклад, Jones et al., *Nature* 321:522 (1986), Carter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4285, Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437 (1992), Singer et al., *J. Immun.* 150:2844 (1993), Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols* (Humana Press, Inc. 1995), Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al., (eds.), pages 399-434 (John Wiley & Sons, Inc. 1996) and Queen et al., *US Patent No. 5,693,762* (1997).

Крім того, запропоновані антитіла anti-IL-22RA або фрагменти антитіл можна періпувати описаними тут відомими способами.

Поліклональні антиідіотипічні антитіла можна синтезувати, імунізуючи тварин антитілами anti-IL-22RA або фрагментами антитіл, застосовуючи стандартні методики. Див., наприклад, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera", in *Methods in Molecular Biology: Immunochemical Protocols*, Manson (ed.), pages 1-12 (Humana Press 1992). Також див. Coligan на стор. 2.4.1-2.4.7. Як варіант, моноклональні антиідіотипічні антитіла можна синтезувати, використовуючи як імуногени антитіла

anti-IL-22RA або фрагменти антитіл за методиками, описаними вище. Ще один варіант: вищеописаними методами можна синтезувати гуманізовані антиідіотипічні антитіла або антиідіотипічні антитіла людиноподібних мавп. Способи синтезу антиідіотипічних антитіл описані, наприклад, Irie, *US Patent No. 5,208,146*, Greene et al., *US Patent No. 5,637,677* and Varthakavi and Minocha, *J. Gen. Virol.* 77:1875 (1996).

Для утворення імунокон'югату anti-IL-22RA можна кон'югувати антитіло anti-IL-22RA з виявлюваною міткою. Відповідні виявлювані мітки включають, наприклад, радіоіотоп, флуоресціюючу мітку, хемілюмінесцентну мітку, ферментну мітку, біоломінесцентну мітку або колоїдне золото. Способи створення і виявлення таких мічених і виявлюваних імунокон'югатів добре відомі і детальніше описані нижче.

Виявлюваною міткою може бути радіоіотоп, який виявляють авторадіографією. Найбільш придатними для цілей даного винаходу є ізотопи: ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S та ^{14}C .

Імунокон'югати anti-IL-22RA також можна мітити флуоресціюючою сполукою. Присутність флуоресцентно-міченого антитіла визначають, піддаючи імунокон'югат дії світла відповідної довжини хвилі і виявляючи виникаючу в результаті флуоресценцію. Флуоресціюючі сполуки-мітки включають флуоресцинізотіоціанат, родамін, фікоеритрин, фікоціанін, алофікоціанін, о-фталальдегід і флуорескамін.

З іншого боку, імунокон'югати anti-IL-22RA можна мітити з можливістю виявлення, зв'язуючи компонент антитіла з хемілюмінесцентною сполукою. Присутність імунокон'югату, міченого хемілюмінесцентною сполукою, визначають, виявляючи наявність люмінесценції, яка виникає під час хімічної реакції. Приклади хемілюмінесцентних сполук міток включають люмінол, ізолюмінол, ароматичний складний ефір акридину, імідазол, сіль акридину та складний ефір оксалату.

Аналогічним чином, для мічення запропонованих імунокон'югатів anti-IL-22RA можна застосовувати біоломінесцентну сполуку. Біоломінесценція - це вид хемілюмінесценції, виявленої в біологічних системах, в яких каталітичний білок підвищує ефективність хемілюмінесцентної реакції. Присутність біоломінесцентного білка визначають за наявності люмінесценції. Біоломінесцентні сполуки, придатні для мічення, включають люциферин, люциферазу та екворин.

Як варіант, імунокон'югати anti-IL-22RA можна мітити з можливістю виявлення, зв'язуючи компонент антитіла anti-IL-22RA з ферментом. При інкубації кон'югату anti-IL-22RA-ферменту у присутності відповідного субстрату компонент ферменту реагує з субстратом і утворює компонент, який можна виявити, наприклад, спектрофотометричним або флуориметричним засобом, або візуально. Приклади ферментів, які можуть служити виявлюваними мітками для поліспецифічних імунокон'югатів, включають β -галактозидазу, глюкозооксидазу, пероксидазу та лужну фосфатазу.

Фахівцям відомі інші відповідні мітки, які можна застосовувати в даному винаході. Зв'язування

компонентів-маркерів з антитілами anti-IL-22RA можна здійснювати за відомими стандартними методиками. Відповідна типова методологія описана Kennedy et al., Clin. Chim. Acta 70:1 (1976), Schurs et al., Clin. Chim. Acta 81:1 (1977), Shih et al., Int'l J. Cancer 46:1101 (1990), Stein et al., Cancer Res. 50:1330 (1990), and Coligan, supra.

Крім того, зручність і різноманітність методів імунохімічного детектування можна підвищити, застосовуючи антитіла anti-IL-22RA, скон'юговані з авидином, стрептавідином та біотином (див., наприклад, Wilchek et al., (eds.), "Avidin-Biotin Technology", in Methods in Enzymology, Vol. 184 (Academic Press 1990), and Bayer et al., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology", in Methods in Molecular Biology, Vol. 10, Manson (ed.), pages 149-162 (The Humana Press, Inc. 1992).

Широко застосовують імуноаналізи. Див., наприклад, Cook and Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays", in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter and Ladyman (eds.), pages 180-208, (Cambridge University Press. 1995), Perry, "The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology", in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch and Lennox (eds.), pages 107-120 (Wiley-Liss, Inc. 1995), and Diamandis, Immunoassay (Academic Press, Inc. 1996).

Даний винахід також розглядає набори для проведення імунологічного діагностичного аналізу експресії гена IL-22RA. Такий набір включає принаймні один контейнер, що містить антитіло anti-IL-22RA або фрагмент антитіла. Набір може також включати другий контейнер з одним або більше реагентів, здатних вказувати на присутність антитіла anti-IL-22RA або фрагментів антитіла. До таких індикаторних реагентів відносяться виявлені мітки, наприклад радіоактивні, флуоресціюючі, хемілюмінесцентні, ферментні, біоломінесцентні мітки, колоїдне золото тощо. Набір також може містити інформацію, що антитіла IL-22RA або фрагменти антитіла застосовуються для виявлення білка IL-22RA. Наприклад, письмові інструкції можуть вказувати, що вміщене антитіло або фрагмент антитіла можна використовувати для виявлення IL-22RA. Письмовий документ може бути вкладений прямо у контейнер або в упаковку.

9. Застосування антитіл anti-IL-22RA для протидії зв'язуванню IL-22RA з IL-22, або і з IL-20, і з IL-22

До інших методик створення або селектування антитіл, придатних для даного винаходу, відносяться: *in vitro* піддання лімфоцитів дії поліпептидів розчинних рецепторів IL-22RA або їх фрагментів, наприклад антигенних епітопів, і відбір бібліотек виявлення антитіл у фагу або аналогічних векторах (наприклад, за допомогою імобілізованих або мічених поліпептидів розчинних рецепторів IL-22RA або їх фрагментів, наприклад антигенних епітопів). Гени, що кодують поліпептиди, які мають потенційні домени зв'язування, наприклад поліпептиди розчинних рецепторів IL-22RA або їх фрагменти, наприклад антигенні епі-

топи, можна отримати скринінгом бібліотек випадкових пептидів, відображених у фагу (фаговий дисплей) або у бактеріях, наприклад *E. coli*. Нуклеотидні послідовності, що кодують поліпептиди, можна отримати багатьма способами, наприклад неспецифічним мутагенезом і випадковим синтезом полінуклеотидів. Ці бібліотеки відображення випадкових пептидів можна застосовувати для скринінгу пептидів, що взаємодіють з відомою мішенню, якою може бути білок або поліпептид, наприклад ліганд або рецептор, біологічна або синтетична макромолекула, органічні або неорганічні субстанції. Методи створення і скринінгу таких бібліотек відображення випадкових пептидів відомі (Ladner et al., US Patent No. 5,223,409, Ladner et al., US Patent No. 4,946,778, Ladner et al., US Patent No. 5,403,484, Ladner et al., US Patent No. 5,571,698), і бібліотеки відображення випадкових пептидів, і набори для скринінгу таких бібліотек є комерційно доступними, їх можна придбати, наприклад, у ф. «CLONTECH Laboratories, Inc.» (Palo Alto, CA), ф. «Invitrogen Inc.» (San Diego, CA), ф. «New England Biolabs, Inc.» (Beverly, MA) і ф. «Pharmacia LKB Biotechnology Inc.» (Piscataway, NJ). Для ідентифікації білків, що зв'язуються з поліпептидами IL-22RA-вмісних рецепторів, можна скринувати бібліотеки відображення випадкових пептидів, застосовуючи поліпептиди розчинних рецепторів IL-22RA або їх фрагменти, наприклад описані тут поліпептидні послідовності антигенних епітопів. Ці «зв'язуючі поліпептиди», які взаємодіють з поліпептидами розчинних IL-22RA-вмісних рецепторів, можна застосовувати для націлювання на клітини; для виділення поліпептидів гомологів методом афінного очищення; їх можна безпосередньо або опосередковано з'єднувати з лікарськими засобами, токсинами, радіонуклідами тощо. Такі зв'язуючі поліпептиди можна також використовувати в аналітичних методах, наприклад для скринінгу експресуючих бібліотек і нейтралізації активності, наприклад для зв'язування, блокування, інгибування, зменшення, протидії або нейтралізації взаємодії між лігандом IL-22 та рецептором, або зв'язування вірусу з рецептором. Зв'язуючі поліпептиди можна також використовувати в діагностичних аналізах для визначення циркуляційних рівнів поліпептидів розчинних IL-22RA-вмісних рецепторів; для виявлення або кількісного аналізу розчинних або нерозчинних IL-22RA-вмісних рецепторів як маркерів прихованої патології або хвороби. Ці зв'язуючі поліпептиди можуть також діяти як «антагоністи» для блокування або інгибування зв'язування (наприклад, з лігандом) розчинного або мембранозв'язаного мономерного рецептора IL-22RA, або гомодимерного, гетеродимерного чи мультідимерного поліпептиду IL-22RA, і сигнальної трансдукції *in vitro* та *in vivo*. І знову, ці зв'язуючі поліпептиди діють як мономерний рецептор anti-IL-22RA або гомодимерні, гетеродимерні чи мультідимерні поліпептиди anti-IL-22RA і є ефективними для інгибування активності IL-22 або і IL-20, і IL-22, а також активності рецептора або зв'язування білка. Антитіла, що протидіють запропонованим комплексам природних рецепторів, антитіла, що зв'язують епітоп IL-22RA, та моноклональні анти-

тіла, що нейтралізують anti-IL-22RA, можуть стати кращими варіантами, оскільки вони можуть діяти більш специфічно проти IL-22RA і можуть інгібувати IL-22 або IL-20, і IL-22. Більш того, антагоністичну і зв'язуючу активність запропонованих антитіл можна перевірити при тестуванні на проліферацію IL-20 або IL-22, TRAP-аналізі сигналів, люциферазному аналізі, тестуванні на фосфопротейн або аналізі на зв'язування у присутності IL-20 або IL-22, розчинних IL-22RA-вмісних рецепторів, та інших описаних тут біологічних або біохімічних аналізах.

Антитіла до поліпептидів розчинних рецепторів IL-22RA (наприклад, антитіла до послідовності SEQ ID NO:3) або їх фрагментів, наприклад антигенних епітопів, можна застосовувати для інгібування запальних дій IL-20, IL-22 або IL-20, і IL-22 *in vivo*; для терапевтичного застосування проти запалення і таких запальних хвороб, як псоріаз, атопічний дерматит, запальні стани шкіри, ендотоксикоз, артрит, астма, запальна хвороба кишечника (ЗХК), коліт, псоріатичний артрит, ревматоїдний артрит та інші описувані тут запальні стани, викликані IL-20 або IL-22; для лічення клітин, які експресують рецептори IL-22RA; для виділення поліпептидів розчинних IL-22RA-вмісних рецепторів афінним очищенням; в діагностичних аналізах для визначення циркулюючих рівнів поліпептидів розчинних IL-22RA-вмісних рецепторів; для виявлення або кількісного аналізу розчинних IL-22RA-вмісних рецепторів як маркерів прихованої патології або хвороби; в аналітичних методах з використанням клітинного сортера з активацією флуоресценції (FACS-аналіз); для скринінгу експресуючих бібліотек; для створення антиідіотипічних антитіл, які можуть діяти як агоністи IL-22 або IL-20; і можна застосовувати як нейтралізуючі антитіла або антагоністи для зв'язування, блокування, інгібування, зменшення чи протидії функції рецептора IL-22RA, або для зв'язування, блокування, інгібування, зменшення, протидії або нейтралізації активності IL-22 та/або IL-20 (або окремо, або разом) *in vitro* та *in vivo*. Відповідні безпосередні мітки включають радіонукліди, ферменти, субстрати, кофактори, біотин, інгібітори, флуоресціюючі маркери, хемілюмінесцентні маркери, магнітні частинки тощо; опосередковані мітки можуть ідентифікувати використання пари біотин/авідин або інших пар комплемент/антикомплемента як посередників. Антитіла в даному винаході можна також безпосередньо або опосередковано з'єднувати з лікарськими засобами, токсинами, радіонуклідами тощо, і ці кон'югати застосовувати для діагностики або терапії *in vivo*. Більш того, антитіла до поліпептидів розчинних IL-22RA-вмісних рецепторів або їх фрагментів можна застосовувати *in vitro* для виявлення денатурованих або неденатурованих поліпептидів IL-22RA-вмісних рецепторів або їх фрагментів в аналізах, наприклад у вестерн-блотінгу або інших відомих аналізах.

Антитіла до розчинного рецептора IL-22RA або до поліпептидів розчинних гомодимерних, гетеродимерних або мультідимерних рецепторів IL-22RA є корисними для лічення клітин, які експресують відповідні рецептори, і для аналізування

рівнів їхньої еспресії, для афінного очищення, в діагностичних аналізах для визначення циркулюючих рівнів поліпептидів рецепторів, аналітичних методах з використанням клітинного сортування активацією флуоресценції. Крім того, двовалентні антитіла та антиідіотипічні антитіла можна застосовувати як агоністи для імітування дії ліганду IL-22RA, IL-22 або IL-20.

Антитіла в даному винаході можна також безпосередньо або опосередковано з'єднувати з лікарськими засобами, токсинами, радіонуклідами тощо, і ці кон'югати застосовувати для діагностики або терапії *in vivo*. Наприклад, антитіла або зв'язуючі поліпептиди, які розпізнають розчинний рецептор IL-22RA, або поліпептиди розчинних гомодимерних, гетеродимерних або мультідимерних рецепторів IL-22RA можна застосовувати для ідентифікації або лікування тканин або органів, які експресують відповідну антикомплементарную молекулу (тобто IL-22RA-вмісний розчинний або мембранозв'язаний рецептор). Конкретніше, антитіла до поліпептидів розчинних IL-22RA-вмісних рецепторів або їх біоактивних фрагментів або ділянок можна з'єднувати з виявлюваними або цитотоксичними молекулами і доставляти ссавцю, що має клітини, тканини або органи, які експресують IL-22RA-вмісний рецептор, наприклад карциноми, що експресують IL-22RA.

Відповідні виявлювані молекули можна безпосередньо, або опосередковано приєднувати до поліпептидів, які зв'язують поліпептиди IL-22RA-вмісних рецепторів, наприклад «зв'язуючих поліпептидів», (в тому числі описаних вище зв'язуючих пептидів) або їх біоактивних фрагментів або ділянок. Відповідні виявлювані молекули включають радіонукліди, ферменти, субстрати, кофактори, біотин, інгібітори, флуоресціюючі маркери, хемілюмінесцентні маркери, магнітні частинки тощо. Відповідні цитотоксичні молекули можна безпосередньо або опосередковано приєднувати до поліпептиду або антитіла, і вони включають бактеріальні або рослинні токсини (наприклад, токсин дифтерії, екзотоксин *Pseudomonas*, рицин, абрин тощо), а також терапевтичні радіонукліди, наприклад йод-131, реній-188 або ітрій-90 (або безпосередньо прикріплені до поліпептиду чи антитіла, або прикріплені опосередковано за допомогою, наприклад, хелатуючого компонента). Зв'язуючі поліпептиди або антитіла можна також з'єднувати з цитотоксичними лікарськими засобами, наприклад адриаміцином. При опосередкованому приєднанні виявлюваної або цитотоксичної молекули цю виявлювану або цитотоксичну молекулу можна з'єднувати з членом пари комплемент/антикомплемента, в якій член, що залишився, з'єднують з ділянкою зв'язуючого поліпептиду або антитіла. Прикладом такої пари комплемент/антикомплемента є пара біотин/стрептавідин.

В іншому варіанті злиті білки «зв'язуючий поліпептид-токсин» або злиті білки «антитіло-токсин» можна застосовувати для націленого на клітину або тканину інгібування або абляції (наприклад, для лікування ракових клітин або тканин). З іншого боку, якщо зв'язуючий поліпептид має багатофункціональні домени (тобто домен активації або лі-

гандзв'язуючий домен плюс орієнтуючий домен), для спрямування виявлюваної молекули, цитотоксичної молекули або комплементарної молекули в клітину або тканину, що становить інтерес, може бути придатний злитий білок, що містить лише згаданий орієнтуючий домен. У випадках, коли злитий білок лише з одним доменом включає комплементарну молекулу, антикомплементарну молекулу можна з'єднувати з виявлюваною або цитотоксичною молекулою. Отже, такі злиті білки «домен-комплементарна молекула» являють собою видовий орієнтуючий засіб для клітино-/тканино-специфічної доставки видових кон'югатів антикомплементарних виявлюваних/цитотоксичних молекул.

В іншому варіанті злиті білки «IL-22RA-зв'язуючий поліпептид-цитокін» або «антитіло-цитокін» можна застосовувати для підсилення *in vivo* цитолізу клітин-мішеней (наприклад, карцином селезінки, підшлункової залози, крові, лімфоїдних карцином, карцином товстої кишки та кісткового мозку), якщо злитий білок «зв'язуючий поліпептид-цитокін» або антитіло рецептора anti-IL-22RA націлити на гіперпроліферативні клітини (див. Hornik et al., Blood 89:4431-47, 1997). Описані злиті білки здатні націлювати цитокін на задане місце прикладання дії, і таким чином забезпечувати збільшену локальну концентрацію цитокіну. Відповідні мономерні, гомодимерні, гетеродимерні або мультимерні антитіла anti-IL-22RA націлюються на небажану клітину або тканину (наприклад, при пухлині або лейкозі), і ці злиті цитокіни опосередковують поліпшений лізис клітин-мішеней клітинами-ефекторами. Придатні для цього цитокіни включають інтерлейкін-2 і гранулоцито-макрофаго-колонієстимулюючий фактор (GM-CSF), наприклад.

Як варіант, описані зв'язуючі поліпептиди рецептора IL-22RA або злиті білки антитіл можна використовувати для підсилення *in vivo* цитолізу тканин-мішеней, безпосередньо стимулюючи рецептор IL-22RA-модульовану апоптичну реакцію, яка призводить до загибелі гіперпроліферативних клітин, що експресують IL-22RA-вмісні рецептори.

10. Терапевтичні застосування поліпептидів, що мають активність IL-22RA або антитіл до IL-22RA

Амінокислотні послідовності, що мають активність розчинного IL-22RA, можна використовувати для модулювання імунної системи шляхом зв'язування лігандів IL-22RA, IL-20 та IL-22 (або окремо, або разом), і таким чином запобігти зв'язуванню ліганду IL-22RA з ендегенним рецептором IL-22RA. Антагоністи IL-22RA, наприклад розчинні антитіла IL-22RA або anti-IL-22RA, також можна використовувати для модулювання імунної системи шляхом інгібування зв'язування ліганду IL-22RA з ендегенним рецептором IL-22RA. У зв'язку з цим даний винахід включає застосування білків, поліпептидів і пептидів, що мають активність IL-22RA (наприклад, розчинні поліпептиди IL-22RA, фрагментів поліпептидів IL-22RA, аналогів IL-22RA (наприклад, антиідіотипічні антитіла anti-IL-22RA) і злитих білків IL-22RA) до суб'єкта, який не має відповідної кількості цього поліпептиду або який

продукує надлишок ліганду IL-22RA. Антагоністи IL-22RA (наприклад, антитіла anti-IL-22RA) можна також застосовувати для лікування суб'єкта, який продукує надлишок або ліганду IL-22RA, або IL-22RA. Відповідні суб'єкти включають ссавців, наприклад людей. Такі поліпептиди IL-22RA та антитіла anti-IL-22RA ефективні, наприклад, для зв'язування, блокування, інгібування, зменшення, протидії або нейтралізації IL-20 та IL-22 (окремо або разом), для лікування запалення та запальних хвороб, наприклад псоріазу, atopічного дерматиту, запальних станів шкіри, псоріатичного артриту, артриту, ендотоксикозу, астми, запальної хвороби кишечника (ЗХК), коліту та інших описуваних тут запальних станів

Крім того, автори показали, що рецептор IL-22RA зв'язує ліганд, названий Фактором Індукованим Т-клітинами (IL-22) (SEQ ID NO:6; Dumoutier, L. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000; послідовність IL-22 миши описана у Dumoutier et al., J. Immunol. 164:1814-1819, 2000). До того ж, zcytor11 (IL-22RA) (пат. США № 5965704) і рецептор CRF2-4 також зв'язують IL-22 (див., міжнародну пат. заявку WO 00/24758; Dumoutier et al., J. Immunol. 164:1814-1819, 2000; Spencer, SD et al., J. Exp. Med. 187:571-578, 1998; Gibbs, VC and Pennica Gene 186:97-101, 1997 (CRF2-4 cDNA); Xie, MH et al., J. Biol. Chem. 275:31335-31339, 2000; and Kotenko, SV et al., J. Biol. Chem. 276:2725-2732, 2001). Крім того, як рецептор для IL-22 можна залучати рецептор IL-10 β , його вважають аналогічним CRF2-4 (Dumoutier, L. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000; Liu Y et al., J. Immunol. 152:1821-1829, 1994 (IL-10R cDNA)). Більш того, автори показали, що рецептор IL-22RA зв'язує ліганд, названий IL-20 (SEQ ID NO:8; міжнародна пат. заявка WO 99/27103). У кращих варіантах форма розчинного рецептора IL-22RA (SEQ ID NO:3) являє собою мономер, гомодимер, гетеродимер або мультимер, який зв'язує, блокує, інгібує, зменшує, протидіє або нейтралізує IL-22 та IL-20 *in vivo*. Антитіла і зв'язуючі поліпептиди до такого мономера, гомодимеру, гетеродимеру або мультимеру IL-22RA також служать антагоністами активності IL-22RA і антагоністами IL-20 та IL-22 (окремо або разом).

Крім того, в даному описі тестами на нейтралізацію в клітинах продемонстровано, що і поліклональні, і моноклональні нейтралізуючі антитіла anti-IL22 зв'язують, блокують, інгібують, зменшують, протидіють або нейтралізують активність IL-22 та IL-20.

Виявили, що IL-22 індукується у присутності IL-9, і вважають, що він бере участь у промотуванні імунних реакцій типу Th1 та запаленні. IL-9 стимулює проліферацію, активацію, диференціацію та/або індукцію імунної функції багатьма шляхами та відіграє певну роль в астмі, мастоцитозі легенів та інших хворобах, а також активує шляхи переносчиків сигналу та активаторів транскрипції. Функція антагоністів IL-22 або IL-9 може бути корисною при лікуванні згаданих хвороб людини. Даний винахід пропонує такі нові антагоністи IL-22.

Виявили, що IL-22 бере участь у підвищеній регуляції продукування реагентів гострої фази,

наприклад сироваткового амілоїду А (SAA), α 1-антихімотрипсину та гаптоглобіну, і що експресія IL-22 збільшується при ін'єкційному введенні ліпополісахариду (LPS) *in vivo*, що дає можливість припустити, що IL-22 бере участь у запальній реакції (Dumoutier, L. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000). Продукування білків гострої фази, наприклад SAA, розглядають як короткотривалий механізм виживання, коли запалення є вигідним; однак підтримання білків гострої фази упродовж більших періодів сприяє хронічному запаленню і може бути шкідливим для здоров'я людини. Див., наприклад, Uhlar, CM and Whitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265:501-523, 1999, and Baumann H. and Gauldie, J. Immunology Today 15:74-80, 1994. Крім того, гадають, що білок гострої фази SAA бере участь у патогенезі кількох хронічних запальних хвороб, в атеросклерозі та ревматоїдному артриті, і є попередником білка амілоїду А, що відкладається при амілоїдозі (Uhlar, CM and Whitehead, AS, supra). Отже, IL-22 діє як прозапальна молекула і викликає продукування SAA, і антагоністи були б корисними при лікуванні запальної хвороби та інших хвороб, асоційованих з реакцією на білки гострої фази, індуковані IL-22. Даний винахід пропонує такі антагоністи. Наприклад, спосіб зменшення запалення, викликаного IL-22 або IL-9, передбачає введення ссавцю із запаленням певної кількості композиції розчинного IL-22RA-вмісного рецептора, достатньої для зменшення запалення. Крім того, спосіб пригнічення запальної реакції у ссавців із запаленням може включати: 1) визначення рівня білка сироваткового амілоїду А; 2) введення композиції, що містить поліпептид розчинного рецептора IL-22RA цитокіну у прийнятному фармацевтичному носії; 3) визначення рівня білка сироваткового амілоїду А після введення; 4) порівняння рівня білка сироваткового амілоїду А на етапі «1» з рівнем білка сироваткового амілоїду А на етапі «3», при цьому відсутність збільшення або зменшення рівня білка сироваткового амілоїду А є показником пригнічення запальної реакції. Описані тут експериментальні дані показують, що антагоністи IL-22, наприклад розчинні рецептори та антитіла, безумовно зменшують рівні SAA в *in vivo*-моделях запальних хвороб, показуючи, що зв'язування, блокування, інгібування, зменшення, протидія або нейтралізація IL-22 дає протизапальний ефект.

Дані свідчать, що IL-20 та його рецептори відіграють певну роль у псоріазі. Ця мультигенна хвороба шкіри характеризується проліферацією кератиноцитів, диференціацією змінених кератиноцитів та інфільтрацією імунікомпетентних клітин в шкіру. Перша група доказів щодо ролі IL-20 у псоріазі полягає у тому, що спостережуваний гіперкератоз і стовщений епідерміс у трансгенних мишей нагадують псоріатичні відхилення у людини. Зменшена кількість тонофіламентів, що, як вважають, пов'язане з дефектною кератинізацією, є наочною ознакою псоріазу людини. Інтрамітохондріальні вкочення були виявлені і в хімічно викликаному, і у природно виникаючому гіперпластичному стані шкіри у мишей. Причина цих вкочень та їхній вплив на мітохондріальну функцію, якщо такі є,

невідомі. IL-20 трансгенні миші виявляють багато характерних ознак, спостережуваних при псоріазі людини.

Крім того, мРНК рецептора IL-20 (а також мРНК і IL-20RA, і IL-20RB) значно активовані у псоріатичній шкірі людини порівняно із здоровою шкірою, що також говорить про роль IL-20 у псоріазі. Обидві субодиниці рецептора IL-20 експресуються в кератиноцитах у всьому епідермісі і також експресуються в субпопуляції імунікомпетентних і ендотеліальних клітин. Припускають, що підвищена експресія активованого рецептора IL-20 може змінювати взаємодії між ендотеліальними клітинами, імунікомпетентними клітинами та кератиноцитами, що приводить до дисрегуляції проліферації та диференціації кератиноцитів. До того ж, описані тут дані щодо нокаутних мишей, у яких рецептор IL-22RA генно нокаутований, показують, що IL-22RA був необхідний для IL-20-індукованих запальних процесів у шкірі трансгенних тварин. Ці результати доводять, що ефективне блокування активності IL-22RA, наприклад шляхом генного нокаута IL-22RA або аналогічним чином за допомогою запропонованого нейтралізуючого антитіла до IL-22RA, аналогічним чином зменшувало б викликаний IL-20 вплив на шкіру, а також викликаний IL-22 вплив на шкіру, наприклад при псоріазі, ЗХК, коліті та інших запальних хворобах, викликаних IL-20 та/або IL-22, в тому числі ЗХК, артриті, астмі, псоріатичному артриті, коліті, запальних станах шкіри та atopічному дерматиті.

Крім того, IL-20 стимулює сигнальну трансдукцію у кератиноцитній клітинній лінії HaCaT людини, що підтримує пряму дію цього нового ліганду у шкірі. До того ж, білки IL-1 β , EGF і TNF- α , про які відомо, що вони є активними у кератиноцитах і беруть участь у проліферативних і прозапальних сигналах у шкірі, підсилюють реакцію на IL-20. І в HaCaT-клітинах, і в ВНК-клітинах, що експресують рецептор IL-20, IL-20 передає сигнал через переносчиків сигналу та активатори транскрипції (STAT3).

Як вже зазначалось, IL-20 залучений до патології псоріазу. Даний винахід, пропонує, зокрема, спосіб лікування псоріазу шляхом уведення агентів, що зв'язують, блокують, інгібують, зменшують, протидіють або нейтралізують IL-20. Антагоністами до IL-20 можуть бути або розчинний рецептор, який зв'язується з IL-20, наприклад розчинний IL-22RA, або антитіла, одноланцюгові антитіла або фрагменти антитіл, які зв'язуються або з IL-20, або з рецептором IL-20, наприклад антитіла anti-IL-22RA. Ці антагоністи будуть, таким чином, запобігати активації рецептора IL-20. Крім того, оскільки IL-20 та IL-22 мають спільний рецептор IL-22RA, антагоністи, наприклад розчинний IL-22RA, або антитіла, одноланцюгові антитіла або фрагменти антитіл, які зв'язуються з рецептором IL-22RA, можна використовувати одночасно для зв'язування, блокування, інгібування, зменшення, протидії або нейтралізації активності IL-22, або і IL-20, і IL-22.

Псоріаз є одним з найбільш розповсюджених дерматологічних захворювань, на яке страждає 1-2% населення світу. Це хронічно запалений стан

шкіри, який характеризується еритематозними, чітко видимими папулами або бляшками округлої форми, покритими сріблясто-слюдоподібними лусочками. Псоріатичні осередки шкіри періодично сверблять. Осередки псоріазу часто розвиваються на травмованих ділянках. Крім того, псоріаз часто загострюють інші зовнішні фактори, в тому числі інфекції, стрес і лікувальні засоби, наприклад літій, бета-блокатори та антималярійні засоби.

Найпоширенішою формою псоріазу є бляшковий псоріаз. Хворі на бляшковий псоріаз мають стабільні, повільно зростаючі бляшки, які залишаються практично незмінними протягом тривалих періодів часу. Найчастіше псоріатичні бляшки з'являються на ліктях, колінах, сідничній щілині та волосній частині шкіри голови. Ураження, як правило, є симетричними. Зворотний псоріаз уражає поперлі ділянки, в тому числі пахову ямку, пахову область, зону під грудьми та пупок, а також часто уражає волосяну частину шкіри голови, долоні та підшви стоп. Окремі осередки являють собою чітко окреслені бляшки, які можуть бути вологими, що обумовлено їхнім місцерозташуванням. Бляшковий псоріаз зазвичай розвивається повільно і довго не гоїться. Зрідка він спонтанно слабшає.

Висипний псоріаз (білоплямистий псоріаз) найчастіше буває у дітей і молодих дорослих. Він розвивається гостро у людей, що не мають псоріазу, або у хворих на хронічний бляшковий псоріаз. Пацієнти мають багато маленьких еритематозних, лускатих папул, часто після інфекції верхніх дихальних шляхів, викликані бета-гемолітичними стрептококами. У хворих на псоріаз часто розвиваються пустульозні осередки. Вони можуть локалізуватися на долонях та підшвах стоп або можуть виникати і асоціюватися з лихоманкою, дискомфортом, діареєю або болем у суглобах.

Приблизно половина всіх хворих на псоріаз має ураження, що проявляється у вигляді точкових заглибин, потовщення нігтів або піднігтьового гіперкератозу. Приблизно 5-10% хворих на псоріаз мають асоційовані скарги на суглоби, і найчастіше це пацієнти з ураженням нігтів пальців рук. Хоча деякі пацієнти мають відповідну наявність класичного ревматоїдного артриту, деякі - хворобу суглобів, яка входить в один з п'яти типів, пов'язаних з псоріазом: 1) хвороба, обмежена одним або кількома маленькими суглобами (70% випадків); 2) серонегативна хвороба, що нагадує ревматоїдний артрит; 3) ураження дистальних міжфалангових суглобів; 4) тяжкий деструктивний артрит з розвитком «arthritis mutilans»; і 5) хвороба, обмежена хребтом.

Псоріаз можна лікувати введенням агентів, що зв'язують, блокують, інгібують, зменшують, протидіють або нейтралізують IL-22, IL-20, або їх обох. Кращими антагоністами є або розчинний рецептор до IL-20 та IL-22, наприклад IL-22RA (SEQ ID NO:3), або антитіла, фрагменти антитіл або одноланцюгові антитіла, які зв'язуються з рецептором IL-22RA, наприклад запропоновані нейтралізуючі антитіла. Такі антагоністи можна вводити окремо або в комбінації з іншими перевіреними терапевтичними засобами, наприклад змащувальними речовинами, кератолітичними агентами, топічними

кортикостероїдами, топічними дериватами вітаміну D, антраліном, системними антиметаболітами, наприклад метотрексатом, у терапії псораленом-ультрафіолетовим світлом, етретинатом, ізотретиноїном, циклоспорином і топічним кальципотріолом-похідним вітаміну D3. Крім того, такі антагоністи можна вводити пацієнту підшкірно, внутрішньовенно або трансдермально, використовуючи крем або трансдермальний пластр, що містить згаданий антагоніст. При підшкірному введенні антагоніст можна впорскувати в одну або більше псоріатичних бляшок. При трансдермальному введенні антагоністи можна наносити безпосередньо на бляшки за допомогою крема, мазі, бальзаму або розчину, що містить антагоніст.

Антагоністи до IL-20 або IL-22 можна вводити пацієнту з астмою, бронхітом, кістозним фіброзом або іншою запальною хворобою легенів з метою лікування цих хвороб. Антагоністи можна вводити будь-яким відповідним методом, в тому числі внутрішньовенно, підшкірно, бронхіальним лаважем, і використовуючи лікарський засіб для інгаляції, що містить антагоніст.

Аналіз розподілу в тканинах мРНК, що відповідає кДНК IL-22RA, виявив найвищий рівень мРНК у плаценті та селезінці, і припускають, що ліганд (IL-22), з яким зв'язується IL-22RA, бере участь у викликанні запальної реакції, в тому числі у викликанні гострофазної реакції (Dumoutier, L. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000). Отже, конкретні варіанти даного винаходу спрямовані на використання розчинних IL-22RA та антитіл anti-IL-22RA як антагоністів при лікуванні запальних та імунопатологічних хвороб або таких станів, як псоріаз, псоріатичний артрит, atopічний дерматит, запальні стани шкіри, ревматоїдний артрит, запальна хвороба кишечника (ЗХК), хвороба Крона, дивертикулез, астма, панкреатит, діабет типу I, панкреатичний рак, дифузний токсичний зоб, рак товстої та тонкої кишок, аутоімунна хвороба, сепсис, трансплантація органа або кісткового мозку; запалення, обумовлене ендотоксикозом, травмою, хірургічною операцією або інфекцією; амілоїдоз; спленомегалія; реакція «трансплантат проти хазяїна»; і у тих випадках, коли необхідне інгібування запалення, імуносупресія, зменшення проліферації кровотворних, запальних або лімфоїдних клітин, макрофагів, Т-клітин (в тому числі клітин Th1 і Th2), супресія імунної реакції на патоген або антиген, або в інших випадках, де необхідне інгібування цитокінів IL-22 або IL-20.

Крім того, антитіла або зв'язуючі поліпептиди, наприклад розчинні рецептори, що зв'язують описані тут поліпептиди IL-22RA, і власне поліпептиди IL-22RA є ефективними для:

1) Блокування, інгібування, зменшення, протидії або нейтралізації сигналіну за допомогою рецепторів IL-20 або IL-22 при лікуванні гострого запалення, запалення в результаті травми, ушкодження тканини, хірургічної операції, сепсису або інфекції, і хронічних запальних хвороб, наприклад астми, запальної хвороби кишечника (ЗХК), хронічного коліту, збільшення селезінки, ревматоїдного артриту, рецидивуючих періодів гострого запалення (наприклад, туберкульозу), і при ліку-

ванні амілоїдозу, атеросклерозу, хвороби Кастлемана, астми та інших хвороб, пов'язаних з індукцією гострофазної реакції.

2) Блокування, інгібування, зменшення, протидії або нейтралізації сигналіну за допомогою рецепторів IL-20 або IL-22 при лікуванні аутоімунних хвороб, наприклад діабету I типу, множинного склерозу, системного червоного вовчака, міастенії *gravis*, ревматоїдного артриту та ЗХК для запобігання або інгібування активації в імунокомпетентних клітинах (наприклад, лімфоцитах, моноцитах, лейкоцитах) за допомогою IL-22RA (Hughes C et al., *J. Immunol* 153:3319-3325, 1994). Альтернативні антитіла, наприклад моноклональні антитіла (MAb) до IL-22RA-вмісних рецепторів, також можна використовувати як антагоністи для знищення небажаних імунокомпетентних клітин і лікування аутоімунної хвороби. Астму, алергію та інші atopічні хвороби можна лікувати запропонованим антитілом MAb проти, наприклад, рецепторами розчинного IL-22RA, для інгібування імунної реакції або знищення клітин, що викликають специфічну алергічну реакцію. Блокування, інгібування, зменшення або протидіяння сигналіну за допомогою IL-22RA, з використанням запропонованих розчинних рецепторів, поліпептидів та антитіл, може також принести користь при лікуванні хвороб підшлункової залози, нирок, пітuitarних і нервових клітин. Це може також сприяти лікуванню діабету I типу, діабету II типу, панкреатиту і панкреатичної карциноми. IL-22RA може служити мішенню для MAb-терапії раку, де протидіює MAb інгібує розвиток раку і націлює імуноопосередкований цитоліз (Holliger P, and Hoogenboom, H: *Nature Biotech.* 16:1015-1016, 1998). Антитіла MAb до розчинного IL-22RA також можуть бути корисними для лікування нефропатій, наприклад гломерулосклерозу, мембранної невропатії, амілоїдозу (який також діє на нирки крім інших тканин), ренального атеросклерозу, гломерулонефриту різних походжень, фібропроліферативних хвороб нирок, а також дисфункції нирок, пов'язаної з системним червоним вовчаком, діабетом I типу, діабетом II типу, ренальними пухлинами та іншими хворобами.

3) Агонювання, підсилення або ініціації сигналіну за допомогою рецепторів IL-20 або IL-22 при лікуванні аутоімунних хвороб, наприклад діабету I типу, множинного склерозу, системного червоного вовчака, міастенії *gravis*, ревматоїдного артриту та ЗХК. Anti-IL-22RA-нейтралізуючі антитіла і моноклональні антитіла можуть сигналізувати лімфоцитам або іншим імунокомпетентним клітинам диференціюватися, змінити проліферацію або змінити продукування цитокінів або білків клітинної поверхні, які сприяють аутоімунності. Конкретніше, модуляція реакції клітини Т-хелпера на альтернативний характер секреції цитокіну може змінити напрямок аутоімунної реакції та поліпшити стан при хворобах (Smith JA et al., *J. Immunol.* 160:4841-4849, 1998). Аналогічним чином, агоністичні нерозчинні IL-22RA, нерозчинні гетеродимери IL-22RA/CRF2-4 і мультимерні моноклональні антитіла можна застосовувати для сигналіну, щоб знищити і вивести імунокомпетентні клітини, що викликають астму, алергію і atopічну хворобу. Сигналінг за допомо-

гою IL-22RA може також сприяти лікуванню хвороб надшлункової залози, нирок, пітuitarних і нервових клітин. Це допоможе при лікуванні діабету I типу, діабету II типу, панкреатиту і панкреатичної карциноми. IL-22RA може служити мішенню для MAb-терапії панкреатитного раку, де сигналізує MAb інгібує розвиток раку і націлює імуноопосередкований цитоліз (Tutt, AL et al., *J. Immunol.* 161:3175-3185, 1998). Аналогічним чином можна лікувати ренальну клітинну карциному моноклональними антитілами до запропонованих розчинних рецепторів, що містять IL-22RA.

Описані тут розчинні поліпептиди IL-22RA можна застосовувати для зв'язування, блокування, інгібування, зменшення, протидії або нейтралізації активності IL-22 або IL-20, при лікуванні аутоімунної хвороби, atopічної хвороби, діабету II типу, панкреатиту та дисфункції нирок. Розчинну форму IL-22RA можна використовувати для промотування реакції антитіла, опосередкованої Th-клітинами, та/або для промотування продукування IL-4 або інших цитокінів лімфоцитами або іншими імунокомпетентними клітинами.

Запропоновані розчинні IL-22RA-вмісні рецептори ефективні як антагоністи цитокіну IL-20 або IL-22. Антагоністичних ефектів можна досягти безпосередньою нейтралізацією або зв'язуванням IL-20 або IL-22. Крім антагоністичної дії запропоновані розчинні рецептори можуть зв'язувати IL-22 і діяти як транспортні білки для цитокіну IL-20 або IL-22, щоб транспортувати цей ліганд в різні тканини, органи і клітини в організмі. Фактично, запропоновані розчинні рецептори можна зливати або з'єднувати з молекулами, поліпептидами або хімічними компонентами, які спрямовують комплекс «розчинний рецептор-ліганд» в конкретне місце, наприклад тканину, конкретну імунокомпетентну клітину або пухлину. Наприклад, при гострій інфекції або деяких видах раку корисною може стати індукція запалення і білків локальної гострофазної реакції в результаті дії IL-22. Отже, запропоновані розчинні рецептори можна використовувати для конкретного спрямування дії IL-20 або IL-22. Див. Cosman, D. *Cytokine* 5:95-106, 1993; and Fernandez-Botran, R. *Exp. Opin. Inves. Drugs* 9:497-513, 2000.

Крім того, запропоновані розчинні рецептори можна застосовувати для стабілізації IL-22 або IL-20, для збільшення біодоступності, терапевтичної довговічності та/або ефективності цього ліганду шляхом надання йому стійкості до деградації або кліренсу, або націлюючи цей ліганд у місце прикладання дії в організмі. Наприклад, комплекс IL-6/розчинний IL-6R, що зустрічається у природі, стабілізує IL-6 і може передавати сигнал через рецептор gp130. Див., Cosman, D. *ibid supra*, and Fernandez-Botran, R., *supra*. Більш того, IL-22RA можна поєднувати з когнатним лігандом, наприклад IL-22, для утворення комплексу ліганд-розчинний рецептор. Такі комплекси можна застосовувати для стимуляції реакції від клітин, що представляють субодиницю рецептора-компаньона, наприклад pDIRS1 (IL-20RB) або CRF2-4 (IL-10RB). Клітинна специфічність комплексу IL-22RA-ліганд може відрізнятися від специфі-

ності, яку спостерігають при введенні тільки ліганду. До того ж, ці комплекси можуть мати різні фармакокінетичні властивості, наприклад вплив на час півжиття, співвідношення доза/реакція або органо- або тканеспецифічність. Комплекси IL-22RA/IL-22 або IL-22RA/IL-20, таким чином, можуть мати агоністичну активність для підсилення імунної реакції або стимуляції мезангіальних клітин, або стимуляції гепатоклітин. З іншого боку, тільки тканини, що експресують сигналізуючу субодиницю і гетеродимеризуються зі згаданим комплексом, можуть змінюватись відповідно реакції на комплекси IL6/IL6R (Hirota H. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 92:4862-4866, 1995; Hirano, T. and Thomason, A. (Ed.) "The Cytokine Handbook", 3rd Ed., p. 208-209). Розчинні комплекси рецептор-цитокін виявляють аналогічну активність для IL-12 та CNTF.

Більш того, запалення є захисною реакцією організму від інвазивного агента. Запалення - це каскадний акт, в якому беруть участь багато клітинних і гуморальних медіаторів. З одного боку, супресія запальних реакцій може залишити хазяїна з імунною недостатністю; однак, якщо цьому не протистояти, запалення може призвести до серйозних ускладнень, в тому числі хронічних запальних хвороб (наприклад, псоріазу, артриту, ревматоїдного артриту, множинного склерозу, запальній хворобі кишечника тощо), септичного шоку і поліорганної недостатності. Важливо, що ці різні хворобливі стани мають спільні медіатори запалення. Всі хвороби, що характеризуються запаленням, дуже впливають на захворюваність і смертність людей. Тому очевидно, що протизапальні білки, наприклад IL-22RA, і антитіла anti-IL-22RA могли б дати критичний терапевтичний потенціал для ряду хвороб людей і тварин, від астми і алергії до аутоімунної хвороби і септичного шоку.

1. Артрит

Артрит, в тому числі остеоартрит, ревматоїдний артрит, артрит суглобів в результаті ураження тощо, є загальновідомими запальними станами, для лікування яких корисним буде терапевтичне застосування протизапальних білків, наприклад запропонованих розчинних поліпептидів IL-22RA. Наприклад, ревматоїдний артрит (РА) є системним захворюванням, яке впливає на весь організм і є однією з найпоширеніших форм артриту. Воно характеризується запаленням мембрани, яка вистілає суглоб, що викликає біль, тугорухливість, печіння, почервоніння і опухання. Запальні клітини вивільняють ферменти, які можуть переварювати кістку і хрящ. В результаті ревматоїдного артриту запалена вистілка суглоба, синовіальна мембрана, може проникати в кістку і хрящ і руйнувати їх, що призводить до пошкодження суглоба і гострого болю крім інших фізіологічних ефектів. Уражений суглоб може втратити свою форму і положення, що призводить до болю і втрати рухливості.

Ревматоїдний артрит (РА) є імуноопосередкованою хворобою, що, зокрема, характеризується запаленням і наступним пошкодженням тканин, що призводить до тяжкої форми інвалідності та збільшує ризик смерті. В ревматоїдних суглобах локально продукується ряд цитокінів. Численні дослідження показали, що у механізмах

синовіального запалення і у прогресуючому руйнуванні суглобів важливу роль відіграють два прототипічні прозапальні цитокіни, IL-1 та TNF-альфа. Дійсно, введення пацієнтам з РА інгібіторів TNF-альфа та IL-1 привело до вражаючого поліпшення клінічних і біологічних ознак запалення і зменшенню радіологічних ознак ерозії кістки і руйнування хряща. Однак попри обнадійливі результати значний відсоток пацієнтів не відреагував на ці агенти, що дає можливість припустити, що у патофізіології артриту залучені також інші медіатори (Gabay, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2(2):135-149, 2002). Одним з тих медіаторів міг бути IL-20 або IL-22, а якщо це так, то молекулою, що зв'язує або інгібує активність IL-22 або IL-20, наприклад поліпептиди IL-22RA або антитіла anti-IL-22RA чи партнери зв'язування, могли б служити цінним терапевтичним засобом для зменшення запалення при ревматоїдному артриті та інших артритних хворобах.

Існує декілька відомих експериментальних моделей (на тваринах) ревматоїдного артриту. Наприклад, у моделі колаген-індукованого артриту (KIA) у мишей розвивався хронічний запальний артрит, який дуже нагадував ревматоїдний артрит людини. Оскільки KIA має аналогічні імунологічні та патологічні ознаки з РА, це робить його ідеальною моделлю для скринінгу потенційних протизапальних сполук для людини. KIA-модель є добре відомою моделлю на мишах, виникнення якої залежить і від імунної реакції, і від запальної реакції. Імунна реакція являє собою взаємодію В-клітин і CD4⁺ Т-клітин у відповідь на колаген, який дають як антиген, і веде до продукування антитіл проти колагену. Запальна фаза є результатом реакцій тканин на медіатори запалення, внаслідок перехресної реакції деяких з цих антитіл на нативний колаген миши і шлях активації комплементу. Перевага використання KIA-моделі полягає в тому, що відомі головні механізми патогенезу. Відповідні епітопи Т-клітин і В-клітин протидентифікували на колагені типу II і визначили різні імунологічні (наприклад, гіперчутливість уповільненого типу і антитіло проти колагену) і запальні (наприклад, цитокіни, хеміцитокіни і розкладаючі матрицю ферменти) параметри, що відносяться до імуноопосередкованого артриту, які, таким чином, можна застосовувати в аналізі ефективності сполук в KIA-моделі (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3:407-20, 1999; Williams et al., *Immunol.* 89:9784-788, 1992; Myers et al., *Life Sci.* 61:1861-78, 1997; and Wang et al., *Immunol.* 92:8955-959, 1995).

Введення в KIA-моделі мишей розчинних IL-22RA2-вмісних поліпептидів (zcyto16), наприклад zcytor16-Fc4 або інших розчинних і злитих білків IL-22RA2, використовують для оцінки застосування розчинного IL-22RA2 як антагоніста IL-22, використаного для поліпшення симптомів і зміни динаміки хвороби. Крім того, результати, що показують інгібування IL-22 запропонованим розчинним IL-22RA2 довели б концепцію, що і інші антагоністи IL-22, наприклад IL-22RA або антитіла до нього, можна також застосовувати для поліпшення симптомів і зміни динаміки хвороби. Оскільки ліганд IL-22RA2,11-22, викликає продукування SAA, що бере участь у патогенезі ревматоїдного артриту, а IL-

22RA2 показав себе здатним інгібувати активність IL-22 та SAA *in vitro* та *in vivo*, системне або локальне введення IL-22RA2-вмісних поліпептидів, наприклад zcytor16-Fc4 або інших розчинних рецепторів IL-22 (наприклад, IL-22RA; SEQ ID NO:3) і антитіл anti-IL-22RA, а також злитих білків може потенційно пригнічувати запальну реакцію при РА. Як необмежувачий приклад, ін'єкція 10-100 мкг розчинного zcytor16-Fc одній миші (тричі на тиждень протягом 4 тижнів) може значно зменшити шкалу оцінки хвороби (оцінка в балах захворювання лап, число випадків запалення або хвороби). Інші потенційні терапевтичні засоби включають поліпептиди IL-22RA, антитіла anti-IL-22RA, антитіла anti-IL-22 або партнери зв'язування тощо.

Одна група показала, що антитіло IL-22 проти миши може зменшити симптоми в мишиній K1A-моделі порівняно з контрольними мишами, концептуально показуючи тим самим, що розчинні поліпептиди IL-22RA та нейтралізуючі антитіла до IL-22RA можуть бути корисними при лікуванні людської хвороби. Введення одного моноклонального антитіла (P3/1) щура, специфічного до мишиного IL-22, зменшувало симптоми артриту у тварин, яким робили ін'єкцію профілактично або після K1A-викликаного артриту в згаданій моделі (WO 02/068476, опублікована 9 вересня 2002 р.). Тому, запропоновані розчинні поліпептиди IL-22RA та антитіла anti-IL-22RA, в то му числі запропоновані нейтралізуючі антитіла проти людського IL-22RA, можна застосовувати для нейтралізації IL-22 та IL-20 при лікуванні таких специфічних людських хвороб, як псоріаз, псоріатичний артрит, артрит, ендотоксикоз, ЗХК, коліт та інші описані тут запальні стани.

2. Ендотоксикоз

Ендотоксикоз - це тяжкий стан, як правило, викликаний інфекційними агентами, наприклад бактеріями та іншими інфекційними патогенними факторами, сепсисом, токсичним шоком, або у пацієнтів з імунною недостатністю, які зазнали опортуністичних інфекцій, тощо. Запропоновані терапевтично корисні протизапальні білки, наприклад поліпептиди IL-22RA і антитіла до них, могли б допомогти у запобіганні та лікуванні ендотоксикозу у людей і тварин. Поліпептиди IL-22RA, антитіла anti-IL-22RA, антитіла anti-IL-22 або партнери зв'язування могли б стати цінним терапевтичним засобом для зменшення запалення і патологічних ефектів при ендотоксикозі.

В ендотоксикозі, викликаному ліпополісахаридами (ЛПС), бере участь велика кількість прозапальних медіаторів, що дають патологічні ефекти інфекційних хвороб, тому ЛПС-індукований ендотоксикоз у гризунів широко застосовують як прийнятну модель для дослідження фармакологічних ефектів потенційних прозапальних або імуномодуючих агентів. ЛПС, утворені в грамотригативних бактеріях, є головним збудником хвороби при патогенезі септичного шоку (Glauser et al., *Lancet* 338:732, 1991). Фактично, шоківий стан можна викликати експериментально однією ін'єкцією ЛПС тваринам. Молекули, продуковані клітинами, реагуючими на ЛПС, можуть націлювати патогени безпосередньо або опосередковано. Хоча ці біо-

логічні реакції захищають хазяїна від інвазивних патогенів, вони також можуть заподіяти шкоду. Отже, загальна стимуляція природного імунітету, що є результатом тяжкої інфекції, викликаній грамотригативними бактеріями, призводить до надлишкового продукування цитокінів та інших молекул і розвитку фатального синдрому, септичного шоку, який характеризується лихоманкою, гіпотензією, дисемінованою внутрішньосудинною коагуляцією і поліорганною недостатністю (Dumitru et al., *Cell* 103:1071-1083, 2000).

Ці токсичні ефекти ЛПС здебільшого пов'язані з активацією макрофага, що призводить до вивільнення багатьох медіаторів запалення. Серед цих медіаторів вирішальну роль відіграє TNF, на що вказує попередження ЛПС-токсичності в результаті введення нейтралізуючих антитіл проти TNF (Beutler et al., *Science* 229:869, 1985). Точно встановлено, що ін'єкція 1 мкг ЛПС *E. coli* миші C57B1/6 призведе до значного збільшення циркулюючого IL-6, TNF-альфа і білків гострої фази (наприклад, SAA) приблизно через 2 години після ін'єкції. Виявляється, що токсичність ЛПС опосередковується цими цитокінами, оскільки пасивна імунізація проти цих медіаторів може зменшити ризик смерті (Beutler et al., *Science* 229:869, 1985). Потенційні імунологічні заходи для профілактики та/або лікування септичного шоку включають застосування anti-TNF mAb, антагоніста рецептора IL-1, LIF, IL-10 та G-CSF.

Введення в згадані ЛПС-моделі розчинних IL-22RA2-вмісних поліпептидів, наприклад Zcytor16-Fc4 або інших розчинних і злитих білків IL-22RA можна використовувати для оцінки застосування IL-22RA2 для поліпшення симптомів та зміни динаміки хвороби, викликані ЛПС. Крім того, результати, що показують інгібування IL-22 в результаті застосування IL-22RA2, служать доказом концепції, що й інші антагоністи IL-22, наприклад, розчинний IL-22RA або антитіла до нього, можна також застосовувати для поліпшення симптомів у ЛПС-індукованій моделі та зміни динаміки хвороби. Ця модель показує індукцію IL-22 в результаті ін'єкції і можливе лікування хвороби поліпептидами IL-22RA2. Оскільки ЛПС викликає продукування IL-22, SAA або інших прозапальних факторів, які, можливо, беруть участь у патології ендотоксикозу, то для зменшення симптомів ендотоксикозу, наприклад спостережуваних при ендотоксичному шоку, можна здійснювати нейтралізацію активності IL-22, SAA або інших прозапальних факторів за допомогою антагоністичного поліпептиду IL-22RA2. Інші можливі терапевтичні засоби включають поліпептиди IL-22RA, антитіла anti-IL-22RA, антитіла anti-IL-22 або партнерів зв'язування тощо.

3. Запальна хвороба кишечника (ЗХК)

У Сполучених Штатах приблизно 500000 людей страждають від запальної хвороби кишечника (ЗХК), яка може уражати або товсту кишку, або пряму кишку (виразковий коліт), або обидві, тонкий і товстий кишечник (хвороба Крона). Патогенез цих хвороб невизначений, але вони включають хронічне запалення уражених тканин. Поліпептиди IL-22RA, антитіла anti-IL-22RA, антитіла anti-IL-22 або партнери зв'язування могли б стати цінним тера-

пептичним засобом для зменшення запалення та патологічних ефектів при ЗХК та споріднених хворобах.

Виразковий коліт (ВК) - це запальна хвороба товстого кишечника, який частіше називають товстою кишкою, що характеризується запаленням і виразкою слизової оболонки або внутрішньої вистілки товстої кишки. Це запалення змушує товсту кишку часто спорожнюватись, що обумовлює діарею. Симптоми включають рідке випорожнення і пов'язану з цим абдомінальну судому, лихоманку і втрату ваги. Хоча точна причина ВК невідома, останні дослідження дають можливість припустити, що природні захисні сили організму діють проти тих білків в організмі, які організм вважає сторонніми («аутоімунна реакція»). Можливо, через те, що вони нагадують бактеріальні білки в кишці, ці білки можуть або провокувати, або стимулювати запальний процес, який починається і руйнує вистілку товстої кишки. По мірі руйнування вистілки товстої кишки утворюються виразки, що виділяють слиз, гній і кров. Хвороба, як правило, починається в ректальній зоні і може в решті решт поширитися на весь товстий кишечник. Повторні періоди запалення призводять до потовщення стінки кишки і прямої кишки з утворенням рубцьової тканини. При тяжкій формі хвороби може статися відмирання тканини товстої кишки або сепсис. Симптоми ВК бувають різні за тяжкістю, і їхній прояв може бути поступовим або раптовим. Напади можуть провокуватися багатьма факторами, в тому числі респіраторними інфекціями або стресом.

Хоча сьогодні немає доступної терапії ВК, методи лікування фокусують на послабленні патологічного запального процесу у вистілці товстої кишки. Застосовувані сьогодні методи лікування хвороби включають використання кортикостероїдних імунодепресантів (наприклад, азатиоприну, меркаптопурину і метотрексату) і аміносаліцилатів. Однак довготривале використання імунодепресантів, наприклад кортикостероїдів і азатиоприну, може призвести до серйозних побічних ефектів, в тому числі стоншенню кісток, катаракті, інфекції та впливу на печінку та кістковий мозок. Для пацієнтів, яким призначена терапія не допомагає, альтернативою є хірургічна операція. Операція включає видалення всієї товстої кишки і прямої кишки.

Існує декілька експериментальних моделей (на тваринах), які можуть частково імітувати хронічний виразковий коліт (ВК). Найбільш широко застосовуваними моделями є моделі коліту, індукованого оксазолоном і 2,4,6-тринітробенесульфонову кислотою/етанолом (TNBS), які викликають хронічне запалення і виразку у товстій кишці. Коли сприйнятливим мишам шляхом внутрішньопрямокишкової інстиляції вводять оксазолон або TNBS, це викликає Т-клітинопосередковану імунну реакцію в слизовій оболонці товстої кишки, що призводить до масивного слизового запалення, яке характеризується щільною інфільтрацією Т-клітин і макрофагів крізь всю стінку товстого кишечника. Більш того, ця гістопатологічна картина супроводжується клінічною картиною поступової втрати ваги (виснаженням), геморагічним проносом, випадінням прямої кишки і

стоншенням стінок товстого кишечника (Neurath et al., Intern. Rev. Immunol. 19:51-62, 2000).

В іншій моделі коліту використовують декстран сульфат натрієву сіль (DSS), яка викликає гострий коліт, що проявляється у вигляді геморагічного проносу, втрати ваги, скорочення товстої кишки і виникнення виразок на слизовій оболонці з нейтрофільною інфільтрацією. DSS-індукований коліт гістологічно характеризується інфільтрацією запальних клітин у власну пластинку слизової оболонки з лімфоїдною гаперплазією, вогнищевим ушкодженням кишкових крипт та епітеліальними виразками. Вважають, що ці зміни розвиваються через токсичний вплив DSS на епітелій, фагоцитоз клітин власної пластинки слизової оболонки і продукування TNF-альфа і TNF-гамма. Попри традиційне застосування DSS залишаються невирішеними декілька питань щодо придатності механізмів DSS для лікування людської хвороби. DSS розглядають як модель, залежну від Т-клітин, бо її спостерігають у тварин з Т-клітинною недостатністю, наприклад у мишей з тяжким комбінованим імунодефіцитом.

Введення розчинних IL-22RA2-вмісних поліпептидів, наприклад zcytor16-Fc4 або інших розчинних і злитих білків IL-22RA в такі TNBS- або DSS-моделі можна використовувати для оцінки застосування розчинного IL-22RA для поліпшення симптомів і зміни динаміки шлунково-кишкової хвороби. Крім того, результати, що показують інгібування IL-22 в результаті застосування IL-22RA2, служать доказом концепції, що й інші антагоністи IL-22, наприклад IL-22RA або антитіла до нього, можна також застосовувати для поліпшення симптомів у моделях коліт/ЗХК та зміни динаміки хвороби. Автори спостерігали підвищену експресію IL-22 в тканинах товстої кишки у мишей з введенням DSS в результаті РЧ-ПЛР, та синергістичну активність IL-22 з IL-1 бета на інтенстинальних клітинних лініях. Це означає, що IL-22, можливо, відіграє певну роль у запальних реакціях при коліті, та нейтралізацію активності IL-22 в результаті введення поліпептидів IL-22RA2 як можливий терапевтичний підхід при лікуванні ЗХК. Інші терапевтичні засоби включають поліпептиди IL-22RA, антитіла anti-IL-22RA, антитіла anti-IL-22 або партнерів зв'язування тощо.

4. Псоріаз

Псоріаз - це хронічний стан шкіри, який мають більше семи мільйонів американців. Псоріаз виникає, коли нові клітини шкіри ростуть аномально, що призводить до запалених, припухлих і лускатих ділянок на шкірі, в яких стара шкіра ще не злущилась. Бляшковий псоріаз, найпоширеніша форма, характеризується запаленими ділянками шкіри («осередками ураження»), покритими сріблясто-білими лусочками. Псоріаз може обмежуватись кількома бляшками або покривати помірні або великі ділянки шкіри, найчастіше на волосяній частині шкіри голови, колінах, ліктях і торсі. Хоча псоріаз дуже помітний, він не є заразним. Патогенез цієї хвороби включає хронічне запалення уражених тканин. Поліпептиди IL-22RA, антитіла anti-IL-22RA, антитіла anti-IL-22 або партнери зв'язування могли б стати цінним терапевтичним засобом для

зменшення запалення та патологічних ефектів при псоріазі, інших запальних хворобах шкіри, шкірній та слизовій алергії та споріднених хворобах.

Псоріаз - це опосередковане Т-клітинами запалення шкіри, який може спричиняти значний дискомфорт. Це невиліковна хвороба, яка уражає людей будь-якого віку. На псоріаз страждає приблизно два відсотки населення Європи та Північної Америки. Хоча окремі люди з легкою формою псоріазу часто можуть регулювати свою хворобу за допомогою місцеводіючих засобів, більш ніж одному мільйону пацієнтів у всьому світі необхідна ультрафіолетова або імуносупресивна терапія. На жаль, незручність і ризик ультрафіолетового випромінювання, а також токсичність багатьох терапевтичних засобів обмежують їх тривале застосування. Крім того, пацієнти, як правило, мають рецидивні псоріазу, і в деяких випадках відновлення симптомів невдовзі після припинення імуносупресивної терапії.

IL-20 є новим гомологом IL-10, який, як виявили, спричиняє неонатальну смертність при патології шкіри, яка включає аберантне епідермальне диференціювання у IL-20 трансгенних мишей (Blumberg H. et al, Cell 104:9-19, 2001). Регуляція рецептора IL-20 різко підвищується у псоріатичній шкірі. Оскільки IL-22 має таку саму рецепторну субодиницю (zcytor11), що і рецептор IL-20, а IL-22 трансгенні миші виявляють аналогічний фенотип, можливо, що IL-22 також бере участь у запальних шкірних хворобах, наприклад псоріазі. Введення поліпептиду IL-22RA або антагоніста антитіла anti-IL-22RA, підшкірно або топічно, потенційно може зменшувати запалення і симптом. Інші терапевтичні засоби включають поліпептиди IL-22RA, розчинні поліпептиди zcytor11/CRF2-4-рецептор, антитіла anti-IL-22 або партнерів зв'язування тощо.

Крім того, в осередках псоріатичного ураження людини виявили надмірну експресію IL-22 та IL-20, що дає можливість припустити, що IL-22, як і IL-20, також бере участь у псоріазі людини. До того ж, надмірна експресія IL-22 та IL-20 у трансгенних мишей виявлялась у епідермальному потовщенні та ураженні імункомпетентних клітин, що є показником псоріатичного фенотипу, а додаткова ін'єкція IL-22 нормальним мишам виявлялась у епідермальному потовщенні та ураженні імункомпетентних клітин, що є показником псоріатичного фенотипу, який зникає під дією антагоніста IL-22RA2 (zcytor16) розчинного рецептора (WO 01/40467). Так, дані *in vivo* дають додаткову підставу припустити, що прозапальний IL-22 бере участь у псоріазі. А якщо так, то антагоністи активності IL-22 та IL-20, наприклад розчинні рецептори IL-22RA та антитіла до них, в тому числі запропоновані моноклональні і нейтралізуючі антитіла проти людського IL-22RA, є корисними при лікуванні запальних хвороб, зокрема в ролі антагоністів і до IL-22, і до IL-20, окремо або разом, при лікуванні псоріазу. Крім того, антагоністи активності IL-22, наприклад розчинні рецептори IL-22RA та антитіла до них, в тому числі запропоновані моноклональні і нейтралізуючі антитіла проти людського IL-22RA, є корисними при лікуванні інших запальних хвороб, наприклад в ролі агентів, що

зв'язують, блокують, інгібують, зменшують, протидіють або нейтралізують IL-22 та IL-20 при лікуванні atopічного дерматиту, ЗХК, коліту, ендотоксикозу, артриту, ревматоїдного артриту, псоріатичного артриту, респіраторного захворювання дорослих, септичного шоку, поліорганної недостатності, запального ураження легенів, наприклад астми або бронхіту, бактеріальної пневмонії, псоріазу, екземи, atopічного і контактного дерматиту та ЗХК, наприклад виразкового коліту та хвороби Крона.

Крім того, запропоновані антитіла anti-IL-22RA і розчинні рецептори IL-22RA можна використовувати для профілактики і лікування втрати ваги, пов'язаної з рядом описаних тут запальних хвороб, а також раку (наприклад, хіміотерапії та кахексії) та інфекційних хвороб. Наприклад, серйозна втрата ваги є головним показником в моделях сепсису, множинного склерозу, ревматоїдного артриту та пухлинних моделях. До того ж, втрата ваги є ключовим параметром для багатьох людських хвороб, в тому числі раку, інфекційної та запальної хвороб. Втрату ваги виявляли миші, яким вводили описаний тут аденовірус IL-22. Антитіла anti-IL-22 і антагоністи IL-22, наприклад запропоновані розчинні рецептори IL-22RA і антитіла до них, а також рецептори zcytor16 (IL-22RA2), можна перевіряти на здатність запобігати втраті ваги або лікувати її на мишах, яким введений аденовірус IL-22. Способи визначення профілактичного або терапевтичного режиму для таких антагоністів IL-22 відомі.

Розчинні поліпептиди рецепторів IL-22RA і антитіла до них можна також використовувати в діагностичних системах для виявлення циркулюючих рівнів ліганду IL-22 або IL-20 і при виявленні IL-22, асоційованого з гострою фазою запальної реакції. В одному з варіантів винаходу антитіла або інші агенти, що специфічно зв'язуються із запропонованими розчинними рецепторами IL-22RA, можна застосовувати для виявлення циркулюючих поліпептидів рецепторів; і навпаки, власне розчинні рецептори IL-22RA можна використовувати для виявлення циркулюючих або локально-діючих поліпептидів IL-22 або IL-20. Підвищені або знижені рівні поліпептидів ліганду або рецептора можуть бути показником патологічних станів, в тому числі запалення або раку. IL-22 відомий як такий, що може викликати асоційовану гострофазну запальну реакцію. Крім того, виявлення білків або молекул гострої фази, наприклад IL-20 або IL-22, може свідчити про хронічний запальний стан при певних хворобах (наприклад, псоріазі, ревматоїдному артриті, коліті, ЗХК). Виявлення таких станів допомагає діагностувати хворобу, а також допомагає лікарю вибрати відповідне лікування.

Внутрішньоутробне введення нейтралізуючих антитіл anti-IL-22 або anti-IL-20 можна використати для демонстрації ефективності *in vivo* в експериментальних моделях хвороб за зменшенням або зникненням фенотипу, виявленого у IL-22 трансгенних сисунків, які надмірно експресують IL-22, або у IL-20 трансгенних сисунків, які надмірно експресують IL-20. В цій області є прецеденти внутрішньоутробного лікування нейтралізуючими моноклональними антитілами (mAb). В одному

випадку на розвиток субпопуляції В-1 клітин В сильно вплинуло лікування вагітної миши антитілом mAb, специфічним до молекули (CD19), яка є специфічною до В-клітин (наприклад, Krop I. et al., Eur. J. Immunol 26(1):238-42, 1996). Krop et al. вводили за певний проміжок часу вагітній миші інтраперитонеально 500 мкг антимишиного mAb CD 19 щура (або ізотипічно подібного контрольного Ab щура) у PBS, починаючи з 9 дня вагітності, з наступними ін'єкціями через день до народження. Дитинчам також один раз ін'єкцію вводили 500 мкг згаданих антитіл на 10 день від народження. В іншому випадку, Tanaka et al., виявили, що при внутрішньоутробному лікуванні моноклональним антитілом до рецептора IL-2 бета-ланцюг повністю припиняє розвиток дендритних епідермальних клітин Thy-1+. Дві різні субодиниці рецептора IL-2, тобто альфа-ланцюг (IL-2R альфа) і бета-ланцюг (IL-2R бета), експресуються майже у взаємовиключній манері протягом усього онтогенезу тимусу плоду. Блокування IL-2R бета, сигналтрансдукуючого компонента IL-2R, введенням нейтралізуючого антитіла mAb до IL-2R дало в результаті повне і вибіркоче зникнення дендритних епідермальних клітин Thy-1+ шкіри. Розвиток будьяких інших субпопуляцій Т-клітин не був аномальним. Це вказує на те, що IL-2 відіграє вирішальну роль у розвитку клітин V гамма 5+ та їхніх нащадків (див., Tanaka, T. et al., Int. Immunol. 4(4):487-9, 1992). Крім того, Schattemann GC et al. показали, що для нормального внутрішньоутробного розвитку серцево-судинної системи мишей необхідний PDGF-A. Декілька груп даних дають можливість припустити, що ланцюг А фактора росту тромбоцитів (PDGF-A) є необхідним для нормального ембріонального розвитку серцево-судинної системи. Внутрішньоутробне введення в децидуальну оболонку миши нейтралізуючих антитіл anti-PDGF-A дало в результаті вибіркоче переривання взаємодій ліганд PDGF-A-рецептор in vivo упродовж 18-24 годин і дозволило визначити, чи потрібен PDGF-A для розвитку серцево-судинної системи і коли він потрібен (див., Schattemann GC et al., Dev. Biol. 176(1):133-42, 1996). Ці результати, а також інші відомі результати, доводять той факт, що нейтралізуючі антитіла mAb можуть викликати сильні внутрішньоутробні ефекти. Аналогічним чином, можна навести дані, що показують ефективність нейтралізації IL-20 або IL-22 моноклональними антитілами in vivo в експериментальних моделях хвороб для зменшення або зникнення фенотипу шкіри, виявленого у дитинчат IL-20 та IL-22 трансгенних мишей, які надмірно експресують IL-20 та IL-22 відповідно. Ці трансгенні миші народжуються з «лискухою» шкірою, що обумовлено, принаймні частково, потовщенням епідермісу. IL-20 трансгенні мишенята, що експресують доволі низькі рівні трансгенного цитокіну, можуть видужати і жити до розмноження але IL-22 трансгенні мишенята помирають незабаром після народження, як правило, не проживши і 5 днів.

Наприклад, нейтралізуючі антитіла до IL-20 включають антитіла, наприклад нейтралізуючі моноклональні антитіла, які можуть зв'язувати антигенні епітопи IL-20 і нейтралізувати активність IL-

20. Відповідно, пептиди, що несуть ентигенні епітопи, і поліпептиди IL-20 є корисними для індукції антитіл, що зв'язуються з описаними тут поліпептидами IL-20, а також для ідентифікації і скринінгу моноклональних антитіл anti-IL-20, які є нейтралізуючими і можуть зв'язувати, блокувати, інгібувати, зменшувати, протидіяти або нейтралізувати активність IL-20. Такі запропоновані моноклональні антитіла можуть зв'язуватись з антигенним епітопом IL-20. Ці епітопи в послідовності SEQ ID NO:8, як передбачає графік Джеймсона-Вульфа, побудований, наприклад, за допомогою комп'ютерної програми DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madison, WI), служать антигенними епітопами, яким віддається перевага, і їх може визначити фахівець. Такі антигенні епітопи включають: амінокислотні залишки 42 (Ile) - 102 (Asp) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 42 (Ile) - 60 (Ile) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 42 (Ile) - 69 (Glu) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 42 (Ile) - 81 (Cys) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 42 (Ile) - 96 (Lys) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 42 (Ile) - 102 (Asp) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 60 (Ile) - 69 (Glu) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 60 (Ile) - 81 (Cys) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 60 (Ile) - 96 (Lys) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 60 (Ile) - 102 (Asp) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 69 (Glu) - 81 (Cys) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 69 (Glu) - 96 (Lys) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 69 (Glu) - 102 (Asp) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 81 (Cys) - 96 (Lys) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 81 (Cys) - 102 (Asp) послідовності SEQ ID NO:8; амінокислотні залишки 96 (Lys) - 102 (Asp) послідовності SEQ ID NO:8.

Крім описаних тут експериментальних моделей хвороб активність антитіл anti-IL-22RA в запаленій тканині, взятій з осередку псоріатичного ураження людини, можна вимірювати in vivo за допомогою мишиної моделі тяжкого комбінованого імунodefіциту (ТКІД). Було розроблено декілька мишиних моделей, в яких людським клітинам пересаджували мишам з імунodefіцитом (узагальнена назва моделей - ксенографти); див., наприклад, Cattani AR, Douglas E, Leuk. Res. 18:513-22, 1994 and Flavell, DJ, Hematological Oncology 14:67-82, 1996. Оскільки це in vivo модель-ксенографт для псоріазу, псоріатичну шкірну тканину людини пересаджували в модель ТКІД-миши і вводили відповідний антагоніст. Крім цього, для оцінки дії антагоністів IL-20 та IL-22 можна використовувати інші відомі тваринні експериментальні моделі псоріазу, наприклад шматки живої псоріатичної тканини людини, пересаджені в модель миши AGR129, і вводили відповідний антагоніст (наприклад, див. Boyman, O. et al., J. Exp. Med. Online publication No. 20031482, 2004, включено тут як посилання). Перевагу віддають антитілам anti-IL-22RA, які зв'язують, блокують, інгібують, зменшують, протидіють або нейтралізують активність IL-22 або і IL-20, і IL-22, хоча в цій моделі можна ви-

користовувати антитіла anti-IL-20 та anti-IL-22 (по одинці або в комбінації), розчинний IL-22RA та інші антагоністи IL-20 та IL-22. Аналогічним чином, у ТКІД-моделі можна використовувати тканини або клітини, отримані з людських осередків ураження колітом, ЗХК, артритом або інших осередків запалення, для оцінки протизапальних властивостей описаних тут антагоністів IL-20 та IL-22.

Терапії, призначені для ліквідування, гальмування або зменшення запалення за допомогою антитіл anti-IL-22RA або їх дериватів, агоністів, кон'югатів або варіантів, можна перевірити введенням антитіл anti-IL-22RA або розчинних сполук IL-22RA ТКІД-мишам з пересаженою запальною тканиною людини (наприклад, з псоріатичним осередком ураження тощо), або в інші описані тут моделі. Ефективність лікування вимірюють і статистично оцінюють як збільшений протизапальний ефект в межах популяції, яку лікують, за певний період часу, використовуючи відомі методи. Деякі приклади методів включають (але не обмежуються цим) вимірювання, наприклад у псоріатичній моделі, товщини епідермісу, кількість запальних клітин у верхній дермі і ступені паракератозу. Такі методи відомі і описані. Див., наприклад, Zeigler, M. et al., *Lab. Invest.* 81:1253, 2001; Zollner, T.M. et al., *J. Clin. Invest.* 109:611, 2002; Yamanaka, N. et al., *Microbiol. Immunol.* 45:501, 2001; Raychaudhuri, S.P. et al., *Br. J. Dermatol.* 144:931, 2001; Boehncke, W.H. et al., *Arch. Dermatol. Res.* 291:104, 1999; Boehncke, W.H. et al., *J. Invest. Dermatol.* 116:596, 2001; Nickoloff, B.J. et al., *Am. J. Pathol.* 146:580, 1995; Boehncke, W.H. et al., *J. Cutan. Pathol.* 24:1, 1997; Sugai, J.M. et al., *J. Dermatol. Sci.* 17:85, 1998; and Villadsen L.S. et al., *J. Clin. Invest.* 112:1511, 2003. Запалення можна також контролювати за певний період добре відомими методами, наприклад протоковою цитометрією (або ПЛР) для кількісного аналізу числа запальних або уражених клітин, присутніх у пробі, оцінкою в балах (втрати ваги, діареї, ректальної кровотечі, довжини товстої кишки) для ЗХК, оцінкою в балах хвороби лапок і запалення для CIA-моделі ревматоїдного артриту. Наприклад, терапевтичні стратегії, що підходять для тестування в такій моделі, включають пряме лікування з використанням антитіл anti-IL-22RA, інших антагоністів IL-20 та IL-22 (окремо або разом) або споріднених кон'югатів, або антагоністів, основаних на перериванні взаємодії антитіл anti-IL-22RA з їх лігандами IL-20 та IL-22, або для клітинних терапій - використання антитіл anti-IL-22RA або їх дериватів, агоністів, кон'югатів або варіантів.

Крім того, псоріаз - це хронічна запальна хвороба шкіри, пов'язана з гіперпластичними епідермальними кератиноцитами та інфільтруючими мононуклеарними клітинами, в тому числі Т-клітинами пам'яті CD4+, нейтрофілами і макрофагами (Christophers, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 110:199, 1996). Вважають, що антигени оточуючого середовища відіграють значну роль в ініціації та сприянні патології хвороби. Однак, як вважають, саме втрата толерантності до аутоантигенів опосередковує патологію псоріазу. Вважають, що дендритні клітини і Т-клітини CD4+ відіграють важли-

ву роль у презентації і розпізнаванні антигена, які опосередковують імунну реакцію, що призводить до патології. Нещодавно автори розробили модель псоріазу, основу на моделі переносу CD4+CD45RB (Davenport et al., *Internal Immunopharmacol.* 2:653-672). Мишам вводять запропоновані anti-IL20, anti-IL22 або антитіла до IL-20R та/або IL-22R, наприклад антитіла anti-IL-22RA, або розчинні IL-22RA. Інгибування показників хвороби (осередків ураження шкіри, запальних цитокінів) свідчить про ефективність антагоністів IL-20 та IL-22, наприклад антитіл anti-IL-22RA або розчинних рецепторів IL-22RA, або інших антагоністів, наприклад антитіл проти IL-20 та/або IL-22 або їхніх рецепторів при лікуванні псоріазу.

5. Атопічний дерматит

У пробах шкіри пацієнтів, хворих на атопічний дерматит, спостерігають підвищену активацію і IL-20, і IL-22. Атопічний дерматит (АД) - це загальна хронічна запальна хвороба, що характеризується гіперактивованими цитокінами субпопуляції 2 клітини Т-хелпера (Th2). Хоча точна причина АД невідома, припускають, що причетність до неї мають багато факторів, в тому числі імунні реакції на гіперактивні Th2, аутоімунність, інфекція, алергени і генетична схильність. Головними ознаками хвороби є ксероз (сухість шкіри), свербіж (короста шкіри), кон'юнктивіт, запалені ділянки шкіри, інфекція *Staphylococcus aureus*, підвищена еозинофілія крові, підвищений рівень IgE та IgG1 сироватки і хронічний дерматит з інфільтрацією Т-клітин, мастоцитів, макрофагів і еозинофілів. Було визнано, що заселення або зараження стафілококами *S. aureus* погіршує АД і зберігає назавжди хронічність цієї хвороби шкіри.

АД часто виявляють у пацієнтів з астмою та алергічним ринітом, і часто він є початковим проявом алергії. Приблизно 20% населення західних країн страждають на ці алергічні хвороби, а кількість випадків АД в розвинених країнах зростає з невідомих причин. АД, як правило, починається у дитинстві і часто може зберігатися і у підлітковому, і зрілому віці. Сучасні методи лікування АД включають застосування топічних кортикостероїдів, орального циклоспорино А, некортикостероїдних імунодепресантів, наприклад такролімусу (FK506 у вигляді мазі), і гамма-інтерферону. Попри велику кількість методів лікування АД симптоми багатьох пацієнтів не поліпшуються, або вони мають побічні (несприятливі) реакції на медикаменти і доводиться шукати інші, більш ефективні терапевтичні засоби. Запропоновані розчинні поліпептиди IL-22RA і антитіла anti-IL-22RA, в тому числі запропоновані нейтралізуючі антитіла проти людського IL-22RA, можна використовувати для нейтралізації IL-22 та IL-20 при лікуванні специфічних хвороб людини, наприклад атопічного дерматиту, запальних станів шкіри та інших описаних тут запальних станів.

Для фармацевтичного застосування запропоновані розчинні IL-22RA або антитіла anti-IL-22RA складають для парентеральної, зокрема внутрішньовенної або підшкірної, доставки традиційними методами. Внутрішньовенне введення здійснюють шляхом болюсної ін'єкції, контрольованого вивільнення, наприклад за допомогою мінінасосів або

інших технічних засобів, або шляхом інфузії протягом, зазвичай, від однієї до кількох годин. Як правило, фармацевтичні композиції включають кровотворний білок у поєднанні з фармацевтично прийнятним носієм, наприклад сольовим розчином, забуференим сольовим розчином, 5%-ним розчином декстрази у воді і т.п. Композиції можуть додатково включати один або більше наповнювачів, консервантів, солюбілізаторів, буферні речовини, альбумін для запобігання втраті білка на поверхнях тари тощо. При застосуванні такої комбінованої терапії цитокіни можна поєднувати в одній композиції або вводити з окремими композиціями. Методи складання композицій добре відомі і описані, наприклад, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Genarro, ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 1990, включений тут як посилання. Терапевтичні дози, як правило, становлять 0,1-100 мг на кг маси тіла пацієнта щоденно, краще 0,5-20 мг/кг щоденно, при цьому точна доза визначається клінічним лікарем згідно з прийнятими стандартами з урахуванням характеру і тяжкості стану, особливостей пацієнта тощо. Визначення дози - справа фахівців цієї галузі. Білки найчастіше вводять протягом періоду до 28 днів після хіміотерапії або пересадки кісткового мозку, або доки кількість тромбоцитів не досягне $>20000/\text{мм}^3$, краще $50000/\text{мм}^3$. Найчастіше білки вводять протягом одного тижня або менше, часто протягом 1-3 днів. Як правило, терапевтично ефективною дозою запропонованих розчинних IL-22RA або антитіл anti-IL-22RA є кількість, достатня, щоб викликати клінічно значне збільшення проліферації та/або диференціації лімфоїдних або мієлоїдних клітин-попередників, що буде свідчити про збільшення циркулюючих рівнів зрілих клітин (наприклад, тромбоцитів або нейтрофілів). Лікування тромбоцитарних розладів, таким чином, слід продовжувати, доки кількість тромбоцитів не сягне принаймні $20000/\text{мм}^3$, краще $50000/\text{мм}^3$. Запропоновані розчинні IL-22RA або антитіла anti-IL-22RA можна також вводити в комбінації з іншими цитокінами, наприклад IL-3, IL-6 та IL-11; фактором стовбурових клітин; еритропоєтином; G-CSF та GM-CSF. В межах режиму комбінованої терапії денні дози інших цитокінів, як правило, такі: EPO, 150 U/kg (одиниць/кг); GM-CSF, 5-15 Ig/kg, IL-3, 1-5 Ig/kg та G-CSF, 1-25 Ig/kg. Комбіновану терапію з використанням EPO, наприклад, призначають анемічним пацієнтам з низькими рівнями EPO.

Як правило, дозування призначеного розчинного IL-22RA (або аналога чи злитого білка IL-22RA) або антитіл anti-IL-22RA буде різним в залежності від таких факторів, як вік пацієнта, вага, зріст, стать, загальний медичний стан та історія хвороби. Зазвичай необхідно забезпечити пацієнту дозу розчинних IL-22RA або антитіл anti-IL-22RA в межах від 1 пг/кг до 10 мг/кг (кількість агента на масу тіла пацієнта), хоча можна призначати меншу або більшу дозу в залежності від обставин.

Введення суб'єкту розчинних IL-22RA або антитіл anti-IL-22RA може бути внутрішньовенним, інтраартеріальним, інтраперитонеальним, внутрішньом'язовим, підшкірним, інтраплевральним, інтратекальним, перфузією через регіонарний ка-

тетер або прямою ін'єкцією всередину уражених тканин. Введення терапевтичних білків ін'єкцією може бути методом безперервної інфузії або одно- або багатоболусного вливання.

Додаткові способи введення включають пероральний, слизово-мембранний, пульмональний та черезшкірний. Пероральна доставка підходить для поліефірних мікросфер, зеїнових мікросфер, протеїноїдних мікросфер, поліціаноакрилатних мікросфер і систем на основі ліпідів (див., наприклад, DiBase and Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins", in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), pages 255-288 (Plenum Press 1997)). Прикладом можливості інтраназальної доставки може служити спосіб введення інсуліну (див., наприклад, Hinchcliffe and Ilium, Adv. DrugDeliv. Rev. 35:199 (1999)). Можна приготувати сухі або рідкі частинки, що містять розчинні IL-22RA або антитіла anti-IL-22RA, і їх вдихати за допомогою диспергаторів сухого порошку, генераторів рідких аерозолів або аерозольних апаратів (наприклад, Pettit and Gombotz, TIBTECH 16:343 (1998); Patton et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 35:235 (1999)). Цей спосіб ілюструється системою для діабетиків AEPX, яка являє собою ручний електронний інгалятор, який доставляє в легені інсулін у вигляді аерозолі. Дослідження показали, що білки з молекулярною масою 48000 кДа доставлялися через шкіру в терапевтичних концентраціях за допомогою низькочастотного ультразвуку, що ілюструє можливість реалізації черезшкірного введення (Mitrugotri et al., Science 269:850 (1995)). Іншим засобом введення молекули з IL-22RA-зв'язуючою активністю, є трансдермальна доставка шляхом електропорації (Potts et al., Pharm. Biotechnol. 10:213 (1997)).

Фармацевтичну композицію, що містить розчинний IL-22RA або антитіло anti-IL-22RA, можна складати відомими способами складання фармацевтично корисних композицій шляхом змішування терапевтичних білків з фармацевтично прийнятним носієм. «Фармацевтично прийнятним носієм» вважають композицію, введення якої добре переноситься пацієнтом. Одним з прикладів фармацевтично прийнятного носія є стерильний забуферений фосфатом фізіологічний розчин. Добре відомі й інші відповідні носії. Див., наприклад, Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995).

У терапевтичних цілях молекули розчинних IL-22RA або антитіл anti-IL-22RA і фармацевтично прийнятний носій вводять пацієнту у терапевтично ефективній кількості. Комбінацію запропонованої терапевтичної молекули і фармацевтично прийнятного носія вважають введеною у «терапевтично ефективній кількості», якщо ця кількість є фізіологічно значущою. Агент є фізіологічно значущим, якщо його присутність приводить до помітної зміни у фізіології пацієнта. Наприклад, агент, застосований для лікування запалення, є фізіологічно значущим, якщо його присутність зменшує запальну реакцію.

Фармацевтичну композицію, що містить IL-22RA (або аналог IL-22RA, або злитий білок) або нейтралізуюче антитіло anti-IL-22RA, можна ство-

ривати у рідкій формі, у вигляді аерозолі або у твердій формі. Рідкі форми - це розчини, які можна вводити ін'єкціями, і пероральні суспензії. Тверді форми - це капсули, таблетки і форми контролюваного вивільнення. Останні представлені мініосмотичними насосами та імплантатами (Bremer et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery", in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), pages 95-123 (CRC Press 1995); Bremer et al., "Protein Delivery with Infusion Pumps", in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), pages 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey et al., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant", in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), pages 93-117 (Plenum Press 1997)).

Одним із засобів доставки терапевтичних поліпептидів суб'єкту внутрішньовенно, інтраперитонеально, інтратекально, внутрішньом'язово, підшкірно або пероральним введенням, інгаляцією або інтраназальним введенням є ліпосоми. Ліпосоми - це мікроскопічні везикули, що складаються з одного або більше ліпідних бішарів водних бульбашок (див., наприклад, Bakker-Woudenberg et al., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suppl 1):S61 (1993), Kim, *Drugs* 46:618 (1993) and Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers", in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), pages 3-24 (CRC Press 1995)). За складом ліпосоми подібні до клітинних мембран, тому ліпосоми можна вводити безпечно, до того ж вони здатні біодеградувати. В залежності від методу приготування ліпосоми можуть бути моноламелярними і мультиламелярними, і розмір їхніх діаметрів може коливатися від 0,02 мкм до більш ніж 10 мкм. В ліпосоми можна інкапсулювати ряд агентів: гідрофобні агенти відокремлюються у бішарах, а гідрофільні агенти - всередині водних бульбашок (див., наприклад, Machy et al., *Liposomes in Cell Biology and Pharmacology* (John Libbey 1987), and Ostro et al., *American J. Hosp. Pharm.* 46:1516 (1989)). Крім того, терапевтичну доступність інкапсульованого агента можна регулювати, варіюючи розмір ліпосоми, кількість бішарів, ліпідний склад, а також заряд і поверхневі характеристики ліпосом.

Ліпосоми можуть адсорбуватися практично у будь-який тип клітини і потім повільно вивільняти інкапсульований агент. Як варіант, абсорбовану ліпосому можуть захопити (ендоцитоз) фагоцитні клітини. Після ендоцитозу відбувається інтраліпосомальна деградація ліпосомальних ліпідів і вивільнення інкапсульованих агентів (Scherphof et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368 (1985)). Після внутрішньовенного введення маленькі ліпосоми (0,1-1,0 мкм), як правило, поглинаються клітинами ретикулоендотеліальної системи, розташованої головним чином у печінці та селезінці, тоді як ліпосоми більше ніж 3,0 мкм осаджуються в легені. Таке преферентивне поглинання менших ліпосом клітинами ретикулоендотеліальної системи можна використати для доставки хіміотерапевтичних агентів у макрофаги і в пухлини печінки.

Ретикулоендотеліальну систему можна оминати кількома способами, в тому числі сатурацією

великими дозами ліпосомних частинок або селективною макрофаговою інактивацією фармакологічними засобами (Claassen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 802:428 (1984)). Крім того, було виявлено, що включення в ліпосомні мембрани гліколіпід- або синтезованих з поліетиленгліколю фосфоліпідів дає в результаті значно менше поглинання ретикулоендотеліальною системою (Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Ліпосоми можна також приготувати таким чином, щоб націлювати на конкретні клітини або органи, змінюючи фосфоліпідний склад або вставляючи в ліпосоми рецептори або ліганди. Наприклад, ліпосоми, приготовані з великим вмістом неіонного сурфактанта, застосовували для націлення на печінку (Hayakawa et al., *Japanese Patent No. 04-244018*; Kato et al., *Biol. Pharm. Bull.* 16:960 (1993)). Ці композиції готували, змішуючи фосфатидилхолін соєвих бобів, α -токоферол і етоксиковану гідрогенізовану рицинову олію (HCO060) в метанолі, концентруючи цю суміш у вакуумі і потім розбавляючи цю суміш водою. Виявлено також, що ліпосомальну композицію дипальмітоїлфосфатидилхоліну (DPPC) із стерилізованою сумішшю, отриманою із соєвих бобів (SG), і холестерин (Ch) можна націлювати на печінку (Shimizu et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:881 (1997)).

Як варіант, до поверхні ліпосоми можна прикріплювати різні орієнтуючі ліганди, наприклад антитіла, фрагменти антитіл, карбогідрати, вітаміни і транспортні білки. Наприклад, ліпосоми можна модифікувати за допомогою розгалужених галактозилліпідних дериватів для націлювання на рецептори асіалоглікопротеїну (галактози), які експресуються виключно на поверхні клітин печінки (Kato and Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287 (1997); Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Аналогічним чином, Wu et al., *Hepatology* 27:772 (1998) показали, що мічення ліпосом асіалофетуїном приводить до скорочення періоду півжиття ліпосомної плазми і значного підвищення поглинання гепатоцитами міченої асіалофетуїном ліпосоми. З іншого боку, печінкову кумуляцію ліпосом, що містять розгалужені галактозилліпідні деривати, можна інгібувати попередньою ін'єкцією асіалофетуїну (Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Іншим прикладом способу націлювання ліпосом на клітини печінки є поліаконітизовані ліпосоми альбуміну сироватки людини (Kamps et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:11681 (1997)). Крім того, Geho et al., у пат. США № 4603044 описують гепатоцит-спрямовану систему доставки везикули, що має специфічність до гепатобілярних рецепторів, асоційованих із специалізованими метаболічними клітинами печінки.

При більш загальному підході до націлювання на тканини клітини-мішені попередньо мітять біотинілованими антитілами, специфічними до ліганду, експресованого такою клітиною-мішенню (Harasym et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)). Після елімінації із плазми вільного антитіла вводять ліпосоми, кон'юговані зі стрептавідином. В інших методах націлюючи антитіла прикріплюють

безпосередньо до ліпосом (Harasym et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)).

Поліпептиди і антитіла можна інкапсулювати в ліпосоми стандартними методами мікроінкапсулювання білків (див., наприклад, Anderson et al., *Infect. Immun.* 31:1099 (1981), Anderson et al., *Cancer Res.* 50:1853 (1990), and Cohen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1063:95 (1991), Alving et al., "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies", in *Liposome Technology*, 2nd Edition, Vol. III, Gregoriadis (ed.), page 317 (CRC Press 1993), Wassef et al., *Meth. Enzymol* 149:124 (1987)). Як зазначалось вище, терапевтично корисні ліпосоми можуть містити ряд компонентів. Наприклад, ліпосоми можуть включати ліпідні деривати полі(етиленгліколю) (Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Для підтримання високих системних рівнів терапевтичних білків були розроблені мікросфери із полімеру, здатного деградувати. Мікросфери виготовляють з таких здатних деградувати полімерів, як полі(співполімер лактиду з гліколідом) (PLG), поліангідриди, полі(складні ортефіри), полімери біологічно нерозкладного етилвінілацетату, в яких білки є заключеними в такий полімер (Gombotz and Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery", in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), pages 51-93 (CRC Press 1995); Roskos and Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery", in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), pages 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus et al., *Science* 281:1161 (1998); Putney and Burke, *Nature Biotechnology* 16:153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548 (1998)). Для внутрішньовенного введення терапевтичних білків носіями також можуть служити наносфери з поліетиленгліколевим покриттям (див., наприклад, Gref et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:167 (1997)).

Даний винахід також розглядає хімічно модифіковані поліпептиди з активністю зв'язування IL-22RA, наприклад мономерні, гомодимерні, гетеродимерні або мультидимерні розчинні рецептори IL-22RA та антагоністи IL-22RA, наприклад антитіла anti-IL-22RA або зв'язуючі поліпептиди, або нейтралізуючі антитіла anti-IL-22RA, причому поліпептид зв'язаний з полімером, як описувалось вище.

Фахівці можуть розробляти й інші лікарські форми, як описано, наприклад, Ansel and Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995), and Ranade and Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

Фармацевтичні композиції можна випускати, наприклад, у вигляді набору, що включає контейнер, який містить поліпептид з позаклітинним доменом IL-22RA, наприклад мономерними, гомодимерними, гетеродимерними або мультидимерними розчинними рецепторами IL-22RA або антагоністом IL-22RA (наприклад, антитілом або фрагментом антитіла, який зв'язує поліпептид IL-22RA, або нейтралізуючим антитілом anti-IL-22RA). Терапев-

тичні поліпептиди можна випускати у формі розчину, який можна вводити ін'єкціями, для однієї або багатьох доз, або у вигляді стерильного порошку, який треба розбавляти перед ін'єкцією. Як варіант, такий набір може включати диспергатор сухого порошку, генератор рідких аерозолів або аерозольний апарат для введення терапевтичного поліпептиду. Такий набір може додатково включати письмову інформацію щодо показань і застосування фармацевтичної композиції. Більш того, така інформація може включати застереження, що композиція IL-22RA протипоказана пацієнтам з відомою гіперчутливістю до IL-22RA.

Фармацевтична композиція, що містить антитіла anti-IL-22RA або партнери зв'язування (або фрагменти антитіл anti-IL-22RA, гібриди антитіл, гуманізовані антитіла тощо), або розчинний рецептор IL-22RA, можна випускати в рідкій формі, у вигляді аерозолу або у твердій формі. Прикладами рідких форм є розчини, які можна вводити ін'єкціями, аерозолі, краплі, топологічні розчини і пероральні суспензії. Прикладами твердих форм є капсули, таблетки і форми з контрольованим вивільненням. Останні представлені мініосмотичними насосами та імплантатами (Bremer et al., *Pharm. Biotechnol* 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery", in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), pages 95-123 (CRC Press 1995); Bremer et al., "Protein Delivery with Infusion Pumps", in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), pages 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey et al., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant", in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), pages 93-117 (Plenum Press 1997)). Інші тверді форми включають креми, пасти, інші топологічні аплікації тощо.

Одним із засобів доставки терапевтичних поліпептидів суб'єкту внутрішньовенно, інтраперитонеально, інтратекально, внутрішньом'язово, підшкірно або пероральним уведенням, інгаляцією або інтраназальним уведенням є ліпосоми. Ліпосоми - це мікроскопічні везикули, що складаються з одного або більше ліпідних бішарів водних бульбашок (див., наприклад, Bakker-Woudenberg et al., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suppl 1):S61 (1993), Kim, *Drugs* 46:618 (1993) and Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers", in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), pages 3-24 (CRC Press 1995)). За складом ліпосоми подібні до клітинних мембран, тому ліпосоми можна вводити безпечно, до того ж вони здатні біодеградувати. В залежності від методу приготування ліпосоми можуть бути моноламельярними і мультиламельярними, і розмір їхніх діаметрів може коливатися від 0,02 мкм до більш ніж 10 мкм. В ліпосоми можна інкапсулювати ряд агентів: гідрофобні агенти відокремлюються у бішарах, а гідрофільні агенти - всередині водних бульбашок (див., наприклад, Machy et al., *Liposomes in Cell Biology and Pharmacology* (John Libbey 1987), and Ostro et al., *American J. Hosp. Pharm.* 46:1516 (1989)). Крім того, терапевтичну доступність інкапсульованого агента можна регулювати, варіюючи розмір ліпо-

соми, кількість бішарів, ліпідний склад, а також заряд і поверхневі характеристики ліпосом.

Ліпосоми можуть адсорбуватися практично у будь-який тип клітини і потім повільно вивільняти інкапсульований агент. Як варіант, абсорбовану ліпосому можуть захопити (ендоцитоз) фагоцитні клітини. Після ендоцитозу відбувається інтраліпосомальна деградація ліпосомальних ліпідів і вивільнення інкапсульованих агентів (Scherphof et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368 (1985)). Після внутрішньовенного введення маленькі ліпосоми (0,1-1,0 мкм), як правило, поглинаються клітинами ретикулоендотеліальної системи, розташованої головним чином у печінці та селезінці, тоді як ліпосоми більше ніж 3,0 мкм осаджуються в легені. Таке преферентивне поглинання менших ліпосом клітинами ретикулоендотеліальної системи можна використати для доставки хімотерапевтичних агентів у макрофаги і в пухлини печінки.

Ретикулоендотеліальну систему можна оминати кількома способами, в тому числі сатурацією великими дозами ліпосомних частинок або селективною макрофаговою інактивацією фармакологічними засобами (Claassen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 502:428 (1984)). Крім того, було виявлено, що включення в ліпосомні мембрани гліколіпід- або синтезованих з поліетиленгліколю фосфоліпідів дає в результаті значно менше поглинання ретикулоендотеліальною системою (Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Ліпосоми можна також приготувати таким чином, щоб націлювати на конкретні клітини або органи, змінюючи фосфоліпідний склад або вставляючи в ліпосоми рецептори або ліганди. Наприклад, ліпосоми, приготовані з великим вмістом неіонного сурфактанта, застосовували для націлення на печінку (Hayakawa et al., *Japanese Patent No. 04-244018*; Kato et al., *Biol. Pharm. Bull.* 16:960 (1993)). Ці композиції готували, змішуючи фосфатидилхолін соєвих бобів, α -токоферол і етоксировану гідрогенізовану рицинову олію (НСО060) в метанолі, концентруючи цю суміш у вакуумі і потім розбавляючи цю суміш водою. Виявлено також, що ліпосомальну композицію дипальмітоїлфосфатидилхоліну (DPPC) із стерилглюкозидною сумішшю, отриманою із соєвих бобів (SG), і холестерином (Ch) можна націлювати на печінку (Shimizu et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:881 (1997)).

Як варіант, до поверхні ліпосоми можна прикріплювати різні орієнтуючі ліганди, наприклад антитіла, фрагменти антитіл, карбогідрати, вітаміни і транспортні білки. Наприклад, ліпосоми можна модифікувати за допомогою розгалужених галактозилліпідних дериватів для націлювання на рецептори асіалоглікопротеїну (галактози), які експресуються виключно на поверхні клітин печінки (Kato and Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287 (1997); Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Аналогічним чином, Wu et al., *Hepatology* 27:772 (1998) показали, що мічення ліпосом асіалофетуїном приводить до скорочення періоду півжиття ліпосомної плазми і значного підвищення поглинання гепатоцитами міченої асіалофетуїном ліпосоми. З іншого боку, печінкову

кумуляцію ліпосом, що містять розгалужені галактозилліпідні деривати, можна інгібувати попередньою ін'єкцією асіалофетуїну (Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Іншим прикладом способу націлювання ліпосом на клітини печінки є поліаконітировані ліпосоми альбуміну сироватки людини (Kamps et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:11681 (1997)). Крім того, Geho et al., у пат. США № 4603044 описують гепатоцит-спрямовану систему доставки везикули, що має специфічність до гепатобілярних рецепторів, асоційованих із специалізованими метаболічними клітинами печінки.

При більш загальному підході до націлювання на тканини клітини-мішені попередньо мітять біотинілованими антитілами, специфічними до ліганду, експресованого такою клітиною-мішенню (Harasym et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)). Після елімінації із плазми вільного антитіла вводять ліпосоми, кон'юговані зі стрептавідином. В інших методах націлюючи антитіла прикріплюють безпосередньо до ліпосом (Harasym et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)).

Нейтралізуючі антитіла anti-IL-22RA і партнери зв'язування з активністю зв'язування IL-22 або IL-20, або розчинний рецептор IL-22RA можна інкапсулювати в ліпосоми стандартними методами мікроінкапсулювання білків (див., наприклад, Anderson et al., *Infect. Immun.* 31:1099 (1981), Anderson et al., *Cancer Res.* 50:1853 (1990), and Cohen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1063:95 (1991), Alving et al., "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies", in *Liposome Technology*, 2nd Edition, Vol. III, Gregoriadis (ed.), page 317 (CRC Press 1993), Wassef et al., *Meth. Enzymol.* 149:124 (1987)). Як зазначалось вище, терапевтично корисні ліпосоми можуть містити ряд компонентів. Наприклад, ліпосоми можуть включати ліпідні деривати полі(етиленгліколю) (Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Для підтримання високих системних рівнів терапевтичних білків були розроблені мікросфери із полімеру, здатного деградувати. Мікросфери виготовляють з таких здатних деградувати полімерів, як полі(співполімер лактиду з гліколідом) (PLG), поліангідріди, полі(складні ортефіри), полімери біологічно нерозкладного етилвінілацетату, в яких білки є заключаєними в такий полімер (Gombotz and Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery", in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), pages 51-93 (CRC Press 1995); Roskos and Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery", in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), pages 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus et al., *Science* 281:1161 (1998); Putney and Burke, *Nature Biotechnology* 16:153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548 (1998)). Для внутрішньовенного введення терапевтичних білків носіями також можуть служити наносфери з поліетиленгліколевим покриттям (див., наприклад, Gref et al., *Pharm. Biotechnol.* 10:167 (1997)).

Даний винахід також розглядає хімічно модифіковані антитіла anti-IL-22RA або партнери зв'язування, наприклад антитіла anti-IL-22RA або роз-

чинний рецептор IL-22RA, зв'язаний полімером, як описувалось вище.

Фахівці можуть розробляти й інші лікарські форми, як описано, наприклад, Ansel and Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995), and Ranade and Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

Даний винахід розглядає композиції антитіл anti-IL-22 і способи терапевтичного застосування описаних тут антитіл, пептиду або поліпептиду. Такі композиції додатково включають носій. Носій може бути традиційним органічним або неорганічним. Прикладами носіїв є вода, буферний розчин, спирт, пропіленгліколь, макрогол, кунжутна олія, кукурудзяна олія тощо.

11. Виведення трансгенних мишей

В осередках псоріатичного ураження людини виявили надмірну експресію IL-22 та IL-20, що дає можливість припустити, що IL-22, як і IL-20, також бере участь у псоріазі людини. До того ж, надмірна експресія IL-22 та IL-20 у трансгенних мишей виявлялась у епідермальному потовщенні та ураженні імункомпетентних клітин, що є показником псоріатичного фенотипу, а додаткова ін'єкція IL-22 нормальним мишам виявлялась у епідермальному потовщенні та ураженні імункомпетентних клітин, що є показником псоріатичного фенотипу, який зникає під дією антагоніста zcytor16 (IL-22RA2) розчинного рецептора. Так, дані *in vivo* дають додаткову підставу припустити, що прозапальний IL-22 бере участь у псоріазі. А якщо так, то антагоністи активності IL-22, наприклад запропоновані моноклональні і нейтралізуючі антитіла проти людського IL-22RA, а також розчинні рецептори IL-22RA є корисними при лікуванні запальних хвороб, зокрема в ролі антагоністів до IL-22 та IL-20 при лікуванні псоріазу. Крім того, антагоністи активності IL-22, наприклад розчинні рецептори IL-22RA та антитіла до них, в тому числі запропоновані моноклональні і нейтралізуючі антитіла проти людського IL-22RA, є корисними при лікуванні інших запальних хвороб, наприклад в ролі агентів, що зв'язують, блокують, інгібують, зменшують, протидіють або нейтралізують IL-22 та IL-20 при лікуванні atopічного дерматиту, ЗХК, коліту, ендотоксикозу, артриту, ревматоїдного артриту, псоріатичного артриту, респіраторного захворювання дорослих, септичного шоку, поліорганної недостатності, запального ураження легенів, наприклад астми або бронхіту, бактеріальної пневмонії, псоріазу, екземи, atopічного і контактного дерматиту, ЗХК, наприклад виразкового коліту та хвороби Крона.

Згідно з одним аспектом, даний винахід пропонує спосіб продукування антитіла до поліпептиду, який передбачає вакцинацію тварини поліпептидом, вибраним з групи, в яку входять: (а) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 1 (Pro) - 6 (Asp) послідовності SEQ ID NO:3; (б) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 26 (Ser) - 32 (Pro) послідовності SEQ ID NO:3; (в) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 41 (Lys) - 47 (Asp) послідовності

SEQ ID NO:3; (г) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 49 (Val) - 62 (Cys) послідовності SEQ ID NO:2; (д) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 41 (Lys) - 62 (Cys) послідовності SEQ ID NO:3; (е) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 84 (Ala) - 97 (Ser) послідовності SEQ ID NO:3; (є) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 103 (Thr) - 108 (Asp) послідовності SEQ ID NO:3; (ж) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 130 (Arg) - 135 (His) послідовності SEQ ID NO:3; (з) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 164 (Gly) - 166 (Lys) послідовності SEQ ID NO:3; (и) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 175 (Tyr) - 179 (Glu) послідовності SEQ ID NO:3; (і) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 193 (Lys) - 196 (Ala) послідовності SEQ ID NO:3; (ї) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 203 (Lys) - 209 (Thr) послідовності SEQ ID NO:3; (й) поліпептид, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:3; та (к) поліпептид, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:4; при цьому згаданий поліпептид викликає імунну реакцію у тварини і продукує антитіло; виділення цього антитіла з тварини, при цьому згадане антитіло специфічно зв'язується з поліпептидом IL-22RA (SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:3); і зменшення активності або IL-20 (SEQ ID NO:8), або IL-22 (SEQ ID NO:6). В одному з варіантів запропоновано спосіб, описаний вище, в якому антитіло, що продукується цим способом, зменшує прозапальну активність або IL-20 (SEQ ID NO:8) або IL-22 (SEQ ID NO:6). В іншому варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому антитіло, що продукується цим способом, нейтралізує взаємодію або IL-20 (SEQ ID NO:8), або IL-22 (SEQ ID NO:6) з IL-22RA (SEQ ID NO:2). Ще в одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому нейтралізація антитілом визначається за нейтралізацією або IL-20 (SEQ ID NO:8), або IL-22 (SEQ ID NO:6) у клітинному аналізі *in vivo* на нейтралізацію. Ще в одному варіанті винаходу запропоновано спосіб, описаний вище, в якому антитіло, що продукується цим способом, зменшує прозапальну активність і IL-20 (SEQ ID NO:8), і IL-22 (SEQ ID NO:6). Ще в одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому антитіло, що продукується цим способом, нейтралізує взаємодію і IL-20 (SEQ ID NO:8), і IL-22 (SEQ ID NO:6) з IL-22RA (SEQ ID NO:2). Ще в одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому нейтралізація антитілом визначається за нейтралізацією і IL-20 (SEQ ID NO:8), і IL-22 (SEQ ID NO:6) у клітинному аналізі *in vivo* на нейтралізацію.

Згідно з іншим аспектом, винахід пропонує антитіло, продуковане описаним способом, яке зв'язується з поліпептидом послідовності SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:3. В одному варіанті запропоновано антитіло, описане вище, яке є а) поліклональним антитілом, б) моноклональним антитілом миши, в) гуманізованим антитілом, синтезованим з антитіла «б»), г) фрагментом антитіла, або д) моноклональним антитілом людини. В іншому варіанті запропоновано антитіло, описане вище, яке

додатково включає радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, пептидну мітку, магнітну частинку або токсин. Ще в одному варіанті запропоновано антитіло, описане вище, яке додатково включає пегілювання. В іншому варіанті запропоновано антитіло, описане вище, яке є а) поліклональним антитілом, б) моноклональним антитілом миши, в) гуманізованим антитілом, синтезованим з антитіла «б»), г) фрагментом антитіла, або д) моноклональним антитілом людини. В іншому варіанті запропоновано антитіло, описане вище, яке додатково включає радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, пептидну мітку, магнітну частинку, лікарський засіб або токсин. Ще в одному варіанті запропоновано антитіло, описане вище, яке додатково включає пегілювання.

Згідно з наступним аспектом, винахід пропонує антитіло або фрагмент антитіла, яке зв'язується з поліпептидом, що містить послідовність амінокислотних залишків, представлену у послідовності SEQ ID NO:3, і зменшує прозапальну активність або IL-20 (SEQ ID NO:8) або IL-22 (SEQ ID NO:6). В одному варіанті запропоновано антитіло або фрагмент антитіла, описане вище, яке зменшує прозапальну активність і IL-20 (SEQ ID NO:8), і IL-22 (SEQ ID NO:6). В іншому варіанті запропоновано антитіло або фрагмент антитіла, описане вище, яке є а) поліклональним антитілом, б) моноклональним антитілом миши, в) гуманізованим антитілом, синтезованим з антитіла «б»), г) фрагментом антитіла, або д) моноклональним антитілом людини. Ще в одному варіанті запропоновано антитіло або фрагмент антитіла, описане вище, яке додатково включає радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, пептидну мітку, магнітну частинку, лікарський засіб або токсин. Ще в одному варіанті запропоновано антитіло або фрагмент антитіла, описане вище, яке додатково включає пегілювання. В наступному варіанті варіанті запропоновано антитіло або фрагмент антитіла, описане вище, причому антитіло або фрагмент антитіла являє собою а) поліклональне антитіло, б) моноклональне антитіло миши, в) гуманізоване антитіло, синтезоване з антитіла «б»), г) фрагмент антитіла, або д) моноклональне антитіло людини. Ще в одному варіанті запропоновано антитіло або фрагмент антитіла, описане вище, причому антитіло додатково включає радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, пептидну мітку, магнітну частинку, лікарський засіб або токсин. Ще в одному варіанті запропоновано антитіло або фрагмент антитіла, описане вище, причому антитіло додатково включає пегілювання.

Згідно з ще одним аспектом, даний винахід пропонує спосіб зменшення або інгібування викликаного IL-22, або IL-20 проліферації або диференціації кровотворних клітин і попередників кровотворних клітин, який передбачає культивування клітин кісткового мозку або клітини периферичної крові за допомогою композиції, що містить певну кількість описаного тут антитіла, достатню для

зменшення проліферації або диференціації кровотворних клітин у кістковому мозку або клітин периферичної крові у порівнянні з клітинами кісткового мозку або периферичної крові, культивованими за відсутності такого антитіла. В одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому кровотворними клітинами та кровотворними клітинами-попередниками є лімфоїдні клітини. В іншому варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому лімфоїдні клітини являють собою макрофаги або Т-клітини.

Згідно з іншим аспектом, даний винахід пропонує спосіб зменшення викликаного або IL-22, або IL-20 запалення, який передбачає введення ссавцю із запаленням кількості композиції, що містить описане антитіло, достатньої для зменшення запалення.

Згідно з ще одним аспектом, даний винахід пропонує спосіб зменшення або інгібування викликаного IL-22 та IL-20 проліферації або диференціації кровотворних клітин і попередників кровотворних клітин, який передбачає культивування клітин кісткового мозку або клітини периферичної крові за допомогою композиції, що містить певну кількість описаного тут антитіла, достатню для зменшення проліферації або диференціації кровотворних клітин у кістковому мозку або клітин периферичної крові у порівнянні з клітинами кісткового мозку або периферичної крові, культивованими за відсутності такого антитіла. В одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому кровотворними клітинами та кровотворними клітинами-попередниками є лімфоїдні клітини. В іншому варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому лімфоїдні клітини являють собою макрофаги або Т-клітини.

Згідно з іншим аспектом, даний винахід пропонує спосіб зменшення викликаного IL-22 та IL-20 запалення, який передбачає введення ссавцю із запаленням кількості композиції, що містить описане антитіло, достатньої для зменшення запалення.

Згідно з ще одним аспектом, даний винахід пропонує спосіб зменшення або інгібування викликаного IL-22 та IL-20 проліферації або диференціації кровотворних клітин і попередників кровотворних клітин, який передбачає культивування клітин кісткового мозку або клітини периферичної крові за допомогою композиції, що містить певну кількість описаного тут антитіла або фрагмента антитіла, достатню для зменшення проліферації або диференціації кровотворних клітин у кістковому мозку або клітин периферичної крові у порівнянні з клітинами кісткового мозку або периферичної крові, культивованими за відсутності такого антитіла або фрагмента антитіла. В одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому кровотворними клітинами та кровотворними клітинами-попередниками є лімфоїдні клітини. В іншому варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому лімфоїдні клітини являють собою макрофаги або Т-клітини.

Згідно з іншим аспектом, даний винахід пропонує спосіб зменшення викликаного IL-22 та IL-20 запалення, який передбачає введення ссавцю із

запаленням кількості композиції, що містить описане антитіло або фрагмент антитіла, достатньої для зменшення запалення.

Згідно з ще одним аспектом, даний винахід пропонує спосіб зменшення або інгібування викликаного IL-22 та IL-20 проліферації або диференціації кровотворних клітин і попередників кровотворних клітин, який передбачає культивування клітин кісткового мозку або клітини периферичної крові за допомогою композиції, що містить певну кількість описаного тут антитіла або фрагмента антитіла, достатню для зменшення проліферації або диференціації кровотворних клітин у кістковому мозку або клітин периферичної крові у порівнянні з клітинами кісткового мозку або периферичної крові, культивованими за відсутності такого антитіла. В одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому кровотворними клітинами та кровотворними клітинами-попередниками є лімфоїдні клітини. В іншому варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому лімфоїдні клітини являють собою макрофаги або Т-клітини.

Згідно з іншим аспектом, даний винахід пропонує спосіб зменшення викликаного IL-22 та IL-20 запалення, який передбачає введення ссавцю із запаленням кількості композиції, що містить описане антитіло або фрагмент антитіла, достатньої для зменшення запалення.

Згідно з ще одним аспектом, даний винахід пропонує спосіб супресії запальної реакції у ссавця із запаленням, який передбачає: 1) визначення рівня білка А сироваткового ампліоїду; 2) введення композиції, що містить описані антитіло або фрагмент антитіла у фармацевтично прийнятному носії; 3) визначення рівня білка А сироваткового ампліоїду після введення композиції; 4) порівняння рівня білка А сироваткового ампліоїду етапу «1») з рівнем білка А сироваткового ампліоїду етапу «3»), при цьому відсутність збільшення або зменшення рівня білка А сироваткового ампліоїду є показником супресії запальної реакції.

Згідно з наступним аспектом, даний винахід пропонує спосіб лікування ссавця, ураженого запальною хворобою, в якій IL-22 або IL-20 відіграє певну роль, який передбачає: введення ссавцю антагоніста IL-22 або IL-20 для зменшення запалення, причому згаданий антагоніст включає (i) антитіло, фрагмент антитіла або зв'язуючий поліпептид, який специфічно зв'язує поліпептид або фрагмент поліпептиду IL-22RA (SEQ ID NO:3), або (ii) поліпептид або фрагмент поліпептиду IL-22RA (SEQ ID NO:3); і в результаті якого (способу) зменшується запальна активність або IL-22 (SEQ ID NO:6) або IL-20 (SEQ ID NO:8). В одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому запальна хвороба є хронічною. В іншому способі запропоновано спосіб, описаний вище, в якому хронічною запальною хворобою може бути ЗХК, виразковий коліт, хвороба Крона, артрит, atopічний дерматит або псоріаз. В ще одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому запальна хвороба є гострою. В іншому способі запропоновано спосіб, описаний вище, в якому гострою запальною хворобою може бути ендотоксикоз, септичний шок, токсичний шок або інфек-

ційна хвороба. І ще в одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому антитіло, фрагмент антитіла або зв'язуючий поліпептид додатково включає радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, пептидну мітку, магнітну частинку, лікарський засіб або токсин.

Згідно з наступним аспектом, даний винахід пропонує спосіб лікування ссавця, ураженого запальною хворобою, в якій IL-22 та IL-20 відіграє певну роль, який передбачає: введення ссавцю антагоніста і IL-22, і IL-20 для зменшення запалення, причому згаданий антагоніст включає (i) антитіло, фрагмент антитіла або зв'язуючий поліпептид, який специфічно зв'язує поліпептид або фрагмент поліпептиду IL-22RA (SEQ ID NO:3), або (ii) поліпептид або фрагмент поліпептиду IL-22RA (SEQ ID NO:3); і в результаті якого (способу) зменшується запальна активність і IL-22 (SEQ ID NO:6), і IL-20 (SEQ ID NO:8). В одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому запальна хвороба є хронічною. В іншому способі запропоновано спосіб, описаний вище, в якому хронічною запальною хворобою може бути ЗХК, виразковий коліт, хвороба Крона, артрит, atopічний дерматит або псоріаз. В ще одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому запальна хвороба є гострою. В іншому способі запропоновано спосіб, описаний вище, в якому гострою запальною хворобою може бути ендотоксикоз, септичний шок, токсичний шок або інфекційна хвороба. І ще в одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому антитіло, фрагмент антитіла або зв'язуючий поліпептид додатково включає радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, пептидну мітку, магнітну частинку, лікарський засіб або токсин.

Згідно з ще одним аспектом, даний винахід пропонує антитіло, в тому числі моноклональне антитіло, яке специфічно зв'язується з антигенним епітопом людського IL-22RA (SEQ ID NO:3), вибраного з групи, яка включає: (а) епітоп, що складається з амінокислотних залишків 1 (Pro) - 6 (Asp) послідовності SEQ ID NO:3; (б) епітоп, що складається з амінокислотних залишків 26 (Ser) - 32 (Pro) послідовності SEQ ID NO:3; (в) епітоп, що складається з амінокислотних залишків 41 (Lys) - 47 (Asp) послідовності SEQ ID NO:3; (г) епітоп, що складається з амінокислотних залишків 49 (Val) - 62 (Cys) послідовності SEQ ID NO:2; (д) епітоп, що складається з амінокислотних залишків 41 (Lys) - 62 (Cys) послідовності SEQ ID NO:3; (е) епітоп, що складається з амінокислотних залишків 84 (Ala) - 97 (Ser) послідовності SEQ ID NO:3; (є) епітоп, що складається з амінокислотних залишків 103 (Thr) - 108 (Asp) послідовності SEQ ID NO:3; (ж) епітоп, що складається з амінокислотних залишків 130 (Arg) - 135 (His) послідовності SEQ ID NO:3; (з) епітоп, що складається з амінокислотних залишків 164 (Gly) - 166 (Lys) послідовності SEQ ID NO:3; (и) поліпептид, що складається з амінокислотних залишків 175 (Tyr) - 179 (Glu) послідовності SEQ ID NO:3; (і) епітоп, що складається з амінокислотних залишків 193 (Lys) - 196 (Ala) послідовності SEQ ID NO:3; (i')

епітоп, що складається з амінокислотних залишків 203 (Lys) - 209 (Thr) послідовності SEQ ID NO:3; (й) епітоп, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:3; та (к) епітоп, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:4; при цьому згадане антитіло зменшує або нейтралізує активність або IL-22 (SEQ ID NO:6), або IL-20 (SEQ ID NO:8). В одному варіанті винаходу запропоновано антитіло, описане вище, яке зменшує або нейтралізує активність і IL-22 (SEQ ID NO:6), і IL-20 (SEQ ID NO:8). В іншому варіанті запропоновано антитіло, описане вище, що являє собою антитіло, вибране з групи, що складається з: а) моноклонального антитіла миши; б) гуманізованого антитіла, синтезованого з «а»); в) фрагмента антитіла і г) моноклонального антитіла людини. Ще в одному варіанті запропоновано антитіло, описане вище, яке додатково включає пегілування.

Згідно з наступним аспектом, даний винахід пропонує спосіб лікування у суб'єкта патологічного стану, пов'язаного з активністю IL-22RA, який передбачає введення суб'єкту ефективної кількості описаного антитіла для лікування згаданого патологічного стану. В одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому патологічний стан являє собою стан хронічного запалення. В іншому способі запропоновано спосіб, описаний вище, в якому станом хронічного запалення може бути ЗХК, виразковий коліт, хвороба Крона, артрит, atopічний дерматит або псоріаз. В ще одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому патологічний стан являє собою стан гострого запалення. В іншому способі запропоновано спосіб, описаний вище, в якому станом гострого запалення може бути ендотоксикоз, септичний шок, токсичний шок або інфекційна хвороба.

Згідно з ще одним аспектом, даний винахід пропонує спосіб лікування ссавця, ураженого запальною хворобою, в якій IL-22RA відіграє певну роль, який передбачає: введення ссавцю антагоніста IL-22RA для зменшення запалення, причому згаданий антагоніст включає антитіло, фрагмент антитіла або зв'язуючий поліпептид, який специфічно зв'язує поліпептид або фрагмент поліпептиду IL-22RA (SEQ ID NO:3), в результаті чого запальна активність зменшується. В одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому запальна хвороба є хронічною. В іншому способі запропоновано спосіб, описаний вище, в якому хронічною запальною хворобою може бути ЗХК, виразковий коліт, хвороба Крона, артрит, atopічний дерматит або псоріаз. В ще одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому запальна хвороба є гострою. В іншому способі запропоновано спосіб, описаний вище, в якому гострою запальною хворобою може бути ендотоксикоз, септичний шок, токсичний шок або інфекційна хвороба. Ще в одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в якому антитіло, фрагмент антитіла або зв'язуючий поліпептид додатково включає радіонуклід, фермент, субстрат, кофактор, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, пептидну мітку, магнітну частинку, лікарський засіб або токсин. І ще в одному варіанті запропоновано спосіб, описаний вище, в

якому антитіло, фрагмент антитіла або зв'язуючий поліпептид додатково включає пегілування.

Згідно з іншим аспектом, даний винахід пропонує спосіб зменшення запалення, який передбачає введення ссавцю із запаленням кількості композиції, що містить описане антитіло, достатньої для зменшення запалення.

Далі винахід ілюструється наступними необмежуваними прикладами.

Приклад 1

Очищення поліпептиду IL-22RA2-Fc4 від трансфікованих клітин BHK 570

Якщо не зазначено інакше, всі операції здійснювали при температурі 4°C. Для очищення поліпептиду IL-22RA2 (зрілого поліпептиду розчинного рецептора із залишків 23 - 231 послідовності SEQ ID NO:13; поліпептидів, представлених у послідовності SEQ ID NO:12), що містив C-кінцеве злиття з людським Fc4 (SEQ ID NO:14), позначене як IL-22RA2-Fc4, застосовували наступну процедуру. Приблизно 16500 мл кондиціонованого середовища із клітин BHK 570, трансфікованих IL-22RA2-Fc4, фільтрували через стерильний фільтр з порами 0,2 мкм і потім додавали розчин інгібіторів протеази до кінцевих концентрацій 0,001 mM лейпептину (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), 0,001 mM пепстатину (Boehringer-Mannheim) та 0,4 mM пефаблоку (Boehringer-Mannheim). Пакували колонку з пористим білком A50 (об'єм шару 20 мл, Applied Biosystems) і промивали 400 мл PBS (Gibco/BRL). Через цю колонку пропускали додане кондиціоноване середовище при швидкості потоку 15 мл/хвил, після чого промивали 800 мл PBS (Gibco/BRL). IL-22RA2-Fc4 елюювали з колонки за допомогою 0,1 М гліцину, pH 3,0, і 5 мл фракцій збирали прямо в 0,5 мл 2M Tris pH 7,8 для регулювання кінцевого pH у фракціях до 7,4.

Показники колонки аналізували вестерн-блотингом, зменшуючи поліакриламідні гелі початкового середовища і пропуск колонки при SDS-електрофорезі у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE). При вестерн-блотингу використовували антитіло проти людського IgG HRP (Amersham), який показав імунореактивний білок при 60000 Да у початковому середовищі, і нічого не показав у каналі, що дає можливість припустити повне захоплення. Елюйовані фракції білка A50 аналізували, зменшуючи гель при SDS-PAGE. Цей гель показував інтенсивно забарвлену барвником кумасі смугу при 60000 Да у фракціях 3-11. Фракції 3-11 збирали у пули. Елююючий пул білка A50 концентрували від 44 мл до 4 мл за допомогою 30000 Да центрифужного концентратора Ultrafree Biomax (об'ємом 15 мл, Millipore). Гель-фільтраційну колонку на гелі Sephacryl S-300 (об'єм шару 175 мл; Pharmacia) промивали 350 мл PBS (Gibco/BRL). Концентрований пул упорскували на колонку зі швидкістю 1,5 мл/хвил, потім промивали 225 мл PBS (Gibco/BRL). Елюйовані піки збирали у 2 мл фракціях.

Елюйовані фракції аналізували за зменшенням або незменшенням забарвлених сріблом гелів (Geno Technology) при аналізі SDS-PAGE. Зменшення забарвлених сріблом гелів SDS-PAGE показувало інтенсивно забарвлену смугу при 60000

Да у фракціях 14-31, тоді як незменшення забарвлених сріблом гелів SDS-PAGE показувало інтенсивно забарвлену смугу при 160000 Да у фракціях 14-31. Фракції 1-13 показували багато смуг різних розмірів. Фракції 14-31 збирали у пули, концентрували до 22 мл за допомогою 30000 Да центрифужного концентратора Ultrafree Biomax (об'ємом 15 мл, Millipore). Цей концентрат фільтрували через стерильний фільтр Acrodisc з порами 0,2 мкм (Pall Corporation).

Концентрацію білка концентрованих зібраних у пули фракцій визначали BCA-методом (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination) (Pierce, Rockford, IL), матеріал ділили на аліквоти і зберігали при -80°C за стандартними процедурами. Концентрація об'єднаних у пул фракцій становила 1,50 мг/мл.

Приклад 2

Конструювання BaF3-клітин, експресуючих рецептор CRF2-4 (клітин BaF3/CRF2-4), та BaF3-клітин, експресуючих рецептор CRF2-4 за допомогою рецептора IL-22RA (клітин BaF3/CRF2-4/IL-22RA)

BaF3-клітини, експресуючі повнорозмірний рецептор CRF2-4, конструювали за допомогою 30 мкг експресуючого вектора CRF2-4, описаного нижче. BaF3-клітини, експресуючі рецептор CRF2-4, позначили як BaF3/CRF2-4. Ці клітини використовували як контроль, потім трансфектували повнорозмірним рецептором IL-22RA (пат. США № 5965704) і використовували для конструювання екрану для активності IL-22, як описано нижче.

А. Конструювання BaF3-клітин, експресуючих рецептор CRF2-4

З бібліотеки кДНК клітинної лінії Daudi виділяли повнорозмірну послідовність кДНК CRF2-4 (Genbank, реєстраційний номер Z17227) і потім клонували в експресуючий вектор pZP7P.

BaF3, інтерлейкін-3 (IL-3)-залежну прелімфоїдну клітинну лінію, синтезовану з кісткового мозку миши (Palacios and Steinmetz, Cell 41:727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cell. Biol. 6:4133-4135, 1986), утримували у повному середовищі (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS), доповненому 10% термоінактивованою фетальною телячою сироваткою, 2 нг/мл IL-3 миши (mIL-3) (R & D, Minneapolis, MN), 2 мМ L-glutaMax-1™ (Gibco BRL), 1 мМ пірувату натрію (Gibco BRL) та антибіотиками PSN (GIBCO BRL). Перед електропорацією синтезували CRF2-4/pZP7P і очищали за допомогою набору Qiagen Maxi Prep kit (Qiagen) за інструкцією виробника. Для електропорації BaF3-клітини промивали один раз у безсироватковому середовищі RPMI і потім ресуспендували у безсироватковому середовищі RPMI при щільності клітин 10^7 клітин/мл. Один мілілітр ресуспендованих BaF3-клітини змішували з 30 мкг плазмідної ДНК CRF2-4/pZP7P і переносили в окремі одноразові електропораційні камери (GIBCO BRL). Після 15-хвилинної інкубації при кімнатній температурі клітини піддавали двом послідовним ударам (800 IFad/300 V; 1180 IFad/300 V), що надходили від електропораційного пристрою (CELL-PORATOR™; GIBCO BRL). Після 5-хвилинного часу відновлення електропоровані клітини переносили у 50 мл пов-

ного середовища і поміщали в інкубатор на 15-24 години (37°C, 5% CO₂). Клітини потім центрифугували і ресуспендували у 50 мл повного середовища, що містило 2 мкг/мл пуроміцину у колбі T-162 для виділення пуроміцин-стійкого пулу. Пули трансфектованих BaF3-клітин, які надалі матимуть назву «клітини BaF3/CRF2-4», аналізували на сигнальну здатність, як описано нижче. Крім того, ці клітини потім трансфектували рецептором IL-22RA, про що йтиметься далі.

В. Конструювання BaF3-клітин, експресуючих рецептори CRF2-4 та IL-22RA

BaF3-клітини, експресуючі повнорозмірний рецептор IL-22RA, конструювали, як описано вище, за допомогою 30 мкг експресуючого вектора IL-22RA. Після видалення трансфектанти селектували, використовуючи 200 мкг/мл зеоцину і 2 мкг/мл пуроміцину. Клітини BaF3/CRF2-4, експресуючі рецептор IL-22RA, позначили як клітини BaF3/CRF2-4/IL-22RA. Ці клітини застосовували для скринінгу активності IL-22, а також активності антагоніста IL-22RA2.

Приклад 3

Скринування на активність антагоніста IL-22 за допомогою клітин BaF3/CRF2-4/IL-22RA в аналізі на проліферацію за допомогою барвника Alamar Blue

А. Скринування на активність IL-22 за допомогою клітин BaF3/CRF2-4/IL-22RA в аналізі на проліферацію за допомогою барвника Alamar Blue

Очищений IL-22-CEE (Приклад 4) використовували для тестування на наявність проліферативної активності. В цьому аналізі використовували очищений IL-22RA2-Fc4 (Приклад 1) для протидії проліферативній реакції IL-22.

Клітини BaF3/CRF2-4/IL-22RA центрифугували у повному середовищі (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS), доповненому 10% термоінактивованою фетальною телячою сироваткою, 2 нг/мл IL-3 миши (mIL-3) (R & D, Minneapolis, MN), 2 мМ L-glutaMax-1™ (Gibco BRL), 1 мМ пірувату натрію (Gibco BRL) та антибіотиками PSN (GIBCO BRL), але без mIL-3 (надалі «середовище без mIL-3»). Клітини центрифугували і тричі промивали, щоб переконатися, що mIL-3 видалено. Потім клітини рахували у гематиметрі. Клітини висівали у 96-лунковий планшет по 5000 клітин на лунку при об'ємі 100 мкл на лунку, використовуючи середовище без mIL-3.

Проліферацію клітин BaF3/CRF2-4/IL-22RA визначали за допомогою білка IL-22-CEE, розбавленого середовищем без mIL-3 до концентрацій 50, 10, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,13, 0,06 нг/мл. 100 мкл такого розбавленого білка додавали до клітин BaF3/CRF2-4/IL-22RA. Загальний аналізований об'єм становив 200 мкл. Аналітичні планшети інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 3 днів і додавали барвник Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) по 20 мкл/лунку. Планшети знову інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 24 годин. Alamar Blue служить флюорометричним індикатором, оснований на кількості живих клітин, і є, таким чином, безпосереднім вимірюванням проліферації клітин у порівнянні з негативним контролем. Планшети знову інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 24 годин.

Планшети зчитували на планшетному рідері Fmax™ (Molecular Devices Sunnyvale, CA) за допомогою програми SoftMax™ Pro, при довжинах хвилі 544 нм (Збудження) та 590 нм (Емісія). Результати підтвердили дозозалежну проліферативну реакцію клітин BaF3/CRF2-4/IL-22RA на IL-22-CEE. Ця визначена реакція була 15-кратно вище фону на верхньому кінці при концентрації 50 нг/мл аж до 2-кратної індукції на нижньому кінці при концентрації 0,6 нг/мл. BaF3-клітини дикого типу та клітини BaF3/CRF2-4 не проліферували під дією IL-22-CEE, що свідчило про те, що IL-22 є специфічним до гетеродимерного рецептора CRF2-4/IL-22RA. Для визначення факту, чи здатний IL-22RA2 протидіяти активності IL-22, описаний ще аналіз повторювали, використовуючи очищений розчинний IL-22RA2/Fc4. При поєднанні IL-22 з IL-22RA2 при концентрації 10 нг/мл, реакція на IL-22 при всіх концентраціях була зменшена до фону. Той факт, що присутність розчинного IL-22RA2 усуває проліферативний вплив IL-22, свідчить про те, що він є ефективним антагоністом ліганду IL-22. Цей аналіз можна застосовувати для тестування інших антагоністів активності IL-22, наприклад антитіл anti-IL-22RA.

Приклад 4

Очищення IL-22-CEE від клітин BHK 570

Якщо не зазначено інакше, всі операції здійснювали при температурі 4°C. Для очищення поліпептиду IL-22, що містив С-кінцеву мітку GluGlu (EE) (SEQ ID NO:15 або SEQ ID NO:16) застосовували наступну процедуру. Кондиціоноване середовище з BHK-клітинами, експресуючими IL-22-CEE, концентрували за допомогою спірального картриджа S10Y3 на ProFlux A30. До цього концентрованого кондиціонованого середовища додавали розчин інгібітора протеази до кінцевої концентрації 2,5 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 0,003 мМ лейпептину (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), 0,001 мМ пепстатину (Boehringer-Mannheim) та 0,4 мМ пефаблоку (Boehringer-Mannheim). Проби видаляли для аналізу, і сумарний об'єм заморожували до -80°C до початку очищення. Загальні концентрації білка-мішені у концентрованому кондиціонованому середовищі визначали аналізами SDS-PAGE та Вестерн-блот з використанням кон'югованого антитіла anti-EE HRP.

Приблизно 100 мл колонки anti-EE G-Sepharose (отриманої, як описано нижче) заливали у скляну колонку Waters AP-5, 5×10 см. Колонку пакували і зрівнювали на BioCad Sprint (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) за допомогою буферного фосфатного розчину (PBS) з pH 7,4. Концентроване кондиціоноване середовище розморожували, фільтрували через стерильний фільтр з отворами 0,2 мкм, pH регулювали до 7,4, потім завантажували на колонку на всю ніч при швидкості потоку приблизно 1 мл/хвил. Колонку промивали 10 колонковими об'ємами PBS (pH 7,4), потім елюювали через пробку з 200 мл PBS (pH 6,0), що містив 0,5 мг/мл EE-пептиду (Anaspec, San Jose, CA) при швидкості 5 мл/хвил. Застосовуваний EE-пептид мав послідовність EYMPME (SEQ ID NO:15). Колонку промивали 10 колонко-

вими об'ємами PBS, потім елюювали з 5 колонковими об'ємами 0,2 М гліцину, pH 3,0. pH гліциноелююваної колонки регулювали до 7,0 двома колонковими об'ємами 5X PBS, потім зрівнювали у PBS (pH 7,4). 5 мл фракцій збирали протягом всієї хроматографії елююванням і перевіряли поглинання при довжині хвилі 280 нм і 215 нм; канал і водняні пули також зберігали і аналізували. Фракції з елююючими піками EE-поліпептиду аналізували на білок-мішень методом SDS-PAGE із забарвленням сріблом та Вестерн-блотингом з використанням кон'югованого антитіла anti-EE HRP. Елююючі фракції з поліпептидом, що становить інтерес, збирали у пул і концентрували від 60 мл до 5,0 мл за допомогою мембранного концентратора з границями відсікання молекулярної маси до 10 кДа (Millipore, Bedford, MA) за інструкціями виробника.

Для відокремлення IL-22-CEE від інших коочищувальних білків об'єднані в пул концентровані елююючі фракції з поліпептидом піддавали дії POROS HQ-50 (міцної аніонобмінної смоли від PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) при pH 8,0. Колонку заливали і пакували на BioCad Sprint. Колонку заряджали протиіонами, потім зрівнювали у 20 мМ Tris pH 8,0 (Tris (гідроксиметиламінометан)). Пробу розбавляли 1:13 (для зменшення іонної сили буфера PBS), потім завантажували на колонку з Poros HQ при швидкості 5 мл/хвил. Колонку промивали 10 колонковими об'ємами 20 мМ Tris pH 8,0, потім елюювали за допомогою 40 колонкових об'ємів градієнту 20 мМ Tris/1 М хлорид натрію (NaCl) при швидкості 10 мл/хвил. 1,5 мл фракцій збирали протягом всієї хроматографії елююванням і перевіряли поглинання при довжині хвилі 280 нм і 215 нм. Фракції з елююючими піками аналізували методом SDS-PAGE із забарвленням сріблом. Фракції, що становили інтерес, об'єднували в пул і концентрували до 1,5-2 мл за допомогою мембранного концентратора з границями відсікання молекулярної маси до 10 кДа (Millipore, Bedford, MA) за інструкціями виробника.

Для відокремлення поліпептиду IL-22-CEE від пептиду, що не містив EE, та будь-яких контамінуючих коочищувальних білків об'єднані в пул концентровані елююючі фракції піддавали гел'фільтраційній хроматографії на колонці Sephadex S200 (Pharmacia, Piscataway, NJ), 1,5×90 см, зрівнювали і завантажували у PBS при швидкості потоку 1,0 мл/хвил з використанням BioCad Sprint. 1,5 мл фракцій збирали протягом всієї хроматографії елююванням і перевіряли поглинання при довжині хвилі 280 нм і 215 нм. Фракції з елююючими піками аналізували методом SDS-PAGE із забарвленням сріблом і тільки найбільш чисті фракції об'єднували у пул. Отриманий матеріал являв собою очищений поліпептид IL-22-CEE.

Цей очищений матеріал нарешті очищали у 4-мілілітровій колонці ActiClean Etox (Sterogene) для видалення будь-яких ендотоксинів, що залишилися. Цю пробу пропускали через PBS-зрівноважену гравітаційну колонку чотири рази, потім колонку промивали одним 3-мілілітровим об'ємом PBS, який об'єднували у пул з «очищеною» пробкою.

Матеріал потім фільтрували через стерильний фільтр з порами 0,2 мкм і зберігали при -80°C до розділення на аліквоти.

При проведенні Вестерн-блот аналізу, аналізів методом SDS-PAGE із кумасі-забарвленням та забарвленням сріблом поліпептид IL-22-CEE мав вигляд однієї основної смуги. Концентрацію білка в очищеному матеріалі визначали BCA-методом (Pierce, Rockford, IL), матеріал ділили на аліквоти і зберігали при -80°C за стандартними процедурами.

Для приготування anti-EE Sepharose об'єм ша-ру 100 мл білка G-сефарозного гелю (Pharmacia, Piscataway, NJ) промивали 3 рази 100 мл PBS, що містив 0,02% азиду натрію, на фільтрувальній установці з порами 0,45 мкм, об'ємом 500 мл ф. «Nalge»». Гель промивали шістьма об'ємами 200 мМ триетаноламіну, pH 8,2 (TEA, Sigma, St. Louis, MO) і додавали рівний об'єм розчину антитіла EE, що містив 900 мкг антитіла. Після інкубування при 4°C всю ніч незв'язане антитіло видаляли, вимиваючи смола 5 об'ємами 200 мМ TEA, як описано вище. Смола ресуспендували у 2 об'ємах TEA, переносили у відповідний контейнер і додали розчинений у TEA диметилпілімідат-2HCl (Pierce, Rockford, IL) до кінцевої концентрації 36 мкг/мл білка G-сефарозного гелю. Гель струшували при кімнатній температурі 45 хвилин, і рідину видаляли за допомогою описаної вище фільтрувальної установки. Неспецифічні сайти на гелі потім блокували 10-хвилинним інкубуванням при кімнатній температурі з 5 об'ємами 20 мМ етаноламіну у 200 мМ TEA. Гель потім промивали 5 об'ємами PBS, що містив 0,02% азиду натрію, і зберігали в цьому розчині при 4°C.

Приклад 5

Вплив поліпептиду IL-22 in vivo

Мишей (саміць, C57BL/6N, віком 8 тижнів; Charles River Labs, Kingston, NY) ділили на три групи. Стандартними методами попередньо синтезували поліпептид IL-22 (SEQ ID NO:6), що експресує аденовірус. В день 0 батьківський або IL-22 аденовірус вводили першій (n=8) і другій (n=8) групам, відповідно, у вену хвоста, причому кожна миша отримувала дозу приблизно 1×10^{11} частинок в об'ємі приблизно 0,1 мл. Третя група лікування не отримувала. На день 12 мишей зважували і збирали кров. Проби крові піддавали повному аналізу і аналізували хімію сироватки. Статистично значущі підвищення кількостей нейтрофілів і тромбоцитів виявляли у пробах крові, взятих в групі мишей, яким був уведений аденовірус IL-22, порівняно з групою, якій вводили батьківський аденовірус. Крім того, у пробах крові, взятих в групі мишей, яким був уведений аденовірус IL-22, виявили значно зменшені кількості лімфоцитів і еритроцитів порівняно з групою, якій вводили батьківський аденовірус. До того ж, заражені аденовірусом IL-22 миші втратили масу тіла, тоді як миші, заражені батьківським аденовірусом, набрали масу. Крім того, на день 3 рівень IL-22 сироватки збільшився, а рівень глюкози зменшився. Таким чином, миші, заражені IL-22-аденовірусом, виявили гострофазну реакцію, яку також можна викликати іншими прозапальними цитокінами, наприклад

цитокінами TNF-альфа, IL-1бета і gp130. Гострофазна реакція - це сукупність швидких запальних реакцій, ініційованих молекулами розпізнавання образу. Білки гострої фази забезпечують підвищений захист від мікроорганізмів і модифікують запальні реакції в результаті впливу на спрямовану міграцію клітин і секрецію медіатора. Наприклад, SAA має сильну лейкоцит-активуючу функцію, в тому числі індукцію хемотоксичної активності, посилення адгезії лейкоцитів до ендотеліальних клітин і збільшення фагоцитозу. Розуміння факторів, що ініціюють і змінюють величину і тривалість гострофазної реакції, є важливим кроком у розвитку нових методів лікування інфекційних і запальних хвороб.

Отримані результати дають можливість припустити, що IL-22 впливає на гемопоєз, тобто утворення клітин крові in vivo. А якщо так, IL-22, можливо, має біологічну активність, що впливає на різні кровотворні стовбурові клітини, в результаті чого збільшуються або зменшуються певні диференційовані клітини крові у конкретній лінії диференціювання. Наприклад, виявляється, що IL-22 зменшує лімфоцити, що, вірогідно, обумовлено інгібуванням комітованих клітин-попередників, які породжують лімфоїдні клітини. IL-22 також зменшує еритроцити, що підтверджує думку про те, що IL-22, можливо, відіграє певну роль при анемії, інфекції, запаленні та/або імунopatологічних захворюваннях, в результаті впливу на клітини крові, що беруть участь у цих процесах. Антагоністи проти IL-22, наприклад антитіла або його розчинний рецептор IL-22RA2, можна було б застосовувати як терапевтичні реагенти при цих хворобах.

Більш того, експерименти з використанням IL-22-аденовірусу на мишах дають можливість припустити, що надекспресія IL-22 підвищує рівень нейтрофілів і тромбоцитів in vivo. Можливо, існують інші фактори (наприклад, цитокіни і гені-модифікатори), які беруть участь в реакціях на IL-22 у всьому організмі тварини. Тим не менш, ці дані підтверджують участь IL-22 у кровотворенні. Отже, IL-22 та його рецептори є підходящими реагентами/мішенями для діагнозу та лікування ряду розладів, наприклад запалення, розладів імунної системи, інфекції, анемії, раку кровотворної системи та інших видів раку тощо.

Приклад 6

Трансгенні миші, що експресують IL-22

А. Виведення трансгенних мишей, що експресують IL-22 миші

Стандартними методами синтезували фрагменти ДНК від трансгенного вектора, що містить 5'- і 3'-кінцеві фланкуючі послідовності лімфоїд-специфічного промотора E μ LCK, IL-22 миші (SEQ ID NO:10; поліпептид, представлений у SEQ ID NO:11), інтрон інсуліну II щура, кДНК IL-22 і послідовність поліаденілової кислоти гормону росту людини, і застосовували для мікроін'єкції в запліднені ооцити мишей B6C3f1 (Taconic, Germantown, NY) згідно із стандартним протоколом здійснення мікроін'єкції. Див., Hogan, B. et al., Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

Серед 154 мишенят ідентифікували двадцять п'ять трансгенних внаслідок мишиного IL-22 з лімфоїд-специфічним промотором E μ LCK. Одинадцять з цих трансгенних мишенят померли в перші години після народження, 9 трансгенних мишенят лискучого вигляду розітнули в день народження, і 2 доросли до дорослого стану. Рівні експресії були низькими у однієї дорослої тварини. Тканини, взяті у мишей, яких розітнули, препарували і гістологічно аналізували, як описано нижче.

Виявилось, що лискучий вигляд новонароджених мишенят пов'язаний з підвищенням жорсткості шкіри, ніби вони були висушеними, в результаті чого зменшився належний догляд. Їхні рухи взагалі стали негнучкими.

Б. Генотипічний аналіз і аналіз експресії

З лінії IL-22-трансгенних мишей, виведених за допомогою вищеописаного промотора E μ Lck, новонароджених мишенят в перший день (день народження) досліджували на відхилення і умертвляли для збору тканин. Всіх мишенят забезпечували індивідуальними вушними кодовими мітками, і відзначали тих, що мали фенотип лискучої шкіри на час умертвіння. Із дванадцяти мишенят шестеро мали фенотип лискучої шкіри, причому відзначили двох з «сильним» фенотипом. Сильні фенотипи визначили у мишенят, маленьких, з малою рухливістю і шкіра яких була особливо лискучою і дуже сухою. Проби шкіри брали з лівого боку кожної дитинчати і заморожували у середовищі для зберігання тканин Tissue-Tek.

Генотипування підтвердило, що лискуча шкіра є хорошим індикатором трансгенного статусу, хоча ніяких даних щодо експресії не було зібрано. Заморожені блоки шкіри секціонували до 7 мкм на кріостаті і забарвлювали, щоб виявити наявність CD3, CD4, CD8, макрофагів миши, В-клітин, CD80 і молекул головного комплексу гістосумісності (ГКГС) класу II. Протокол забарвлення передбачав зв'язування комерційно доступних антитіл з тканиною, детекцію за допомогою вторинного антитіла, міченого пероксидазою, і реакцію хромогена DAB для візуалізації забарвлення.

Виявилось, що у трансгенних тварин більше молекул ГКГС класу II і клітин CD80, які забарвлюються у відповідь на антигенпрезентуючі клітини і дендритні клітини відповідно. Макрофаговий маркер також виявив більше клітин у трансгенних тварин з сильним і несильним фенотипом, ніж у тварин дикого типу, хоча розподіл цих клітин був дуже локалізованим у верхньому шарі дерми. Тварини з сильними фенотипами виявляли найбільше забарвлення при використанні всіх трьох згаданих

маркерів, показуючи значне збільшення інтенсивності та кількості клітин порівняно з диким типом. Така відмінність, можливо, обумовлена різницею в рівні експресії IL-22 у згаданих мишенят-засновників трансгенного типу. Позитивні клітини ГКГС класу II локалізувалися в нижньому шарі дерми, розміщуючись у вигляді пухких розсіяних скупчень, тоді як позитивні клітини CD80 розміщувались здебільшого під дермою, або в шарі м'яз/жир, або прямо над цим шаром. Виявилось, що ці дві популяції клітин не перекриваються. Всі згадані маркери мали еквівалентне забарвлення у всіх тварин. Забарвлення мастоцитів толуюдином синім виявило невелику різницю між тваринами дикого типу і трансгенними або зовсім не виявило різниці.

В. Мікроскопічне дослідження тканин трансгенних мишей: IL-22 трансгенних (ТГ) мишей з промотором E μ LCK має неонатальну летальну гістологію

У день народження мишенят з виводка, де були IL-22 трансгенні тварини, гуманно умертвляли і все тіло консервували іммерсією у 10%-ий буферний формалін. Шістьох трансгенних і двох нетрансгенних мишенят піддавали подальшому дослідженню. Відзначили, що четверо з шести трансгенних мишенят мали лискучу шкіру в момент умертвіння. З законсервованих тканин робили 5 зрізів (подовжній зріз з голови і поперечні зрізи з верхньої і нижньої частин грудної клітки та верхньої і нижньої частин черевної порожнини). Тканини занурювали у парафін, обробляли звичайною процедурою, секціонували на зрізі товщиною 5 мкм (Jubg 2065 Supercut microtome, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) і забарвлювали гематоксином і еозином (H&E). Забарвлені тканини досліджували під оптичним мікроскопом (Nikon Eclipse E600, Nikon Inc., Melville, NY) згідно з процедурою, сертифікованою ветеринарним патологом.

При мікроскопічному дослідженні виявили, що епідерміс двох трансгенних мишенят був товщий за епідерміс інших шістьох мишей, в тому числі контрольних. Ніяких інших відхилень в шкірі та в інших тканинах жодної миши не помітили. Репрезентативні ділянки шкіри з відповідних ділянок грудної клітки та черевної порожнини відображали за допомогою 40 \times лінзи об'єктива і цифрової камери CoolSnap (Roper Scientific, Inc., San Diego, CA), прикріпленої до мікроскопа. Товщину епідермісу потім визначали за допомогою гістоморфометричної програми (Scion Image for Windows (NIH Image), Scion Corp., Frederick, MD, version B4.0.2). Результати представлені в Таблиці 5.

Таблиця 5

Генотип/фенотип	Середня товщина шкіри з грудної клітки (мкм)	Середня товщина шкіри з черевної порожнини (мкм)
Нетрансгенний/нормальний	5,2	5,4
Трансгенний/нелискучий	5,0	6,7
Трансгенний/лискучий	8,2	7,4
Трансгенний/всілякий	7,1	7,1

Для визначення статистичної значущості були недостатні кількості мишей, однак трансгенні, особливо ті, що мали лиску шкіри, виявили тенденцію до більш товстого епідермісу, ніж трансгенні миші з неліскухою шкірою та нетрансгенні контрольні миші. Можливо, трансгенні миші з лискухою шкірою мають більш високий рівень експресії IL-22, ніж трансгенні миші з неліскухою шкірою, однак рівні експресії у цих мишей не визначали. Отримані дані дають можливість припустити, що IL-22 відіграє певну роль у псоріазі, псоріатичному артриті або інших запальних станах шкіри і запальних хворобах.

Приклад 7

Вплив поліпептиду IL-22 *in vivo*

Мишей (саміць, C57BL/6N, віком 8 тижнів; Charles River Labs, Kingston, NY) ділили на три групи. Стандартними методами попередньо синтезували поліпептид IL-22 (SEQ ID NO:6), що експресує аденовірус. В день 0 батьківський або IL-22 аденовірус вводили першій (n=8) і другій (n=8) групам, відповідно, у вену хвоста, причому кожна миша отримувала дозу приблизно 1×10^{11} частинок в об'ємі приблизно 0,1 мл. Третя група лікування не отримувала. На день 12 мишей зважували і збирали кров. На день 20 дослідження мишей умертвляли, реєстрували масу тіла, а кров і тканини збирали для аналізу. Всі проби крові піддавали повному аналізу і аналізували хімію сироватки. І на день 12, і на день 20 статистично значущі підвищення кількостей нейтрофілів і тромбоцитів виявляли у пробах крові, взятих в групі мишей, яким був уведений аденовірус IL-22, порівняно з групою, якій вводили батьківський аденовірус. Крім того, на день 12 у пробах крові, взятих в групі мишей, яким був уведений аденовірус IL-22, виявили значно зменшені кількості лімфоцитів і еритроцитів порівняно з групою; якій вводили батьківський аденовірус, але на день 20 спостерігали протилежний ефект. До того ж, заражені аденовірусом IL-22 миші втратили масу тіла, тоді як миші, заражені батьківським аденовірусом, набрали масу. В обидва згадані дні рівень глюкози значно зменшився в пробах сироватки від мишей, яким був уведений аденовірус IL-22 порівняно з групою, якій вводили батьківський аденовірус. В обидва згадані дні рівень альбуміну сироватки також значно зменшився. В обидва згадані дні рівень глобуліну сироватки значно збільшився в групі мишей, яким був уведений аденовірус IL-22 порівняно з групою, якій вводили батьківський аденовірус. При мікроскопічному дослідженні спостерігали гістоморфометричну зміну, яку пояснили тубулярною регенерацією IL-22 у нирці. У цій групі тварин спостерігали нехарактерне для мишей підвищення частоти виникнення і тяжкості захворювання. Нефропатія - це мультифокальні ділянки базofilії кортикальних клітин тубулярного епітелію.

Для перевірки отриманих результатів і збирання додаткових проб проводили додатковий експеримент, за процедурою аналогічною вищеповисаній. В цьому експерименті масу тіла реєстрували кожні три дні, кров збирали у мишей на третій день після аденовірусної ін'єкції, а мишей умертв-

ляли для збору крові і тканини на день 10 (n=4 на групу) і день 20 (n=4 на групу). І знову виявляли підвищені кількості нейтрофілів і тромбоцитів у пробах крові, взятих в групі мишей, яким був уведений аденовірус IL-22, порівняно з групою, якій вводили батьківський аденовірус. Цей ефект був явним щодо нейтрофілів на день 3, але кількість тромбоцитів не мала значних змін до дня 10. Крім того, кількості лімфоцитів значно зменшилися в групі мишей, яким був уведений аденовірус IL-22, порівняно з групою, якій вводили батьківський аденовірус на день 3 і 10, але вони не були підвищеними на день 20 у попередньому експерименті. І знову, миші з введеними аденовірусом IL-22 втрачали масу упродовж експерименту, а миші, заражені контрольним вірусом і незаражені миші масу набирали. Параметри хімії сироватки узгоджувались з попереднім експериментом. Гістологічні дані тубулярної регенерації в нирці, пов'язані із зараженням аденовірусом IL-22, тікож підтвердились в цьому експерименті. Вони узгоджувались з додатковим виявленням помірної протеїнурії у мишей з введеним аденовірусом IL-22 (день 20).

Отримані результати дають можливість припустити, що IL-22 впливає на гематопоез, тобто утворення клітин крові *in vivo*. А якщо так, IL-22, можливо, має біологічну активність, що впливає на різні кровотворні стовбурові клітини, в результаті чого збільшуються або зменшуються певні диференційовані клітини крові у конкретній лінії диференціювання. Наприклад, виявляється, що IL-22 зменшує лімфоцити, що, вірогідно, обумовлено інгібуванням комітованих клітин-попередників, які породжують лімфоїдні клітини. IL-22 також зменшує еритроцити, що підтверджує думку про те, що IL-22, можливо, відіграє певну роль при анемії, інфекції, запаленні та/або імунопатологічних захворюваннях, в результаті впливу на клітини крові, що беруть участь у цих процесах. Антагоністи проти IL-22, наприклад антитіла або його розчинний рецептор IL-22RA2, можна було б застосовувати як терапевтичні реагенти при цих хворобах.

Більш того, експерименти з використанням IL-22-аденовірусу на мишах дають можливість припустити, що надекспресія IL-22 підвищує рівень нейтрофілів і тромбоцитів *in vivo*. Можливо, існують інші фактори (наприклад, цитокіни і гени-модифікатори), які беруть участь в реакціях на IL-22 у всьому організмі тварини. Тим не менш, ці дані підтверджують участь IL-22 у кровотворенні. Отже, IL-22, антитіла anti-IL-22, розчинні рецептори IL-22RA (наприклад, SEQ ID NO:3) та антитіла anti-IL-22RA є підходящими реагентами/мішенями для діагнозу та лікування ряду розладів, наприклад запалення, розладів імунної системи, інфекції, анемії, раку кровотворної системи та інших видів раку тощо.

Про зв'язок експресії IL-22 з втратою маси, виникненням гострофазного білка SAA та метаболічними порушеннями свідчать підвищений рівень глюкози та альбуміну сироватки і азоту сечі, що дає можливість припустити, що IL-22 є цитокіном, що діє на ранній стадії певних запальних реакцій. Миші з введеним аденовірусом IL-22 можуть вияв-

ляти стан хронічного запалення, наприклад такого, яке спостерігається при ЗХК, виразковому коліті, артриті, псоріазі, псоріатичному артриті, астмі тощо. Певні пагубні запальні процеси можна інгібувати, використовуючи антагоніст до IL-22, наприклад антитіла anti-IL-22, та їх рецептори, наприклад розчинні рецептори IL-22RA (SEQ ID NO:3), та антитіла anti-IL-22RA тощо.

Б. IL-22 - прозапальний піто кін: сироватковий рівень SAA у адено-IL-22-мишей

Для визначення рівня SAA у адено-IL-22-мишей проводили твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA) за допомогою протоколу і набору для визначення SAA мишей методом імуоналізу (Biosource International, California, USA). Розбавлені стандартні і досліджувані проби поміщали разом з HRP-anti-mouse SAA в аналітичні планшети, попередньо покриті антитілом anti-mouse SAA. Планшети інкубували 1 годину при 37°C і потім промивали згідно з інструкціями згаданого набору. Планшети проявляли 15 хвилин при кімнатній температурі, використовуючи TMB (триметилбензол), і припиняли за допомогою 2M H₂SO₄. Поглинання при довжині хвилі 450 нм читали за допомогою Spectromax 190 (Molecular Devices, California, USA). Отримані дані аналізували за допомогою програм Softmax Pro (Molecular Devices, California, USA) та Excel (Microsoft Corp., Washington, USA).

Миші, заражені IL-22-аденовірусом, мали підвищені рівні mSAA, більш ніж у 10 разів, порівняно з контрольними мишами, зараженими батьківським аденовірусом.

В. Аналіз протоковою цитометрією мишей, заражених IL-22-аденовірусом

Для аналізу впливу експресії IL-22 *in vivo* в результаті введення аденовірусу у заражених IL-22-аденовірусом мишей C57BL/6N виділяли периферичну кров, селезінку і кістковий мозок на день 10 і 20 після зараження. Приблизно 100 мкл крові збирали у гепаринізовані пробірки, потім видаляли червоні кров'яні клітини гіпотонічним лізісом (клітини лізували в 4,5 мл dH₂O протягом ≈5 секунд перед додаванням 1,5 мл 3,6% NaCl). Селезінки роздавлювали між двома предметними стеклами з матового скла, вивільнені клітини пропускали через мембрану Nyltex (клітинний фільтр) і осаджували центрифугуванням. Кістковий мозок отримували, роздавлюючи одну стегнову кістку за допомогою ступки и товчачика і пропускаючи отримані клітини через клітинний фільтр (Falcon). Клітини ресуспендували у промивному буфері клітинного сортера з активацією флуоресценції (FACS) (промивний буфер = HBSS/1%BSA/10 mM HEPES (N-2-гідроксиетил-піперазин-N-2-етансульфонова кислота)), визначали кількість у трипановому синьому барвнику, і 1x10 життєздатних клітин кожного типу поміщали у вигляді аліквот у 5-мілілітрові полістиролові пробірки. Клітини промивали і осаджували центрифугуванням, потім 20 хвилин інкубували на льоду разом з коктейлями із флуоресцентно-мічених (FITC, PE та CyChrome) моноклональних антитіл (PharMingen, San Diego, CA), що розпізнають різні клітинно-поверхневі ма-

ркери, застосовувані для ідентифікації конкретних субпопуляцій імуокомпетентних клітин. Ці маркери включають наступні (перелічені в протестованих групах 3). Для забарвлення крові: CD3, Gr1 та B220; для забарвлення селезінки: CD62L, CD44 та CD3; CD21, CD23 та B220; IgD, IgM та B220; CD11b, Gr1 та CD8; для забарвлення кісткового мозку: CD11b, Gr1, CD3; IgD, IgM та B220. Клітини промивали 1,5 мл промивного буфера і осаджували центрифугуванням, потім ресуспендували в 0,4 мл промивного буфера і аналізували на FACScan за допомогою програми CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Виявили, що фракція нейтрофілів у крові мишей, заражених аденовірусом IL-22, збільшилась у 4-13 разів на день 10 і у 2-3 рази на день 20. На день 10 ця різниця дала в результаті супутнє зменшення фракції лімфоцитів і моноцитів у крові. У кістковому мозку виявили, що загальна кількість В-клітин зменшилась приблизно у 1,5 раза, тоді як процентний вміст зрілих рециркулюючих В-клітин збільшився, і загальна кількість незрілих В-клітин трохи зменшилась на день 10. На день 20 багато цих відмінностей не були явними, хо виявили невелике збільшення у фракції зрілих рециркулюючих В-клітин. В селезінці загальна кількість В-клітин трохи зменшилась (у 1,5-2 рази) в обидва зазначені дні, хоча на день 20 фракція В-клітин граничної зони (CD21+CD23-B220+) збільшилась у 2 рази, а кількість фолікулярних В-клітин (CD21+CD23+B220+) зменшилась у 2 рази. В-клітини граничної зони вважають першою лінією захисту від патогенів, оскільки вони більш чутливі до мітогенів В-клітин (наприклад ліпополісахариди (LPS)), ніж звичайні В-клітини, і коли вони зустрічають свій когнатний антиген, вони швидко диференціюються в антитіло-секретуючі клітини. Можливо, що IL-22 або підсилює конверсію фолікулярних В-клітин у В-клітини граничної зони, або що він селективно збіднює менш зрілі фолікулярні клітини. Зміни у кількостях В-клітин, виявлені у кістковому мозку, можуть відображати підсилене диференціювання пре/про та/або незрілих В-клітин або збільшений приплив рециркулюючих В-клітин з крові/селезінки і, можливо, відповідне збільшення експорту незрілих В-клітин до периферії. Фактична кількість зрілих В-клітин кісткового мозку не збільшується, так що, можливо, що IL-22 і не підсилює їхню проліферацію. З іншого боку, IL-22, можливо, блокує, зменшує або інгібує диференціацію незрілих В-клітин і тим самим збільшує відносну репрезентацію зрілих В-клітин.

Г. IL-22RA2-Fc4 нейтралізує активність IL-22 *in vivo*: твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA) SAA показує, що експресія SAA викликана IL-22, інгібується в результаті введення IL-22RA2-Fc4

Щоб визначити, чи може IL-22RA2 інгібувати SAA-індукцію в результаті IL-22, мишей (самців, C3H/HEJ, віком 8 тижнів; Jackson Labs, Bar Harbor, ME) ділили на 5 груп по три тварини в кожній і інтраперитонеально вводили білки, як показано в Таблиці 6:

Таблиця 6

№ групи	IL-22	IL-22RA2
Група 1	-	-
Група 2	-	100 мкг
Група 3	3 мкг	-
Група 4	3 мкг	20 мкг
Група 5	3 мкг	100 мкг

Ін'єкції IL-22RA2 робили на 15 хвилин раніше ін'єкцій IL-22. Обидві ін'єкції робили інтраперитонеально. Пробу крові брали у кожної миши перед уведенням, потім на 2 і 6 години після введення. З кожної проби виділяли сироватку для вимірювання SAA та IL-22.

Для визначення рівня SAA у мишей з введеним IL-22 і розчинним рецептором для IL-22, описуваним тут IL-22RA2-Fc4, здійснювали ELISA-аналіз, як описано вище. Миші з введеним 3 мкг IL-22 у поєднанні з IL-22RA2-Fc4 в концентрації 20-100 мкг показали зменшення рівня SAA, викликаного одним IL-22, до фонових рівнів, що демонструє, що IL-22RA2 інгібує SAA-індукцію, викликану активністю IL-22 in vivo.

Приклад 8

Експресія IL-22 в мишиній експериментальній моделі запальної хвороби кишечника

Запальна хвороба кишечника (ЗХК) є мультифакторіальною хворобою, що має два типи: виразковий коліт (БК) і хвороба Крона (ХК). Етіологія цих хвороб дотепер невідома, і клінічні прояви бувають різними. Виразковий коліт обмежується товстим кишечником, симптоми включають кривавий пронос, втрату маси тіла та абдомінальний біль. Макроскопічні ознаки БК включають виразки і скорочену товсту кишку. На відміну від цього хвороба Крона може уражати інші частини кишечника. Симптоми включають діарею (часто менш криваву, ніж при БК), слабкий прояв лихоманки і біль. Макроскопічні ознаки включають фіброзний і стенозований кишечник зі стриктурами, глибокі виразки, тріщини і нориці.

Існує декілька експериментальних моделей на тваринах, що імітують ці людські хвороби. Трьома найчастіше застосовуваними моделями коліту для скринування нових лікарських засобів є: щуряча модель коліту, викликаного 2,4,6-тринітробензолсульфоновою кислотою (TNBS), мишина модель переносу Т-клітин і мишина модель коліту, викликаного декстран сульфатом натрієвою сіллю (DSS-індукованого коліту). DSS-модель розроблено на основі моделі д-ра S.Murthy, в якій застосовується система підрахунку індексів активності хвороби (S.N.S. Murthy, Treatment of Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis by Intracolonic Cyclosporin, Digestive Diseases and Sciences, Vol. 38, No. 9 (September 1993), pp. 1722-1734).

В даному дослідженні гострий коліт викликали у мишей, додаючи їм у питну воду DSS протягом 6 днів. Тварини виявляли втрату маси і кривавий пронос, що нагадувало стан пацієнтів з БК. Механізм ураження DSS-сіллю недостатньо досліджено, але вважають, що DSS викликає неспецифічну імунну реакцію та імітує вплив оточуючого середо-

вища на кишечник. Можливо, що продукується H_2S , який може бути токсичним для клітин. Крім того, виникають зміни у бактеріальній флорі порожнистого органу. У кишечнику виявили активовані моноцити, макрофаги і мастоцити. Медіатори для всіх трьох експериментальних моделей на тваринах включають запальні простагландини, лейкотрієнові метаболіти і цитокіни.

А. Спосіб

Коліт викликали прийомом DSS всередину самицями мишей Swiss Webster від Charles River Laboratories. Миші були віком 10 і 11 тижнів на момент початку експерименту. Протягом 6 днів мишам давали з питною водою 4% DSS (заражені миші) або давали тільки нормальну питну воду (контрольні миші). Застосовували систему клінічних індексів активності хвороби (IAX), яка включає поєднання замірів якості випорожнення, прихованої крові та втрати маси тіла. IAX реєстрували щоденно для кожної миши, починаючи з першого дня після DSS-зараження. Через 6 днів DSS видаляли з питної води заражених мишей. Всіх мишей контролювали за даними IAX до смертності на день 2, 7 або 10 від початку експерименту. На кожний день 2 і 7 умертвляли чотири DSS-заражені миші і одну контрольну. На день 10 умертвляли чотири DSS-заражені миші і дві контрольні. У всіх тварин після смертності виміряли довжину кишечника. Зрізи кишечника консервували у 10%-ному нейтральному буферному формаліні для гістологічного аналізу або заморожували для екстракції мРНК.

Б. Гістологічна оцінка і система підрахунку індексів активності хвороби (IAX)

Гістологічні індекси отримували наступним способом, позначеним цифрою 1. Як правило, зрізи кишечника оцінював патолог наосліп на наявність криптогенних показників, гіперпластичного епітелію, деформації крипт і запалення.

Щодня кожну мишу оцінювали за клінічним індексом щодо втрати маси тіла, консистенції випорожнень і кишкової кровотечі. Вищі індекси присвоювали збільшенням кількостям втрати маси, діареї і кровотечі. Щоденним показником для кожної миши була середня величина, отримана від трьох результатів/спостережень.

В. Результати

Довжини товстої кишки у DSS-заражених мишей були дещо коротшими на день 7 і 10, ніж у незаражених, контрольних мишей, але ці результати, можливо, не є значущими (не перевірялися статистичною системою). Клінічні індекси активності хвороби відобразили збільшення симптомів хвороби у мишей, заражених DSS, аналогічне збільшенню, яке спостерігали в останніх експериментах з використанням цієї моделі. Прихована кров була найбільшою приблизно на день 4 і 5, тоді як рідкі випорожнення превалювали на день 6 і 7. Гістопатологічні результати показали, що показники хвороби відрізнялись від показників контрольних мишей у всі дні смертності, особливо на день 7 (пік) і 10. Показники гістопатологічного скринування були такими: контрольні=0,5; DSS-заражені миші на день 2=8,8; DSS-заражені миші на день 7=21; DSS-заражені миші на день 10=18. Клінічні та гістопатологічні показники показують, що DSS-

заражені миші мали значну хворобу товстого кишечника порівняно з незараженими, контрольними мишами. Проби заморожених тканин використовували пізніше для визначення мРНК методом, описаним нижче.

Г. Тканинна експресія РНК IL-22 у пробах з товстого кишечника мишей із ЗХК. виявлювана методом ПЛР у реальному часі (РЧ-ПЛР)

Для визначення відносної експресії РНК мишиного IL-22 (SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:11) в експериментальній моделі запальної хвороби кишечника у DSS-заражених мишей збирали дистальні ділянки товстої кишки і заморожували в рідкому азоті. В цьому експерименті миші були DSS-заражені, і проби брали на день 2, 7 і 10 після зараження. Також збирали проби від здорових, незаражених, контрольних мишей. Потім з цих проб виділяли РНК за допомогою стандартного набору Rneasy Midiprep™ Kit (Qiagen, Valencia, CA), дотримуючись інструкцій виробника.

При проведенні РЧ-ПЛР-реакцій використовували систему "Superscript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq". (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Кожні 25 мкл реакційної суміші склалися з: 12,5 мкл 2X реакційного буфера, 0,5 мкл (20пмоль/мкл) ZC39289 (SEQ ID NO:17), 0,5 мкл (20пмоль/мкл) ZC39290 (SEQ ID NO:18), 0,4 мкл суміші RT/Taq-полімераза, 10 мкл води без рибонуклеази, 1,0 мкл загальної РНК (100 нг/мкл). Ампліфікацію здійснювали наступним чином: один цикл при 50°C 30 хвил, потім 35 циклів при 94°C 30 сек; при 58°C 30 сек; при 72°C 60 сек; потім кінцеве подовження при 72°C протягом 7 хвилин. 8-10 мкл продукту ПЛР-реакції піддавали стандартному електрофорезу на агарозному гелі, використовуючи 2% агарозний гель. Відповідний передбачений розмір фрагмента кДНК спостерігали наступним чином. В обох пробах на день 2 була нечітка смуга. У двох з трьох проб на день 7 спостерігали чітку смугу, а проба дня 3 генерувала дуже інтенсивну смугу. У трьох пробах дня 10 спостерігали чітку смугу. І нарешті, у двох «нормальних» контрольних пробах зовсім не спостерігали ніяких смуг. Ці результати дають можливість припустити, що може бути активація IL-22 в деяких типах запальних реакцій у товстому кишечнику, в тому числі реакцій, асоційованих з ЗХК, ВК та ХК. Ці дані підсумовані в Таблиці 7, в якій виражена в балах відносна експресія означає: 0=немає смуги, 1=нечітка смуга, 2=чітка смуга, 3=дуже інтенсивна смуга.

Таблиця 7

Тканина	Відносна експресія (0-3)
Нормальна товста кишка	0
Нормальна товста кишка	0
День 2 після зараження	1
День 2 після зараження	1
День після зараження	3
День 7 після зараження	2
День 7 після зараження	2
День 10 після зараження	2
День 10 після зараження	2
День 10 після зараження	2

Приклад 9

IL-22RA2 зменшує рівні IL-6 та SAA в експериментальній моделі колаген-індукованого артриту на мишах

А. Експериментальна модель колаген-індукованого артриту (KIA-модель) на мишах

Самців мишей DBA/1J віком 10 тижнів (Jackson Labs) ділили на 3 групи, по 13 мишей на групу. На день -21 тваринам підшкірною ін'єкцією вводили 50-100 мкл колагену типу II курчат при концентрації 1 мг/мл у повному ад'юванті Фрейнда (Chondrex, Redmond, WA), і через три тижні, на день 0, ін'єкційно вводили 100 мкл (25 мкг) LPS з E.coli 0111:B4, приготованого у вигляді 250 мкг/мл з ліофілізованої аліквоти (Sigma, St. Louis, MO). За період день 0 - день 25 інтраперитонеально вводили IL-22RA2 тричі на тиждень протягом 4 тижнів. Перші дві групи отримували або 100 мкг, або 10 мкг IL-22RA2 кожній тварині на дозу, а третя група отримувала контрольний носій, PBS (Life Technologies, Rockville, MD). Тварини почали виявляти симптоми артриту після ін'єкції LPS, причому у більшості тварин запалення розвивалося в межах 2-3 тижнів. Ступінь хвороби оцінювали в кожній лапі, застосовуючи штангенциркуль для замірів товщини лап і оцінюючи клінічним показником (0-3) кожну лапу: 0=нормальна, 0,5=палець(-ці) запалений, 1=слабке запалення лапи, 2=помірне запалення лапи і 3=сильне запалення лапи.

Спостереження за хворобою

Тварини почали виявляти ознаки запалення лап незабаром після другої ін'єкції колагену, а деякі тварини почали виявляти ознаки запалення пальців перед другою ін'єкцією колагену. У більшості тварин артрит розвивався в межах 2-3 тижнів від бустер-ін'єкції, але деяким може знадобитися більше часу. Кількість випадків захворювань в цій моделі зазвичай становить 95-100%, при участі в експерименті 40 тварин виявляють, як правило 0-2 таких, що не зреагували (після 6 тижнів спостереження). Слід зазначити, що з початком запалення може виникати тимчасове слабке запалення лапи або пальців. З цієї причини не вважають, що тварина має установлену хворобу, доки не розвинується помітне, стійке опухання.

За всіма тваринами спостерігали щоденно для оцінювання статусу хвороби в їхніх лапах, яке здійснювали за кількісним клінічним показником для кожної лапи. Кожний день 4 лапи кожної тварини оцінювали за допомогою балів згідно з клінічними симптомами хвороби. Для визначення клінічного показника лапу умовно ділили на три зони: пальці, власне лапу (м'яз, що керує пальцями, або стопу) і зап'ясток або гомілковостопний суглоб. До уваги брали ступінь і тяжкість запалення в цих зонах, в тому числі спостереження за всіма пальцями для виявлення будь-якого опухання суглобів, нерівних нігтів або почервоніння, відзначення будь-якої ознаки набряку або почервоніння у будь-якому місці лапи, відзначення будь-якої втрати найменшої анатомічної демаркації сухожиль або кісток, оцінювання зап'ястка або щиколотки на будь-який набряк або почервоніння та ви-

значення того, чи поширюється запалення прохимально вище кінцівки. Оцінка лапи в 1, 2 або 3 бали ґрунтувалась, по-перше, на загальному враженні від тяжкості і, по-друге, на кількості залучених зон. Нижче наведена шкала для клінічного оцінювання.

Клінічний показник:

0 = нормальна;

0,5 = охоплений один або більше пальців, але запалені тільки пальці;

1 = слабе запалення, що охоплює лапу (1 зону) і може включати палець або пальці;

2 = помірне запалення в лапі і може включати декілька пальців та/або зап'ясток/сухожилля (2 зони);

3 = сильне запалення в лапі, зап'ясток/сухожилля і декілька або всі пальці (3 зони).

Хворобу вважають установленою при кількісному показнику запалення лапи, оціненому у 2 бали і більше, і якщо вона триває всю ніч (два дні поспіль). Як тільки хворобу встановлено, цю дату реєструють і позначають як перший день відповідної тварини з «установленою хворобою».

Упродовж всього експерименту збирають кров для спостереження за рівнями антиколагенових антитіл у сироватці. Тварин безболісно уметвляли на день 21, кров збирали для аналізу сироватки і для повного клінічного аналізу. Від кожної тварини: одну уражену лапу зберігали у 10%-ому нейтральному буферному формаліні (НБФ) для гістології і одну заморожували у рідкому азоті і зберігали при -80°C для аналізу мРНК. Крім того, ½ селезінки, ½ вилочкової залози, ½ мезентеріального лімфотичного вузла, одну частку печінки і ліву нирку збирали для аналізу РНК, а ½ селезінки, ½ вилочкової залози, ½ мезентеріального лімфотичного вузла, іншу частку печінки і праву нирку консервували у 10%-ому НБФ для гістології. Сироватку збирали і заморожували при -80°C для аналізу імуноглобуліну і ігитокіну.

Не було виявлено ніяких статистично значущих розбіжностей між групами, в яких аналізували клінічні показники хвороби лап і аналізованими даними вимірювань, хоча було припущення, що одна заражена група, що приймала IL-22RA2, може мати затримку початку і розвитку запалення лап. Не було значних розбіжностей між групами щодо змін маси тіла, параметрів повного клінічного аналізу крові або рівнів протиколагенових антитіл. Ці ранні результати вказують на те, що IL-22RA2 не має шкідливого впливу на масу тіла, червоні або білі кров'яні клітини або продукування антитіл, але, можливо, здатен зменшувати запалення. Подальші дослідження щодо дозування, механізму дії та ефективності тривають (Приклад 10).

Б. Дані ELISA-аналізу на протиколагенові антитіла в мишиній KIA-моделі

Від мишиної моделі колаген-індукованого артриту (KIA) (Приклад 9А вище) на день 0, 7, 14, 21 і 28 від дати LPS-зараження (день 0) брали проби сироватки. Ці проби скринували методом ELISA на титри протиколагенових антитіл. Не було статистично значущого впливу IL-22RA2-зараження в групах, в яких вводили 100 мкг або 10 мкг, на рівні

протиколагенових антитіл порівняно з контрольними мишами, яким вводили PBS. Нижче наведений опис методів і матеріалів при ELISA-аналізі.

Для проведення ELISA-аналізу на протиколагенові антитіла застосовували наступні засоби і реагенти: 96-лункові титраційні мікропланшети Maxisorp (NUNC, Rochester, NY), колаген типу II курчати (Chondrex, Redmond, WA), біонабори та реагенти Super Block (Pierce, Rockford, IL), goat anti-mouse IgGH-A+M(H+L), кон'югований з пероксидазою з хрину (HRP) (Zymed, South San Francisco, CA) і субстрат з о-фенілендіаміндігідрохлориду (Pierce, Rockford, EL). У всіх аналізах застосовували наступні буфери: буфер В для розбавлення для ELISA-аналізу (PBS+0,1% BSA+0,05% Tween (Sigma, St. Louis, MO)), промивний буфер С для ELISA-аналізу (PBS+0,05% Tween) і хроматографічний буфер NovoD (0,063 М цитрат натрію, 0,037 М лимонна кислота), H₂O₂ (Sigma) і 1N H₂SO₄ (VWR, Tukwill, WA).

Приблизно 100 мкл периферичної крові брали з ретроорбітального синусу і поміщали у пробірки для відокремлення сироватки крові (Becton Dickinson). Сироватку збирали центрифугуванням (2-3 хвил, 16000×g, 4-6°C) і зберігали при -20°C до початку аналізу. Для визначення рівнів протиколагенових антитіл класу Ig на планшети ф. NUNC наносили 10 мкг/мл покриття колагену типу II курчати (Chondrex, Redmond, WA) та інкубували всю ніч при 4°C. Планшети промивали буфером С для ELISA-аналізу, блокували (5 хвилин, кімнатна температура) за допомогою біонабору Super Block (Pierce, Rockford, EL) і промивали буфером С для ELISA-аналізу. Розбавлені проби сироватки (розбавлені у буфері В для ELISA-аналізу 5-кратно від 1:5000 до 1:625000) додавали до ELISA-планшетів у трьох екземплярах, і планшети інкубували всю ніч при 4°C. Після інкубації планшети промивали буфером С для ELISA-аналізу і додавали мічений пероксидазою goat anti-mouse Ig Fc (Zymed, 1:2000 у буфері В для ELISA-аналізу). Планшети інкубували (кімнатна температура, 90 хвилин), промивали знову буфером С для ELISA-аналізу і розвивали активність пероксидази з хрину, використовуючи субстрат з о-фенілендіаміндігідрохлориду (10 мл NovoD+1 таблетка OPD [ортофенілендіаміну]+10 мкл H₂O₂ (Pierce)). Реакцію припиняли за допомогою 1N H₂SO₄. Заміри відносної оптичної густини проб сироватки здійснювали при розбавленні 1:25000, довжині хвилі 490 нм за допомогою Spectra MAX 190, і отримані дані аналізували за допомогою програми SoftMax Pro (Molecular Devices Corporation, Palo Alto, CA).

В. Аналіз IL-6 та SAA в мишиній KIA-моделі

На день 0 у мишей, що представляли KIA-модель, збирали проби сироватки (Приклад 9А) через 4 години після інтраперитонеального введення 25 мкг LPS. Проби скринували на концентрації IL-6 та сироваткового ампілоїду А (SAA) за допомогою комерційно доступних наборів для ELISA-аналізу, придбаних у ф. «Biosource International» (Camarillo, CA), дотримуючись інструкцій виробника.

Рівні IL-6 становили 9651 +/- 1563 пг/мл, 10,865 +/- 1478 пг/мл і 15,006 +/- 2,099 пг/мл в групах мишей, яким вводили 10 мкг IL-22RA2, 10 мкг IL-22RA2 і PBS-контроль відповідно. Концентрація IL-6 в групі KIA-мишей, яким вводили дозу 100 мкг IL-22RA2, була значно нижче порівняно з контрольними мишами, яким вводили PBS при $p=0.0351$. Статистичну значущість обчислювали за допомогою критерію PLSD Фішера при рівні значущості 5% (ABACUS Concepts, INC, Berkeley, CA). Крім того, концентрації SAA становили 381 +/- 40 мкг/мл, 348 +/- 37 мкг/мл і 490 +/- 50 мкг/мл в групах мишей, яким вводили 10 мкг IL-22RA2, 10 мкг IL-22RA2 і PBS-контроль відповідно. Концентрація SAA в групі KIA-мишей, яким вводили дозу 10 мкг IL-22RA2, була значно нижче порівняно з контрольними мишами, яким вводили PBS при $p=0.0257$. Статистичну значущість обчислювали за допомогою критерію PLSD Фішера при рівні значущості 5% (ABACUS Concepts, INC, Berkeley, CA).

Приклад 10

Моноклональні антитіла anti-IL-22RA або anti-IL-22 інгібують тяжкість хвороби в мишиній KIA-моделі

Модель колаген-індукованого артриту (KIA) - це експериментальна модель на мишах ревматоїдного артриту, яка дуже нагадує цю хворобу, спостережувану у людей (Moore, *Methods Mol. Biol.* 225:175-179, 2003; Waksman, *Scand J. Immunol.* 56:12-34, 2002). Мишей імунізували 2 дозами колагену, емульгованого у повному ад'юванті Фрейнда (CFA) в ділянці біля основи хвоста. Це призвело до опухання лап, яке збільшувалось з часом і яке оцінювали візуально і заміряли за допомогою штангенциркуля. Крім того, протиколагенові антитіла сироватки добре корелюють з тяжкістю хвороби. Базуючись на даних, що показали викликане IL-20 та IL-22 запалення, колаген-імунізованим мишам вводили моноклональні антитіла (mAbs) anti-IL-22RA і anti-IL22 і оцінювали в балах вплив на хворобу. Зменшення балів оцінки стану лап і товщини лап після введення моноклональних антитіл anti-IL-22RA або anti-IL22 дає можливість припустити, що IL-20 та IL-22 промотують імунну реакцію, що відбувається в моделі, на аутоімунність, і блокування, інгібування, зменшення, протидія або нейтралізація їхньої функції може інгібувати аутоімунні порушення. Інгібування TNFα сироватки і протиколагенових антитіл також дає можливість припустити, що блокування IL-22RA може бути корисним при аутоімунній хворобі.

Отже, щоб визначити, чи впливають моноклональні антитіла anti-IL-22RA і anti-IL22 на аутоімунність, їх тестують на мишиній моделі ревматоїдного артриту - колаген-індукованого артриту (KIA). Зокрема, мишам DBA1J ін'єкційно вводили колаген, щоб викликати ревматоїдноподібний артрит. Інокуляція на день 0 являла собою підшкірну ін'єкцію гомогенату, що складався з повного ад'юванту Фрейнда (CFA) і колагену типу II (50-100 мкг, при концентрації колагену 2 мг/мл). Ін'єкцію робили біля основи хвоста. На день 21 здійснювали другу інокуляцію, яка відрізнялася тільки тим, що гомогенат готували з використанням неповного ад'юванту Фрейнда (IFA), а не CFA. Показники стану

лап і товщину лап виміряли щоденно. Групи мишей отримували PBS, 20-200 мкг контрольного ізоотопу, порівняного з моноклональним антитілом або 20-200 мкг моноклонального антитіла anti-IL-22RA або anti-IL22, інтраперитонеально двічі або тричі на тиждень протягом 1-4 тижнів, починаючи з другої ін'єкції колагену. Мишей контролювали щоденно до дня 30. На день 30 мишей умертвляли, брали сироватку для аналізу на протиколагенові антитіла і для аналізу на цитокіни (TNFα).

Інгібування збільшення клінічних показників лап, товщини лап, TNFα сироватки і протиколагенові антитіла сироватки в результаті введення моноклональних антитіл anti-IL-22RA або anti-IL22 дає можливість припустити, що блокування IL-22RA може зв'язувати, блокувати, інгібувати, зменшувати, протидіяти або нейтралізувати IL-22, інгібувати імунну реакцію, що відбувається в моделі, на аутоімунність, і може інгібувати аутоімунні порушення.

Приклад 11

Експресія рецептора IL-22, IL-22RA, у миші-моделі, зараженої DSS

Для визначення рівнів експресії мишиного IL-22RA у товстому кишечнику мишей з DSS-індукованою ЗХК (Приклад 8) проводили кількісну РЧ-ПЛР. РНК виділяли з товстої кишки здорової миші і з дистальних відділків товстих кишок мишей, заражених декстран сульфатом натрієвою сіллю (DSS) на день 2, 7 і 10 після зараження. РЧ-ПЛР проводили з використанням приладу Applied Biosystems 7700 TaqMan і за відповідним протоколом. Стисло, використовували програму «Primer Express» для синтезу праймерів проти послідовності мишиного IL-22RA (ZC39776 (SEQ ID NO:19) та ZC39777 (SEQ ID NO:20)) і мічений FAM/TAMRA зонд TaqMan (ZC38752 (SEQ ID NO:21)), дотримуючись інструкцій ф. «Applied Biosystems». До кожної реакційної суміші додавали 25 нг РНК разом з реагентами для РЧ-ПЛР PE/Applied Biosystems TaqMan EZ і вищезгаданими праймерами і зондом. РЧ-ПЛР-реакції проводили двічі при наступних параметрах циклування: при 50°C 2 хвилини, при 60°C 30 хвилин, при 95°C 5 хвилин, 40 циклів при 94°C 20 секунд і при 60°C 1 хвилину. Рівні експресії порівнювали зі стандартною кривою відомих кількостей молекул синтетичного транскрипту РНК IL-22RA миши, і експресію виражали як абсолютну кількість молекул мишиного IL-22RA на реакцію. Попередні дані дають можливість припустити, що експресія мишиного IL-22RA трохи зменшує активацію в дистальних відділках товстого кишечника на день 7 і день 10 у мишей з DSS-індукованою ЗХК у порівнянні з рівнями експресії в кишечнику здорової миші.

Приклад 12

IL-22 і прозапальні індикатори в експериментальній моделі слабого ендотоксикозу: мишина модель LPS-індукованого ендотоксикозу

А. Мишина модель LPS-індукованого ендотоксикозу: визначення прозапальних цитокінів і температури тіла в мишиній моделі LPS-індукованого ендотоксикозу

Для визначення впливу IL-22RA2 в мишиній моделі LPS-індукованого слабого ендотоксикозу

проводили експеримент *in vivo*. Для збору контрольних даних для початкової оцінки цієї моделі виміряли рівні прозапальних цитокінів і температуру тіла.

Стисло, самицям мишей Balb/c (CRL) віком 6 місяців інтраперитонеальними ін'єкціями вводили 25 мкг LPS (Sigma) у стерильному PBS. В групах з 8 мишей брали проби сироватки в 0 годин, через 1, 4, 8, 16, 24, 48 і 72 години. Проби сироватки аналізували на рівні прозапальних цитокінів. Рівні IL-1b, IL-6, TNF α , IL-10 та білка сироваткового амілоїду A (SAA) визначали за допомогою комерційно доступних наборів для ELISA-аналізу від ф. «Biosource International» (Camarillo, CA).

Рівні TNF α сягали 4000 пг/мл, а рівні IL-10 - 341 пг/мл через 1 годину після LPS-ін'єкції. Через 4 години після LPS-ін'єкції рівні IL-6, IL-1b та IL-10 становили 6100 пг/мл, 299 пг/мл та 229 пг/мл відповідно. До 4-ої години після LPS-ін'єкції рівні SAA в сироватці становили 0,405 мг/мл. Концентрації SAA в сироватці продовжували зростати до 3,9 мг/мл до 24 години після LPS-ін'єкції, однак рівні SAA, вищі ніж 1-2 мг/мл в сироватці важко виміряти точно або відтворено за допомогою існуючого набору для ELISA-аналізу через взаємодії між SAA та іншими компонентами сироватки. Отримані результати показали, що додатково до IL-22 (Приклад 11Б) прозапальні цитокіни дійсно продукувались в цій моделі. Таким чином, як біологічні маркери для експериментальної моделі LPS-індукованого слабого ендотоксикозу були встановлені наступні критерії: рівні TNF α сироватки через 1 годину після LPS-ін'єкції, рівні IL-6 через 4 години після LPS-ін'єкції і рівні SAA через 4 і 8 годин після LPS-ін'єкції.

Температуру тіла тварин в окремій групі контролювали за допомогою хірургічно імплантованих телеметричних пристроїв упродовж 72 годин експерименту. Через 30 хвилин після LPS-ін'єкції температури тіла мишей спадали максимально на 2°C, з 37,07°C до 34,98°C.

Ін'єкція 100 мкг злитого білка IL-22RA2-Fc за 30 хвилин до LPS-ін'єкції значно зменшила, приблизно на 50%, індукцію SAA через 4 години і через 8 годин, тоді як 10 мкг IL-22RA2-Fc не мали значного впливу. Не виявили значних змін і в рівнях TNF-альфа та IL-6. Ін'єкція IL-22RA2-Fc зменшила кількість нейтрофілів у кровообігу через 1 годину після LPS-ін'єкції. Це показало, що введення IL-22RA2-Fc може нейтралізувати активність IL-22 щодо індукції SAA.

Б. Виявлення активності IL-22 в мишиній сироватці від миши-моделі LPS-індукованого ендотоксикозу за допомогою клітин BaF3/CRF2-4/IL-22RA в аналізі на проліферацію з використанням барвника Alamar Blue

Описані тут клітини BaF3/CRF2-4/IL-22RA центрифугували і промивали у PBS двічі, щоб переконатися у видаленні mIL-3, потім втретє центрифугували і ресуспендували у повному середовищі (RPMI 1640, 10% FBS, 1% GlutaMAX, 1% піруват натрію), але без mIL-3 (надалі «середови-

ще без mIL-3»). Клітини потім підраховували в гемоцитометрі. Клітини висівали у 96-лунковий планшет зі щільністю 5000 клітин на лунку в об'ємі 100 мкл на лунку, застосовуючи середовище без mIL-3.

Сироватку, отриману від мишей-моделей LPS-індукованого ендотоксикозу в експерименті, описаному у Прикладі 11А, розбавляли до 2% у середовищі без mIL-3 у верхньому ряді планшета і потім серійно розбавляли 1:2 решту 7 рядів на 96-лунковому планшеті, залишаючи в кожній лунці об'єм 100 мкл. Саме після цього додавали до цих 100 мкл клітин для отримання кінцевих сироваткових концентрацій 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,063%, 0,031%, 0,016% та 0,018% в загальному аналітичному об'ємі 200 мкл. Аналітичні планшети інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 4 днів і в цей час додавали барвник Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) в концентрації 20 мкл/лунку. Планшети знову інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 16 годин. Alamar Blue дає можливість флуориметричного зчитування, ґрунтованого на кількості живих клітин і є, таким чином, прямим вимірюванням проліферації клітин у порівнянні з негативним контролем. Планшети зчитували на лічильнику Wallac Victor 2 1420 Multilabel Counter (Wallac, Turku, Finland) при довжині хвилі 530 нм (Збудження) і 590 нм (Емісія).

Результати не показали значної проліферації відносно фонових рівнів через 0 годин, 1, 8 і 16 годин. Проби сироватки після 4 годин показали 4-кратне і більше, аж до 10-кратного, збільшення проліферації порівняно з фоном, що вказувало на наявність IL-22 в цих пробах.

В. Мишина модель LPS-індукованого ендотоксикозу: експеримент по оцінюванню впливу IL-22RA2

Аналізували здатність IL-22BA2-зараження впливати на прозапальні показники, викликані однією дозою 25 мкг LPS, введеною мишам інтраперитонеально. Всі проби аналізували на SAA, IL-22 та кількості циркулюючих нейтрофілів. Субпопуляції від кожної групи аналізували на рівні конкретних цитокінів (після 1 години проби скринували на TNF-альфа, через 4 години - на IL-6). Тварин умертвляли в зазначені години (Таблиця 8 нижче), всю кров і сироватку збирали і ділили на аліквати для аналізу.

72 самицям мишей C57BL/6N (від CRL) вводили інтраперитонеально 1 дозу IL-22RA2, як описано у Таблиці 8. Контрольними мишами були миші C57BL/6N (від CRL).

Через 30 хвилин їм робили інтраперитонеально ще одну ін'єкцію 25 мкг LPS (Sigma) у 100 мкл, щоб ініціювати ендотоксикоз. Мишей в кожній групі умертвляли у відповідні моменти часу, наведені в Таблиці 8, 50 мкл всієї крові збирали для визначення загальних кількостей циркулюючих нейтрофілів і решту центрифугували для відокремлення сироватки і ділили на аліквати для проведення різних аналізів.

Таблиця 8

Група	№	Зараження	LPS	Умертвіння	Проби
A	8	100 мкг IL-22RA2, IP	25 мкг, IP 30 хвил. після 1 зараження	Через 1 годину після ін'єкції	Аліквоти сироватки Кров на повний клінічний аналіз
B	8	10 мкг IL-22RA2, IP	25 мкг, IP 30 хвил. після 1 зараження	Через 1 годину після ін'єкції	Аліквоти сироватки Кров на повний клінічний аналіз
C	8	200 мкл PBS, IP	25 мкг, IP 30 хвил. після 1 зараження	Через 1 годину після ін'єкції	Аліквоти сироватки Кров на повний клінічний аналіз
D	8	100 мкг IL-22RA2, IP	25 мкг, IP 30 хвил. після 1 зараження	Через 4 години після ін'єкції	Аліквоти сироватки Кров на повний клінічний аналіз
E	8	10 мкг IL-22RA2, IP	25 мкг, IP 30 хвил. після 1 зараження	Через 4 години після ін'єкції	Аліквоти сироватки Кров на повний клінічний аналіз
F	8	200 мкл PBS, IP	25 мкг, IP 30 хвил. після 1 зараження	Через 4 години після ін'єкції	Аліквоти сироватки Кров на повний клінічний аналіз
G	8	100 мкг IL-22RA2, IP	25 мкг, IP 30 хвил. після 1 зараження	Через 8 годин після ін'єкції	Аліквоти сироватки Кров на повний клінічний аналіз
H	8	10 мкг IL-22RA2, IP	25 мкг, IP 30 хвил. після 1 зараження	Через 8 годин після ін'єкції	Аліквоти сироватки Кров на повний клінічний аналіз
J	8	200 мкл PBS, IP	25 мкг, IP 30 хвил. після 1 зараження	Через 8 годин після ін'єкції	Аліквоти сироватки Кров на повний клінічний аналіз
K	5	контрольні	не вводили	До ін'єкції	Аліквоти сироватки Кров на повний клінічний аналіз

Г. IL-22RA2-Fc4 нейтралізує індукцію SAA in vivo: ELISA-аналіз SAA показує, що експресія SAA, індукована LPS в миши-моделі LPS-індукованого ендотоксикозу, інгібується в результаті ін'єкції IL-22RA2-Fc4

Для визначення, чи може IL-22RA2 інгібувати індукцію SAA в миши-моделі LPS-індукованого ендотоксикозу, мишам вводили IL-22RA2 за 30 хвилин до LPS-ін'єкції, як описано в Таблиці 8 вищенаведеного Прикладу 11В.

ELISA-аналіз для визначення у пробах рівнів SAA через 4 години і 8 годин після LPS-ін'єкції здійснювали за допомогою набору для імуноаналізу SAA миши «Mouse SAA Immunoassay Kit» (BioSource International, California) за інструкціями виробника. Через 4 години миші, заражені 100 мкг або 10 мкг IL-22RA2, виявили дозозалежне статистично значуще зменшення SAA-рівнів відносно контрольних мишей, яким вводили PBS. Через 8 годин миші, заражені 100 мкг, продовжували виявляти дозозалежне статистично значуще зменшення SAA-рівнів відносно контрольних мишей, яким вводили PBS. Це вказує на те, що присутність IL-22RA2 здатна in vivo інгібувати індукцію SAA в результаті введення LPS.

Приклад 13

Вплив in vivo поліпептиду IL-22 на шкіру

A. IL-22-індукований акантоз

Мишей (самиць, C3H/HEJ, віком 8 тижнів; Jackson Labs, Bar Harbor, ME) ділили на три групи по шість тварин і одну групу з чотирьох тварин. IL-22, продукований з людських клітин BHK, вводили постійною інфузією за допомогою міні-осмотичних насосів, в результаті чого утворилися локальні стійкі концентрації сироватки, пропорційні концентрації IL-22, що містилась в насосі. Міні-осмотичні насоси Alzet (модель 2002; Alza Corporation, Palo Alto, CA) заповнювали в стерильних умовах білком IL-22 (A601F, 0,22 мл), розбавленим у фосфатно-

му буферному розчині (pH 7,0) до концентрації 2 мг/мл всередині насоса для групи 1 мишей, 0,2 мг/мл для групи 2 мишей, 0,02 мг/мл для групи 3 мишей і 0 мг/мл (тільки розріджувач) для групи 4 мишей. Насоси імплантували під шкіру через 1 см розріз в дорсальній шкірі, і шкіру закривали стерильним ушиванням рани. Ці насоси призначені для доставки їхнього вмісту зі швидкістю 0,5 мкл/год упродовж 14 днів. Застосовуючи таку номінальну швидкість інфузії, рівні доз обчислювали як 24 мкг/день, 2,4 мкг/день, 0,24 мкг/день і 0 мкг/день для груп 1-4 відповідно.

На день 14 мишей безболісно умертвляли і від кожної миши брали приблизно 1 см² проби шкіри, що оточувала ділянку з насосом. Цю шкіру фіксували у 10%-ому нейтральному буферному формаліні. Фіксовані формаліном проби шкіри занурювали у парафін, відомим методом обробляли, секціонували на зразки розміром 5 мкм і забарвлювали за допомогою гематоксиліну та еозину. Тканини досліджували під мікроскопом сліпим методом за участю ветеринарного патолога. Були помітні гістологічні зміни, і тяжкість акантозу (тобто стовщення епідермісу) оцінювали в балах наступним чином: 0 - нормальний, 1 - мінімальний акантоз, 2 - слабкий акантоз, 3 - помірний акантоз і 4 - тяжкий акантоз. Крім того, за допомогою цифрової камери CoolSnap (Roper Scientific, Inc., San Diego, CA) створювали зображення шкіри вибраних груп, і товщину епідермісу визначали за допомогою гістофотометричної програми (Scion Image for Wmdows, v. 4.02, Scion Corp., Frederick, MD).

Введення IL-22 в дозах 2,4 мкг/день і 24мкг/день призвело до потовщення епідермісу, позначеного середнім балом акантозу (див. s), що значно більше ніж у шкірі контрольних мишей. Більш того, заражені IL-22 тварини також мали інфільтрати мононуклеарних клітин в епідермісі.

Таких інфільтратів не було у контрольних мишей, яким вводили тільки наповнювач.

Оцінювальні бали акантозу (стовщення епідермісу) та заміри товщини шкіри (в наastroюваних

компонентах - пікселях) по групах наведені в Таблиці 9.

Таблиця 9

№ групи	n=	Насос	Середній акантоз	Виміряна товщина
1	6	24 мкг IL-22 в день	3,0	ND
2	6	2,4 мкг IL-22 в день	2,4	67,5
3	6	0,24 мкг IL-22 в день	2,2	ND
4	4	інфузія PBS	1,8	45,6

Б. Вплив IL-22RA2 на IL-22-індукований акантоз

Мишей (саміць, СЗН/HEJ, віком 8 тижнів; Jackson Labs, Bar Harbor, ME) ділили на вісім груп по вісім тварин в кожній групі. IL-22 вводили постійною інфузією за допомогою міні-осмотичних насосів, як описано у Прикладі 12A. Міні-осмотичні насоси Alzet (модель 2001; Alza Corporation, Palo Alto, CA) заповнювали в стерильних умовах білком IL-22 (A601F, 0,22 мл), розбавленим у фосфатному буферному розчині (pH 7,0) до концентрації 0,22 мг/мл всередині насоса для груп 1-2 мишей, 0,45 мг/мл для груп 3-4 мишей, 0,9 мг/мл для груп 5-6 мишей і 0 мг/мл (тільки розріджувач) для груп 7-8 мишей. Ці насоси призначені для доставки їхнього вмісту зі швидкістю 0,5 мкл/год упродовж 14 днів. Застосовуючи таку номінальну швидкість інфузії, рівні доз обчислювали як 10 мкг/день в групах 1-2, 5 мкг/день в групах 3-4, 2,5 мкг/день в групах 5-6 і 0 мкг/день для груп 7-8. Для кожної пари груп задану дозу IL-22 одній з груп вводили три рази (день 1, 3 і 5) разом з 0,1 мг людського білка IL-22RA2-Fc інтраперитонеально. Іншим групам робили інтраперитонеальні ін'єкції наповнювача (PBS).

На день 8 експерименту мишей безболісно умертвляли і від кожної миши брали приблизно 1

см проби шкіри, що оточувала ділянку з насосом. Цю шкіру фіксували у 10%-ому нейтральному буферному формаліні. Фіксовані формаліном проби шкіри занурювали у парафін, відомим методом обробляли, секціонували на зразки розміром 5 мкм і забарвлювали за допомогою гематоксиліну та еозину. Тканини досліджували під мікроскопом сліпим методом за участю ветеринарного патолога. Цей експеримент оцінювали інакше, ніж у попередньому прикладі. Визначали кількість шарів в епідермісі, від базального шару до зернистого шару. Базуючись на отриманих результатах, зрізи оцінювали наступним чином: 0 - нормальний (2-3 шари), 1 - слабке стовщення (3-4 шари), 2 - помірне стовщення (4-6 шарів) і 3 - сильне стовщення (>6 шарів).

Введення IL-22 в дозах 2,5, 5, 10 мкг/день призвело до стовщення епідермісу (Таблиця 10). Більш того, заражені IL-22 тварини також мали інфільтрати мононуклеарних клітин в епітермісі. Таких інфільтратів не було у контрольних мишей, яким вводили тільки наповнювач. Конкурентне введення 100 мкг IL-22RA2 (3 ін'єкції) зменшувало ступінь епідермального стовщення у мишей, яким вводили дозу 5 мкг IL-22/день.

Оцінювальні бали акантозу (стовщення епідермісу) по групах наведені в Таблиці 10.

Таблиця 10

№ групи	n=	Насос	Ін'єкція	Середній акантоз
1	8	2,5 мкг IL-22 у день	100 мкл наповнювача (3 ін'єкції)	1,1
2	8	2,5 мкг IL-22 у день	100 мкг IL-22RA2 (3 ін'єкції)	0,8
3	8	5 мкг IL-22 у день	100 мкл наповнювача (3 ін'єкції)	2,0
4	8	5 мкг IL-22 у день	100 мкг IL-22RA2 (3 ін'єкції)	0,6
5	8	10 мкг IL-22 у день	100 мкл наповнювача (3 ін'єкції)	2,0
6	8	10 мкг IL-22 у день	100 мкг IL-22RA2 (3 ін'єкції)	1,9
7	8	Наповнювач	100 мкл наповнювача (3 ін'єкції)	0,0
8	8	Наповнювач	100 мкг IL-22RA2 (3 ін'єкції)	0,0

Епідермальне стовщення та імунні інфільтрати також спостерігали у псоріатичній шкірі людини. Фенотип такої шкіри, виявлений при підшкірному введенні IL-22, додатково свідчить про можливу роль IL-22 у патогенезі псоріазу. Той факт, що злитий білок IL-22RA2-Fc може нейтралізовувати IL-22-індукований фенотип шкіри, дає можливість припустити можливість застосування інших антагоністів, наприклад нейтралізуючого антитіла anti-IL-22 або розчинного рецептора для лікування

псоріазу та інших IL-22-індукованих запальних хвороб.

В. Вплив розчинних рецепторів IL-22RA та антитіл anti-IL-22RA на IL-22- або IL-20-індукований акантоз

Здатність розчинних рецепторів IL-22RA або антитіл до IL-22RA інгібувати in vivo активність IL-22 або IL-20 оцінювали аналогічним чином, використовуючи гістологічний результат акантозу, викликаного підшкірною інфузією білка IL-22 або IL-20. У прикладі даної моделі мишам СЗН/HEJ ім-

плантували підшкірні міні-осмотичні насоси, як описано у Прикладах 12(А) і 12(Б) вище. Упродовж періоду піддання дії IL-22 або IL-20 мишам ін'єкційно вводили очищене моноклональне антитіло до IL-22 або аналогічно вводили наповнювач (контрольні миші). Наприкінці періоду інфузії IL-22 збирали проби шкіри з ділянки навколо насоса для гістологічного аналізу. Аналогічно антагоністу IL-22 розчинного рецептора IL-22RA2 припускають, що запропоновані розчинні рецептори IL-22RA антагоніста IL-22 або IL-20, або антитіла anti-IL-22RA зменшив атимуть епідермальне стовщення та інфільтрати імункомпетентних клітин, викликані IL-22 або IL-20, а відтак будуть корисними як антагоністи IL-22 або IL-20 і як терапевтичний засіб при лікуванні псоріазу або іншої викликані IL-22 або IL-20 запальної хвороби.

Приклад 14

Підвищення функціональної активності IL-22 у пробах псоріатичної шкіри людини

А. РНК-проби

Брали зразки здорової шкіри і шкіри пацієнтів, хворих на псоріаз. Останні включали шкіру хворого на стійкий бляшковий псоріаз і шкіру з сусідньої незахопленої ділянки. Звичайними методами виділяли РНК із проб шкіри людини. Цілісність і якість РНК-проб тестували на біоаналізаторі Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Б. Праймери і зонди для кількісної РЧ-ПЛР

Кількісний метод полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (РЧ-ПЛР) із застосуванням детекційної системи ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) був описаний раніше (див., Heid, C.A. et al., Genome Research 6:986-994, 1996; Gibson, U.E.M. et al., Genome Research 6:995-1001, 1996; Sunderasan, S. et al., Endocrinology 139:4156-4764, 1998). Цей метод включає використання генспецифічного зонда, який містить і репортерний барвник, і барвник-гасник флуоресценції. Коли зонд інтактний, емісія репортерного барвника пригнічується завдяки близькості барвника-гасника. Під час поширення ПЛР за допомогою додаткових генспецифічних переднього і заднього праймерів зонд розщеплюється в рузяті активності 5' - 3'-кінцевої ДНК-полімерази rTth, яка вивільняє репортерний барвник із зонда, в результаті чого збільшується флуоресцентна емісія.

Праймери і зонди, застосовані для кількісного методу РЧ-ПЛР із зворотною транскрипцією для аналізів експресії IL-22, синтезували за допомогою програми для синтезу праймерів Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Праймери для людського IL-22 синтезували, здійснюючи з'єднання інтрон-екзон для виключення ампліфікації геномної ДНК. Для синтезу продукту 72 bp у ПЛР-реакції (нижче) застосовували передній праймер, ZC42459 (SEQ ID NO:22), і задній праймер, ZC42458 (SEQ ID NO:23), при концентрації 800 nM. Відповідний зонд IL-22, ZC42460 (SEQ ID NO:24), синтезували і мітили в лабораторії ZymoGenetics. Зонд IL-22 мітили на 5'-кінці репортерним флуоресцентним барвником (6-карбоксифлуоресцеїн) (FAM) (PE Applied

Biosystems), а на 3'-кінці - барвником-гасником флуоресценції (6-карбокситетраметилпродамін) (TAMRA) (PE Applied Biosystems).

В. Кількісний метод ПЛР із зворотною транскрипцією у реальному часі

Відносні рівні мРНК IL-22 визначали, аналізуючи всі проби загальної РНК за допомогою набору TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents Kit (PE Applied Biosystems). Для кількісної оцінки був синтезований "runoff" IL-22-транскрипт для створення стандартної кривої. Криву складали на основі 10-кратних серійних розбавлень від 1e8 до 1e3 загальних копій всього сигналу для IL-22, причому кожну точку стандартної кривої аналізували тричі. Проби шкіри на загальну РНК також аналізували тричі для визначення рівнів IL-22-транскрипту людини і рівнів hGUS як ендогенного контролю. У загальному об'ємі 25 мкл кожну РНК-пробу піддавали реакції РЧ-ПЛР TaqMan EZ (PE Applied Biosystems), яка включала: приблизно 25 нг загальної РНК у DEPC (діетилпірокарбонаті), обробленому водою (тобто він не містив ДНКази/РНКаз); відповідні праймери (приблизно 800 nM ZC42459 (SEQ ID NO:22) і ZC 42458 (SEQ ID NO:23); відповідний зонд (приблизно 100 nM ZC 42460 (SEQ ID NO:24); 1X буфер TaqMan EZ; 3 mM ацетату марганцю; 300 мкМ d-CTP, d-ATP і d-GTP, кожного, і 600 мкМ d-UTP; rTth ДНК-полімераза (0,1 Од/мкл) і суміш AmpErase UNG (0,01 Од/мкл). Параметри термального циклування ПЛР були такими: етап первинної UNG-обробки - один цикл при 50°C 2 хвилини, потім етап зворотної транскрипції (3T) - один цикл при 60°C 30 хвилин, далі етап UNG-деактивації - один цикл при 95°C 5 хвилин, потім 40 циклів ампліфікації при 94°C 20 секунд і при 60°C 1 хвилину.

Відносні рівні ДНК IL-22 визначали методом стандартної кривої за інструкціями виробника, PE Biosystems (User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, December 11, 1997). Для нормалізації рівнів IL-22 застосовували заміри hGUS. Дані наведені в Таблиці 11.

Таблиця 11

Проба шкіри	IL-22
Здорової людини	0
З незараженої ділянки	0
З зараженої ділянки	1149

Не було виявлено мРНК IL-22 у пробах шкіри від здорових пацієнтів або взятих з незаражених ділянок. І навпаки, різке підвищення активації IL-22-сигналу у заражених ділянках шкіри від хворих на псоріаз. Ці дані підтверджують можливість асоціації тяжкої хвороби від IL-22 з псоріазом людини.

У псоріатичних осередках людини виявили надекспресію IL-22, що дає можливість припустити, що IL-22 бере участь у псоріазі людини. Крім того, як уже описувалось, надекспресія IL-22 у трансгенних мишей проявилась у стовщенні епідермісу і залученні імункомпетентних клітин, що є показником псоріатичного фенотипу, і при додатковій ін'єкції IL-22 здоровим мишам виявили стов-

щення епідермісу і залучення імунокомпетентних клітин, що є показником псоріатичного фенотипу, який зникав при введенні антагоніста IL-22RA2 цього розчинного рецептора. Отже, дані, отримані *in vivo*, додатково підтверджують, що прозапальний IL-22 приймає участь у псоріазі. А якщо так, то антагоністи активності IL-22, наприклад запропоновані винаходом моноклональні антитіла проти людського IL-22, а також розчинні рецептори і антитіла до них, є корисними при лікуванні запальних хвороб, зокрема як антагоністи IL-22 при лікуванні псоріазу. Крім того, антагоністи активності IL-22, наприклад запропоновані винаходом моноклональні антитіла проти людського IL-22, а також розчинні рецептори і антитіла до них, є корисними при лікуванні інших запальних хвороб, зокрема як антагоністи IL-22 при лікуванні atopічного дерматиту, ЗХК, коліту, ендотоксикозу, артриту, ревматоїдного артриту і псоріатичного артриту, хвороби дихальних шляхів у дорослих, септичного шоку, мультиорганної недостатності, запального ураження легенів, наприклад астми або бронхіту, бактеріальної пневмонії, псоріазу, екземи, atopічного і контактного дерматиту, і такої ЗХК, як виразковий коліт і хвороба Крона.

Приклад 15

Підвищення функціональної активності IL-22 у пробах шкіри людини, хворої на atopічний дерматит

А. РНК-проби

Брали проби шкіри від здорових людей ($n=4$) і від хворих на atopічний дерматит ($n=4$). З цих проб шкіри людини відомими методами виділяли РНК. Цілісність і якість РНК-проб тестували на біоаналізаторі Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Б. Праймери і зонди для кількісної РЧ-ПЛР

Кількісний метод полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (РЧ-ПЛР) із застосуванням детекційної системи ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) був описаний раніше (див., Heid, C.A. et al., *Genome Research* 6:986-994, 1996; Gibson, U.E.M. et al., *Genome Research* 6:995-1001, 1996; Sunderasan, S. et al., *Endocrinology* 139:4156-4764, 1998). Цей метод включає використання генспецифічного зонда, який містить і репортерний барвник, і барвник-гасник флуоресценції. Коли зонд інтактний, емісія репортерного барвника пригнічується завдяки близькості барвника-гасника. Під час поширення ПЛР за допомогою додаткових генспецифічних переднього і заднього праймерів зонд розщеплюється в результаті активності 5' - 3'-кінцевої ДНК-полімерази *rTth*, яка вивільняє репортерний барвник із зонда, в результаті чого збільшується флуоресцентна емісія.

Праймери і зонди, застосовані для кількісного методу РЧ-ПЛР із зворотною транскрипцією для аналізів експресії IL-22, синтезували за допомогою програми для синтезу праймерів Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Праймери для людського IL-22 синтезували, здійснюючи з'єднання інтрон-екзон для виключення ампліфікації геномної ДНК. Для синтезу продукту 72 bp у ПЛР-реакції (нижче) застосовували передній

праймер, ZC42459 (SEQ ID NO:22), і задній праймер, ZC42458 (SEQ ID NO:23), при концентрації 800 nM. Відповідний зонд IL-22, ZC42460 (SEQ ID NO:24), синтезували і мітили в лабораторії ZymoGenetics. Зонд IL-22 мітили на 5'-кінці репортерним флуоресцентним барвником (6-карбоксіфлуоресцеїн) (FAM) (PE Applied Biosystems), а на 3'-кінці - барвником-гасником флуоресценції (6-карбокситетраметилпродамін) (TAMRA) (PE Applied Biosystems).

В. Кількісний метод ПЛР із зворотною транскрипцією у реальному часі

Відносні рівні мРНК IL-22 визначали, аналізуючи всі проби загальної РНК за допомогою набору TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents Kit (PE Applied Biosystems). Для кількісної оцінки був синтезований "runoff" IL-22-транскрипт для створення стандартної кривої. Криву складали на основі 10-кратних серійних розбавлень від $1e8$ до $1e3$ загальних копій всього сигналу для IL-22, причому кожну точку стандартної кривої аналізували тричі. Проби шкіри на загальну РНК також аналізували тричі для визначення рівнів IL-22-транскрипту людини і рівнів hGUS як ендогенного контролю. У загальному об'ємі 25 мкл кожну РНК-пробу піддавали реакції РЧ-ПЛР TaqMan EZ (PE Applied Biosystems), яка включала: приблизно 25 нг загальної РНК у DEPC (діетилпірокарбонаті), обробленому водою (тобто він не містив ДНКази/РНКаз); відповідні праймери (приблизно 800 nM ZC42459 (SEQ ID NO:22) і ZC 42458 (SEQ ID NO:23); відповідний зонд (приблизно 100 nM ZC 42460 (SEQ ID NO:24); 1X буфер TaqMan EZ; 3 mM ацетату марганцю; 300 мкМ d-CTP, d-ATP і d-GTP, кожного, і 600 мкМ d-UTP; *rTth* ДНК-полімераза (0,1 Од/мкл) і суміш AmpErase UNG (0,01 Од/мкл). Параметри термального циклування ПЛР були такими: етап первинної UNG-обробки - один цикл при 50°C 2 хвилини, потім етап зворотної транскрипції (3T) - один цикл при 60°C 30 хвилини, далі етап UNG-деактивації - один цикл при 95°C 5 хвилини, потім 40 циклів ампліфікації при 94°C 20 секунд і при 60°C 1 хвилину.

Відносні рівні ДНК IL-22 визначали методом стандартної кривої за інструкціями виробника, PE Biosystems (User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, December 11, 1997). Для нормалізації рівнів IL-22 застосовували заміри hGUS.

Не було виявлено мРНК IL-22 у пробах шкіри від здорових пацієнтів або взятих з незаражених ділянок. І навпаки, різке підвищення активації IL-22-сигналу у 3 з 4 зразків шкіри хворих на atopічний дерматит. Ці дані підтверджують можливість асоціації тяжкої хвороби від IL-22 з atopічним дерматитом людини.

У пробах шкіри людини, хворої на atopічний дерматит, виявили надекспресію IL-22, що дає можливість припустити, що IL-22 бере участь у atopічному дерматиті людини. Крім того, як уже описувалось, надекспресія IL-22 у трансгенних мишей проявилась у стовщенні епідермісу і залученні імунокомпетентних клітин, що є показником фенотипу atopічного дерматиту, і при додатковій ін'єкції IL-22 здоровим мишам виявили стовщення

епідермісу і залучення імунокомпетентних клітин, що є показником фенотипу atopічного дерматиту, який зникав при введенні антагоніста IL-22RA2 цього розчинного рецептора. Отже, дані, отримані *in vivo*, додатково підтверджують, що прозапальний IL-22 приймає участь у atopічному дерматиті. А якщо так, то антагоністи активності IL-22, наприклад запропоновані винаходом моноклональні антитіла проти людського IL-22, а також розчинні рецептори і антитіла до них, є корисними при лікуванні запальних хвороб, зокрема як антагоністи IL-22 при лікуванні atopічного дерматиту. Крім того, антагоністи активності IL-22, наприклад запропоновані винаходом моноклональні антитіла проти людського IL-22, а також розчинні рецептори і антитіла до них, є корисними при лікуванні інших запальних хвороб, зокрема як антагоністи IL-22 при лікуванні ЗХК, коліту, ендотоксикозу, артриту, ревматоїдного артриту і псоріатичного артриту, хвороби дихальних шляхів у дорослих, септичного шоку, мультиорганної недостатності, запального ураження легенів, наприклад астми або бронхіту, бактеріальної пневмонії, екземи, atopічного і контактного дерматиту, і такої ЗХК, як виразковий коліт і хвороба Крона.

Приклад 16

Поліклональні антитіла проти людського IL-22

Поліклональні антитіла anti-IL-22 отримували, імунізуючи двох самиць новозеландських білих кроликів очищеним зрілим рекомбінантним поліпептидом людського IL-22 (амінокислотні залишки 22 (Ala) - 167 (Ile) послідовності SEQ ID NO:6), отриманими з ВНК-клітин (IL-22-ВНК). Кожному кролику робили першу інтраперитонеальну (IP) ін'єкцію 200 мкг очищеного білка у повному ад'юванті Фрейнда, потім IP бустер-ін'єкції по 100 мкг пептиду у неповному ад'юванті Фрейнда кожні три тижні. Через 7-10 днів після введення другої бустер-ін'єкції (всього 3 ін'єкції) у тварин брали кров і сироватку. Потім кожні три тижні тваринам робили бустер-ін'єкції і брали кров.

Людські IL-22-специфічні поліклональні антитіла очищали афінною хроматографією від імунної сироватки кроликів за допомогою колонки на білку 4В CNBr-SEPHAROSE (Pharmacia LKB), яку приготували, затосувавши 10 мг специфічного очищеного від антигена рекомбінантного білка людини IL-22-ВНК на грам CNBr-SEPHAROSE, потім проводили 20X діаліз у PBS всю ніч. Людські IL-22-специфічні антитіла аналізували методом ELISA, використовуючи як антитіло-мішень 500 нг/мл очищеного рекомбінантного білка людини IL-22-ВНК. Нижня границя детекції (НГД) очищеного афінною хроматографією антитіла anti-human IL-22 становить 280 пг/мл на його специфічний очищений рекомбінантний антиген IL-22-ВНК людини.

Людські IL-22-специфічні поліклональні антитіла додатково аналізували на їхню здатність блокувати клітинно-проліферативну активність («аналіз на нейтралізацію») очищеного рекомбінантного білка людини IL-22-ВНК на клітинах BaF3/CRF2-4/IL-22RA (Приклади 2 і 3). Для інгібування проліферації клітин достатньо було 50X молярного надлишку людських IL-22-специфічних поліклональних антитіл.

Приклад 17

Моноклональні антитіла anti-human IL-22

Моноклональні антитіла отримували, імунізуючи 4 самиць щурів Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Wilmington, Ma) очищеним зрілим рекомбінантним поліпептидом людського IL-22 (амінокислотні залишки 22 (Ala) - 167 (Ile) послідовності SEQ ID NO:6), отриманими з ВНК-клітин (IL-22-ВНК). Кожному щуру робили першу інтраперитонеальну (IP) ін'єкцію 100 мкг очищеного білка у повному ад'юванті Фрейнда (Pierce, Rockford, IL), потім IP бустер-ін'єкції по 50 мкг очищеного рекомбінантного білка у неповному ад'юванті Фрейнда кожні два тижні. Через 7-10 днів після введення третьої бустер-ін'єкції у тварин брали кров і сироватку.

Проби специфічної до людського IL-22 сироватки щурів аналізували ELISA-методом, використовуючи 500 нг/мл біотинильованого білка IL-22-ВНК людини, 500 нг/мл біотинильованого IL-22 миши, біотинильованих антитіл-мішеней mull-22-E.coli (R+D Systems, Minneapolis, MN). Три проби сироватки щурів мали титр до специфічного антитіла-мішені біотинильованого mull-22-E.coli при розбавленні 1: 1E4.

Спленоцити і клітини лімфотичних вузлів збирали у щурів з подвійними титрами і зливали з клітинами мієломи миши SP2/0 двома окремими процедурами зливання, використовуючи PEG 1500 (співвідношення 4:1 при зливанні спленоцитів з клітинами мієломи, "Antibodies A Laboratory Manual, E. Harlow and D.Lane, Cold Spring Harbor Press). Через 10 днів росту після злиття методом ELISA з використанням біотинильованого рекомбінантного білка IL-22-ВНК людини та біотинильованого рекомбінантного білка mull-22-E.coli як антитіл-мішеней були ідентифіковані специфічні антитілопродукуючі гібридомні пули. Гібридомні пули, позитивні в обох ELISA-протоколах, аналізували додатково на їхню здатність блокувати або зменшувати клітинно-проліферативну активність («аналіз на нейтралізацію») очищеного рекомбінантного білка mull-22-E.coli на клітинах BaF3/CRF2-4/IL-22RA (Приклади 2 і 3).

Гібридомні пули, що дали позитивні результати при лише ELISA-аналізі або при лише ELISA-аналізі та «аналізі на нейтралізацію», клонували принаймні два рази методом серійного розведення.

Моноклональні антитіла, очищені від культового середовища для тканин, аналізували на їхню корисність в ELISA-аналізі для кількісного визначення рекомбінантного і нативного людського білка IL-22 у пробах сироватки миши і людини. За результатами кількісного аналізу вибирали два антитіла з нижньою границею детекції приблизно 1 нг/мл рекомбінантного білка hull-22-E.coli у 100% сироватки людини.

Моноклональні антитіла, очищені від культового середовища для тканин, аналізували на їхню здатність блокувати або зменшувати клітинно-проліферативну активність («аналіз на нейтралізацію») очищеного рекомбінантного білка hull-22-E.coli або mull-22-E.coli на клітинах BaF3/CRF2-4/IL-22RA (Приклади 2 і 3). Таким шля-

хом ідентифікували шість «нейтралізуючих» моноклональних антитіл. Гібридами, що експресували нейтралізуючі моноклональні антитіла до людського IL-22, були віддані на зберігання в Американську колекцію культур (ATCC; Manassas, VA) депозитарію з охороною прав власності як оригінальні депоненти згідно з Будапештським договором, де їм були дані відповідні реєстраційні номери ATCC: клон 255.16.1.4.4.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-5035); клон 266.5.1.2.2.3 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-5033); клон 267.17.1.1.4.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-5038); клон 267.4.1.1.4.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-5037); клон 266.12.6.1.3.2.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-5034); клон 266.19.1.10.5.2 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-5036) і клон 267.9.1.1.4.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-5353).

Приклад 18

Моноклональні антитіла anti-IL-22RA

Моноклональні антитіла отримували, імунізуючи 4 щурів Lewis (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) розщепленим і очищеним рекомбінантним злитим білком muIL-22RA-Fc (SEQ ID NO:4). Кожному щуру робили первинну інтраперитонеальну (IP) ін'єкцію 100 мкг очищеного рекомбінантного злитого білка у повному ад'юванті Фрейнда (Pierce, Rockford, IL), потім IP бустер-ін'єкції по 50 мкг очищеного рекомбінантного білка у неповному ад'юванті Фрейнда кожні два тижні протягом 4 тижнів. Після перших 4 тижнів імунізації кожні 2 тижні упродовж 4 тижнів вводили IP бустер-ін'єкції 50 мкг розщепленого очищеного рекомбінантного білка, з'єданого з білком-носієм гемоціаніном лімфи равлика (KHL, Pierce, Rockford IL) у неповному ад'юванті Фрейнда, потім у тварин брали кров і сироватку.

Проби специфічної до muIL-22RA сироватки щурів аналізували ELISA-методом, використовуючи 500 нг/мл очищеного рекомбінантного злитого білка muIL-22RA-Fc як специфічне антитіло-мішень, а неспоріднений злитий білок як неспецифічне антитіло-мішень.

Спленоцити збирали у щурів з одинарним титром і зливали з клітинами мієломи миши SP2/0 згідно з оптимізованим протоколом ПЕГ-опосередкованого злиття (Rockland Immunochemicals). Через 12 днів росту після злиття методом ELISA з використанням 500 нг/мл кожного з: очищеного рекомбінантного злитого білка muIL-22RA-Fc-Bv як специфічного антитіла-мішені і неспорідненого злитого білка як неспецифічного антитіла-мішені були ідентифіковані специфічні антитілопродукуючі гібридомні пули. Гібридомні пули, позитивні тільки до специфічного антитіла-мішені, аналізували додатково на їхню здатність блокувати або зменшувати клітинно-проліферативну активність («аналіз на нейтралізацію») очищеного рекомбінантного білка muIL-22-E.coli на клітинах BaF3/CRF2-4/IL-22RA (Приклади 2 і 3) та методом FACS-аналізу на здатність зв'язуватись з клітинами BaF3/CRF2-4/IL-22RA (Приклади 2 і 3) як антитіла-мішені.

Гібридомні пули, що дали специфічні позитивні результати при лише ELISA-аналізі і позитивні результати при FACS-аналізі або «аналізі на нейтралізацію», клонували принаймні два рази методом серійного розведення.

Моноклональні антитіла в культуральних середовищах для тканин аналізували на їхню здатність блокувати або зменшувати проліферацію клітин BaF3/CRF2-4/IL-22RA (Приклади 2 і 3), вироблених у присутності очищених рекомбінантних білків muIL-22-E.coli або huIL-22-BHK. Ідентифікували чотирнадцять «нейтралізуючих» моноклональних антитіл і клонували дев'ять моноклональних антитіл.

Гібридами, що експресували нейтралізуючі моноклональні антитіла до мишиного IL-22RA, були віддані на зберігання в Американську колекцію культур (ATCC; Manassas, VA) депозитарію з охороною прав власності як оригінальні депоненти згідно з Будапештським договором, де їм були дані відповідні реєстраційні номери ATCC: клон R2.1.1G11.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6035); клон R2.1.5F4.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6024); клон R2.1.5H8.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6025); клон R2.1.12G7.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6036); клон R2.1.13C8.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6037); клон R2.1.15E2.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6038); клон R2.1.16C11.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6039); клон R2.1.18C8.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6040) і клон R2.1.21G8.2 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6111).

Гібридами, що експресували нейтралізуючі моноклональні антитіла до людського IL-22RA, були віддані на зберігання в Американську колекцію культур (ATCC; Manassas, VA) депозитарію з охороною прав власності як оригінальні депоненти згідно з Будапештським договором, де їм були дані відповідні реєстраційні номери ATCC: клон 280.46.3.4 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6284); клон 281.73.49.1.1 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6285); клон 283.4.1.2 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6287); клон 283.52.5.4 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6311) і клон 283.108.2.3 (позначення патентного депозиту ATCC PTA-6286).

Приклад 19

Величини спорідненості до зв'язування двох моноклональних антитіл Rat-anti-Ms-IL-22RA

Антитіло (Jackson), специфічне до Goat-anti-Rat IgG-Fc-гамма, імобілізували на чіпі CM5 Biacore. Аналіз оптимізували таким чином, щоб зв'язувати кожне моноклональне антитіло на поверхні захоплення anti-Rat, і потім ряд концентрацій IL-22RA упорскували через моноклональне антитіло (mAb), щоб визначити швидкість асоціації (Ka) і швидкість дисоціації (Kd). Після попереднього тестування спостерігали неспецифічне зв'язування між злитим білком і поверхнею захоплення на чіпі. Брали флакон з IL-22RA, що мав Fc4-мітку, розщеплену тромбіном, і послідовно аналізували, щоб виявити відсутність впливу фону. Після кож-

ного тесту поверхню регенерували знову в антитіло anti-Rat за допомогою 2 ін'єкцій 20 мМ HCl. Дані отримували для кожного mAb, і для оцінки кінетики зв'язування антитіла anti-IL-22RA з білком IL-22RA використовували програму оцінки (BIAevaluation software version 3.2, Pharmacia BIAcore, Uppsala, Sweden). Отримані дані наведені в Таблиці 12.

Таблиця 12

Клон R2.1.5F4.1 **		Клон R2.1.15E2.1 **	
ka (M-1s-1)	1.49E+06	ka (M-1s-1)	1.76E+06
kd (s-1)	1.70E-04	kd (s-1)	2.55E-04
KA (M-1)	8.76E+09	KA (M-1)	6.66E+09
KD (M)	1.14E-10	KD (M)	1.504E-10
Chi2	2.08	Chi2	1.5

** Показані константи рівноваги швидкості асоціації (Ka) і швидкості дисоціації (Kd) для кожного моноклонального антитіла anti-IL-22RA і значення знаходяться в машинних межах. Chi2 відноситься до суми площі залишків між кривими зв'язування і згладжувальними кривими оцінки. Чим ближче до 0, тим більша достовірність даних.

Як видно з Таблиці 12, обидва моноклональні антитіла anti-IL-22RA міцно зв'язуються з білком IL-22RA, що доводиться зв'язуванням у пікомолярній концентрації з IL-22RA (розщеплена тромбіном Pс4-мітка). Наведені дані мають високу достовірність, яка базується на низьких значеннях Chi² і тому факті, що клон R2.15F4.1 моноклонального антитіла має трохи більшу спорідненість до рецептора IL-22RA.

Приклад 20

Імуногістохімічний аналіз експресії білка IL-22 in vivo у пробах тканин

А. Стисле викладення

Імуногістохімічний (ІГХ) аналіз експресії білка IL-22 і локалізації проводили, використовуючи моноклональне антитіло (Mab 266.19.1.10.5.2) проти людського IL-22 (anti-hIL-22) в наступних зразках тканин: багатотканинних контрольних препаратах людини Normal Grid та такни пухлин Tumor Grid; у пробах тканин із запаленої підшлункової залози людини, легенів і при хворобі нирок; у пробах шкіри від людей, хворих на псоріаз; INS IL-22 TG (експресованого із промотора інсуліну щура) і підшлункової залози миши WT; mIL-22-EuLCK TG і зразках шкіри миши WT; і зразку товстої кишки миши DSS (WT та IL-22 KO). Крім того, порівнювали картину забарвлення моноклонального антитіла anti-hIL-22 (MAB 266.19.1.10.5.2 (Приклад 17)) з поліклональним антитілом (anti-hIL-22 кролика (Приклад 16)).

Моноклональні антитіла anti-Human IL-22 Mab 266.16.1.4.4.1 та Mab 266.19.1.10.5.2 щурів (Приклад 17) при тестуванні виявили забарвлення більшості клітин ВНК/IL-22 людини (>50%), але і деякої кількості клітин ВНК/IL-22 миши (1-5%) і були використані для дослідження розподілу в тканинах і експресії IL-22 як у пробах людини, так і у пробах тварин-моделей, а також для порівняння

картини забарвлення з поліклональним антитілом кролика для підтвердження результатів.

Б. Матеріали і методи

Фіксовані формаліном і занурені у парафін клітини і тканини від людських джерел і від мишиних моделей секціонували на зразки по 5 мкм. Клітини включали ВНК-клітини, експресуючі або людський, або мишиний IL-22, і дикий тип як позитивний контроль і негативний контроль відповідно. Тканини людини включали: багатотканинний контрольний препарат (NormalGrid™; Biomed, Foster City, CA) з 50 зрізами різних тканин здорової людини (наприклад, головного мозку, гіпофізу, надниркової залози, молочної залози, нирки, серця, шлунку, тонкої кишки, задньої кишки, печінки плоду, печінки, шкіри, підшлункової залози, легенів, мигдалини, яєчника, яєчок, простати, матки, плаценти, щитовидної залози і селезінки); багатотканинний контрольний препарат (TumorGrid™; Biomed, Foster City, CA) з 50 зрізами тканин різних пухлин людини (наприклад, аденокарциноми легенів, аденокарциноми печінки, аденокарциноми нирки, аденокарциноми товстого кишечника, аденокарциноми молочної залози, аденокарциноми щитовидної залози, аденокарциноми шлунку, аденокарциноми простати, аденокарциноми підшлункової залози, аденокарциноми яєчника, лімфоми, меланоми, саркоми Евінга, епітеліоїдної саркоми, злоякісної фіброгістіоцитоми, саркоми Рабдо, карциноїдної пухлини, недиференційованої карциноми, мезотеліоми, теретоми і пухлини яєчка); карциноми легенів від CHTN (Cooperation Human Tissue Network, Cleveland, Ohio); здорової підшлункової залози, підшлункової залози з хронічним панкреатитом; легенів з хронічним навколосудинним запаленням, нирки або з багатофокальним гломерулосклерозом, мезангіопроліферативним гломерулонефритом, або з склеротичним клубочковим інтерстиціальним фіброзом від NDRI (National Disease Research Interchange, Philadelphia, PA); та зразків псоріатичної шкіри людини. Мишині тканини включали: товсті кишки від мишей-моделей запальної хвороби кишечника (3XK) (описаної тут DSS-моделі, миші-самиці Swiss Webster) та від мишей-моделей коліту (DSS-миші; миші-самиці дикого типу (WT) та IL-20-нокаутні миші-самиці (KO)), яким вводили або наповнювач, або 4% DSS у питну воду протягом 7 днів; зразки шкіри від трансгенних (TG) тварин-моделей, в тому числі mIL-22-EuLCK TG та mIL-22-INS контрольних і трансгенних тварин. Один зріз на блок/препарат забарвлювали гематоксиліном і еозином (H&E) для гістологічного дослідження, і наступні зрізи імуногістохімічно забарвлювали для виявлення експресії та локалізації білка IL-22.

Для імуногістохімічного дослідження клітини і зрізи тканин поміщали на предметні стекла мікроскопа ChemMate™ Capillary Gap Plus (BioTek, Winooski, Vermont), висушували при 60°C у печі протягом 60 хвилин і депарафінували в стандартних умовах: 3х5 хвилин у ксилолі, 4 хвил. у 100% EtOH, 3 хвил. у 100% EtOH і 2 хвил. у 95% EtOH. Зрізи тканин піддавали 20-хвилинному процесу фермент-індукованого виведення епітопу при 37°C за допомогою пепсину (NeoMarkers, Fremont, CA) з

наступним етапом блокування авідином/біотином за інструкціями виробника (Zymed, South San Francisco, CA). Для забарвлення використовували автоматичний забарлювальний пристрій TechMate 500™ Automated Immunostainer та імуногістохімічний протокол використання імунопероксидази (IP-протокол) з системою детекції комплексу авідин-біотин (Ventana Biotek Systems, Tucson, AZ). Забарлювальний пристрій TechMate 500™ Automated Immunostainer використовує принцип капілярної дії, а IP-протокол - тип забарвлювання за так званою «сендвіч»-методикою. Зрізи попередньо блокували за допомогою 5% нормальної сироватки козла (Vector, Burlingame, CA) в PBS протягом 10 хвилин, після чого один раз промивали буфером 1 (Signet, Dedham, MA), потім інкубували з первинним антитілом проти IL-22 (MAB 266.19.1.10.5.2) (Приклад 17), PAS, очищений при 2,04 мг/мл, розбавляли при співвідношенні 1:1800 протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, після чого 5 разів промивали буфером 1. Первинне антитіло розбавляли у буфері для розбавлення антитіл TechMate 500™ (Ventana). Біотинілований імуноглобулін Goat anti-rat IgG (Vector) розбавляли при співвідношенні 1:200 плюс використовували 5% нормальну сироватку козла і 2,5% знежирене сухе молоко як вторинно-зв'язуючі антитіла протягом 25 хвилин при кімнатній температурі, потім 1 раз промивали буфером 1 і один раз буфером 2 і 3 (Signet). Зрізи тканин потім піддавали протягом 3х7 хвилин блокуванню пероксидом водню (HP) (Ventana), потім три рази промивали буфером 2 і 3. Мічення імунопероксидазою здійснювали за допомогою набору пероксидів DAB kit (Ventana), інкубували з комплексом авідин-біотин (ABC) протягом 30 хвил., потім 5 разів промивали буфером 2 і 3 і діамінобензидином (DAB) протягом 4х4 хвилин, після чого 2 рази промивали буфером 2 і 3 і один раз водою (Signet, Cat. No. 2340). Тканини потім рахували, забарвлювали метиловим зеленим барвником (Dako, Cat. No. S1962) протягом 10 хвил., потім два рази промивали буфером 2 і 3 і три рази водою. Контроль включав неімунні первинні сироватки з використанням контролю у вигляді ізотопу первинного антитіла (Zymed) для заміщення первинного антитіла.

Імунозабарвлення досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BH-2, а зображення фіксували за допомогою цифрової камери CoolSNAP HQ (Roper Scientific, Tucson, AZ).

В. Результати

Позитивні і негативні контрольні клітинні лінії: MAB 266.19.1.10.5.2, моноклональне антитіло anti-IL-22, показало позитивне забарвлення і на ВНК-клітинах (+++), що експресували людський IL-22, і на ВНК-клітинах (+), що експресували мишиний IL-22, і не показало забарвлення на ВНК-клітинах дикого типу (-). Всі позитивні і негативні клітинні лінії ВНК, забарвлені негативним контролем ізотопом шура для заміщення первинного антитіла, не показали забарвлення (-), що означало, що антитіло є специфічним до ліганду IL-22. Антитіло мало перехресну імунореактивність і по відношенню до людського IL-22, і до мишиного IL-22.

Тканини людини: досліджували багатотканинні препарати людини Normal Grid та тканини пухлин Tumor Grid, зразки уражених хворобою підшлункової залози, легені та нирки і зразки псоріатичної шкіри людини. Ці тканини людини включали тканини: 1) головного мозку, гіпофізу, надниркової залози, молочної залози, нирки, серця, шлунку, тонкої кишки, задньої кишки, печінки плоду, печінки, шкіри, підшлункової залози, легені, мигдалини, яєчника, яєчок, простати, матки, плаценти, щитовидної залози і селезінки) на багатотканинних контрольних препаратах (NormalGrid™)/тканини здорової людини; 2) аденокарциноми легенів, аденокарциноми печінки, аденокарциноми нирки, аденокарциноми товстого кишечника, аденокарциноми молочної залози, аденокарциноми щитовидної залози, аденокарциноми шлунку, аденокарциноми простати, аденокарциноми підшлункової залози, аденокарциноми яєчника, лімфоми, меланоми, саркоми Евінга, епітеліоїдної саркоми, злоякісної фіброгістіоцитоми, саркоми Рабдо, карциноїдної пухлини, недиференційованої карциноми, мезотеліоми, теретоми і пухлини яєчка на багатотканинних контрольних препаратах (TumorGrid™)/ненормальні тканини людини/пухлина; 3) здорової підшлункової залози, підшлункової залози з хронічним панкреатитом; легені з хронічним навколосудинним запаленням, нирки або з багатофокальним гломерулосклерозом, мезангіопроліферативним гломерулонефритом, або з склеротичним клубочковим інтерстиціальним фіброзом від CHTN та/або NDRI та 4) зразків псоріатичної шкіри людини.

Мишині тканини: досліджували підшлункові залози трансгенних мишей (INS IL-22 TG) і мишей дикого типу (WT). Клітини, розсіяні по островках у підшлункових залозах мишей INS IL-22 TG, демонстрували сильне позитивне забарвлення (+++) з моноклональним антитілом MAB 266.19.1.10.5.2, а підшлункові залози мишей дикого типу не показали забарвлення (-).

Порівняння поліклональних і моноклональних антитіл. Поліклональне антитіло anti-IL-22 (Приклад 16) виявилось чутливим, тоді як моноклональне антитіло MAB 266.19.1.10.5.2 - специфічним. Поліклональне антитіло показало позитивне забарвлення на на ВНК-клітинах (+++), що експресували IL-22 людини, на ВНК-клітинах (+), що експресували мишиний IL-22, в різних зразках тканин людей і мишей (+) і в островках мишей INS IL-22 TG (+++). Більший процент позитивного забарвлення в зазначених островках був у трансгенних мишей порівняно з мишами дикого типу. У трансгенних мишей забарвлення, як правило, розподілялось по всьому островку (+++), тоді як у мишей дикого типу забарвлення, як правило, обмежувалося периферією островка (+). Однак це антитіло також показало неспецифічне забарвлення на негативних контрольних ВНК-клітинах дикого типу (+). Моноклональне антитіло показало позитивне забарвлення на на ВНК-клітинах (+++), що експресували IL-22 людини, на ВНК-клітинах (+), що експресували мишиний IL-22 і в зазначених островках мишей INC mIL-22 TG (+++). У трансгенних мишей забарвлення, як правило, розподілялось по всьому

му островку (+++), тоді як в островках мишей дикого типу забарвлення не було (-).

Приклад 21

Підвищена функціональна активність IL-20 у пробах псоріатичної шкіри людини

А. РНК-проби

Брали зразки здорової шкіри і шкіри пацієнтів, хворих на псоріаз. Останні включали шкіру хворого на псоріаз і шкіру з сусідньої неуразеної ділянки. Звичайними методами виділяли РНК із проб шкіри людини. Цілісність і якість РНК-проб тестували на біоаналізаторі Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Б. Праймери і зонди для кількісної РЧ-ПЛР

Кількісний метод полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (РЧ-ПЛР) із застосуванням детекційної системи ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) був описаний раніше (див., Heid, C.A. et al., Genome Research 6:986-994, 1996; Gibson, U.E.M. et al., Genome Research 6:995-1001, 1996; Sunderasan, S. et al., Endocrinology 139:4756-4764, 1998). Цей метод включає використання генспецифічного зонда, який містить і репортерний барвник, і барвник-гасник флуоресценції. Коли зонд інтактний, емісія репортерного барвника пригнічується завдяки близькості барвника-гасника. Під час поширення ПЛР за допомогою додаткових генспецифічних переднього і заднього праймерів зонд розщеплюється в результаті активності 5' - 3'-кінцевої ДНК-полімерази rTth, яка вивільняє репортерний барвник із зонда, в результаті чого збільшується флуоресцентна емісія.

Праймери і зонди, застосовані для кількісного методу РЧ-ПЛР із зворотною транскрипцією для аналізів експресії IL-20, синтезували за допомогою програми для синтезу праймерів Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) Для синтезу продукту 71 bp у ПЛР-реакції (нижче) застосовували передній праймер, ZC40541 (SEQ ID NO:25), і задній праймер, ZC40542 (SEQ ID NO:26), при концентрації 800 нМ. Відповідний зонд IL-20 TaqMan®, ZC40544 (SEQ ID NO:27), синтезували і мітили в лабораторії PE Applied Biosystems. Зонд IL-20 мітили на 5'-кінці репортерним флуоресцентним барвником (6-карбоксифлуоресцеїн) (FAM) (PE Applied Biosystems), а на 3'-кінці - барвником-гасником флуоресценції (6-карбокситетраметилпродамін) (TAMRA) (PE Applied Biosystems).

В. Кількісний метод ПЛР із зворотною транскрипцією у реальному часі

Відносні рівні мРНК IL-20 визначали, аналізуючи всі проби загальної РНК за допомогою набору TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents Kit (PE Applied Biosystems). Для кількісної оцінки був синтезований "runoff" IL-20-транскрипт для створення стандартної кривої. Криву складали на основі 10-кратних серійних розбавлень від 1e8 до 1e3 загальних копій всього сигналу для IL-20, причому кожну точку стандартної кривої аналізували тричі. Проби шкіри на загальну РНК також аналізували тричі для визначення рівнів IL-20-транскрипту людини і рівнів hGUS як ендogenous контролю. У загальному об'ємі 25 мкл кожну РНК-пробу підда-

вали реакції РЧ-ПЛР TaqMan EZ (PE Applied Biosystems), яка включала: приблизно 25 нг загальної РНК у DEPC (діетилпірокарбонаті), оброблену водою (тобто він не містив ДНКази/РНКази); відповідні праймери (приблизно 800 нМ ZC40541 (SEQ ID NO:25) і ZC 40542 (SEQ ID NO:26); відповідний зонд (приблизно 100 нМ ZC 40544 (SEQ ID NO:27); 1X буфер TaqMan EZ; 3 мМ ацетату марганцю; 300 мкМ d-CTP, d-ATP і d-GTP, кожного, і 600 мкМ d-UTP; rTth ДНК-полімераза (0,1 Од/мкл) і суміш AmpErase UNG (0,01 Од/мкл). Параметри термального циклування ПЛР були такими: етап первинної UNG-обробки - один цикл при 50°C 2 хвилини, потім етап зворотної транскрипції (3T) - один цикл при 60°C 30 хвилин, далі етап UNG-дезактивації - один цикл при 95°C 5 хвилин, потім 40 циклів ампліфікації при 94°C 20 секунд і при 60°C 1 хвилину.

Відносні рівні РНК IL-20 визначали методом стандартної кривої за інструкціями виробника, PE Biosystems (User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, December 11, 1997). Для нормалізації рівнів IL-20 застосовували заміри hGUS. Дані наведені в Таблиці 13.

Таблиця 13

Проба шкіри	IL-20
Здорової людини	2903
З незараженої ділянки	7233
З зараженої ділянки	27,695

Хоча було виявлено мРНК IL-20 у пробах шкіри від здорових пацієнтів або взятих з незаражених ділянок, підвищення активності IL-20-сигналу спостерігали в зараженій шкірі хворих на псоріаз. Субодиночі рецептори IL-20, в тому числі IL-20RA, IL-22RA та IL-20RB, експресували у здоровій і хворій шкірі людини. Ці дані підтверджують можливість асоціації тяжкої хвороби від IL-20 з псоріазом людини.

У псоріатичних осередках людини виявили надекспресію IL-20, що дає можливість припустити, що IL-20 бере участь у псоріазі людини. Крім того, як уже описувалось, надекспресія IL-20 у трансгенних мишей проявилась у стовщенні епідермісу і залученні імунотоксичного клітин, що є показником псоріатичного фенотипу. Отже, дані, отримані in vivo, додатково підтверджують, що IL-20 приймає участь у псоріазі. А якщо так, то антагоністи активності IL-20, наприклад запропоновані винаходом моноклональні антитіла проти людського IL-22RA, розчинні рецептори і антитіла до них, а також нейтралізуючі та моноклональні антитіла є корисними як антагоністи IL-20 при лікуванні запальних хвороб, наприклад псоріазу та інших описаних тут станів.

Приклад 22

Підвищена функціональна активність IL-20 у пробах шкіри людини, хворої на atopічний дерматит

А. РНК-проби

Брали зразки здорової шкіри і шкіри пацієнтів, хворих на псоріаз. Останні включали шкіру хворого

на псоріаз і шкіру з сусідньої неураженої ділянки. Звичайними методами виділяли РНК із проб шкіри людини. Цілісність і якість РНК-проб тестували на біоаналізаторі Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Б. Праймери і зонди для кількісної РЧ-ПЛР

Кількісний метод полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (РЧ-ПЛР) із застосуванням детекційної системи ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) був описаний раніше (див., Heid, C.A. et al., *Genome Research* 6:986-994, 1996; Gibson, U.E.M. et al., *Genome Research* 6:995-1001, 1996; Sunderasan, S. et al., *Endocrinology* 139:4756-4764, 1998). Цей метод включає використання генспецифічного зонда, який містить і репортерний барвник, і барвник-гасник флуоресценції. Коли зонд інтактний, емісія репортерного барвника пригнічується завдяки близькості барвника-гасника. Під час поширення ПЛР за допомогою додаткових генспецифічних переднього і заднього праймерів зонд розщеплюється в результаті активності 5' - 3'-кінцевої ДНК-полімерази rTth, яка вивільняє репортерний барвник із зонда, в результаті чого збільшується флуоресцентна емісія.

Праймери і зонди, застосовані для кількісного методу РЧ-ПЛР із зворотною транскрипцією для аналізів експресії IL-20, синтезували за допомогою програми для синтезу праймерів Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Для синтезу продукту 71 бп у ПЛР-реакції (нижче) застосовували передній праймер, ZC40541 (SEQ ID NO:25), і задній праймер, ZC40542 (SEQ ID NO:26), при концентрації 800 нМ. Відповідний зонд IL-20 TaqMan®, ZC40544 (SEQ ID NO:27), синтезували і мітили в лабораторії PE Applied Biosystems. Зонд IL-20 мітили на 5'-кінці репортерним флуоресцентним барвником (6-карбоксифлуоресцеїн) (FAM) (PE Applied Biosystems), а на 3'-кінці - барвником-гасником флуоресценції (6-карбокситетраметилпропамін) (TAMRA) (PE Applied Biosystems).

В. Кількісний метод ПЛР із зворотною транскрипцією у реальному часі

Відносні рівні мРНК IL-20 визначали, аналізуючи всі проби загальної РНК за допомогою набору TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents Kit (PE Applied Biosystems). Для кількісної оцінки був синтезований "runoff" IL-20-транскрипт для створення стандартної кривої. Криву складали на основі 10-кратних серійних розбавлень від 1e8 до 1e3 загальних копій всього сигналу для IL-20, причому кожну точку стандартної кривої аналізували тричі. Проби шкіри на загальну РНК також аналізували тричі для визначення рівнів IL-20-транскрипту людини і рівнів hGUS як ендogenous контролю. У загальному об'ємі 25 мкл кожну РНК-пробу піддавали реакції РЧ-ПЛР TaqMan EZ (PE Applied Biosystems), яка включала: приблизно 25 нг загальної РНК у DEPC (діетилпірокарбонаті), обробленому водою (тобто він не містив ДНКази/РНКазі); відповідні праймери (приблизно 800 нМ ZC40541 (SEQ ID NO:25) і ZC 40542 (SEQ ID NO:26); відповідний зонд (приблизно 100 нМ ZC 40544 (SEQ ID NO:27); 1X буфер TaqMan EZ; 3 мМ ацетату мар-

ганцю; 300 мкМ d-CTP, d-ATP і d-GTP, кожного, і 600 мкМ d-UTP; rTth ДНК-полімераза (0,1 Од/мкл) і суміш AmpErase UNG (0,01 Од/мкл). Параметри термального циклування ПЛР були такими: етап первинної UNG-обробки - один цикл при 50°C 2 хвилини, потім етап зворотної транскрипції (3Т) - один цикл при 60°C 30 хвилин, далі етап UNG-дезактивації - один цикл при 95°C 5 хвилин, потім 40 циклів ампліфікації при 94°C 20 секунд і при 60°C 1 хвилину.

Відносні рівні РНК IL-20 визначали методом стандартної кривої за інструкціями виробника, PE Biosystems (User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, December 11, 1997). Для нормалізації рівнів IL-20 застосовували заміри hGUS.

У пробах шкіри виявили низький рівень мРНК IL-20 (приблизно 800 копій). І навпаки, у пробах шкіри хворих на atopічний дерматит виявили підвищену функціональну активність IL-20-сигналу (приблизно 8600 копій). Субодиниці рецептора IL-20, в тому числі IL-20RA, IL-22RA та IL-20RB, експресували у здоровій і хворій шкірі людини. Ці дані підтверджують можливість асоціації тяжкої хвороби від IL-20 з atopічним дерматитом людини. У пробах шкіри людини, хворої на atopічний дерматит, виявили надекспресію IL-20, що дає можливість припустити, що IL-20 бере участь у atopічному дерматиті людини. Крім того, як уже описувалось, надекспресія IL-20 у трансгенних мишей проявилась у стовщенні епідермісу і залученні імункомпетентних клітин, що є показником фенотипу atopічного дерматиту. Отже, дані, отримані in vivo, додатково підтверджують, що IL-20 приймає участь у atopічному дерматиті. А якщо так, то антагоністи активності IL-20, наприклад запропоновані винаходом моноклональні антитіла проти людського IL-22RA, розчинні рецептори і антитіла до них, а також нейтралізуючі та моноклональні антитіла є корисними як антагоністи IL-20 при лікуванні запальних хвороб, наприклад atopічного дерматиту та інших описаних тут станів.

Приклад 23

Підвищення функціональної активності IL-8 під дією IL-20

Епідермальні неонатальні кератиноцити здорової людини (NHEK) (від Clonetics) при пасажі 2 висівали і вирощували до конfluентності у 12-лункових планшетах для культивування тканин. Середовище для вирощування кератиноцитів (KGM) купували у ф. "Clonetics". Коли клітини досягали конfluентності, їх промивали середовищем KGM мінус фактори росту = кератиноцитарне базальне середовище (KBM). Клітини послаблювали без сироватки у KBM протягом 72 годин перед додаванням до досліджуваних сполук, як позитивний контроль використовували тромбін при концентрації 1 Міжнародна одиниця/мл (МО/мл) і трисин при 25 нМ. Додавали один мілілітр середовища на лунку. Як негативний контроль використовували лише KBM.

Готували IL-20 в KBM-середовищі і додавали в різних концентраціях, від 2,5 мкг/мл до 618 нг/мл в першому експерименті і від 2,5 мкг/мл до 3 нг/мл у другому експерименті.

Клітини інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 48 годин. Супернатанти видаляли і заморожували при -80°C протягом кількох днів перед визначенням рівнів IL-8 і GM-CSF. Для визначення продукції цитокіну використовували набір № D8050 (RandD Systems, Inc.) для імуноаналізу людського IL-8 і набір № HSGMO (RandD Systems, Inc.) для імуноаналізу людського GM-CSF, дотримуючись інструкцій виробника.

Результати показали, що експресія IL-8 та GM-CSF була викликана IL-20.

Приклад 24

Підвищення функціональної активності запальних цитокінів під дією IL-20

Клітинну лінію кератиноцитів людини, HaCaT, вирощували при 37°C кілька днів після досягнення конfluence у колбах T-75 для культивування тканин. Потім нормальне середовище для вирощування (DMEM+10% FBS) видаляли і заміняли безсироватковим середовищем. Потім 2 дні клітини інкубували при 37°C. DMEM потім видаляли і по 4 колби з клітинами обробляли за один раз при кожному з чотирьох наступних режимів протягом 4 годин при 37°C: рекомбінантний людський (rh) IL-1 альфа в концентрації 5 нг/мл; rh IL-1 альфа в концентрації 20 нг/мл; rh IL-1 альфа в концентрації 5 нг/мл+IL-20 в концентрації 1 мкг/мл або rh IL-10 в концентрації 10 нг/мл.

Після обробки цитокіном середовище видаляли, і клітини лізували за допомогою розчину тіоціанату гуанідину. Загальну РНК виділяли з клітинного лізату центрифугуванням всю ніч на градієнті хлориду цезію. Наступного дня осад РНК ресуспендували у розчині TE/SDS і осаджували етанолом. Потім за допомогою спектрофотометра визначали кількість РНК, обробляли ДНК-полімеразою, дотримуючись інструкції Section V.B. of Clontech's Atlas™ cDNA Expression Arrays User Manual (version PT3140-1/PR9X390, published 11/5/99). Якість РНК-проб перевіряли обчисленнями чистоти, що базувалися на даних спектрометра, і візуалізацією на агарозному гелі. Геномне забруднення РНК-проб виключали ПЛР-аналізом бета-актинового гена.

Потім за протоколами ф. "Clontech" здійснювали збагачення PolyA+, синтез зонда і гібридизацію згідно з інструкціями Atlas™ (див. plus Atlas™ Pure Total RNA Labeling System User Manual, PT3231-1/PR96157, published 6/22/99). Стисло, РНК polyA+ виділяли з 50 мг загальної РНК за допомогою покритих стрептавідином магнітних гранул (Clontech, Paolo Alto, CA) і сепаратора магнітних частинок. РНК polyA+ потім мітили ^{alpha32}P-dATP методом РЧ-ПЛР. В реакції застосовували праймери Clontech CDS, специфічні до 268 генів на Atlas™-матриці цитокінів/рецепторів людини (Cat.#7744-1). Мічений зонд виділяли методом колонкової хроматографії і рахували у сцинтиляторі.

Atlas™-матриці попередньо гібридизували за допомогою Clontech ExpressHyb плюс 100 мкг/мл денатурованої нагріванням ДНК сперми лосося протягом принаймні 30 хвилин при 68°C при постійному струшуванні. Мембрани потім гібридизували при 1,9×10⁷ імпульсах за хв./мл (всього

1,14×10⁷ імпульсів/хв) всю ніч при 68°C при постійному струшуванні. Наступного дня мембрани промивали протягом 30 хвилин 4 рази у 2X SSC, 1% SDS при 68°C, плюс 1 раз протягом 30 хвилин в 0,1X SSC, 0,5% SDS при 68°C, потім один останній раз при кімнатній температурі промивали 5 хвилин у 2X SSC. Матричні мембрани потім поміщали у пластикові камери Kodak, герметично закривали і піддавали дії фосфорного екрану пристрою для створення зображень всю ніч при кімнатній температурі. Наступного дня фосфорні екрани сканували на фосфорний пристрій створення зображень і аналізували за допомогою програми Clontech's AtlasImage™ 1.0.

Гени, функціональна активність яких підвищилась під дією IL-20:

1. Активність фактора некрозу пухлини (TNF) підвищилась у 1,9-2,4 рази під дією IL-20.

2. Активність факторів росту плаценти (PLCF) 1 і 2 підвищилась у 1,9-2,0 рази під дією IL-20.

3. Активність рецептора фактора II коагуляції підвищилась у 2,0-2,5 рази під дією IL-20.

4. Активність рецептора кальцитоніну підвищилась у 2,2-2,3 рази під дією IL-20.

5. Активність білка TSG-6, зв'язуючого TNF-індукований гіалуронат, підвищилась у 2,1-2,2 рази під дією IL-20.

6. Активність попередника рецептора-1 фактора росту васкулярного ендотелію (VEGF), рецептора тирозин-протеїнкінази (FLT) (SFLT) підвищилась у 2,1-2,7 рази під дією IL-20.

7. Активність MRP-8 (кальційзв'язуючого білка у макрофагах, споріднених з фактором інгібування міграції) підвищилась у 2,9-4,1 рази під дією IL-20.

8. Активність MRP-14 (кальційзв'язуючого білка у макрофагах, споріднених з фактором інгібування міграції) підвищилась у 3,0-3,8 рази під дією IL-20.

9. Активність релаксину H2 підвищилась у 3,14 рази під дією IL-20.

10. Активність рецептора III (300 кДа) фактора-бета росту трансформації (TGFP) підвищилась у 2,4-3,6 рази під дією IL-20.

Гени, що виявляють синергізм при обробці IL-20 + IL-1

1. Активність морфогенного білка 2а кістки підвищилась у 1,8 рази під дією тільки IL-20, у 2,5 рази під дією тільки IL-1 і у 8,2 рази під дією IL-20 та IL-1 разом.

2. Активність MRP-8 підвищилась у 2,9 рази під дією тільки IL-20, у 10,7 рази під дією тільки IL-1 і у 18,0 разів під дією і IL-20, і IL-1 разом.

3. Активність білка еритроїдного диференціювання (EDF) підвищилась у 1,9 рази під дією тільки IL-20, у 9,7 рази під дією тільки IL-1 і у 19,0 разів під дією IL-20 та IL-1 разом.

4. Активність MRP-14 (кальційзв'язуючого білка у макрофагах, споріднених з фактором інгібування міграції) підвищилась у 3,0 рази під дією тільки IL-20, у 12,2 рази під дією тільки IL-1 і у 20,3 рази під дією IL-20 та IL-1 разом.

5. Активність гепаринзв'язуючого EGF-подібного фактора росту підвищилась у 2,0 рази під дією тільки IL-20, у 14 разів під дією тільки IL-1 і у 25,0 разів під дією IL-20 та IL-1 разом.

6. Активність білка, подібного до бета-тромбоглобуліну підвищилась у 1,5 раза під дією тільки IL-20, у 15 разів під дією тільки IL-1 і у 27 разів під дією IL-20 та IL-1 разом.

7. Активність синтезованого з мозку нейротропного фактора (BDNF) підвищилась у 1,7 рази під дією тільки IL-20, у 25 разів під дією тільки IL-1 і у 48 разів під дією IL-20 та IL-1 разом.

8. Активність хемотаксичного фактора активації моноцитів (MCAF) підвищилась у 1,3 раза під дією тільки IL-20, у 32 рази під дією тільки IL-1 і у 56 разів під дією IL-20 та IL-1 разом.

Приклад 25

IL-20 Трансгенний Фенотип

Використовуючи розмаїтість промоутерів, і людський, і мишачий IL-20 були надекспресовані в трансгенних мишах. Специфічний для печінки миші промоутер альбуміну, направляючи експресію людського IL-20, використовувався спочатку в спробі досягти циркулюючих рівнів білка. Наступні дослідження проводилися з використанням промоутера кератину 14 (K14), що насамперед призначається для експресії епідермісу й інших стратифікованих шарів епітелію; промоутер мишачого metallothionein-1, що дає широку експресію моделі; і E μ LCK промоутер, що веде експресію в клітинах лімфатичного походження. Подібні результати були отримані у всіх чотирьох випадках, можливо тому, що ці промоутери всі дають початок циркулюючим рівням IL-20. У всіх випадках трансгенні мишенята, що експресують IL-20 трансген, були менше, ніж нетрансгенні виводки, мали сонячний зовнішній вигляд із щільною, зморшкуватою шкірою й вмерли протягом перших декількох днів після народження. У мишенят у шлунках було молоко, що вказувало, що вони були здатні до вигодовування. У цих мишей були непомірно більші кінцівки, хвіст, ніздрі й область рота, й вони мали труднощі з переміщенням. Крім того, миші були кволими, з недовільним виглядом жирової тканини, і затримкою розвитку вух і пальців ніг. Низькі експресійні рівні в печінці (менше ніж 100 mRNA молекул/клітин) були достатні для неонатальної смертності й для шкірних аномалій. Трансгенні миші без явного фенотипу або не експресували трансген, не експресували їх на виявляємих рівнях, або були мозаїчні.

Гістологічний аналіз шкіри IL-20 трансгенних мишей показав стовщений епідерміс, гіперкератоз і компактний шар злущування в порівнянні з нетрансгенним виводком. Іноді спостерігалися серо-целюлярні кірки. Електронно-мікроскопічний (ЕМ) аналіз шкіри трансгенних мишей показав внутрішньомітохондріальні ліпоїдні включення, плямисті кератогіалінові гранули, і відносно невелику кількість волокон, подібних до спостережуваних у людській шкірі, ураженої псоріазом, і в мишачих моделях шкірного захворювання. Крім того, багато хто із трансгенних мишей мав апоптоїдні тімичні лімфоцити. Ніякі інші відхилення не були виявлені гістопатологічним аналізом. Гістологічний і ЕМ результати підтверджують і розширюють спостережувані масові зміни шкіри.

Приклад 26

Конструкція експресійного вектора для експресії розчинного людського IL-22RA-muFc

Людський IL-22RA розчинний рецептор-muFc змішування (позначений як IL-22RA -C (m2a) вміщуючий позаклітинний домен IL-22RA, змішаний із щурячою гамою 2a важкого ланцюга Fc області (m2a), був готовий. Експресія плазмиди, що містить IL-22RA-C (m2a), була побудована через відповідну рекомбінацію з використанням двох окремих фрагментів ДНК і вектора експресії pZMP40. Фрагменти полінуклеотидної послідовності IL-22RA (SEQ ID NO:1), і m2a SEQ ID NO:39 були генеровані розширенням ПЦР, використовуючи наступні праймери: (a) IL-22RA праймер ZC45,593 (SEQ ID NO:28), та ZC45,592 (SEQ ID NO:29); і (б) m2a праймер ZC45,591 (SEQ ID NO:30), і ZC45,594 (SEQ ID NO:31).

Перший фрагмент містив IL-22RA позаклітинний домен, що кодує область, що був зроблений з використанням IL-22RA полінуклеотида (наприклад, SEQ ID NO:1) як шаблону. Перший фрагмент включав 5' накладень із часткової pZMP40 векторною послідовністю, IL-22RA сегмент, і 3' накладення, що містять лінкерну послідовність і часткову m2a послідовність. Умови ПЦР: 1 цикл, 94°C, 5 хвилин; 35 циклів, 94°C, 1 хвилина, після 55°C, 2 хвилин, що впливає після 72°C, 3 хвилин; 1 цикл, 72°C, 10 хвилин.

Другий фрагмент включав 5' накладень із лінкерною послідовністю й часткової IL-22RA послідовністю, m2a сегмент, і 3' накладення, що містять часткову pZMP40 векторну послідовність. Щуряча гама 2a важкого ланцюга області Fc (m2a) (SEQ ID NO:39), був зроблений від клону щурячої Ig гами 2a важкого ланцюга cDNA m2a містить стрижень, C_H 2, і C_H 3 домени щурячої іммуноглобулінової гами 2a важкого ланцюга константної області. Умови PCR: 1 цикл, 94°C, 5 хвилин; 35 циклів, 94°C, 1 хвилина, після 55°C, 2 хвилин, що випливає за 72°C, 3 хвилини; 1 цикл, 72°C, 10 хвилин.

ПЦР реактивні змішування були продовжені на 1%-ому агарозному гелі, і смуга, що відповідає розмірам вставок була витягнута гелем з використанням QIAquick(TM) Gel Extraction Kit (Qiagen).

Плазмідна pZMP40, що була скорочена Bg1II, використовувалася в трьох шляхах рекомбінації з обома із фрагментів вставки ПЦР. Плазмідна pZMP40 - вектор експресії в ссавців, що містить касету експресії, що має промоутер MPSV, і множинні рестриктивні ділянки для вставки кодуючих послідовностей; E. coli джерело реплікації; одиниця маркера експресії ссавців, що включає промоутер SV40CT, що підсилює і джерело реплікації, DHFR ген, і термінатор SV40; і URA3 і CEN-ARS послідовності, необхідні для селекції і реплікації S. cerevisiae. Плазмідна pZMP40 була конструйована з pZMP21 (депонований при American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, і розроблена No. PTA-5266) доповненням декількох рестрикційних ділянок ферменту полілінкеру.

Клітини ста мікролітрів компетентних дріжджів (S. Cerevisiae) були незалежно комбіновані з 10 μ л ДНК вставки й 100 нг скороченого pZMP40 вектора, і суміш була перенесена 0.2 див електропора-

ційну кюветку. Суміш дріжджів/ДНК була електропульсована з використанням електроживлення (BioRad Laboratories, Hercules, CA) параметри на-строювання 0.75 кв (5 кв/см), ∞ омів, і 25 μ F. Шістсот μ л 1,2 м сорбітола на 1.2 м було додано до кюветки, і дріжджі були покриті металом в 100 μ л і 300 μ л кратно на дві пластини URA-D і інкубовані при 30°C. Приблизно після 72 години, Ura⁺ трансформовані дріжджі від одиночної пластини були повторно суспендовані в 1 мл H₂O і завіхрені коротко до кульки дріжджових клітин. Кулька із клітин була повторно суспендована в 0.5 мл лізисного буфера (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 м NaCl, 10 м Tris, р 8.0, 1 м EDTA). П'ятсот мікролітрів лізисної суміші були додані до труби Eppendorf, що містить 250 μ л вимитий кислотою стекляруса і 300 μ л хлороформа фенолу, були завіхрені 3 хвилини й оберталися протягом 5 хвилин у центрифугі Eppendorf на максимальній швидкості. Триста мікролітрів водної фази були передані новій трубці, і ДНК була прискорена з 600 μ л етанолу (EtOH) і 30 μ л 3М ацетату натрію, після центрифугування протягом 30 хвилин на максимальній швидкості Труба була профільтована, і кулька була вимита з 1 мл 70%-ого етанолу. Труба фільтрувалася, і кулька ДНК була повторно суспендована в 30 μ л TE.

Перетворення електрокомпетентних *E. coli* клітин хазяїна (DH12S) - були зроблені, використовуючи 5 μ л приготовлених ДНК дріжджів і 50 μ л клітин. Клітини були електропульсовані в 2.0 кв, 25 μ F, і 400 омів. Після електропорації, 1 мл SOC (2%-ий Bacto (TM) Tryptone (Difco, Detroit, MI), 0,5% дріжджового екстракту (Difco), 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄, 20 мМ глюкози) були додані й потім клітини були покриті металом в 50 μ л і 200 μ л кратно на двох LB AMP пластинах (LB broth (Lennox), 1,8% Bacto (TM) Agar (Difco), 100 мг/л ампіциліна).

Вставки трьох клонів для конструкції були піддані послідовному аналізу, і один клон для кожної конструкції, що містить правильну послідовність, був відібраний. Більшого розміру плазміда ДНК була ізольована, використовуючи комерційно доступний комплект (QIAGEN Plasmid Mega Kit, Qiagen, Valencia, CA) відповідно до інструкцій виготовлювача.

Приклад 27

Експресія й очищення людського розчинного IL-22RA-muFc поліпептиду

Три набори 200 μ г IL-22RA-C (m2a) конструкції (Приклад 22) були кожний розщеплені з 200 одиницями Pvu I при 37°C протягом трьох годин і потім були прискорені з IPA і завіхрені вниз в 1,5 мл мікрофуговану трубу. Супернатанти були відфільтровані від кульки, і кулька була вимита з 1 мл 70%-ого етанолу й інкубована протягом 5 хвилин при кімнатній температурі. Трубу крутили в мікрофугі протягом 10 хвилин при 14000 об/хв, і супернатанти фільтрувалося від кульки. Кулька була тоді повторно суспендована в 750 μ л PF-CHO засобі в стерильному оточенні, і інкубована при 60 С протягом 30 хвилин. 5Е6 APFDXB11 клітини завіхрені вниз у кожній із трьох труб і були повторно суспендовані, використовуючи ДНК розчин. Суміші

ДНК/клітини були поміщені в 0,4 см інтервальну кюветку й електропораційовані з використанням наступних параметрів: 950 μ F, висока ємність, і 300 V. Потім зміст кюветок був вилучений, об'єднаний, і розчинений з 25 мл PF-CHO засобом і поміщений в 125 мл колбу для втрушування. Колба була поміщена в інкубатор на шейкере при 37 С, 6%- CO₂, і втрушена при 120 обертах у хвилину.

Клітинна лінія була піддана нутрієнтній селекції, супроводжуваної збільшенням кроку до 10Онм метотрексата (MTX), потім до 50Онм MTX, і нарешті до 1 μ M MTX. Збільшення кроку було після CD8 клітинного сорту. CD8 сорт клітин був досягнутий взяттям стійкого 1 μ M MTX посиленого об'єднання й зафарблення приблизно 5Е6 клітин з моноклональним FITC anti-CD8 антитілом (BD PharMingen, cat# 30324X) з використанням рекомендованої виробником концентрації. Зафарбовані клітини були оброблені й відсортовані на FACS Vantage (BD) потоковому цитометрі. Кращі 5% клітин були зібрані й окремо вирощені Експресія була підтверджена Western blotting, і лінія клітин була обміркована й очищена від білка, використовуючи стандартний супроводжуваний метод.

Приклад 28

Нейтралізація huEL-22RA сироваткою мишей, імунізованих hu22RA-m2a

А. Аналіз клітинно-базованої нейтралізації для перевірки інгібіції IL-20 і/або IL-22.

Фактор-залежна pre-B клітинна лінія Ba3 ко-трансфектована з IL-22RA і IL-20RB (pDIRS1) (BAF/IL-22RA/IL-20RB клітини; Приклад 38), була використана для оцінки потенціалу нейтралізації anti-IL-22RA антитіл, протидіючи IL-20 на IL-22RA/IL-20RB рецептор. Так само Ba3 ко-трансфектована з IL-22RA і IL-10RB (CRF2-4) (BAF/IL-22RA/CRF2-4 клітини; Приклад 2) була використана для оцінки потенціалу нейтралізації anti-IL-22RA антитіл, протидіючи IL-22 на 22RA/TL10RB рецептор. Проліферація в присутності IL-20 або BL22 на його відповідальний рецептор експресії клітинної лінії, і інгібіції такої проліферації в присутності антитіл антагоніста, була оцінена, використовуючи Alamar blue assay, як описано в Прикладі 3. Інгібіція проліферації на цих клітинах показує нейтралізуючої активності в цьому аналізі.

В. Anti-IL-22RA сироватка нейтралізує й IL-20 і IL-22 у клітинно-базованому аналізі нейтралізації.

Використовуючи випробування, описане в Прикладі 28А, сироватка від IL-22RA приголомшених мишей, імунізованих huIL-22RA-mu2a (Приклад 30 (А) (I)) була додана як послідовне розведення в 1%, 0.5%, 0.25%, 0.13%, 0.06%, 0.03%, 0.02%, і 0%. Пластини аналізу були інкубовані при 37°C, 5%-ий CO₂ протягом 4 днів, у який час Alamar Blue (Accumed, Чикаго, IL) був доданий в 20 л/колодаз. Пластини були знову інкубовані при 37°C, 5%-ий CO₂ протягом 16 годин. Alamar Blue дає флюорометричне читування, засноване на числі живих клітин, і в такий спосіб вимірює проліферацію клітин у порівнянні з негативним контролем. Пластини були читані на Wallac Victor 2 1420 Multilabel Counter (Wallac, Turku, Finland) у довжи-

нах хвилі 530 (збудження) і 590 (емісія). Результати показали, що сироватка від всіх семи імунізованих тварин могла нейтралізувати передачу сигналів і huIL-22 і huIL20 через huIL-22RA. Наприклад, при 1%-ій концентрації, сироватка від п'яти тварин (16517, 16518, 16519, 16520, і 16527) повністю нейтралізувала проліферацію, викликану huEL-22, з інгібіцією проліферації, що зменшується в дозозалежному стилі при більш низьких концентраціях. Крім того, при 1%-ій концентрації, сироватка від інших двох тварин (16471 і 16701) інгібувала приблизно 90% проліферації, викликаной huEL-22, з інгібіцією проліферації, що зменшується в дозозалежному стилі при більш низьких концентраціях. Так само при 1%-их, 0,5% концентраціях, сироватка від п'яти тварин (16517, 16518, 16519, 16520, і 16527) повністю нейтралізувала проліферацію, викликану huEL-20, з інгібіцією проліферації, що зменшується в дозозалежному стилі при більш низьких концентраціях. Крім того, при 1%-ій концентрації, сироватка від тварини 16701 повністю нейтралізувала проліферацію, викликану huEL-20, з інгібіцією проліферації, що зменшується в дозозалежному стилі при більш низьких концентраціях. При 1%-ій концентрації, сироватка від тварини 16471 нейтралізувала приблизно 95% проліферації, викликаной huDL-20, з інгібіцією проліферації, що зменшується в дозозалежному стилі при більш низьких концентраціях. Таким чином, сироватки від всіх семи тварин могли нейтралізувати проліферацію, викликану або IL-20 або IL-22 через huIL-22RA рецептор. Ці результати далі демонстрували, що антитіла до IL-22RA могли дійсно протидіяти діяльності прозапальних лігандів, IL-20 і IL-22 при низьких концентраціях.

Ці результати забезпечили додаткове свідчення того, що ефективно блокування IL-22RA активності зв'язуванням, блокуванням, інгібіцією, скороченням, протидією або нейтралізацією IL-20 або IL-22 активності (індивідуально або разом), наприклад, через нейтралізуюче моноклональне антитіло до IL-22RA представленого винаходу, може бути вигідно в скороченні ефектів IL-20 і IL-22 (один або разом) *in vivo* і може бути, зменшує IL-20 і/або IL-22-індуковане запалення, таке як спостережуване в IL-20-індукованих шкірних ефектах, так само як в IL-22-індукованих шкірних ефектах, наприклад при псоріазі, 33K, коліті, або інших запальних захворюваннях, викликаних IL-20, і або IL-22, включаючи 33K, артрит, астму, псоріатичний артрит, коліт, запальні стани шкіри, і atopічний дерматит.

Приклад 29

Генерація P815/hIL-22RA клітин і імунізація мишей

А. P815/hIL-22RA клітинна генерація і ін'єкція в мишей для генерації anti-hIL-22RA антитіл:

WT клітини P815 (ATCC TIB-64) були трансфектовані із плазмідним вектором, що містить hIL-22RA cDNA послідовність (наприклад, SEQ ID NO:1) і селективний пуроміцин резистентний маркер, використовуючи Eugene реактив відповідно до протоколу виробника (Roche, Indianapolis, IN). Клітини були поміщені під пуроміцинову селекцію 48 годину після трансфекції. Пуроміцин-стійкі тран-

сфектанти були клоновані з обмеженим розведенням, і показані на екрані для свого рівня hIL-22RA клітин поверхневої експресії потоковою цитометрією, використовуючи біотинілований людський IL-22 (huIL-22-біотин). Коротко, клітини були інкубовані з 5 ug/ml huIL-22-біотина протягом 30 хвилин на льоді й потім вимиті. Приєднання huIL-22-біотина до клітин було тоді виявлено з використанням PE-labeled стрептавідину в 1:500. Клітини були проаналізовані в Facscan потоковому цитометрі з використанням Cellquest software. (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Селектований P815/IL-22RA клітинний клон був вирощений і потім був зібраний для ін'єкції. Клітини були зібрані, вимиті три рази у ФБР, рухуючи, повторно суспендовані в 1×10^8 клітин у мілілітрі, і опромінені 10000 радами. Клітинна суспензія була тоді перенесена 1мл шприц, і уведена інтраперитонеально DBA/2 мишам. Миші були збільшені в ідентичний спосіб через 3 тижні, і сироватки були показані на екрані для приєднання з hIL-22RA трансфектованою лінією клітин. Коротко, сироватки були розведені 1:100 у буфері FACS (HBSS, 2%-а BSA, 0,2% Na₃), і потім інкубовані з Fc-blocked 293 людськими нирковими клітинами, що надекспресують hIL-22RA. Приєднання anti-IL-22RA антитіл до клітин було потім виявлене з використанням флюоресцин-кон'югованого цапиного антимішачого Ig, розведеного до 1:200. (Southern Biotech, Birmingham, AL). Клітини були проаналізовані як описано попередньо. Миші були збільшені, ще в цілому 3 рази й сироватки були показані на екрані як описано. Дві миші були відібрані для змішування гібридами, використовуючи стандартні методи в мистецтві для генерації моноклональних антитіл (Приклад 25), засновані на рівні їхнього сироваткового приєднання з hIL-22RA трансфектантами.

Вищезгаданий метод також використовується для генерації клітин P815, експресуючих гетеродимеричні IL-22RA рецептори, типу IL-22RA/CRF2-4 (P815#L-22RA/CRF2-4 клітини), IL-22RA/pDIRS1 (P815/IL-22RA/pDIRS1 клітини), або IL-22RA/CRF2-4/pDIRS1 (P815/IL-22RA/CRF2-4/pDIRS1 клітини), наприклад для імунізації мишей для покоління моноклональних антитіл проти IL-22RA і IL-22RA-вміщуючих гетеродимеричних рецепторів.

Приклад 30

Генерація щурячого антилюдського IL-22RA (ЄПЬ-22RA) МАТ

А. Імунізація для генерації anti-IL-22RA антитіл:

(1) Використовуючи розчинний iL-22RA-muFc

Шести-дванадцятитижневі приголомшені миші IL-22RA (Приклад 26) були імунізовані інтраперитонеально ін'єкцією 25-50 ug розчинного людського білка IL-22RA-muFc (Приклад 23) змішаного 1:1 (v:v) з Ribi adjuvant (Sigma) два рази в тиждень за планом. Сім-десять днів після третьої імунізації зразки крові були взяті через ретро орбітальну судину, сироватка зібрана й оцінена на здатність інгібувати приєднання IL-22 або й IL-20 і IL-22 до IL-22RA в аналізі нейтралізації (наприклад, описаний тут) і пофарбована IL-22RA трансфектованим проти нетрансфектованих 293 клітин в FACS фар-

буючому аналізі Миші залишалися імунізованими й зразки крові бралися й оцінювалися як описано вище, поки титри нейтралізації не досягли плато. Тоді, мишам з найвищими титрами нейтралізації були введені інтраваскулярно 25-50 μ g розчинного білка IL-22RA-Fc у ФБР. Через три дні, селезінка й лімфовузли від цих мишей були зібрані й використовувалися для генерації гібридоми, наприклад використовуючи мієлому миші (P3-X63-Ag8.653.3.12.11), клітини або інші відповідні клітинні лінії в мистецтві, використовуючи стандартні методи, відомі в мистецтві (наприклад, дивися Kearney, J.F. і ін., J Immunol 123:1548-50, 1979; і Lane, R.D. J Immunol Methods 81:223-8, 1985).

(2) Використання P815 трансфектантов. які експресують рецептор IL-22RA.

Шести-десятиденні миші самки DBA/2 імунізовані інтраперитонеально 1×10^5 живими, трансфектованими P815 клітинами, наприклад P815/IL-22RA клітини, P815/IL-22RA/CRF2-4, P815/IL-22RA/pDIRS1 або P815/CL-22RA/CRF2-4/pDIRS1 клітини (Приклад 24) (наприклад, 0,5 мл клітинної щільності 2×10^5 клітини/мл). До ін'єкції клітини підтримані в експонентній фазі росту. Для ін'єкції клітини зібрані, вимиті три рази із ФБР і потім повторно суспендовані у ФБР до щільності 2×10^5 клітини/мл. У цій моделі, у мишей розвивається пухлина з асцитом протягом 2-3 тижні і прогресує до смерті 4-6 тижні, якщо імунна відповідь на трансфектований цільовий антиген не була встановлена. Тритижневих мишей без очевидної черевної пухлини (показник асциту) повторно імунізували, як описано вище, в 2-3 тижневих інтервалах Сімдесять днів після другої імунізації, зразки крові взяті через ретроорбітальну судину, сироватка зібрана й оцінена на здатність інгібувати приєднання IL-22 або й IL-20 і IL-22 до IL-22RA в аналізі нейтралізації (наприклад, описаний тут) і пофарбована IL-22RA трансфектованими проти нетрансфектованих 293 клітин в FACS фарбуючому аналізі. Миші залишалися імунізованими й бралися зразки крові й оцінювалися, як описано вище, поки титри нейтралізації не досягли плато. Тоді мишам з найвищими титрами нейтралізації уведено інтраперитонеально з 1×10^5 живих трансфектованих P815 клітин. Через чотири дні, селезінка й лімфовузли від цих мишей зібрані й використані для генерації гібридоми, наприклад використовуючи мієломні мишачі (P3-X63-Ag8.653.3.12.11) клітини або інші відповідні клітинні лінії в мистецтві, використовуючи стандартні методи, відомі в мистецтві (наприклад, Kearney, J.F. і ін., supra.: і Lane, R.D. supra.). Альтернатива вищезгаданій схемі імунізації живими трансфектованими P815 клітинами, інтраперитонеальна ін'єкція $1-5 \times 10^6$ опроміненими трансфектованими клітинами кожні 2-3 тижня. У цьому підході ніякі тварини не хворіють і не вмирають від асциту. Замість цього тварини перевірені на нейтралізацію імунної відповіді на IL-22RA у своїй сироватці, як виділено вище, що починається із кровотечі після другої імунізації. Як тільки титри нейтралізації досягають максимального рівня, мишам з найвищими титрами дають предсуміш, інтраперитонеально 5×10^6 опромінених клітин й через чотири дні, селезінка й лімфовузли від

цих мишей зібрані й використані для генерації гібридоми, наприклад використовуючи мієлому миші (P3-X63-Ag8.653.3.12.11), клітини або інші відповідні клітинні лінії в мистецтві, використовуючи стандартні методи, відомі в мистецтві (наприклад, дивися Kearney, J.F. і ін. supra; і Lane, R.D. supra.).

В. Скринінг гібридомних змішань для антитіл, що приєднують IL-22RA і інгібують приєднання IL-22 до IL-22RA:

Два різні праймерні екрани були виконані на гібридомних супернатантах на 8-10 день постзмішування. Для першого випробування, антитіла супернатантів були перевірені на їхню здатність приєднувати до пластини зв'язаний розчинний людський білок IL-22RA-muFc ELISA з використанням HRP-кон'югованої цапиної антимишачої каппи й антилямбди легкого ланцюга другого кроку реактивів для ідентифікації зв'язаних мишачих антитіл. Для демонстрації специфічності для IL-22RA частини IL-22RA-muFc білка, супернатанти в початковому випробуванні були оцінені на невідповідному білку, приєднаному до тої ж самої шурячої області Fc (m2a). Антитіло в тих супернатантах, що приєднано до IL-22RA-muFc а не невідповідного muFc, що містить білок змішання, як вважали, було специфічним для IL-22RA Для другого випробування, антитіла у всіх гібридомних супернатантів були оцінені ELISA на здатності інгібувати приєднання біотинілізованого людського IL-22 людини до пластини приєданого IL-22RA-muFc.

Всі супернатанти, що містять антитіла, які приєднували специфічно з IL-22RA, чи вони інгібували приєднання IL-22 до IL-22RA чи ні у випробуванні ELISA, були згодом перевірені на їхню здатність інгібувати приєднання (і супутній пропроліферативний ефект) IL-20 або IL-22 до IL-22RA/IL-20RB і IL-22RA/CRF2-4 трансфектованих Baf3 клітин, відповідно. Всі супернатанти, які були нейтралізовані позитивно або в аналізі інгібіції IL-22 або в аналізі інгібіції IL-20 і IL-22, були згодом оцінені на їхню здатність зафарбити IL-22RA трансфектовані проти нетрансфектованих Baf3 клітин FACS аналізом. Цей аналіз був розроблений, щоб підтвердити, що інгібіція IL-22, приєданого з IL-22RA/CRF2-4, або IL-20, що зв'язує з IL-22RA/IL-20RB, відбувалося дійсно через антитіло, що виразно зв'язує рецептор IL-22RA. Додатково тому, що аналіз FACS був виконаний з anti-Ig реактивом другого кроку, певні позитивні результати FACS указують, що антитіло нейтралізації, імовірно, мало б клас Ig. Цими засобами, зразок колодязя був ідентифікований тим, що приєднання IL-22RA із пластиною ELISA, інгібувало приєднання IL-22 до IL-22RA в ELISA, зазначеному на аналізі інгібіції, блокуванні взаємодії IL-20 і IL-22RA з IL-22RA/IL-20RB і IL-22RA/CRF2-4 трансфектованих Baf3 клітин (Приклад 28), відповідно, і було рішуче позитивним для фарбування й IL-22RA/IL-20RB і IL-22RA/CRF2-4 трансфектованих Baf3 клітин з антимишачим Ig реактивом другого кроку.

Д. Клонування Anti-IL-22RA специфічного антитіла, продукуючого гібридоми:

Гібридома, що продукує anti-IL-22RA mAb, які поперечно-нейтралізували приєднання IL-20 і IL-22 до відповідно трансфектованих Baf3 клітин була

клонована стандартним з малою щільністю розведенням (менше ніж 1 клітина в колодязі). Через приблизно 5-7 днів після металізації, клони були показані на екрані ELISA на пластині приєднаного людського IL-2RA-muFc після перетесту позитивних колодязів ELISA на невідповідному muFc, що містить білок змішання як описано вище. Відібрані клони, чиї супернатанти приєднані до IL-22RA-muFc і не невідповідного muFc, що містить білок змішання, були далі підтверджені специфічною активністю антитіла, повторюючи й аналіз нейтралізації й аналіз FACS. Всі відібрані IL-22RA антитілопозитивні клони були клоновані мінімум два рази для допомоги в підстрахуванні клонування й оцінці стабільності виробництва антитіла. Далі раунди клонування були виконані й показані на екрані, як до цього описано, принаймні 95% результативних клонів, були позитивні для нейтралізації анти-IL-22RA продукції антитіл.

Е. Біохімічна характеристика молекули, що розпізнає Anti-IL-22RA МАТ:

Біохімічне підтвердження, що цільова молекула, IL-22RA, що розпізнає передбачуване anti-IL-22RA МАТ є дійсно IL-22RA, виконано зі стандарту імунопреципітації, що впливає за аналізом SDS PAGE або Western blotting, що використовують розчинні мембранні препарати з IL-22RA трансфектованих проти нетрансфектованих Baf3 клітин. Крім того, розчинні мембранні препарати нетрансфектованих клітинних ліній, які експресують IL-22RA, використовуються показувати, що МАТ розпізнають рідний ланцюг рецептора так само, як трансфектовані. Альтернативно, МАТ перевірені на їхню здатність до специфічної імунопреципітації або Western blotting розчинного - IL-2RA-muFc білка.

Приклад 31

Нейтралізація hu22RA сироватками від мишей, що ін'єктовані P815 клітинами трансфектованими з hu22RA

Використовуючи клітинно-базований аналіз нейтралізації, описаний в Прикладі 28, сироватка від мишей, ін'єктованих живими huIL-22RA трансфектованими P815 клітинами (Приклад 30.2), була додана як послідовне розведення в 1%, 0.5%, 0.25%, 0.13%, 0.06%, 0.03%, 0.02%, і 0%. Пластини аналізу були інкубовані в 37C, 5%-ий CO2 протягом 4 днів, під час якого Alamar Blue (Accumed, Чикаго, IL) був доданий в 20л/колодязь. Пластини були знову інкубовані при 37C, 5%-ий CO2 протягом 16 годин. Результати показали, що сироватка від чотирьох тварин могла нейтралізувати передачу сигналів і huIL-22 і huIL20 через huIL-22RA. При 1%-ій концентрації, сироватка від шести тварин (7125, 7127, 7128, 7118, 7124 і 7117) нейтралізувала між 50% і 80% проліферації, викликані huIL-22, з інгібіцією проліферації, що зменшується в дозозалежному стилі при більш низьких концентраціях. Крім того, при 1%-ій концентрації, сироватка від чотирьох тварин (7125, 7127, 7118, і 7117) нейтралізувала між 40% і 70% проліферації, викликані huIL20, з інгібіцією проліферації, що зменшується в дозозалежному стилі при більше низьких концентраціях. Ці результати далі демонстрували, що антитіла до IL-22RA могли

дійсно протидіяти активності прозапальних лігандів, IL-20 і IL-22 при низьких концентраціях.

Ці результати забезпечили додаткове свідчення, що ефективно блокування IL-22RA активності приєднанням, блокуванням, інгібіцією, скороченням, антагонізмом або нейтралізацією IL-20 або IL-22 активності (індивідуально або разом), наприклад через нейтралізуюче моноклональне антитіло до IL-22RA з представленого винаходу, може бути вигідно в скороченні ефектів IL-20 і IL-22 (один або разом) у природних умовах і може бути, зменшує IL-20 і/або IL-22-індуковане запалення, таке як спостережуване в IL-20-індукованих шкірних ефектах, так само як в IL-22-індукованих шкірних ефектах, наприклад при псоріазі, 33К, коліті, або інших запальних захворюваннях, викликаних IL-20, і або IL-22, включаючи 33К, артрит, астму, псоріатичний артрит, коліт, запальні стани шкіри, і atopічний дерматит.

Приклад 32

Фенотип IL-22RA приголомшених мишей

А. Генерація мишей, що несуть генетичні модифікації

1. Генерація трансгенних мишей, експресуючих шурячий IL-20 із сонячними немовлятами

а) Конструкція для експресії шурячого IL-20 від K14 промоутера

Для дослідження біологічної функції IL-20 in vivo, була зроблена трансгенна конструкція, у якій шурячий IL-20 управлявся людським DO14 промоутом (також див., Приклад 21). Олігонуклеотиди були розроблені для генерації фрагмента ПЦР, що містить консенсус Kozak послідовності і шурячий IL-20 кодуєчої області Ці олігонуклеотиди були розроблені з FseI ділянці в 5' кінцях і ділянці Ascl в 3' кінцях, щоб полегшити клонування в pRSK14, стандартном трансгенном векторі, що містить людський кератиноцит і епітеліальний клітинно-специфічний промоутер.

Реакції ПЦР були поставлені з 200 нг шурячим IL-20 (SEQ ID NO:33), і олігонуклеотиди розвивались на всю довжину з IL-20 (SEQ ID NO:34). Умови реакції PCR були визначені, використовуючи методи, відомі в мистецтві. Продукти PCR були відділені електрофорезом з агарозним гелем й очищені з використанням QiaQuick (TM) (Qiagen) комплектом гелевої екстракції. Ізольований, правильного розміру фрагмент ДНК був розщеплений з FseI і Ascl (Boehringer-Мангейм), преципітованим етанолом і лігатован в pRSK14, попередньо розщеплений з FseI і Ascl. pRSK14 плазміда, розроблена для експресії гена зацікавленого в кератиноциті й епітелії в трансгенних мишах, містить касету експресії, що граничить із приблизно 3 КБ людського кератину специфічного DO14a промоутера.

Приблизно один мікролітр лігативної реакції був електропоративований в DH10B ElectroMax (TM) компетентних клітинах (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) відповідно до керівництва виробника й покритий LB пластинами, що містять 100 мкг/мл ампіциліна, і на ніч інкубований. Колонії були обрані й вирощені в LB засобі, що містить 100 мкг/мл ампіциліна. Мініпреп ДНК була готова від обраних клонів і показана на екрані для шурячої IL-20 вставки з обмеженням розщеплення FseI і

Ascl комбінованих, далі йшов електрофорез із агарозним гелем. Конструкція TG із правильними cDNA вставками була підтверджена послідовним аналізом. Максипрепи правильного pRSK14-щурячого IL-20 були виконані.

б) Генерація й характеристика ДО14а IL-20 трансгенних мишей.

Фрагмент NotI приблизно 4 КБ у довжині був ізольований від трансгенного вектора (TG), що містить 5' і 3' флангових послідовностей кератину специфічного ДО14 промоутера, мишачого IL-20 (SEQ ID NO:33; поліпептид, показаний в SEQ ID NO:34), інтрон Gormon, IL-20 cDNA і людський гормон росту поліА сигнальної послідовності. Це використовувалося для мікроін'єкції в запліднені B6C3f1 (Taconic, Germantown, NY) щурячих ооцитів. Мікроін'єкція й продукція трансгенних мишей були зроблені як описано в Hogan, B., et al. Manipulation the Mouse Embryo 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1994. TaqMan (TM) RT ПЦР реакція була використана в кількісній експресії TG РНК при використанні PCR праймерів, специфічних для людського гормону росту поліА сигнальної частини трансгена.

Усі TG конструкції, експресуючі IL-20, виставляють високу норму перинатальної смертності, і мишенята TG, які були породжені типово, показують "сонячний" фенотип. Сонячний зовнішній вигляд новонароджених мишенят, виявилось був пов'язаний із шорсткою шкірою, тому вони були начебто висушені, приводячи до зниження належного нагляду. Їхні рухи утруднилися взагалі. Гістопатологічно сонячні мишенята мають стовщений епідерміс і ущільнений шар кератину. Більшість цих сонячних мишенят померло протягом перших 5 днів і ті, що вижили й відняті від грудей мишенят, взагалі не експресували трансген (у розшифрованому аналізі), або вони були химерними (у низькій передачі трансгена до потомства).

Одна лінія експресії щурячого IL-20, ведена K14 промоутером, була встановлена. Рівень експресії в шкірі й тімусі був низьким, і всі немовлята народилися із сонячним фенотипом. Взагалі ця лінія мала 20%-е TG потомство, що показує 50-60% трансгенних мишенят, померлих внутрішньо, (в гемізиготному зчепленні 50% потомства повинні бути TG.)

2. Генерація мишей з вилученої IL-22RA експресією: IL-22RA приголомшені миші

а). Генерація приголомшеної (КО) конструкції для щурячого IL-22RA.

Щоб далі вивчати біологічну функцію IL-22RA in vivo, миші приголомшені (КО) напругою були створені для видалення експресії IL-22RA. Спочатку, миша IL-22RA cDNA дослідження використана для показу на екрані мишиного 129/Sv genomic BAC library. Клон, що містить IL-22RA геномне місце розташування були ідентифіковані й характеризовані. Щурячий IL-22RA поліонуклеотид, показаний в SEQ ID NO:41 і поліпептиді в SEQ ID NO:42.

Для створення приголомшеної конструкції для видалення IL-22RA, приголомшений вектор був зроблений з використанням ET клонуєчої технології (Zhang і ін. 1998. Нова логіка для розробки

ДНК, використовуючи рекомбінацію в *E. coli*. Nat. Genet. Vol 20:123-8). Коротко, вектор КО містить 1.8 КБ 5' рук (коротка рука), IRES-Lac/MCneo селективного маркера, і 10 КБ 3' руки (довга рука) гена IL-22RA. У векторі КО, були екзони 2, 3 і 4, так само як інтрони 2 і 3 з IL-22RA геномної послідовності були замінені IRES-Lac/MCneo селективним маркером так, щоб видалення приблизно 4.4 КБ було зроблено відповідною рекомбінацією в клітинах ES.

Після лінеаризації вектора КО ферментом обмеження PmeI, було електропоратировано в 129/Sv ES клітини. Селекція гомологічних рекомбінацій, так само як ідентифікація рекомбінантних клонів ES була виконана, як описано в Робертсон Е.Джл ін. Тератокарцинома й ембріональні стовбурні клітини: Практичний Підхід, ERL Press Limited, Оксфорд, 1987.

б). Створення й аналіз мишей з вилученою IL-22RA експресією.

Позитивні ES клони, у яких видалення екзонів 2-4 і інтронів 2-3 з IL-22RA геномного локусу відбувалося, були розширені. Вони були введені в бластоцисти мишей C57B1/6J. Після короткої реекспансії уведених бластоцистів, вони були введені у псевдо вагітним мишам, матерям-вихователям, для генерування химери. Ін'єкція бластоцистів, розмноження химери й наступна ембріональноклітинна трансмісія мутованого IL-22-RA були виконані як описане в Робертсон Е. Дж. і ін. Тератокарцинома й ембріональні стовбурні клітини: Практичний Підхід, IRL Press Limited, Оксфорд, 1987. КО мутовані миші були ідентифіковані ПЦР генотипною стратегією. Три ПЦР праймера, ZC22901 (SEQ ID NO:35), ZC45039 ((SEQ ID NO:36), ZC38573 (SEQ ID NO:37), використалися в мультиплексної реакції ПЦР для виявлення алелі дикого типу й алелі мутанта. Дикого типу WT алель приводить до ДНК фрагмента 229 базових крапок у довжині, у той час як алель мутанта робить ДНК фрагмент 371 базової крапки в довжину.

Спарювання гемізиготних мишей робить нормальне відношення гомозиготних (HOM), гетерозиготних (Het), і дикого типу WT потомство, так само як при нормальних сексуальних відносинах. Огляд мишей через PhysioScreen (Збирає масу тіла, вага тканини, повний аналіз крові (CBC), клінічна хімія, масове спостереження, і гістопатологія) не показав ніяких очевидних розходжень між HOM, Het, і тваринами WT.

В. IL-22RA був необхідний для IL-22 індукованого SAA: SAA ELISA що показує SAA експресію, індуковану IL-22. був відсутній у приголомшених мишах IL-22RA:

Для оцінки, чи був IL-22RA необхідний для індукції SAA у мишей, ін'єкованих IL-22, IL-22RA КО мишей, було уведено 5 ug IL-22 і відібране 6 годинами пізніше.

Elisa для визначення рівнів SAA у зразках сироватки був виконаний з використанням мишачого комплексу імунологічного обстеження SAA (BioSource, International, CA) після вказівок виробника, із сироваткою, розведеною 1:1000. Чотири з п'яти мишей WT показали підняті рівні SAA у відповідь на ін'єкцію IL-22, у той час як чотири з п'яти

HOM IL-22RA KO мишей показали базальні рівні SAA. Обидві Het IL-22RA KO перевірені миші підняли рівні SAA, але нижче чим рівні SAA у мишей WT. Це вказує, що IL-22RA був необхідний для індукції SAA IL-22.

Ці результати забезпечили свідчення, що ефективно блокування активності IL-22RA, наприклад через IL-22RA генне оглушення або подібно через нейтралізуюче моноклональне антитіло до IL-22RA представленого винаходу, подібно буде зменшувати IL-22 індуковане запалення, наприклад при псоріазі, 33K, коліті, ендотоксемії, або інших запальних захворюваннях, викликаних IL-22.

C. IL-22RA був необхідний для IL-22 індукованого епітеліального стовщення: призначення IL-22 чистого білка через осмотичний мінінасос, впровадження підшкірно, не викликає стовщення епідермісу в IL-22R KO мишей.

Для оцінки, чи був IL-22RA необхідний для IL-22 індукованого епітеліального стовщення, IL-22 був призначений підшкірно IL-22RA HOM і WT KO мишам через осмотичні мінінасоси. Насоси призначили IL-22 по нормі 18.4 μ л у день протягом 7 днів. Чотири HOM і 6 WT IL-22RA KO миші одержали IL-22 білок, у той час як 3 HOM і 1 WT одержали ФБР.

Зразки сироватки від IL-22 пролікованих мишей були перевірені в Ва3 аналізі проліферації для підтвердження присутності IL-22. Ва3 клітини, трансфектовані з IL-22RA і CRF2-4 вимагали присутності або IL-22 або щурячого IL3 для проліферації. Ці клітини були завірені вниз і милися в закінчених засобах, без mIL-3 (середовище RPMI (JRH Bioscience Inc, Lenexa, KS) додано з 10% інактивованою високою температурою ембріональною сироваткою теляти, 2m L-glutaMax-1 (TM) (Gibco, BRL), 1 мм Натрію піруват (Gibco, BRL), і антибіотик PSN (GIBCO, BRL)) (надалі названий "mIL-3 вільний засіб"). Клітини завірені й вимиті 3 рази, щоб гарантувати видалення mIL-3. Клітини потім були підраховані в гематиметрі й покриті металом в 96 - колодцевому форматі в 5000 клітин у колодязь у заключному обсязі 200 μ л на колодязь із використанням mIL-3 вільних засобів. Сироватка миші була присутня в колодязях в 1%, 0.5%, 0.25% або 0.125%. Пластини випробування були інкубовані при 37°C, 5%-ий CO2 протягом 3 днів, після чого Alamar Blue (Accumed, Чикаго, IL) був доданий в 20 μ л/колодязь. Пластини були знову інкубовані при 37°C, 5%-ий CO2 протягом 24 годин. Alamar Blue дає флуориметричне зчитування, засноване на числі живих клітин, і було в такий спосіб прямим виміром проліферації клітин у порівнянні з негативним контролем. Пластини були знову інкубовані при 37°C, 5%-ий CO2 протягом 24 годин. Пластини були зчитані на Wallac Victor 2 1420 Multilabel Counter (Wallac, Turku, Finland у довжинах хвилі 530 (збудження) і 590 (емісія). Результати показали, що жодна із ФБР ін'єкованих тварин не мала IL-22 активності, у той час як 1 з 1 тварини Het, 2 з 4 тварин HOM, і 3 з 6 тварин WT мали винайдену активність IL-22. Проліферація, викликана цією сироваткою була блокована присутністю 1 μ г/ml IL-22BP, доводячи, що вона була IL-22 специфічною.

Зразки шкіри від IL-22 пролікованих є непролікованих IL-22RA HOM і Het приголомшених (KO), і WT контрольних мишей були фіксовані із зануренням в 10% буферному формаліні. Тканини були урізані й вкладені в парафін, звичайно оброблений, секціями в 5 μ м. (Jung 2065 Supercut microtome, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) і зафарбовані Г&Е. Зафарбовані тканини були оцінені під легким мікроскопом (Nikon Eclipse E600, Nikon Inc., Melville, NY) АСVP очолюваним сертифікованим ветеринарним патологом.

Кожний зразок шкіри був оцінений від 0 (нічого) до 4 (важкий) шкалі для ступеню запалення в тканині, що обмежує ділянку впровадження насоса в гіподерму, від 0 (нічого) до 3 (розповсюджений) шкалі для ступеня епідермального стовщення (acanthosis), і число епітеліальних шарів було підраховано в самій товстій частині епідерми. Ніяке розходження не було знайдено між мишами HOM і мишами WT, яким дали ФБР. Результати цих двох груп були об'єднані в одну ФБР групу. Середнє й стандартне відхилення було визначено для кожної групи лікування й показано в таблиці 14 нижче.

Таблиця 14

Лікування	ФБР контроль	HOM KO: IL-22	WT: IL-22
Число мишей	4	4	6
Товщина епітелію	3,5 \pm 1,0	3,2 \pm 0,5	5,9 \pm 2,3
Міра акантоза	0,5 \pm 1,0	0,2 \pm 0,5	1,9 \pm 1,3
Почервоніння	1,5 \pm 1,0	1,2 \pm 1,0	2,0 \pm 1,0

Результати показали тенденцію до збільшеної епітеліальної товщини й акантоза в мишей WT пролікованих IL-22 і меншою епітеліальною товщиною й акантозом в IL-22RA HOM мишей при експозиції до IL-22.

Ці результати забезпечують свідчення, що ефективно блокування IL-22RA активності, наприклад через генне оглушення IL-22RA або подібно через нейтралізуюче моноклональне антитіло до IL-22RA представленого винаходу, подібно зменшило б IL-22 індуковані шкірні ефекти, наприклад при псоріазі, ІЗК, коліті, або інших запальних захворюваннях, викликаних IL-22.

D. IL-22RA був необхідний для IL-20 індукованого сонячної шкіри щеняти немовляти: Схрещування трансгенних мишей, що експресують щурячий IL-20IL-22RA KO миші продукують трансгенних мишенят, які не сіяють

Для оцінки чи був IL-22RA необхідний для IL-20 індукованого сонячних немовлят TG мишенят, K14 mIL-20 трансген був пересічений в IL-22RA KO лінії, і немовлята були обстежені на сонячний фенотип.

Шістдесят дев'ять щенят були породжені з Менделєвським генотипним відношенням. Всі TG на Het KO фоні були сонячні, у той час як жоден з HetTG, HetTG на HOM KO фоні не були сонячними.

Alamar Blue аналіз проліферації, використовуючи Ва3 клітини, що експресують IL-20RA і IL-20RB, був виконаний для оцінки присутності IL-20 у сироватці миші. Ці клітини будуть проліферувати або у відповідь на IL-20, або у відповідь на щуря-

чий IL3. Процедура була та ж сама як, описана в Секції С, вище. Результати аналізу показали, що всі миші TG мали порівнянну активність IL-20, і на тому же самому рівні як IL-20 TG на фоні C57BL/6N. Відсутність будь-якого сонячного фенотипу немовляти вказує, що худий фенотип немовляти залежав від присутності IL-22RA. Аналіз проліферації показав, що всі TG миші мали порівнянні IL-20 активності, і на тому же самому рівні як IL-20 TG на фоні C57BL/6N. Відсутність будь-якого сонячного фенотипу немовляти вказує, що худий фенотип немовляти був залежний від присутності IL-22RA.

Через 3 дні після народження мишенят з виводка, що містить K14 muIL-20 TG на IL-22RA KO фоні були гуманно евтаназовані, і фіксовані з повним зануренням тіла в 10% буферний формалін. Фіксовані тканини були урізані в поперечні секції грудної клітини й живота, вкладені в парафін, звичайно оброблений, секції в 5 μ m (Jung 2065 Supercut microtome, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) і зафарбовані з Г&Е. Зафарбовані тканини були оцінені під легким мікроскопом Nikon Eclipse E600, Nikon Inc., Melville, NY) блендовим способом ACVP очолюваним сертифікованим ветеринарним патологом. Відхилення тканини були відзначені, і число епітеліальних шарів в епідерміс дорзальної передньої грудної клітини підраховані.

Тканини від трьох IL20 TG на IL-22RA тлі KO HOM (IL-20TG/IL-22RA KO HOM), і три не-TG на IL-22RA KO тлі (не-TG/IL-22RA KO HOM) мишей були ретельно досліджені і як знайшли не містили ніяких відхилень. Тканини від двох IL-20 TG на Het IL-22RA KO тлі (IL-20 TG/IL-22RA KO Het) мишей були також досліджені. Числа епітеліальних шарів в епідермі були подібні у всіх тварин. Однак, епідерміс двох IL-20 TG/IL-22RA KO Het мишей був гіперезинофільним у порівнянні з ін-

шими тваринами й показав зниження гранулярності в гранульозному шарі. Ніякі інші відхилення не були відзначені в шкірі або інших тканинах ні однієї з мишей.

Ці результати забезпечують свідчення, що ефективно блокує IL-22RA активність, наприклад через генне оглушення IL-22RA або подібно через нейтралізуюче моноклональне антитіло до IL-22RA представленого винаходу, подібно зменшила б IL-20 індуковані шкірні ефекти, так само як IL-22-індуковані шкірні ефекти, наприклад при псоріазі, 33K, коліті, або інших запальних захворюваннях, викликаних IL-20, і або IL-22, включаючи 33K, артрит, астму, псоріатичний артрит, коліт, запальні стани шкіри, і атопічний дерматит.

Приклад 33

Гістоморфометричне відображення аналізу IL-22RA приголомшених мишей

Лінія k14 IL-20 м трансгенних мишей (TG) була встановлена, і немовлята TG показують сонячний фенотип. Трансген експресований k14 промоутером, що направляє експресію до кератину, продукуючому клітини в шкірі. Лінія IL-22RA приголомшених мишей (KO), була також встановлена, і ніякі істотні зміни не спостерігалися в безперечних мишах. Ці дві лінії були пересічені разом, і немовлята були забрані, маючи наступні чотири різних генотипи: (1) TG/HOM: експресія k14 IL-20 м трансгена на фоні неекспресного IL-22RA; (2) TG/Het: експресія k14 IL-20 м трансгена на фоні, експресуючого деякий IL-22RA від однієї копії гена IL-22RA; (3) WT/HOM: неекспресний k14 IL-20 м трансген на фоні неекспресного IL-22RA; і (4) WT/Het: неекспресний k14 IL-20 м трансген на фоні, експресуючого деякий IL-22RA від однієї копії гена IL-22RA. Тридцять чотири немовлята мишенятка цих різних генотипів були піддані евтаназії на 3 день, приблизно 48 годин після народження (Таблиця 15):

Таблиця 15

	TG/HOM* (група 1)	TG/Het* (група 2)	WT/HOM* (група 3)	WT/Het* (група 4)
усього	n=10	n=10	n=9	n=5

TC=трансгенний; WT=дикий тип; HOM=гомозиготний; Het=гетерозиготний; і n=кількість мишенят.

Кожне мишенятко було поперечно розсічено у три секції (верхня грудна клітина, нижня грудна клітина й живіт) через тіло, і від голови відмовлялися. Екземпляри тканини, 4.0-5.0mm товщиною, були фіксовані в 10%-ом нейтральному буферному формаліні, обробленому в парафінові блоки й зафарбовані гематоксиліном і еозином (Г&Е) для звичайної гістологічної експертизи й гістоморфометричного аналізу зображення. Епідерміс від дорзальної області спинного мозку в кожному зразку тканини був обраний для гістоморфометричного аналізу зображення, використовуючи Olympus BH-2 мікроскоп, відеокамеру (Dage-MTI, Michigan City, DSf) and BioQuant True Color windows 98 software (R&M Biometrics, Inc. Nashville, TN 37209) з наступними налаштуваннями: параметри: mag. 10X, Z від набору 0; Безліч: довжина (Dm); вимір: ручний і сукупний спосіб. Товщина (m) епідермісу й пласту злушування або шару, що злушується від кожного

зразка шкіри була індивідуально обмірювана 10 разів, із приблизно 0,1 мм інтервалом між кожним виміром, у кожному 10x мікроскопічному полі й середній величині, SD і SEM були отримані обчисленням в Excel. Всі секції були рандомізовані й обмірювані блендовим способом. Після виміру секції були неблендові, і результати підібрані по лікувальних групах. Заключні результати лікувальних груп були класифіковані в такий спосіб: 1. Середня зпідермальна товщина (Dm) у верхній грудній клітині, нижній грудній клітині й животі, і потім субкласифіковані: (a) середня епідермальна товщина у верхній грудній клітині; (b) середня епідермальна товщина в нижній грудній клітині; і (c) середня епідермальна товщина на животі 2. Середня товщина пласту злушування (Dm) у верхній грудній клітині, нижній грудній клітині й животі, і субкласифіковані як (a) Середня товщина пласту злушування у верхній грудній клітині; (b) Середня

товщина пласту злушчування в нижній грудній клітині; і (с) Середня товщина пласту злушчування на животі. 3. Середня товщина епідерміса плюс пласту злушчування у верхній грудній клітині, нижній грудній клітині й животі. Отримані дані були проаналізовані, використовуючи GraphPad InStat software (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA 92121). Однобічний дисперсійний аналіз (ANOVA) був застосований, щоб досліджувати статистичне значення розходжень у середніх величинах від групи 1 до групи 4. Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test використався для визначення статистичних розходжень у середніх величинах між двома групами (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$). Спостереження $P < 0.05$ вважали істотними.

(1) Гістоморфометричні результати

(а) Середня епідермальна Товщина (μm) у верхній грудній клітині, нижній грудній клітині й животі.

Епідермальна товщина збільшена значно у трансгенних мишенят IL-20, з недоліком в одній копії гена IL-22RA (TG/-Het) проти трансгенних

мишенят IL-20 без експресії IL-22RA (TG/-HOM, $P = 0,001^{***}$) і проти контрольного виводка (WT/HOM, $P = 0,001^{***}$ і WT/Het, $P = 0,001^{***}$), відповідно (таблиця 16). TG/-Het мишенята показали збільшену товщину некератинізованого епідермісу можливо через гіпертрофію кератиноцитів. Це збільшення могло б затягнути всі три некератинізовані шари (базальний, шиповатий і гранульований), але найчастіше торкалося шару шиповатих клітин. Епідерміс TG/-Het мишенята збільшений приблизно на 25% у товщині, і шипи стала видно. Беручи до уваги, що епідерміс TG/-HOM мишенята був небагато більше товстим, чим контрольних (WT/HOM і WT/Het) і статистика не вказала ніякого істотного розходження між групами ($P > 0.05$). Епідермальна товщина у верхній грудній клітині, нижній грудній клітині й животі була також зрівняна. Звичайно тонкий епідерміс живота більше товстий, чим на нижній грудній клітині, а на нижній грудній клітині більше товстий, чим на верхній грудній клітині (таблиця 16).

Таблиця 16

	TG/-HOM (N=28)	TG/-Het (N=30)	WT/HOM (N=27)	WT/Het (N=15)
значення	32,58 \pm 1,25	41,05 \pm 2,04	31,31 \pm 1,08	30,83 \pm 1,43

Результати представляють середні значення \pm SEM. N=число секційних вимірів.

Сквамозний епітелій шкіри у верхній грудній клітині від TG/-Het мишей показав збільшення товщини, супроводжуване гіпертрофією епідермальних клітин (кератиноцитів); однак не було ніякого статистичного розходження в порівнянні з іншими групами, TG/-HOM, WT/HOM і WT/Het ($P = 0.1565$, таблиця 17). Це, видимо, треба або з гістологічно-

го експоната, наприклад, мінливість секції-до-секції, природна архітектура епідермісу, або з невеликого ефекту в тонкій шкірі у верхній грудній клітині. Відзначте: процедура гістології або секція тканини верхньої грудної клітини могли б бути дискваліфіковані для гістоморфометричного аналізу для одержання статистичного значення.

Таблиця 17

	TG/-HOM (N=10)	TG/-Het (N=10)	WT/HOM (N=9)	WT/Het (N=5)
значення	29,18 \pm 2,24	33,20 \pm 2,24	27,28 \pm 0,62	29,38 \pm 1,77

Результати представляють середні величини \pm SEM. N=число секційних вимірів.

IL-20 (TG/-) з однією копією гена IL-22RA (Het) показав збільшену середню величину епідермальної товщини в порівнянні з TG/-HOM ($P < 0.05^*$), WT/HOM ($P < 0.001^{***}$), і WT/Het ($P < 0.01^*$), відповідно (таблиця 18). Статистика вказала надзвичайно істотно серед груп ($P < 0.0001^{****}$). TG/-Het епідерміс збільшився приблизно на 29% чому з WT/Het. Фенотип IL-20 мишенята (TG/-) з відсутністю IL-22RA (HOM) частково мав подібність із мишенятами з недоліком однієї копії гена IL-22RA (Het) пов'язаним з більш товстим епідермісом, чим які з контрольного виводка (WT/HOM і WT/Het), однак, це не демонструвало ніякого статистичного розходження в порівнянні з контрольними ($P > 0.05$). TG/-

HOM епідерміс збільшився на приблизно 14%, чим з WT/HOM. На відміну від IL-20 TG/-мишенята, IL-22RAm рецепторнедостатні мишенята (WT/HOM і WT/Het) демонстрували відносно більше тонку епідермальну товщину. Помітно, гістоморфометричні результати епідермальної товщини в нижній грудній клітині були послідовно виявлені, кореляційно до середньої епідермальної товщини у верхній грудній клітині, нижній грудній клітині й животі (таблиця 15), що показала, що гістологічна процедура й секція тканини нижньої грудної клітини виконані з найкращою якістю для гістоморфометричного аналізу зображення.

Таблиця 18

	TG/-HOM (N=10)	TG/-Het (N=10)	WT/HOM (N=9)	WT/Het (N=5)
значення	35,91±1,37	43,79±2,35	30,83±1,86	30,94±2,83

Результати представляють середні величини±SEM. N=число секційних вимірів.

Результати середньої епідермальної товщини на животі (таблиця 19) були подібні цьому в нижній грудній клітині (таблиця 18) за винятком того, що TG/-HOM не показали ніяких розходжень у порівнянні з контрольним виводком (WT/HOM і WT/Het,

P>0.05). Там були деякі зміни в секціях тканини, і також дві секції були пропущеними, тобто без епідермісу, що покриває дорзальну область в TG/-HOM групі.

Таблиця 19

	TG/-HOM (N=8)	TG/-Het (N=10)	WT/HOM (N=9)	WT/Het (N=5)
значення	32,35±1,44	46,33±3,10	35,81±1,90	32,16±2,97

Результати представляють середні величини±SEM. N=число секційних вимірів.

(б) Середня товщина (µm) пласту злушчування у верхній грудній клітині, нижній грудній клітині й животі

Незважаючи на збільшену епідермальну товщину у трансгенних мишей IL-22RA (HOM) або експресованої однієї копії гена (Het), що переважає в скороченні пласту злушчування або товщини шара, що злушчується, була отримано в TG/-HOM і TG/-Het шкірі в порівнянні з контрольним виводком (WT/HOM і WT/Het), і статистика вказала надзвичайно істотно серед груп (P<0.0001****, Таблиця 20). TG/-Het мишенята показали приблизно 36%, 50% і 49% зменшеної кількості кера-

тину на поверхні епідермісу проти TG/-HOM (P<0.01**), WT/HOM (P<0.001****) і WT/Het (P<0.001****), відповідно. TG/-HOM мишенята показали приблизно 22%-е істотне скорочення в товщині пласту злушчування в порівнянні з її контролем (WT/HOM, P<0.05*) і тільки 17%-е скорочення проти WT/Het, що не показав ніякого статистичного значення (P>0.05). Товщина пласту злушчування в контрольних мишах, WT/HOM і WT/Het була такою ж самою. Очевидно, пласт злушчування в нижній грудній клітині більш товстий, чим на животі, а на животі більше товстий, чим на нижній грудній клітині

Таблиця 20

	TG/-HOM (N=8)	TG/-Het (N=10)	WT/HOM (N=9)	WT/Het (N=5)
значення	33,26±2,69	21,41±1,27	42,54±2,01	40,31±3,82

Результати представляють середні величини±SEM. N=число секційних вимірів.

Середня товщина пласту злушчування у верхній грудній клітині (таблиця 21) мала подібність до цього у верхній грудній клітині, нижній грудній клітині й животі (таблиця 20), однак істотне скорочення пласту злушчування було знайдено тільки в TG/-Het проти TG/-HOM (P<0.05*) і проти WT/HOM (P<0.01**), відповідно. Стандартне відхилення й стандартна помилка в середньому

були високі, які могли б відбутися через погану секцію, брак зразків шкіри, природної архітектури епідермісу, або у верхній грудній клітині був невеликий ефект. Відзначте: процедура гістології або секція тканини верхньої грудної клітини могли б бути дискваліфіковані для гістоморфометричного аналізу для одержання якісного результату.

Таблиця 21

	TG/-HOM (N=28)	TG/-Het (N=30)	WT/HOM (N=26)	WT/Het (N=14)
значення	34,96±3,53	18,14±3,99	40,47±4,38	32,96±8,11

Результати представляють середні величини±SEM. N=число секційних вимірів.

Результат середньої товщини пласту злушчування в нижній грудній клітині (таблиця 22) був подібний цьому у верхній грудній клітині, нижній грудній клітині й животі, але із трьома виключеннями: (1) TG/-HOM проти TG/-Het і TG/-HOM про-

ти. WT/HOM не показав ніяких статистичних розходжень (P>0.05); (2) TG/-HOM проти. WT/Het показав істотне розходження (P<0.01**); (3) пласт злушчування в WT/Het, значно товстий, котрий міг би бути наслідком тканини, оброблюваної

артефакт, наприклад, кератин, роздутий або розширений при знаходженні його в гіпотонічному

розчині або залишенні у водяній бані занадто довго.

Таблиця 22

	TG/-HOM (N=10)	TG/-Het (N=10)	WT/HOM (N=8)	WT/Het (N=4)
значення	35,64±3,4	24,22±1,54	44,35±3,51	53,77±7,21

Результати представляють середні величини±SEM. N=число секційних вимірів.

Тільки TG/-HOM проти. WT/HOM і TG/-Het проти. WT/HOM показали статистично істотне розходження, $P<0.05^*$ і $P<0.001^{***}$, відповідно (таблиця 23). TG/-мишенята показали скорочення

товщини пласту злушчування на животі в порівнянні з його контрольним виводком (WT/HOM і WT/Het).

Таблиця 23

	TG/-HOM (N=8)	TG/-Het (N=10)	WT/HOM (N=9)	WT/Het (N=4)
значення	28,84±4,36	21,86±1,30	42,45±3,15	33,25±3,96

Результати представляють середні величини±SEM. N=число секційних вимірів.

(с) Середня товщина (μm) епідермісу плюс пласту злушчування у верхній грудній клітині, нижній грудній клітині й животі

TG/-Het мишенята показали істотне збільшення епідермальної товщини й істотного змен-

шення в товщині пласту злушчування в порівнянні з контрольним виводком (WT/HOM і WT/Het), і TG/-HOM зробили подібний результат, але з мінімальним ефектом (таблиця 24).

Таблиця 24

	TG/-HOM (N=10)	TG/-Het (N=10)	WT/HOM (N=9)	WT/Het (N=4)
Пласт злушчування	32,58	41,05	31,31	30,83
Епідерміс	33,26	21,41	42,54	40,31

Результати представляють середні величини. N=число мишенят

(d) Передача сигналів IL-20 і через IL-20RA і IL-22RA

Епідерміс - стратифікований, безупинно поновлюваний епітелій, що залежить від балансу між клітинною проліферацією, диференціюванням, і смертю для гомеостазу. У нормальному епідермісі, мітотична активність базального шару дає початок термінальної диференціації кератиноцитів, які мігрують назовні й в остаточному підсумку злушчуються від поверхні шкіри як нуклеативна сквама, кератин або шар, що злушчується, розташований у пласті злушчування. Хоча багато білків, як відомо, функціонують у підтримці епідермального гомеостазу, молекулярна координація цих подій погано зрозуміла.

IL-20 - новий рецептор-інтерактивний білок, і він сигналізує або через IL20RA або через рецептори IL-22RA (IL-22RA), виражені в шарі шкіри, пов'язаній із проліферацією кератиноцитів. IL-20 трансгенні немовлята показують неправильний стовщений і сонячний фенотип шкіри. IL-22RAm (HOM) дефіцит у мишах не показав ніякої відповіді на IL-22 лікування, тоді як дикий тип мишей з IL-22RA геном і лікуванням IL-22, демонстрував істотне збільшення епідермальної товщини ($P<0.001^{***}$, див. результати в IL-22RAm KO/IL-22 гістоморфометричного аналізу зображення, PDD 59.2). Щоб досліджувати, чи має відсутність IL-

22RA ефект на сонячний фенотип, спостережуваний в IL-20m K14 немовлят Т трансгенні миши, що ектопічно експресували IL-20, з'єднувалися з IL-22RA гомозиготними (HOM) або IL-22RA гетерозиготними (Het) недосконаліми. Кількісний аналіз зображення епідермальної товщини був попередньо виконаний на меншій кількості мишенят у нижній грудній клітині від цього дослідження (тобто 19 мишенят, 1 секція на щеня, у цілому 19 секцій), але ніяке статистичне значення не було отримано через обмежене число вивчених тварин і зміни в межах груп. Метою існуючого дослідження був гістоморфометричний підрахунок більшої кількості зразків шкіри у верхній грудній клітині, нижній грудній клітині й животі від кожного мишенятка того ж самого дослідження (тобто 34 мишенятка, 3 секції на мишеня, у цілому 102 секції), щоб досліджувати біологію IL-20 і одержати надійні кількісні результати. Для ефективного аналізу зображення, ми впевнилися, що орієнтація шкіри в парафіновому блоці була послідовна, і зразки шкіри були обмірювані від тих же самих відповідних місць розташування індивідуально й у групах мишенят. Два види розмірів були виконані: (1) товщина епідермісу була обмірювана 10 разів в 10х мікроскопічному полі в кожному зразку шкіри, кожний на дорзальній стороні спинного мозку, для дослідження ролі IL-20 у посередниц-

тві проліферації кератиноцитів і диференціюванні; (2) товщина шару, що злущується або пласту злущування була обмірювана в тій же самій манері кореляції результатів із сонячним зовнішнім виглядом шкіри в IL-20 TG немовляти.

Гістоморфометричний аналіз зображення епідермальної товщини показав, що TG/-Het немовлята, експресуючи k14 IL-20m трансген на фоні експресії деякого IL-22RA від однієї копії IL-22RA гена показали стовщений епідерміс і TG/-HOM немовлята, що експресують k14 IL-20m трансген на фоні, неекспресійного IL-22RA не мали ніякої істотної зміни. Епідермальна товщина збільшилася значно в IL-20 трансгенних мишенят, з недостатністю однієї копії IL-22RA гена (TG/-Het) проти трансгенних щенят IL-20, з недостатністю в обох копіях IL-22RA генів (TG/-HOM, $P=0.001^{***}$) і проти контрольного виводка (WT/HOM, $P=0.001^{***}$ і WT/Het, $P=0.001^{***}$). TG/-Het мишенята показали збільшену товщину некератинізованого епідермісу головним чином через гіпертрофію кератиноцитів у шиповатому шарі. Епідерміс TG/-Het мишенята збільшений приблизно на 25% у товщині, тоді як епідерміс TG/-HOM мишенята був тільки небагато більше товстий, збільшений приблизно на 4-5%, чим контрольні (WT/HOM і WT/Het) і статистика не вказали ніякого істотного розходження між TG/-HOM і його контролем WT/HOM ($P>0.05$).

Гістоморфометричні результати пласту злущування показали, що незважаючи на епідермальне стовщення в TG/-Het немовлят переважне скорочення кератину або товщини шару, що злущується було дотримано в TG/-HOM і TG/-Het шкірі в порівнянні з контрольними мишами (WT/HOM і WT/Het), і статистика вказала надзвичайно істотно серед груп ($P<0.0001^{****}$). TG/-Het мишенята показали приблизно 36%, 50% і 49% зменшеної кількості кератину на поверхні епідермісу проти TG/-HOM ($P<0.01^{**}$), WT/HOM ($P<0.001^{***}$) і WT/Het ($P<0.001^{***}$), відповідно. TG/-HOM мишенята показали приблизно 22%-е істотне скорочення товщини пласту злущування в порівнянні з її контролем (WT/HOM, $P<0.05^{*}$) і тільки 17%-е скорочення проти WT/Het ($P>0.05$). Товщина пласту злущування у контрольних мишенят, WT/HOM і WT/Het була приблизно така ж. Зменшення середньої товщини пласту злущування в TG/-HOM і TG/-Het немовлят, видимо, корелювало з масовим виявленням, у якому на цілому рівні IL-20 (TG)/IL-22RA (Het) у немовлят

відзначається, зменшення саява (наприклад, з меншою кількістю кератину), названого блиском, у той час як IL-20 (TG)/TJL-22RA (HOM) немовлята не сяють (наприклад, з більшою кількістю кератину).

Гістологічно, кератин у пласті злущування у TG/-мишенятах відзначений більше компактним, чим в WT-мишенятах. Разом, стовщений епідерміс, пов'язаний з гіпертрофічними кератиноцитами й тонким пластом злущування у трансгенних немовлят IL-20 міг би пояснити, чому вони показали сонячний фенотип шкіри. Збільшена гіпертрофія й порушене термінальне диференціювання кератиноцитів були дотримані у IL-20 трансгенних немовлят із плановим приголомшенням для однієї копії гена IL-22RA (Het). Шкіра показала гіпертрофію кератиноцитів, які не повністю диференціюються, маючи недолік у кератині або шарі дерми. IL-20 трансгенні немовлята з руйнуванням двох копій IL-22RA генів (HOM) виявили фенотип, що нагадував TG/-Het шкіру, але показав менший або мінімальний ефект (ілюстрація 12-15). Видимо, відсутність IL-22RA (HOM) має частковий ефект на сонячний фенотип, спостережуваний в K14 IL-20m TG немовлят, а відсутність IL-22RA (Het) має мінімальний або ніякий ефект на сонячний фенотип. Інакше кажучи, передача сигналів IL-20, новий рецептор-інтерактивний білок, що сигналізує або через IL-20RA або через рецептор IL-22RA (IL-22RA), імовірно не утруднена по дефіцитній експресії однієї копії гена IL-22RA (Het), але частково утруднена по дефіцитній експресії двох копій IL-22RA гена (HOM).

Ці результати забезпечують доказ того, що ефективно блокування активності IL-22RA, наприклад через генне приголомшення IL-22RA або подібно через нейтралізуюче моноклональне антитіло до IL-22RA представленого винаходу, буде подібно зменшенню IL-20-індукованим шкірним ефектам, так само як ефекти шкіри IL-22-індуковані шкірні ефекти, наприклад при псоріазі, 33К, коліті, або інших запальних захворюваннях, викликаних IL-20, і або IL-22.

Приклад 34

Ефект IL-22 на IL-22RA приголомшених мишей

Тридцять шість мишей, включаючи 23 IL-22RA KO (HOM) і 13 контрольних (WT) були проліковані IL-22 або ФБР, призначеним підшкірно, імплантованим мінінасосом із трубкою або тільки мінінасосом (Таблиця 25):

Таблиця 25

	НОМ/ФБР (група 1)	НОМ/IL-22 (група 2)	WT/ФБР (група 3)	WT/IL-22 (група 4)
Самці	n=3	n=10	n=3	n=8
Самки	n=0	n=10	n=0	n=2
Усього	n=3	n=20	n=3	n=10

Зразок шкіри, 1.5-2.5см у довжину й 4.0-5.0mm у товщину з насосної ділянки кожної тварини був отриманий для звичайної гістологічної експертизи й гістоморфометричного аналізу зображення. Всі екземпляри тканини були фіксовані в 10%-ом нейтральному буферному формаліні й

оброблені в парафінових блоках. Шість сегментальних секцій, 5um у товщині й 10um в інтервалі між суміжними секціями з епітелієм, що покриває всю поверхню, від кожного зразка шкіри тварини були пофарбовані гематоксиліном і еозином (Г&Е). Гістоморфометричний аналіз зображення

зразків шкіри був виконаний, використовуючи Olympus BH-2 мікроскоп, відео камера (Dage-MTI, Michigan City, IN) і BioQuant True Color windows 98 software (R&M Biometrics, Inc. Nashville, TN 37209) з наступними налаштуваннями: Параметри, Мег. 10X, Z від набору 0; Безліч: довжина (um); Міра: ручний і сукупний спосіб. Товщина (um) епідермісу була обмірювана 5 разів у кожному 10х мікроскопічна область від у цілому 4 областей, захоплених від центра 0,4 див кожної секції шкіри (наприклад, один 10х мікроскопічних полів=0.1cm і чотири 10х мікроскопічні поля=0,4cm). Загальна кількість 6 секцій від кожної тварини була обміряна й середня величина, SD і SEM були отримані обчисленням в Excel. Всі секції були рандомізовані й оцінені блендовим способом. Після виміру, секції були оброблені, і результати підібрані по лікувальних групах. Заключні результати лікувальних груп були класифіковані в такий спосіб: 1. Епідермальна товщина від НОМ і WT мишей самців і самок. 2. Епідермальна товщина від НОМ і WT мишей самців. Отримані дані були проаналізовані, використовуючи GraphPad InStat software (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA 92121).

Був застосований однобічний дисперсійний аналіз (ANOVA) для дослідження статистичного значення, розходжень у середніх величинах від групи 1 до групи 4. Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test and Unpaired-T тест були застосовані, щоб проаналізувати значення в середніх величинах між двома групами. Спостереження $P < 0.05$ уважали істотними.

III. Гістоморфометричні результати (1) епідермальної товщини (um) від НОМ і WT мишей самців і самок

Епідермальна товщина, значно збільшена в WT мишачій шкірі пролікованих IL-22 (WT/IL-22) проти WT/ФБР ($P = 0,0001$). IL-22RAm КО мишача шкіра, пролікована IL-22 (НОМ/IL-22) показала збільшену середню величину епідермальної товщини в порівнянні з НОМ/ФБР контрольними, однак статистика не вказала ніякого істотного розходження між цими двома групами ($P > 0.05$). Переважне скорочення епідермальної товщини було дотримано в IL-22RAm КО мишах у порівнянні з WT мишами (наприклад, НОМ/IL-22 проти WT/IL-22: $P < 0.001$) (Таблиця 26).

Таблиця 26

	НОМ/ФБР (N=3)	НОМ/IL-22 (N=19)	WT/ФБР (N=3)	WT/IL-22 (N=10)
Значення	14,15±0,19	19,01±1,03	23,34±5,49	43,08±1,85

Результати представляють середні величини±SEM. N=число тварин.

(2) Епідермальна товщина (um) від НОМ і WT мишей-самців

Епідермальна товщина, збільшена 2-кратно в шкірі WT мишей-самців пролікованих з IL-22 (WT/IL-22) у порівнянні з WT/ФБР контрольними самцями ($P = 0,0001$), однак, IL-22RAm КО епідерміс мишей самців, пролікованих IL-22, НОМ/IL-22

показав тільки невелике поліпшення в порівнянні НОМ/PBS контрольними самцями ($P > 0.05$). Помітно, IL-22RAm КО миші показали відзначене скорочення епідермальної товщини при порівнянні з контрольними, WT митами самцями (наприклад, НОМ/ФБР проти WT/ФБР: $P < 0.05$; НОМ/IL-22 проти WT/IL-22: $P < 0.001$) (Таблиця 27).

Таблиця 27

	НОМ/ФБР (N=3)	НОМ/IL-22 (N=9)	WT/ФБР (N=3)	WT/IL-22 (N=8)
Значення	14,15±0,19	15,86±0,75	23,34±5,49	41,41±1,71

Результати представляють середні величини±SEM.

(3) Епідермальна товщина (um) в НОМ і WT мишей самців проти самок

Епідерміс у самок була знайдений більш товстим, чим у самців (наприклад, НОМ/IL-22/самців

проти НОМ/IL-22/самок: $P < 0.01$; WT/IL-22/самців проти WT/IL-22/самок: $P < 0.05$) (Таблиця 28).

Таблиця 28

	НОМ/IL-22 (самці, N=9)	НОМ/IL-22 (самки, N=10)	WT/IL-22 (самці, N=8)	WT/IL-22 (самки, N=2)
Значення	15,86±0,75	21,85±1,3	41,41±1,71	49,75±4,82

Результати представляють середні величини±SEM.

(4) Епідермальна товщина (um) в НОМ мишей, IL-22 насос проти IL-22 насоса із трубкою

Епідерміс в IL-22RAm КО (НОМ) мишей з IL-22 насосом і трубкою був знайдений значно бі-

льше товстим, чим в IL-22RAm КО (НОМ) мишей тільки з насосом ($P < 0.0001$, непарним-T тестом) (Таблиця 29).

Таблиця 29

	HOM w/IL-22 насос (M=8 & F=2, N=10)	HOM w/IL-22 насос із трубкою (M=2 & F=8, N=10)
Значення	15,85±0,65	23,30±1,36

Результати представляють середні величини±SEM.

M: чоловічий; F: жіночий; N: загальна кількість мишей.

IV. Обговорення:

Разом, мета цього дослідження полягає в тому, щоб характеризувати епідермальні ефекти в IL-22 пролікованій шкірі й від IL-22RAm KO і від WT мишей, і зв'язати ці отримані дані із клінічними ознаками. Для визначення товщини епідермісу в Г&Е зафарбованих відділах шкіри був виконаний кількісний аналіз зображення. Зразки шкіри від кожної тварини були гістоморфометрично обмірюваними, 120 разів (тобто 20 разів/кожний відділ X 6 сегментальних відділів від кожної миші =120 вимірів) і середня епідермальна товщина була отримана обчисленням в Excel. Гістоморфометричне дослідження демонструвало, що IL-22 привів до істотного збільшення епідермальної товщини особливо в WT мишах із присутністю рецептора IL-22RA ($P<0.0001$ ANOVA, прийнятий в увагу надзвичайно істотним) і показав зменшені або мінімальні ефекти на IL-22RAm KO (HOM) мишах з відсутністю IL-22RA рецептора ($P>0.05$). Епідермальна товщина в IL-22 пролікованих WT мишах була збільшена, приблизно на 43% чим в тих, які лікувалися ФБР (наприклад, WT/ФБР $P<0.001$), тоді як IL-22 проліковані IL-22RAm KO (HOM), миші показали тільки 26%-е збільшення епідермальної товщини в порівнянні з контролем (HOM/PBS, $P>0.05$). IL-22RAm KO миші показали більш тонкий епідерміс при порівнянні з мишами WT ($P<0.001$). У цілому, біологічні ефекти IL-22 на мишачій шкірі припускають, що цей фактор міг би бути залучений у регулювання епідермального росту й проліферації.

Приклад 35

Фармакокінетика антилюдського IL-20 моноклонального антитіла (Клон #262.7.1.3.2.4)

Тестуємо моноклональне антитіло, антилюдське IL-20 мАт, (клон #262.7.1.3.2.4) було забезпечено в 3х 3 мл кратно в концентрації 1.08

мг/мол (певним УФ поглинанням в 280 нМ) і було збережено при - 80 С до використання. Розчинником були 1X ФБР (50 м NaPO₄, 109 м NaCl), р 7.3. МАТ розтануло при кімнатній температурі перед використанням, і кратно 1 і 2 використалися як передбачено для 100 мкг IV і SC дозованих груп, відповідно. Половина кратних 3 була розведена 1:2 в 1X ФБР для 50 мкг SC дозованих груп, а друга половина кратних 3 була розчинена 1:10 в 1X ФБР для 10 мкг SC дозованих груп. Самки SCID (n=96), були отримані від Лабораторій Чарльза Ривера. Здоров'я тварин було перевірено по прибуттю й їх розмістили групами (3 тварини у клітину). Мишам було 12 тижнів із середньою вагою тіла 22 г на початку дослідження.

А Дозувальний протокол

Самки SCID (n=24/доза група) були безладно розміщені в чотири групи дозування (див. Таблиця 30). Групі 1 призначили anti-huIL-20 мАт через IV ін'єкцій приблизно 93 мкл у вену хвоста, а Групам 2, 3 і 4 призначили мАт через SC ін'єкцію приблизно 93 мкл у зашийок шиї.

В. Зразок збору

До збору крові, миші були повністю знеболені галотаном або ізофлюораном. Зразки крові були забрані через серцевий прокол для всіх точок часу, крім 168 годин (узяті через вічко і в тих же самих тварин відбирали знову в 504 години краплі часу через серцевий прокол). Кров була зібрана в трубках сироваткового сепаратора й згущена протягом 15 хвилин. Зразки згодом центрифугувались протягом 3 хвилин при 14000 обертів у хвилину. Після центрифугування кратні 125-150 мкл розподілені в позначені Ерпендорф трубки й негайно збережені при -80°C до аналізу (Таблиця 30).

Таблиця 30

Групи#	Дози (ROA)	Тварини	РК точки часу
1	100 мкг (IV)	3 миші/точка часу*	0,25, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336 і 504 години
2	100 мкг (SC)	3 миші/точка часу*	0,25, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336 і 504 години
3	50 мкг (SC)	3 миші/точка часу*	0,25, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336 і 504 години
4	10 мкг (SC)	3 миші/точка часу*	0,25, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336 і 504 години

* Деякі тварини використалися для 168 і 504 годин точок часу.

С. Визначення кількості сироваткової Anti-huEL-20 мАт концентрації ELISA

Фермент зв'язаний імуносорбентний аналіз (ELISA) був розвинений і готувався, щоб проаналізувати зразки мишачої сироватки від тварин, дозуємих з anti-IL-20 мАт 267.7.1.3.2.4 під час фармакокінетичних досліджень. Це випробування було розроблено, щоб використати у своїх інте-

ресах комерційно доступне вторинне антитіло й колориметричне виявлення, використовуючи ТМВ. Розведення, використовувані для стандартної кривої були змінені, щоб поліпшити визначення лінійної частини стандартної кривої. Стандартна крива в діапазоні 100 нг/мл до 0.231 нг/мл з 2-кратними розведеннями враховувала кількість зразків мишачої сироватки. QC зразки були роз-

ведені до 1:100, 1:1000 і 1:10000 в 10%-ой SCID мишачій сироватці й назад обчислені зі стандартної кривої

Д. Фармакокінетичний аналіз

Концентрація сироватки проти даних часу була завантажений в WinNonlin Professional 4.0 software (Pharsight, Inc; Cary, NC) для фармакокінетичного аналізу. Неізольований аналіз викори-

стався для визначення фармакокінетичних параметрів, заснованих на середніх даних у кожній точці часу.

Е. Результати

Середня сироваткова антилюдського IL-20 мАт концентрація після призначення 100 μ г IV і 100, 50, і 10 μ г SC, показана в Таблиці 31:

Таблиця 31

Година (г)	100 мкг IV Конц (мкг/мл)	10 мкг Конц (мкг /мл)	50 мкг SC Конц (мкг/мл)	100 мкг SC Конц (мкг/мл)
0,25	196 (12)	LTR	0,101 (0,065)	0,481 (0,485)
1	154 (18)	0,356 (0,146)	1,61 (0,52)	3,48 (1,72)
4	118 (20)	2,42 (0,53)	10,4 (3,4)	19,7 (4,7)
8	112 (20)	3,41 (0,30)	18,9 (3,6)	40,2 (6,4)
24	103 (13)	4,95 (0,05)	26,3 (0,7)	50,1 (6,2)
72	101 (16)	4,27 (0,79)	21,0 (3,4)	43,4 (2,7)
168	45,6 (15,4)	2,92 (0,53)	19,6 (2,7)	37,6 (3,4)
336	36,4 (16,6)	3,6 (0,31)	23,5 (3,5)	34,4 (5,8)
504	28,8 (3,8)	2,74 (0,39)	20,5 (3,6)	25,7 (2,1)

LTR: менш чим заслуговує на публікацію

Після IV призначення концентрація мАт проти профілю часу демонструвала біоекспотенціальне падіння. Після SC призначення мАт з'явилося й мало повільну поглинальну фазу, з поглинанням

обмеженої норми елімінації. Сироваткові фармакокінетичні параметри, засновані на середніх даних у кожній точці часу, показані в Таблиці 32:

Таблиця 32

параметри	одиниці	100	10	50	100
C_0 (IV); C_{\max} (SC)	мкг/мл	212	4,95	26,3	50,1
T_{\max}	г	N/A	24	24	24
$T_{1/2, \lambda z}$	г мкг/м	509 27059	ND 1730	ND 10845	612 18110
$AUC_{(0-4)}$	л мкг/м	48269	ND	ND	41561
$AUC_{(0-inf)}$	л				
$AUC(\% \text{ екстраполяції})$	%	43,9	ND	ND	56,4
V_{ss} (IV); V_z/F (SC)	мл	1,34	ND	ND	2,12
CI (IV); CL/F (SC)	мл/г	0,002	ND	ND	0,002
F (біонакопичення)	%	N/A	ND	ND	86,1

ND: не позначені дані не визначні через недостачу даних у граничній фазі усунення концентрації проти профілю часу

Наступне IV призначення мАт демонструвало дуже низький кліренс ($CI=0.002$ мл/година) і тривалі напіввиведення ($T_{1/2, \lambda z}$ 21 день). Мат демонструвало сталий обсяг розподілу ($V_{ss}=1.3$ мл), що є менше ніж обсяг крові миші ($=1.7$ мл), припускаючи, що мАт не істотно розподілялося із судинного русла. Назад вирахована максимальна концентрація (C_0) була вище, ніж очікувана, ґрунтуючись на введenu дозу й обсяг крові миші. Це, поряд з маленьким V_{ss} , припускає, що мАт може бути обмежено, у великому ступені, у сироватковій фракції крові.

Наступне SC призначення, C_{\max} величина збільшилися лінійно з дозою. В 100 μ г доза SC, мАт мали $T_{1/2, \lambda z}$ приблизно 25 днів із кліренсом і

очевидним обсягом розподілу, подібного тому, що впливало в IV дозуванні. Біонакопичення було 86%. У більше низьких двох SC дозах, головні фармакокінетичні параметри не могли бути оцінені через недостачу вимірної граничної фази усунення, навіть при тому, що зразки були вибрані 504 годинам. Абсорбція мАт після SC дозування з'являється для досягнення сталої елімінації по всій тривалості дослідження.

Приклад 36

IL-20 і IL-22 антагоністи в $CD4^+$ $CD45RB^{hi}$ ($CD25^-$) кліті і псоріатичної моделі

А. Резюме

Передача $CD4^+$ $CD45RB^{hi}$ або $CD4^+$ $CD25^-$ Т клітин в генетично сумісній SCID миші приводить

до коліту в мишей. Копередача регулюючих Т клітин ($CD4^+ CD25^-$ або $CD4^+ CD45RB^{10}$) інгібує цей коліт. Після передачі $CD4^+ CD25^-$ Т клітин мишам, яким додатково уведений стафілококовий ентеротоксин Б (СЭБ), у мишей розвивається не тільки коліт, але також і псоріаз. Антитілами проти IL-22RA, IL-20, IL-22, IL20R i/або IL-22R, або розчинних рецепторів IL-22RA управляють з 0 по 21 день після пересадження клітин для перевірки ознак коліту й псоріазу. Інгібіція псоріатичної мітки або коліту (гістологічно) вказує, що IL-21 можуть інгібувати ці аутоімунні захворювання.

В. Проект дослідження

Селезінка й пахові лімфовузли ізольовані від B10.D2 мишей. Одинокі клітини суспензії сформовані й підраховані. Використовуючи краплинну систему Miltenyi, $CD25^+$ клітини відсортовані позитивним добром. Клітини пофарбовані $CD25-PE$ (BD Pharmingen) в 1:100 розведенні й інкубовані протягом 15 хвилин. Зайве антитіло змивають, клітини інкубовані 10 μ l anti-PE краплі/ 10^6 клітин протягом 20 хвилин. Клітини вимиті ФБР і передані LS стовпчику (Біотехнологія Miltenyi). Клітини, які проходять через стовпчик ($CD25^-$), були збережені для подальших аналізів. $CD4$ збагачений коктейль (Клітинні технології Стема) доданий (1:100) до цих $CD25^-$ клітин і інкубований протягом 15 хвилин. Клітини вимиті ФБР. 1:10 розведення антибіотинного тетрамера додане до клітин протягом 15 хвилин, супроводжуване магнітним колоїдом (60 μ l/ 10^6 клітин) протягом 15 хвилин (усе із Клітинних технологій Стема). Клітини передаються через негативний відбірний стовпчик (0.5", Технології Стовбурної клітини). Клітини, які проходять, є $CD4-KO25^-$ клітинами. Чистота проаналізована з використанням потокової цитометрії. $0,4 \times 10^6$ клітин уведено in vivo наївним CB-17 мишам SCID у повному обсязі 200 л. Мишам введено i.p. 10 м SEB наступного дня (д1). Ознаки псоріазу й коліту впливають через 2-5 тижнів. Миші відзначені через хворобу псоріазу відповідно до наступних критеріїв. 0 - ніяких ушкоджень, 1 - помірні ушкодження на шиї, 2 - серйозних ушкоджень на шиї й спині (тілі) 3 - дуже серйозні ушкодження на шиї, спині й животі мишей. Стовщення вуха також визначена як міра тяжкості хвороби. Групам мишей введені i.p. ФБР, 100 м контрольного антитіла або 10-100 м антитіл проти IL-22RA, IL-20, IL-22, IL-20R або IL-22R, або розчинний IL-22RA з 1 по 30 день із різним дозувальним режимом (3X/тиждень або 2X/тиждень).

С. Результати й Висновок

Інгібіція ознак псоріазу й коліту в мишей, пролікованих антитілами, вказує, що інгібіція IL-20 i/або IL-22 функції може надавати аутоімунні ознаки в цій моделі для псоріазу й коліту.

Приклад 37

IL-20 і IL-22 антагоністи в SCID-hu пересадженій псоріатичній моделі

Людська псоріатична шкіра, щеплена на SCID миші може підтримати її клінічні, легкі мікроскопічні, і імуногістохімічні псоріатичні особливості протягом декількох тижнів. Ця модель забезпечує систему для оцінки терапії, що має намір відно-

вити ушкоджену тканину до нормального фенотипу. Як тільки людська шкіра успішно щеплена антитілами проти IL-22RA, IL-20, IL-22, IL-20R i/або IL-22R, або розчинних IL-20 або IL-22 рецепторів можна назначати протягом декількох тижнів, і епідермальна товщина може бути проаналізована для оцінки ефекту цих антагоністів на псоріазі.

В. Проект дослідження

Проколи біопсії товщиною 6 мм, що складаються із всього епідермісу й декількох мм дерми отримані на здорових дорослих добровольцях і псоріатичній ураженій шкірі. Від кожного донора отримано чотири-шість біопсій. Одна біопсія від кожного донора пересаджена на дорзальну поверхню реципієнта SCID миші (CB-17, Taconic). Тварини втримувалися в насколишнім середовищі без хвороботворних мікроорганізмів. Лікування почало після успішного щеплення (2-3 тижня після трансплантації) наступним образом: одна біопсія для негативного контролю (ФБР або ізотип мАт), одна біопсія для позитивного контролю (циклоспорин А), і 2-3 біопсії для лікування з антилюдським IL-22RA, антилюдським IL-20, антилюдським IL-22 мАт або розчинні рецептори для IL-20 або IL-22 (інтраперитонеальна ін'єкція, три рази в тиждень протягом 2-4 тижнів в M-W-F режимі).

С. Кількісний аналіз:

Клінічні спостереження й оцінки будуть зроблені регулярно протягом експериментів, і будуть зареєстровані Серйозність псоріатичних ушкоджень оцінена по шорсткості, затвердінню й еритемі блендовим способом. Параметри можуть бути вираховані, використовуючи масштаб із трьома пунктами: 0 = повна відсутність залучення шкіри; 1 = невелике залучення; 2 = помірне залучення; 3 = серйозне залучення. Наприкінці дозованого періоду кожна тварина піддана евтаназії, і тканини забрані для гістології й ІНС. (1) Частина тканини фіксована в 10%-ом формаліні й пофарбована гематоксиліном і еозіном. Епідермальна область обмірювана як функція змін епідермальної товщини, на одиницю довжини використовуючи NIH Image software. Багаторазові області від кожного пересадження визначені кількісно для забезпечення високої цінності й значимості епідермальної області (2) число запальних мононуклеарних клітин у високоенергетичних полях ($0,103 \times 0,135$ мм) у верхній дермі; (3) вид паракератозу оцінений у довільному масштабі від 0 до 3, де 0 відсутність паракератозу, 1 - паракератоз менше ніж в одній третині секції, 2 паракератоз був у більше чому однієї третини, але менше ніж двох третинах секції, 3 - паракератоз у більше чому двох третинах секції. (4) залишок тканини буде зафарбований Ki67 (маркер проліферації кератиноцитів) для оцінювання числа Ki67 циклу розвитку кератиноцитів у мм довжини секції. Знижена тяжкість псоріазу, обмірювана епідермальною товщиною, вказує на нейтралізацію IL-20 і IL-22 функції, які можуть бути ефективними в цій моделі псоріазу. Щоб визначати кількість зниженої тяжкості псоріазу, ми вимірюємо епідермальну товщину, число запальних клітин у верхній

дермі, числа Ki67 циклу розвитку кератиноцитів, і види паракератозу. Значно знижені всі чотири параметри для розглянутих груп у порівнянні з контрольними мишами, указують на потенційне терапевтичне використання IL-20, IL-22 антагоністів.

Приклад 38

Скринінгова для IL-20 антагоністична активність із використанням Ва3/IL-22RA/IL-20RB клітин, використовуваних в Alamar Blue Proliferation Assay

Фактор-залежна pre-B клітинна лінія Ва3 була ко-трансфектована з IL-22RA і IL-20RB (див., метод у Прикладі 3) і мала справу з IL-20 при різних концентраціях. Проліферацію було оцінено з використанням Alamar Blue аналізу, як описано в Прикладі 3. IL-20 стимулював проліферацію в дозо-залежному способі при концентраціях, очікуваних для цитокіна, демонструючи, що IL-20 зв'язує й активізує гетеродимеричний IL-22RA/IL-20RB рецептор при концентраціях, очікуваних для цитокіна. Негативні засоби керування, що містять непереданий Ва3, не поширювалися.

Щоб визначити, чи здатні anti-IL-22RA антитіла до антагоністичного IL-20 діяльності, аналіз, описаний вище, виконаний з використанням anti-IL-22RA антитіл, як антагоніст до діяльності IL-20. Коли IL-20, об'єднаний з таким же антагоністом, відповідь IL-20 знижена до другорядних рівнів. Присутність антагоніста, що видаляє або зменшує проліферативний ефект IL-20, демонструє, що це - антагоніст ліганда IL-20. Цей аналіз може використовуватися для перевірки інших антагоністів IL-20 активності, описаної тут, таких як антагоніст поліпептидів, що включають розчинний рецептор IL-22RA.

Приклад 39

Нейтралізація IL-20 і IL-22 активності anti-hu22RA моноклонального антитіла

Використовуючи клітинно-базований аналіз нейтралізації, описаний в Прикладі 28, очищене мишаче anti-huIL-22RA моноклональне антитіло (Приклад 30 (D)) було додано як послідовне розчинення, наприклад, в 10ug/ml, 5ug/ml, 2,5ug/ml, 1,25ug/ml, 625ng/ml 313ng/ml, 156ng/ml і 78ng/ml. Пластини аналізу були інкубовані при 37C, 5%-ий CO2 протягом 4 днів, тоді Alamar Blue(Accumed, Чикаго, IL) був доданий 20 л/колодязь. Пластини були знову інкубовані при 37C, 5%-ий CO2 протягом 16 годин. Результати показали, що очищене anti-huIL-22RA моноклональне антитіло могло нейтралізувати передачу сигналів і huIL-22 і huIL-20 через huIL-22RA. При 10ug/ml концентрації, антитіло повністю нейтралізувало проліферацію, викликану huIL-22 або huIL-20, з інгібіцією проліферації, що зменшується в дозо-залежному стилі при більш низьких концентраціях. Ізотип-підібране негативне контрольне мишаче МАт, перевірене при концентраціях, описаних вище, не забезпечило ніякої інгібіції проліферації будь-якого цитокіна. Ці результати далі демонструють, що моноклональні антитіла до IL-22RA могли дійсно протидіяти діяльності прозапальних лігандів, IL-20 і IL-2 при низьких концентраціях.

Ці результати забезпечили додаткове свідчення, що ефективне блокування IL-22RA активності, наприклад через нейтралізуюче моноклональне антитіло до IL-22RA, представленого винаходу, могло бути вигідно в блокуванні, інгібіції, скороченні, протидії або нейтралізації ефектів IL-20 і IL-22 (по одному або разом) *in vivo* і можливо зменшувало IL-20 і/або IL-22-індуковане запалення, таке як спостерігалось в IL-20-індукованих шкірних ефектах, так само як IL-22-індукованих шкірних ефектах, наприклад при псоріазі, 33К, коліті, або інших запальних захворюваннях, викликаних IL-22, і або IL-22, включаючи 33К, артрит, астму, псоріатичний артрит, коліт, запальні стани шкіри, і атопічний дерматит.

Приклад 40

Лікування вагітних IL-20 і IL-22 трансгенних мишей з нейтралізуючим anti-IL-22RA моноклональним антитілом

Для тестування пацюка антимишачим IL-22RA моноклональним антитілом (мат) з нейтралізуючою активністю *in vivo*, вагітним IL-20 трансгенним (Tg) і IL-22 Tg мишам уведено інтраперитонеально антимишаче IL-22RA МАТ. Новонароджені мишенята тоді оцінені на присутність або відсутність "сонячного" шкірного фенотипу, що звичайно характеризує ці породи мишей.

Чоловічим IL-20 Tg (який зроблений з використанням кератин -14) або IL-22 Tg (з використанням інсулінового промоутера) розводять мишей C57BL/6N самок у тіці, і розмножені самки ідентифіковані присутністю піхвового штепселя наступного дня. Кожна вагітна самка відсаджена в окрему клітину й перевірялася щодня. Лікувальні групи включають принаймні по 4 вагітних самки в кожній, для обліку статистично істотного аналізу й Tg і HeTg мишенята. Заснований на попередньому досвіді з цими Tg мишами, виводок звичайно складається приблизно з 6-8 мишенят, з яких 2-3 є Tg+.

Через сім-дев'ять днів після того, як миші розводяться (ембріональний вік 7-9; е7-9), самкам уведено інтраперитонеально 250-500ug щурячого антимишачого IL-22RA МАТ (щурячий Ig2a ізотип) в обсязі 200-250ul ФБР. Для ін'єкції використовують короткі голки під маленьким кутом, щоб уникнути безпосереднього введення в матку. Вагітним самкам вводять таким способом 3 дні в тиждень (у понеділок, у середу, і в п'ятницю) протягом 2х тижнів (до народження), для успішного проходження ембріонів, що розвиваються. Контрольні групи (не менше ніж 4 вагітних самки в кожній) включають наступне: ізотип контрольного пацюка Ig2a МАТ, антилюдський/мишачий IL-22 МАТ (щурячий Ig1 ізотип), і ізотип контрольного пацюка Ig1 МАТ. Як контроль для нейтралізації щурячого IL-20, вагітним самкам уведений або розчинний зв'язуючий білок IL-20R-Fc4, що може зв'язувати й нейтралізувати і людський і із щурячий IL-20, або контрольний білок Fc4.

З 1 по 2 день після народження мишенята уважно перевірені на появу блискучого фенотипу шкіри. В 2 день, мишенята піддані евтаназії, і частина хвоста забрана для ДНК ізоляції для

визначення генотипу (Tg або nonTg) кожного мишенятка. Зразки шкіри забрані для гістологічного аналізу, щоб оцінити, чи показують мишенята стовщені епідермальні шари клітин, які звичайно характеризують цих Tg мишей. Артеріальна кров також забрана від мишенят (і з очного вічка через один день після народження) для підрахунку ELISA, рівні анти-IL-22RA мАт у сироватці кожної миші. Оскільки ці мАт є потужними інгібіторами IL-20 і/або IL-22 in vivo, Tg мишенята мають нормальну шкіру (тобто немає епідермального стовщення або "сонячного" зовнішнього вигляду).

Приклад 41

IL-20 і антагоністи IL-22 в органічній культурі псоріатичної моделі

Людська псоріатична бляшечна шкіра може бути збережена в органічній культурі, і неправильні гістологічні ознаки ураженої шкіри підтримані у відсутності екзогенних факторів росту. Антитілами проти IL-22RA, IL-20, IL-22, EL20R і/або IL-22R, або розчинних IL-20 або IL-22 рецепторів можна управляти, і гістологічні ознаки псоріатичної ураженої шкіри можуть бути поліпшені.

В. Проект дослідження

Прокол біопсії товщиною 2 мм, що складається із всього епідермісу й декількох мм дерми, отримані або від здорових дорослих добровольців або від ураженої псоріазом шкіри. Безпосередньо перед біопсією, тканина занурена в середовище культури, що складається з базальних медіальних кератиноцитів (KBM) (Clonetics Inc, Walkersville, MD). Середовище культури додане до Ca12, щоб принести заключну Ca2+ концентрацію до 1.4 mM (Varani і інші, 1993, 1994). Біопсія потім інкубована в колодазі 96 колодцевих западин, що містять 200 μ l Ca2+ доданих KBM з або без додаткового лікування антитілами антилюдського IL-20, IL-22, IL-22RA, або розчинних рецепторів IL-20 або IL-22. Культури інкубовані при 37°C в атмосфері 95%-ого повітря й 5%-ого CO2 протягом 8 днів.

С Кількісний аналіз:

В кінці інкубаційного періоду, тканина зафіксована в 10% буферному формаліні й досліджена гістологічно після фарбування з гематоксиліном і еозіном. Поява псоріатичної тканини, підданої дії антитілами або розчинними рецепторами могло бути більш близько схожим з нормальними тканинами, що включають наступне спостереження: спочатку неорганізовані, що мають неправильну форму базальні епітеліальні клітини розвивали більше колоночну появу з відновленою полярністю; епідермальні гребінці регресували з меншою кількістю областей епітеліальної

клітинної експансії в простір шкіри; і було менш повне виродження верхніх епідермальних шарів. Органічна культурна модель забезпечує швидкий і сприйнятливий засіб для визначення, чи має специфічний склад потенціал як антигіперпроліферативний агент. Неправильна гістологічна ознака може бути поліпшена у присутності IL-20, антагоніста IL-22, пропонуючи ефективність такого агента в лікуванні псоріазу.

Приклад 42

Картографія mIL22RA (zCvtoRI Im) областей, приєднаних до нейтралізуючих мАт R2.1. 5F4.1 і R2.1.15E2.1

А. Антигенні детермінанти на щурячому IL-22RA, на яких зв'язуються нейтралізуючі моноклональні антитіла.

Експерименти, описані нижче були націлені на ідентифікацію області або областей в амінокислотній послідовності щурячого розчинного рецепторного білка IL-22RA (SEQ ID NO:62), які були важливі для діяльності рецептора, або для антагоніста або зв'язуючого нейтралізуючого антитіла. Щурячий білок IL-22RA-Fc, що був попередньо розщеплений тромбіном для видалення Fc, був тоді розщеплений C-термінально до залишків метіоніну в послідовності інкубації із цианогеном бромідом (CNBr). CNBr-генеровані пептиди фракціонувались, і фракції були перевірені на зв'язуючу активність, як відкрито ELISA, і на реактивність Західним аналізом з використанням моноклональних антитіл з нейтралізуючими властивостями, клонів R2.1. 5F4.1 і R2.1.15E2.1.

Що стосується розщеплення CNBr, наступні пептиди були потенційно генеровані від нескороченого, на всю довжину mIL-22RA (Таблиця 33). При нередуційних умовах цистеїни є дисульфіднозв'язаними з'єднаннями, що може призвести до внутрішнього зв'язування в пептиді 1 і зв'язку між пептидами 3 і 5. Залишки в рельєфному резервуарі потенційно залучені в ліганд приєднання, що відповідають людським залишкам IL-22RA, потенційно залученим у ліганд приєднання в SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:3, як описано в Прикладі 42В. Виразно, SEQ ID NO:48 відповідає залишкам амінокислоти 16 (His) до 83 (Met) з SEQ ID NO:42; SEQ ID NO:49 відповідає залишкам амінокислоти 84 (Glu) до 109 (Met) з SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:50 відповідає залишкам амінокислоти 110 (Thr) до 137 (Met) з SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:51 відповідає залишкам амінокислоти 138 (Leu) до 177 (Met) з SEQ ID NO:42, і SEQ ID NO:52, що відповідає залишкам амінокислоти 163 (His) до 208 (Pro) з SEQ ID NO:42 або 163 (His) до 212 (Arg) SEQ ID NO:62.

Таблиця 33

Пептид-ний номер	Від	До	Послідовність
CNBr Peptide 1	1	68	HTTVDTSGLLQHV/KFQSSNFENILTWGGPASTSDTVYSVEYKKYGERKWLAKAGCORITQI CFCNLTM (SEQ ID NO:48)
Нескорочені: цистеїни в пептиді 1 з'єднані			
CNBr Peptide 2	69	94	ETRMTEFFYYAKVTAVSAGGPPVTKM (SEQ ID NO:49)
CNBr Peptide 3	95	122	TDRFSSSLQHTTIKPPDVTICPKVRSIQM (SEQ ID NO:50)
Нескорочені: цистеїни в пептидах 3-5 з'єднані			
CNBr Peptide 4	123	162	LVHPTLTPVLSEGDHQLTLEEIFHDLFYRLELHVNHNTYQM (SEQ ID NO:51)
CNBr Peptide 5	163	213	HLEGKQREYEFGLTPDTEFLGSITILTPILSKESAPYVCRVKTLPLVPR (SEQ ID NO:52)

<EMI ID=224.1>

1. Розщеплення CNBr і ізоляція пептидних фракцій

50 μ г mL22RA були ліофілізовані й відтворені в 180 μ л мурашиної кислоти (70%). Був доданий 1 μ л 5M CNBr, розчинений в ацетонітрилі. Зразок був змішаний і вилучений для реагування протягом 18 годин при кімнатній температурі в темряві. 150 μ л реактивної суміші фракціонува-лись протифазою HPLC, пристосованої до аналітичного Zorbax SB300-C8 стовпчика. Піки були виділені з використанням градієнта, що починається в 25%-ом ацетонітрилі (0,085% TFA) і 75%-а воді (0,1% TFA) і закінчуються в 95%-ом ацетонітрилі (0,085% TFA) і 5%-а воді (0,1% TFA). УФ аналіз показав три головних і два незначних піки, які були зібрані. Кожна фракція була розділена навпіл; одна частина була представлена ELISA, інша частина була ліофілізована й відтворена в 150 μ л у фосфатно-буферному сольовому розчині (ФБР). УФ аналіз ФБР фракцій підтверджував відновлення всіх піків, зібраних з аналітичного стовпчика. ФБР фракції були представлені для Західного аналізу.

2. ELISA

Фракції HPLC, що містять пептидні послідовності від IL22RA, розщеплені CNBr, були розчинені в передбачуваній рівній концентрації, використовуючи буфер HPLC (90%-ий ацетонітрил, 10%-ий H₂O, 0.09% трифлюорооцетілова кислота). Зразки були завантажені на дев'яносто шести мікротитрових пластинах в 4 колодязях кожний по 100 л/колодязь, і їм була дана можливість висохнути за ніч при кімнатній температурі у випарному ковпаку. Пластини були вимиті ELISA C буфером (PBS, 0,05% Tween- 20), і потім блоковані ELISA B буфером (PBS, 0,1% BSA 0.05% Tween-20) протягом 2 годин при температурі 37°C. Два моноклональних антитіла (мАт) до IL22RA (Клон R2.1.5F4.1, і Клон R2.1.15E2.1) були розчинені до 2 г/мл в ELISA B. Кожне мАт було додано до кожного зразка послідовності пептиду в 100 л/колодязь, і пластини були інкубовані протягом 60 хвилин при 37°C. Пластини були вимиті, щоб видалити незв'язане антитіло, і вторинне антиті-

ло (цапиний антищурячий Ig, кон'югований з пероксидазою хрому; (Jackson)) було розчинено до 1 г/мл в ELISA B буфері й додано до всіх колодязів в 100 л/колодязь. Пластини були інкубовані протягом 1 години при 37°C. Колодязі були вимиті в ELISA C буфері, і потім інкубовані з TMB 1 Component HRP Microwell Substrate (BioF_x) протягом 5 хвилин. Реакція була зупинена додаванням 450 нм Stop Reagent для TMB Microwell (BioF_x) і пластин, що зчитують в спектральній вбираючій здатності 450 нм в Dynatech ELISA пластини зчитування (Молекулярні Пристрої).

Результати вказують, що мАт R2.1. 5F4.1 реагували із фракцією HPLC #4 mL22RA CNBr реакції, що також зробила смугу в експериментах Western blotting.

3. Західний

Фракції HPLC, що містять послідовності пептиду від IL22RA, розщепленого з CNBr були ліофілізовані за ніч при кімнатній температурі, і відтворені в ФБР. Потім зразки були змішані з нескороченою моделлю буфера (Invitrogen) і кипіли 10 хв. Зразки були завантажені й піддані електрофорезу SDS-PAGE на 4-12% гелі Bis-Tris (Invitrogen), що використовує 1xMES-SDS керуючий буфер (Invitrogen) і перейшли на нітроцелюлозу (0.2 m; Bio-Rad) в 20%-ом метанольному трансферному буфері, усе при кімнатній температурі. Фільтрам дозволяли висохнути за ніч при кімнатній температурі. Фільтри були блоковані 10%-им знежиреним сухим молоком у буфері A (50 mM Tris, р 7.4, 5 mM EDTA, 0.05% Igepal CA 630, 150m NaCl, 0.25% желатин) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Моноклональне антитіло (мАт) до IL22RA (Клон R2.1. 5F4.1) було розчинено в 2 г/мл у буфері A, що містить 2,5% знежирене сухе молоко. Блоти були виведені в цьому первинному антитілі протягом 1 години при кімнатній температурі. Після інкубації блоти були вимиті три рази в буфері A і виведені за 1 годину при кімнатній температурі з 1:5000 розведенням вторинного антитіла (цапиний антищурячий Ig, кон'югований з пероксидазою хрому; Jackson, Inc) у буфері A з 2,5% знежиреним

сухим молоком. Потім блоти були вимиті, проявлені з хемілюмінесцентним субстратом (Lumi-Lidht Western Blotting Substrate; Roche), і виставлені з використанням люмінесцентного блоку формування зображень (Mannheim Boehringer Lumi-Imager).

Використовуючи 30 хвилинну експозицію, нескорочений гель показав дуже сильні смуги для фракцій #4 і #5, поряд зі слабкою смугою для фракції #3. Фракція #4 також випробувала позитив в ELISA.

N-термінальна послідовність активної фракції #4

З п'яти фракцій пептиду CNBr, зібраних з аналітичного протифазного стовпчика, фракція #4 показала активність в ELISA і була також позитивна в Western blotting. Щоб ідентифікувати пептиди, представлені в активній фракції #4, зразок був наданий деградації Edman з використанням добре відомих методів. Три N-термінала були ідентифіковані з активної фракції, які були сумісні з пептидами 2 (SEQ ID NO:49), 3 (SEQ ID NO:50), і 5 (SEQ ID NO:52). Ці результати вказали, що антитіла пов'язані з пептидами 2 (SEQ ID NO:49), 3 (SEQ ID NO:50); і 5 (SEQ ID NO:52).

Таблиця 34

Edman Деградація	N-термінальна послідовність	Пептидна ідентифікація
Перша послідовність, отримана із фракції #4 CNBr-генерована mIL22RA послідовність	HLEGK QREYE FLGLT PDTEF HLEGK QREYE FLGLT PDTEF LGSIT ILTPI LSKES APYVQ RVKTL PLVPR (SEQ ID NO:53)	CNBr Peptide 5 (SEQ ID NO:52)
Друга послідовність, отримана із фракції CNBr-генерована mTL22RA послідовність	ETRNH TEFYY AKVTA VSAGG ETRNH TEFYY AKVTA VSAGG PPVTM K (SEQ ID NO:54)	CNBr Peptide 2 (SEQ ID NO:49)
Третя послідовність, отримана із фракції CNBr-генерована nJL22RA послідовність	TDRFS XLQHT XIXPX DXXXI TDRFS SLQHT TIKPP DVTQI PKVRS IQM (SEQ ID NO:55)	CNBr Peptide 3 (SEQ ID NO:50)

Обговорення

П'ять фракцій були ізолювані від суміші CNBr-розщеплених mIL22RA пептидів. З них, тільки фракція #4 була активна в ELISA і позитивна в Західному аналізі. Деградація Edman ідентифікувала три N-терміналі, сумісні з пептидами CNBr 2 (SEQ ID NO:49), 3 (SEQ ID NO:50), і 5 (SEQ ID NO:52) у фракції #4. У межах цих областей, шість залишків потенційно залучені у лігандне приєднання. Ці залишки - Y93, R112, K210, і E211 SEQ ID NO:42, які також відповідають залишкам Y78, R97, K195, і E196 SEQ ID NO:62. Залишки Y60 і F164 SEQ ID NO:42 також залучені у зв'язування ліганд не приєднання.

В. Антигенні детермінанти на людському IL-22RA, на яких з'єднуються нейтралізуючі моноклональні антитіла.

Експерименти, описані нижче, націлені на ідентифікацію області або областей у позаклітинному домені для послідовності амінокислоти людського білка IL-22RA (SEQ ID NO:2), які є важливими для активності рецептора, або для антагоніста або зв'язуючого нейтралізуючого антитіла. Людський розчинний рецептор білка IL-22RA (наприклад, включаючи SEQ ID NO:3, типу IL-22RA-Fc, розщеплений тромбіном для видалення Fc) тоді розщеплений C-термінально до метіонінових залишків в послідовності інкубацією із цианогеном бромідом (CNBr), або іншим агентом, відомий в умінні розщеплювати людський білок

на певні фрагменти. CNBr-генеровані пептиди фракціонуються, і фракції, що виходять, перевіряються на приєднувальну активність, як відкрито ELISA, і на реактивність Західним аналізом, з використанням моноклональних антитіл з нейтралізуючими властивостями.

Чотири цистеїна спрогнозовані, щоб бути дисульфідноприєднаними зі сполучною моделлю Cys71-Cys79 і Cys204-Cys217 SEQ ID NO:2. Що стосується розщеплення CNBr, наступні пептиди потенційно генеровані від нескороченого, на всю довжину людського IL-22RA: пептид 6 (SEQ ID NO:56), пептид 7 (SEQ ID NO:57); пептид 8 (SEQ ID NO:58); пептид 9 (SEQ ID NO:59); пептид 10 (SEQ ID NO:60); і пептид 11 (SEQ ID NO:61) (Таблиця 35). Цистеїни є дисульфідносприєднаними, що призводить до можливого зв'язку між пептидами 7 (SEQ ID NO:57) і 10 (SEQ ID NO:60). Специфічно, SEQ ID NO:56 відповідає залишкам амінокислоти 1 (Pro) 92 (Met) SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:57 відповідає залишкам амінокислоти 93 (Thr) 120 (Met) SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:58 відповідає залишкам амінокислоти 121 (Ile) 160 (Met) SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:59 відповідає залишкам амінокислоти 161 (His) 185 (Met) SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:60 відповідає залишкам амінокислоти 186 (Ile) 199 (Met) SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:61 відповідає залишкам амінокислоти 200 (Cys) 211 (Thr) SEQ ID NO:3.

Таблиця 35

Пептидний номер	Від	До	Послідовності
CNBr Peptide 6	1	92	Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Thr Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Thr Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu Tnr Val Glu Tnr Gly Asn Leu Tnr Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser Ala Thr Lys Met (SEQ ID NO:56)
CNBr Peptide 7	93	120	Thr Asp Arg Phe Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Leu Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Ser Lys Val Arg Ser Ile Gln Met (SEQ ID NO:57)
CNBr Peptide 8	121	160	Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu Phe Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met (SEQ ID NO:58)
CNBr Peptide 9	161	185	His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met (SEQ ID NO:59)
CNBr Peptide 10	186	199	Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Met (SEQ ID NO:60)
CNBr Peptide 11	200	211	Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr (SEQ ID NO:61)

4. CNBr розкол і ізоляція пептидних фракцій, Західний і ELISA, і N-термінальні послідовності

Приблизно 50 μ г людського BL22RA ліофілізовано й відтворено, фракціоновано, зібране й аналізовано з використанням Західного аналізу й ELISA, як описано в Прикладі 42 А, для ідентифікації фракцій, що містять anti-IL-22RA моноклональні антитіла, і ті, які зв'язують IL-22RA, як показано ELISA і Західним аналізом. CNBr пептидні фракції, які зібрані від аналітичного протифазного стовпчика, потім перевірені на активність в ELISA і підтверджені як позитивні Western blotting. Для позитивних фракцій пептиди ідентифіковані через деградацію Edman, з використанням добре відомих методів.

Обговорення

Мишачий CNBr пептид #5 (SEQ ID NO:52) відповідає людським CNBr пептидам #9, і #10 (SEQ NO:59 і SED NO:60); мишачий CNBr пептид #2 (SEQ ID NO:49) відповідає людському CNBr #6 (SEQ NO:56); і мишачий CNBr пептид #3 (SEQ ID NO:50) відповідає людському CNBr #7 (SEQ ID NO:57). Із фракцій, які ізолювані від суміші CNBr-

розколотих людських IL-22RA пептидів, шість залишків у межах можливих областей потенційно залучені у зв'язування ліганда: Залишки SEQ ID NO:2 (і відповідні залишки SEQ ID NO:3), які важливі для лігандного рецептора зв'язування, включають Tyr-60, і Phe-164, Tyr-93, Arg -112, Lys-210, і Glu-211 SEQ ID NO:2 і (і відповідні залишки SEQ ID NO:3). Крім того, первинні залишки SEQ ID NO:2 (і відповідні залишки SEQ ID NO:3), які важливі для напрямку лігандного рецептора зв'язування, включають Tyr-60, і Phe-164 SEQ ID NO:2 (і відповідні залишки SEQ ID NO:3), і вторинні залишки включають залишки Tyr-93, Arg -112, Lys-210, і Glu-211 SEQ ID NO:2 і (і відповідні залишки SEQ ID NO:3).

Зі згаданого вище, буде оцінено, що, хоча певні втілення винаходу були описані тут з метою ілюстрації, різні модифікації можуть бути зроблені, не відхиляючись від духу й обсягу винаходу. Відповідно, винахід нічим не обмежено, крім формули винаходу.

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc. et al.

<120> ANTI-IL-22RA ANTIBODIES AND BINDING
PARTNERS AND METHODS OF USING IN INFLAMMATION

<130> 04-14PC

<150>

<151>

<150>

<151>

<160> 62

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2831

<212> DNA ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (34)...(1755)

<400> 1

```

tagaggccaa gggagggctc tgtgccagcc ccg atg agg acg ctg ctg acc atc 54
                               Met Arg Thr Leu Leu Thr Ile
                               1                               5

ttg act gtg gga tcc ctg gct gct cac gcc cct gag gac ccc tgg gat 102
Leu Thr Val Gly Ser Leu Ala Ala His Ala Pro Glu Asp Pro Ser Asp
          10                      15                      20

ctg ctc cag cac gtg aaa ttc cag tcc agc aac ttt gaa aac atc ctg 150
Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu
          25                      30                      35

acg tgg gac agc ggg cca gag ggc acc cca gac acg gtc tac agc atc 198
Thr Trp Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile
          40                      45                      50                      55

gag tat aag acg tac gga gag agg gac tgg gtg gca aag aag ggc tgt 246
Glu Tyr Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys
          60                      65                      70

cag cgg atc acc cgg aag tcc tgc aac ctg acg gtg gag acg ggc aac 294
Gln Arg Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn
          75                      80                      85

ctc acg gag ctc tac tat gcc agg gtc acc gct gtc agt gcg gga ggc 342
Leu Thr Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly
          90                      95                      100

cgg tca gcc acc aag atg act gac agg ttc agc tct ctg cag cac act 390
Arg Ser Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe Ser Ser Leu Gln His Thr
          105                      110                      115

```

189	96122	190
acc ctc aag cca cct gat gtg acc tgt atc tcc aaa gtg aga tcg att 438 Thr Leu Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Ser Lys Val Arg Ser Ile 135 120 125 130		
cag atg att gtt cat cct acc ccc acg cca atc cgt gca ggc gat ggc 486 Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly 150 140 145		
cac cgg cta acc ctg gaa gac atc ttc cat gac ctg ttc tac cac tta 534 His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu Phe Tyr His Leu 165 155 160		
gag ctc cag gtc aac cgc acc tac caa atg cac ctt gga ggg aag cag 582 Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly Gly Lys Gln 180 170 175		
aga gaa tat gag ttc ttc ggc ctg acc cct gac aca gag ttc ctt ggc 630 Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly 195 185 190		
acc atc atg att tgc gtt ccc acc tgg gcc aag gag agt gcc ccc tac 678 Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr 215 200 205 210		
atg tgc cga gtg aag aca ctg cca gac cgg aca tgg acc tac tcc ttc 726 Met Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr Tyr Ser Phe 230 220 225		
tcc gga gcc ttc ctg ttc tcc atg ggc ttc ctc gtc gca gta ctc tgc 774 Ser Gly Ala Phe Leu Phe Ser Met Gly Phe Leu Val Ala Val Leu Cys 245 235 240		
tac ctg agc tac aga tat gtc acc aag ccg cct gca cct ccc aac tcc 822 Tyr Leu Ser Tyr Arg Tyr Val Thr Lys Pro Pro Ala Pro Pro Asn Ser 260 250 255		
ctg aac gtc cag cga gtc ctg act ttc cag ccg ctg cgc ttc atc cag 870 Leu Asn Val Gln Arg Val Leu Thr Phe Gln Pro Leu Arg Phe Ile Gln 275 265 270		
gag cac gtc ctg atc cct gtc ttt gac ctc agc ggc ccc agc agt ctg 918 Glu His Val Leu Ile Pro Val Phe Asp Leu Ser Gly Pro Ser Ser Leu 295 280 285 290		
gcc cag cct gtc cag tac tcc cag atc agg gtg tct gga ccc agg gag 966 Ala Gln Pro Val Gln Tyr Ser Gln Ile Arg Val Ser Gly Pro Arg Glu 310 300 305		
ccc gca gga gct cca cag cgg cat agc ctg tcc gag atc acc tac tta 1014 Pro Ala Gly Ala Pro Gln Arg His Ser Leu Ser Glu Ile Thr Tyr Leu 325 315 320		
ggg cag cca gac atc tcc atc ctc cag ccc tcc aac gtg cca cct ccc 1062 Gly Gln Pro Asp Ile Ser Ile Leu Gln Pro Ser Asn Val Pro Pro Pro 340 330 335		
cag atc ctc tcc cca ctg tcc tat gcc cca aac gct gcc cct gag gtc 1110 Gln Ile Leu Ser Pro Leu Ser Tyr Ala Pro Asn Ala Ala Pro Glu Val 355 345 350		
ggg ccc cca tcc tat gca cct cag gtg acc ccc gaa gct caa ttc cca 1158 Gly Pro Pro Ser Tyr Ala Pro Gln Val Thr Pro Glu Ala Gln Phe Pro 375 360 365 370		
ttc tac gcc cca cag gcc atc tct aag gtc cag cct tcc tcc tat gcc 1206 Phe Tyr Ala Pro Gln Ala Ile Ser Lys Val Gln Pro Ser Ser Tyr Ala		

191	96122	192
	380	385
cct caa gcc act ccg gac agc tgg cct ccc tcc tat ggg gta tgc atg 1254	Pro Gln Ala Thr 395	Pro Pro Ser Tyr Gly Val Cys Met 405
	385	390
gaa ggt tct ggc aaa gac tcc ccc act ggg aca ctt tct agt cct aaa 1302	Glu Gly Ser Gly Lys Asp Ser Pro Thr Gly Thr Leu Ser Ser Pro Lys 410	
cac ctt agg cct aaa ggt cag ctt cag aaa gag cca cca gct gga agc 1350	His Leu Arg Pro Lys Gly Gln Leu Gln Lys Glu Pro Pro Ala Gly Ser 425	
tgc atg tta ggt ggc ctt tct ctg cag gag gtg acc tcc ttg gct atg 1398	Cys Met Leu Gly Gly Leu Ser Leu Gln Glu Val Thr Ser Leu Ala Met 440	
gag gaa tcc caa gaa gca aaa tca ttg cac cag ccc ctg ggg att tgc 1446	Glu Glu Ser Gln Gln Ala Lys Ser Leu His Gln Pro Leu Gly Ile Cys 460	
aca gac aga aca tct gac cca aat gtg cta cac agt ggg gag gaa ggg 1494	Thr Asp Arg Thr Ser Asp Pro Asn Val Leu His Ser Gly Glu Glu Gly 475	
aca cca cag tac cta aag ggc cag ctc ccc ctc ctc tcc tca gtc cag 1542	Thr Pro Gln Tyr Leu Lys Gly Gln Leu Pro Leu Leu Ser Ser Val Gln 490	
atc gag ggc cac ccc atg tcc ctc cct ttg caa cct cct tcc ggt cca 1590	Ile Glu Gly His Pro Met Ser Leu Pro Leu Gln Pro Pro Ser Gly Pro 505	
tgt tcc ccc tcg gac caa ggt cca agt ccc tgg ggc ctg ctg gag tcc 1638	Cys Ser Pro Ser Asp Gln Gly Pro Ser Pro Trp Gly Leu Leu Glu Ser 520	
ctt gtg tgt ccc aag gat gaa gcc aag agc cca gcc cct gag acc tca 1686	Leu Val Cys Pro Lys Asp Glu Ala Lys Ser Pro Ala Pro Glu Thr Ser 540	
gac ctg gag cag ccc aca gaa ctg gat tct ctt ttc aga ggc ctg gcc 1734	Asp Leu Glu Gln Pro Thr Glu Leu Asp Ser Leu Phe Arg Gly Leu Ala 555	
ctg act gtg cag tgg gag tcc tgaggggaat gggaaaggct tgggtgcttcc 1785	Leu Thr Val Gln Trp Glu Ser 570	
tcctctgtccc taccagtggt cacatccttg gctgtcaatc ccatgcctgc ccatgccaca 1845		
cactctgtcga tctggcctca gacgggtgcc cttgagagaa gcagagggag tggcatgcag 1905		
ggccccctgcc atgggtgcgc tcctcaccgg aacaaagcag catgataagg actgcagcgg 1965		
gggagctctg gggagcagct tgtgtagaca agcgcgtgct cgctgagccc tgcaaggcag 2025		
aaatgacagt gcaaggagga aatgcaggga aactcccag gtccagagcc ccacctccta 2085		
acaccatgga ttcaaagtgc tcagggaatt tgccctctcct tgccccattc ctggccagtt 2145		
tcacaatcta gctcgacaga gcatgaggcc cctgcctctt ctgtcattgt tcaaagggtgg 2205		
gaagagagcc tggaaaagaa ccaggcctgg aaaagaacca gaaggaggct gggcagaacc 2265		
agaacaacct gcacttctgc caaggccagg gccagcagga cggcaggact ctaggaggagg 2325		
gtgtggcctg cagctcattc ccagccaggg caactgcctg acgttgacag atttcagctt 2385		
cattctcttg atagaacaaa gcgaaatgca ggtccaccag ggagggagac acacaagcct 2445		
tttctgcagg caggagtctt agaccctatc ctgagaatgg ggtttgaaag gaaggtgagg 2505		
gctgtggccc ctggacgggt acaataacac actgtactga tgtcacaact ttgcaagctc 2565		
tgcttgggt tcagcccatc tgggctcaaa ttccagcctc accactcaca agctgtgtga 2625		
cttcaaacaa atgaaatcag tgcccagaac ctcggtttcc tcatctgtaa tgtggggatc 2685		
ataaaccta cctcatggag ttgtgtgtgaa gatgaaatga agtcatgtct ttaaagtgtc 2745		

taatagtgcc tggtagatgg gcagtgccca ataaacggta gctattttaa aaaaaaaaaa 2805
 aaaaaaaaaa atagcgccg cctcga 2831

<210> 2

<211> 574

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Arg	Thr	Leu	Leu	Thr	Ile	Leu	Thr	Val	Gly	Ser	Leu	Ala	Ala	His
1				5					10					15	
Ala	Pro	Glu	Asp	Pro	Ser	Asp	Leu	Leu	Gln	His	Val	Lys	Phe	Gln	Ser
		20					25					30			
Ser	Asn	Phe	Glu	Asn	Ile	Leu	Thr	Trp	Asp	Ser	Gly	Pro	Glu	Gly	Thr
	35					40					45				
Pro	Asp	Thr	Val	Tyr	Ser	Ile	Glu	Tyr	Lys	Thr	Tyr	Gly	Glu	Arg	Asp
	50					55					60				
Trp	Val	Ala	Lys	Lys	Gly	Cys	Gln	Arg	Ile	Thr	Arg	Lys	Ser	Cys	Asn
65					70				75					80	
Leu	Thr	Val	Glu	Thr	Gly	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Val
			85						90				95		
Thr	Ala	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Arg	Ser	Ala	Thr	Lys	Met	Thr	Asp	Arg
		100					105						110		
Phe	Ser	Ser	Leu	Gln	His	Thr	Thr	Leu	Lys	Pro	Pro	Asp	Val	Thr	Cys
	115					120						125			
Ile	Ser	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Gln	Met	Ile	Val	His	Pro	Thr	Pro	Thr
	130					135					140				
Pro	Ile	Arg	Ala	Gly	Asp	Gly	His	Arg	Leu	Thr	Leu	Glu	Asp	Ile	Phe
145					150				155					160	
His	Asp	Leu	Phe	Tyr	His	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Asn	Arg	Thr	Tyr	Gln
			165						170					175	
Met	His	Leu	Gly	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Tyr	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Thr
		180						185					190		
Pro	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Gly	Thr	Ile	Met	Ile	Cys	Val	Pro	Thr	Trp
	195						200					205			
Ala	Lys	Glu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Met	Cys	Arg	Val	Lys	Thr	Leu	Pro	Asp
	210					215					220				
Arg	Thr	Trp	Thr	Tyr	Ser	Phe	Ser	Gly	Ala	Phe	Leu	Phe	Ser	Met	Gly
225					230					235				240	
Phe	Leu	Val	Ala	Val	Leu	Cys	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Val	Thr	Lys
			245						250				255		
Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Asn	Ser	Leu	Asn	Val	Gln	Arg	Val	Leu	Thr	Phe
			260				265						270		
Gln	Pro	Leu	Arg	Phe	Ile	Gln	Glu	His	Val	Leu	Ile	Pro	Val	Phe	Asp
		275					280					285			
Leu	Ser	Gly	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Gln	Pro	Val	Gln	Tyr	Ser	Gln	Ile
	290					295					300				
Arg	Val	Ser	Gly	Pro	Arg	Glu	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Gln	Arg	His	Ser
305					310					315				320	
Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Tyr	Leu	Gly	Gln	Pro	Asp	Ile	Ser	Ile	Leu	Gln
			325						330				335		
Pro	Ser	Asn	Val	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Tyr	Ala
			340				345					350			
Pro	Asn	Ala	Ala	Pro	Glu	Val	Gly	Pro	Pro	Ser	Tyr	Ala	Pro	Gln	Val
	355						360					365			
Thr	Pro	Glu	Ala	Gln	Phe	Pro	Phe	Tyr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ile	Ser	Lys
	370					375					380				
Val	Gln	Pro	Ser	Ser	Tyr	Ala	Pro	Gln	Ala	Thr	Pro	Asp	Ser	Trp	Pro
385					390					395				400	
Pro	Ser	Tyr	Gly	Val	Cys	Met	Glu	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Ser	Pro	Thr
			405						410				415		
Gly	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Lys	His	Leu	Arg	Pro	Lys	Gly	Gln	Leu	Gln
		420						425					430		
Lys	Glu	Pro	Pro	Ala	Gly	Ser	Cys	Met	Leu	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln
	435						440					445			
Glu	Val	Thr	Ser	Leu	Ala	Met	Glu	Glu	Ser	Gln	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu

```

      450              455              460
His Gln Pro Leu Gly Ile Cys Thr Asp Arg Thr Ser Asp Pro Asn Val
465      470      475      480
Leu His Ser Gly Glu Glu Gly Thr Pro Gln Tyr Leu Lys Gly Gln Leu
      485      490      495
Pro Leu Leu Ser Ser Val Gln Ile Glu Gly His Pro Met Ser Leu Pro
      500      505      510
Leu Gln Pro Pro Ser Gly Pro Cys Ser Pro Ser Asp Gln Gly Pro Ser
      515      520      525
Pro Trp Gly Leu Leu Glu Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Glu Ala Lys
      530      535      540
Ser Pro Ala Pro Glu Thr Ser Asp Leu Glu Gln Pro Thr Glu Leu Asp
545      550      555      560
Ser Leu Phe Arg Gly Leu Ala Leu Thr Val Gln Trp Glu Ser
      565      570

```

<210> 3
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 3
Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser Ser
 1      5      10      15
Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro
      20      25      30
Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp
      35      40      45
Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu
      50      55      60
Thr Val Glu Thr Gly Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr
65      70      75      80
Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe
      85      90      95
Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Leu Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile
      100      105      110
Ser Lys Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro
      115      120      125
Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His
      130      135      140
Asp Leu Phe Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met
145      150      155      160
His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro
      165      170      175
Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala
      180      185      190
Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Met Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp Arg
      195      200      205
Thr Trp Thr
210

```

<210> 4
 <211> 541
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>
 <223> A Soluble IL-22RA-Fc Fusion Polypeptide Розчинний злитий поліпептид IL-22-RA-Fc

```

<400> 4
Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser Ser
 1      5      10      15
Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro
      20      25      30

```

Asp	Thr	Val	Tyr	Ser	Ile	Glu	Tyr	Lys	Thr	Tyr	Gly	Glu	Arg	Asp	Trp
		35					40					45			
Val	Ala	Lys	Lys	Gly	Cys	Gln	Arg	Ile	Thr	Arg	Lys	Ser	Cys	Asn	Leu
	50				55						60				
Thr	Val	Glu	Thr	Gly	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Val	Thr
65					70					75				80	
Ala	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Arg	Ser	Ala	Thr	Lys	Met	Thr	Asp	Arg	Phe
				85					90					95	
Ser	Ser	Leu	Gln	His	Thr	Thr	Leu	Lys	Pro	Pro	Asp	Val	Thr	Cys	Ile
		100						105					110		
Ser	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Gln	Met	Ile	Val	His	Pro	Thr	Pro	Thr	Pro
		115					120						125		
Ile	Arg	Ala	Gly	Asp	Gly	His	Arg	Leu	Thr	Leu	Glu	Asp	Ile	Phe	His
	130					135					140				
Asp	Leu	Phe	Tyr	His	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Asn	Arg	Thr	Tyr	Gln	Met
145					150					155					160
His	Leu	Gly	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Tyr	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Thr	Pro
				165					170					175	
Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Gly	Thr	Ile	Met	Ile	Cys	Val	Pro	Thr	Trp	Ala
		180						185					190		
Lys	Glu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Met	Cys	Arg	Val	Lys	Thr	Leu	Pro	Asp	Arg
		195					200					205			
Thr	Trp	Thr	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro
	210					215					220				
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val
225					230					235					240
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
			245						250					255	
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly
		260						265					270		
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly
		275					280					285			
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys
	290					295					300				
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys
305					310					315					320
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
				325					330					335	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
			340					345					350		
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys
		355					360					365			
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
	370					375					380				
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
385					390					395					400
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
				405					410					415	
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
			420					425					430		
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
		435					440					445			
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
	450					455					460				
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
465					470					475					480
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
				485					490					495	
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
		500						505					510		
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
		515					520					525			
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
	530					535					540				

199

96122

200

<210> 5
<211> 1116
<212> DNA ДНК
<213> Homo sapiens

```
<220>
<221> CDS
<222> (21) ... (557)
```

<400> 5	tcgaggttaga	attgtctgca	atg gcc gcc ctg cag aaa tct gtg agc tct ttc	53
	Met	Ala	Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe	
	1		5 10	
ctt atg ggg acc ctg gcc acc agc tgc ctc ctt ctc ttg gcc ctc ttg	101			
Leu Met Gly Thr 15				
	20		25	
gta cag gga gga gca gct gcg ccc atc agc tcc cac tgc agg ctt gac	149			
Val Gln Gly Gly Ala Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp				
	30		35	
	40			
aag tcc aac ttc cag cag ccc tat atc acc aac cgc acc ttc atg ctg	197			
Lys Ser Asn Phe Gln Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu				
	45		50	
	55			
gct aag gag gct agc ttg gct gat aac aac aca gac gtt cgt ctc att	245			
Ala Lys Glu Ala Ser Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile				
	60		65	
	70			
ggg gag aaa ctg ttc cac gga gtc agt atg agt gag cgc tgc tat ctg	293			
Gly Glu Lys Leu Phe His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu				
	80		85	
	90			
atg aag cag gtg ctg aac ttc acc ctt gaa gaa gtg ctg ttc cct caa	341			
Met Lys Gln Val Leu Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln				
	95		100	
	105			
tct gat agg ttc cag cct tat atg cag gag gtg gtg ccc ttc ctg gcc	389			
Ser Asp Arg Phe Gln Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala				
	110		115	
	120			
agg ctc agc aac agg cta agc aca tgt cat att gaa ggt gat gac ctg	437			
Arg Leu Ser Asn Arg Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu				
	125		130	
	135			
cat atc cag agg aat gtg caa aag ctg aag gac aca gtg aaa aag ctt	485			
His Ile Gln Arg Asn Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu				
	140		145	
	150			
	155			
gga gag agt gga gag atc aaa gca att gga gaa ctg gat ttg ctg ttt	533			
Gly Glu Ser Gly Glu Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe				
	160		165	
	170			
atg tct ctg aga aat gcc tgc att tgaccagagc aaagctgaaa aatgaataac	587			
Met Ser Leu Arg Asn Ala Cys Ile				
	175			
taacccccctt tccctgctag aaataacaat tagatgcccc aaagcgattt tttttaacca	647			
aaaggaagat gggaagccaa actccatcat gatgggtgga ttccaaatga acccctgcgt	707			
tagttacaaa ggaaaccaat gccacttttg ttataagac cagaaggtag actttctaag	767			
catagatatt tattgataac atttcattgt aactggtgtt ctatacacag aaaacaattt	827			
atttttataa taattgtctt ttcccataaa aaagattact ttccattcct ttaggggaaa	887			
aaaccocctaa atagcttcat gtttccataa tcagtacttt atattttataa atgtatttat	947			
tattattataa agactgcatt ttattttatat catttttatta atattgattt attttatagaa	1007			
acatcattcg atatttgctac ttgagtgtaa ggctaataatt gatatttatg acaataatta	1067			

201

96122

202

tagagctata acatgtttat ttgacctcaa taaacacttg gatataccta

1116

<210> 6

<211> 179

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

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

```

<210> 7

<211> 926

<212> DNA

ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (45)...(575)

<221> variation

варіація

<222> (188)...(188)

<223> Nucleotide may be C or G at position 188

Нуклеотид може бути С або G в позиції

<400> 7

```

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

```

56

```

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

```

104

```

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

```

152

```

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

```

200

```

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

```

248

203	96122	204
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 cct 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 tag gaggaagtg		585
Leu Asp Ile Leu Leu Gln Trp Met Glu Glu Thr Glu *		
165 170 175		
atgctgctgc taagaatatt cgagggtcaag agctccagtc ttcaatacct gcagaggagg		645
catgacccca aaccaccatc tctttactgt actagtcttg tgctgggtcac agtgtatctt		705
atztatgcat tacttgcttc cttgcatgat tgtctttatg catccccaat cttaattgag		765
accatacttg tataagattt ttgtaatatc tttctgctat tggatatatt tattagttaa		825
tatatatttatt tattttttgc tattaatgta tttaattttt tacttggggca tgaaacttta		885
aaaaaaaaac acaagattat atttataacc tgactagagc a		926
<210> 8		
<211> 176		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<221> VARIANT ВАРИАНТ		
<222> (48)...(48)		
<223> Amino acid at position 48 can be a D (Asp) or E (Glu)		
	Амінокислота в позиції 48 може бути D (Asp) або E(Glu)	
<221> VARIANT ВАРИАНТ		
<222> 48		
<223> Xaa = Any Amino Acid Будь-яка амінокислота		
<400> 8		
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 Xaa		
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		

205

96122

206

```

      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> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

Штучна послідовність

<220>

<223> Peptide Linker

Пептидний лінкер

<400> 9

```

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1             5             10             15

```

<210> 10

<211> 1050

<212> DNA

ДНК

<213> Mus musculus

Миша домовая

<220>

<221> CDS

<222> (5)...(589)

<400> 10

```

aaca ggc tct cct ctc act tat caa ctt ttg aca ctt gtg cga tcg gtg      49
  Gly Ser Pro Leu Thr Tyr Gln Leu Leu Thr Leu Val Arg Ser Val
   1             5             10             15

```

```

atg gct gtc ctg cag aaa tct atg agt ttt tcc ctt atg ggg act ttg      97
Met Ala Val Leu Gln Lys Ser Met Ser Phe Ser Leu Met Gly Thr Leu
      20             25             30

```

```

gcc gcc agc tgc ctg ctt ctc att gcc ctg tgg gcc cag gag gca aat      145
Ala Ala Ser Cys Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Ala Gln Glu Ala Asn
      35             40             45

```

```

gcg ctg ccc atc aac acc cgg tgc aag ctt gag gtg tcc aac ttc cag      193
Ala Leu Pro Ile Asn Thr Arg Cys Lys Leu Glu Val Ser Asn Phe Gln
      50             55             60

```

```

cag ccg tac atc gtc aac cgc acc ttt atg ctg gcc aag gag gcc agc      241
Gln Pro Tyr Ile Val Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser
      65             70             75

```

```

ctt gca gat aac aac aca gac gtc cgg ctc atc ggg gag aaa ctg ttc      289
Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe
      80             85             90             95

```

```

cga gga gtc agt gct aag gat cag tgc tac ctg atg aag cag gtg ctc      337
Arg Gly Val Ser Ala Lys Asp Gln Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu
      100             105             110

```

```

aac ttc acc ctg gaa gac att ctg ctc ccc cag tca gac agg ttc cgg      385
Asn Phe Thr Leu Glu Asp Ile Leu Leu Pro Gln Ser Asp Arg Phe Arg
      115             120             125

```

207

96122

208

```

ccc tac atg cag gag gtg gtg cct ttc ctg acc aaa ctc agc aat cag 433
Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Thr Lys Leu Ser Asn Gln
      130      135      140
.

ctc agc tcc tgt cac atc agt ggt gac gac cag aac atc cag aag aat 481
Leu Ser Ser Cys His Ile Ser Gly Asp Asp Gln Asn Ile Gln Lys Asn
      145      150      155

gtc aga agg ctg aag gag aca gtg aaa aag ctt gga gag agc gga gag 529
Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu
      160      165      170      175

atc aaa gcg atc ggg gaa ctg gac ctg ctg ttt atg tct ctg aga aat 577
Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn
      180      185      190

gct tgc gtc tga gcgagaagaa gctagaaaac gaagaactgc tccttcctgc 629
Ala Cys Val *

cttctaaaaa gaacaataag atccctgaat ggactttttt actaaaggaa agtgagaagc 689
taacgtccac catcattaga agatttcaca tgaaacctgg ctcagttgaa agagaaaata 749
gtgtcaagtt gtccatgaga ccagaggtag acttgataac cacaaagatt cattgacaat 809
attttattgt cattgataat gcaacagaaa aagtatgtac tttaaaaaat tgtttgaaag 869
gaggttacct ctattcctc tagaagaaaa gcctatgtaa cttcatttcc ataaccaata 929
ctttatatat gtaagtttat ttattataag tatacathtt atttatgtca gtttattaat 989
atggatttat ttatagaaaa attatctgat gttgatattt gagtataaag caaataatat 1049
t 1050

```

<210> 11

<211> 194

<212> PRT

<213> Mus musculus Миша домовая

<400> 11

```

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

```

<210> 12

<211> 2149

<212> DNA

ДНК

209

96122

210

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(693)

<400> 12

atg atg cct aaa cat tgc ttt cta ggc ttc ctc atc agt ttc ttc ctt	48
Met Met Pro Lys His Cys Phe Leu Gly Phe Leu Ile Ser Phe Phe Leu	
1 5 10 15	
act ggt gta gca gga act cag tca acg cat gag tct ctg aag cct cag	96
Thr Gly Val Ala Gly Thr Gln Ser Thr His Glu Ser Leu Lys Pro Gln	
20 25 30	
agg gta caa ttt cag tcc cga aat ttt cac aac att ttg caa tgg cag	144
Arg Val Gln Phe Gln Ser Arg Asn Phe His Asn Ile Leu Gln Trp Gln	
35 40 45	
cct ggg agg gca ctt act ggc aac agc agt gtc tat ttt gtg cag tac	192
Pro Gly Arg Ala Leu Thr Gly Asn Ser Ser Val Tyr Phe Val Gln Tyr	
50 55 60	
aaa ata tat gga cag aga caa tgg aaa aat aaa gaa gac tgt tgg ggt	240
Lys Ile Tyr Gly Gln Arg Gln Trp Lys Asn Lys Glu Asp Cys Trp Gly	
65 70 75 80	
act caa gaa ctc tct tgt gac ctt acc agt gaa acc tca gac ata cag	288
Thr Gln Glu Leu Ser Cys Asp Leu Thr Ser Glu Thr Ser Asp Ile Gln	
85 90 95	
gaa cct tat tac ggg agg gtg agg gcg gcc tcg gct ggg agc tac tca	336
Glu Pro Tyr Tyr Gly Arg Val Arg Ala Ala Ser Ala Gly Ser Tyr Ser	
100 105 110	
gaa tgg agc atg acg ccg cgg ttc act ccc tgg tgg gaa aca aaa ata	384
Glu Trp Ser Met Thr Pro Arg Phe Thr Pro Trp Trp Glu Thr Lys Ile	
115 120 125	
gat cct cca gtc atg aat ata acc caa gtc aat ggc tct ttg ttg gta	432
Asp Pro Pro Val Met Asn Ile Thr Gln Val Asn Gly Ser Leu Leu Val	
130 135 140	
att ctc cat gct cca aat tta cca tat aga tac caa aag gaa aaa aat	480
Ile Leu His Ala Pro Asn Leu Pro Tyr Arg Tyr Gln Lys Glu Lys Asn	
145 150 155 160	
gta tct ata gaa gat tac tat gaa cta cta tac cga gtt ttt ata att	528
Val Ser Ile Glu Asp Tyr Tyr Glu Leu Leu Tyr Arg Val Phe Ile Ile	
165 170 175	
aac aat tca cta gaa aag gag caa aag gtt tat gaa ggg gct cac aga	576
Asn Asn Ser Leu Glu Lys Glu Gln Lys Val Tyr Glu Gly Ala His Arg	
180 185 190	
gcg gtt gaa att gaa gct cta aca cca cac tcc agc tac tgt gta gtg	624
Ala Val Glu Ile Glu Ala Leu Thr Pro His Ser Ser Tyr Cys Val Val	
195 200 205	
gct gaa ata tat cag ccc atg tta gac aga aga agt cag aga agt gaa	672
Ala Glu Ile Tyr Gln Pro Met Leu Asp Arg Arg Ser Gln Arg Ser Glu	
210 215 220	
gag aga tgt gtg gaa att cca tgacttggtg aatttggcat tcagcaatgt	723
Glu Arg Cys Val Glu Ile Pro	
225 230	

```

ggaaattcta aagctccctg agaacaggat gactcgtgtt tgaaggatct tattttaaatt 783
tgtttttcta ttttctttaa gcaatattca ctgttacacc ttggggactt ctttgtttat 843
ccattctttt atcctttata tttcatttta aactatattt gaacgacatt ccccccgaat 903
aattgaaatg taaagatgag gcagagaata aagtgttcta tgaaattcag aactttatatt 963
ctgaatgtaa catccctaata aacaaccttc attcttctaa tacagcaaaa taaaaattta 1023
acaaccaagg aatagtattt aagaaaaatgt tgaataaatt tttttaaaat agcattacag 1083
actgaggcgg tcctgaagca atgggtttttc actctcttat tgagccaatt aaattgacat 1143
tgctttgaca attttaaact tctataaagg tgaatatatt tcatacattt ctattttata 1203
tgaatatact ttttatatat ttattattat taaatatatt tacttaatga atcaaaaattt 1263
tggttttaaag tctactttat gtaaataaga acagggttttg gggaaaaaaa tcttatgatt 1323
tctggattga tatctgaatt aaaactatca acaacaagga agtctactct gtacaattgt 1383
ccctcattta aaagatatat taagcttttc ttttctgttt gtttttgttt tgtttagttt 1443
ttaatcctgt cttagaagaa cttatcttta ttctcaaaat taaatgtaat ttttttagtg 1503
acaagaaga aaggaaacct cattactcaa tccttctggc caagagtgtc ttgcttgttg 1563
cgcttctctc atctctatat aggaggatcc catgaatgat ggtttatttg gaactgctgg 1623
ggtcgacccc atacagagaa ctgagcttga agctggaagc acacagtggg tagcaggaga 1683
aggacgggtg ttggtagggt cctacagaga ctatagagct agacaaagcc ctccaaactg 1743
gcccctcctc ctactgcct ctctgagta gaaatctggt gacctaaggc tcagtgcggt 1803
caacagaaag ctgccttctt cacttgaggc taagtcttca tatatgttta aggttgtctt 1863
tctagtgagg agatacatat cagagaacat ttgtacaatt ccccatgaaa attgctccaa 1923
agttgataac aatatagtcg gtgcttctag ttatatgcaa gtactcagtg ataaatggat 1983
taaaaaatat tcagaaatgt attggggggt ggaggagaat aagaggcaga gcaagagcta 2043
gagaattggt ttcttgcct ccttgatgc tcagaaaaca ttgatttgag catagacgca 2103
gagactgaaa aaaaaaaaaat gctcgagcgg cgcctatctc cttggt 2149

```

<210> 13

<211> 231

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

```

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

```

<210> 14

<211> 699

ДНК

<212> DNA

<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>

<223> C-Terminal Fc4 tag C-кінцева Fc4-мітка

<400> 14

gagcccagat	cttcagacaa	aactcacaca	tgcccaccgt	gccccagcacc	tgaagccgag	60
ggggccaccgt	cagtcttct	cttcccccca	aaacccaagg	acaccctcat	gatctcccgg	120
acccctgagg	tcacatgcgt	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagtgc	180
aactgggtacg	tggaacggcg	ggaggtgcat	aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	240
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggctgaat	300
ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc	catcctccat	cgagaaaaacc	360
atctccaaag	ccaaagggca	gccccgagaa	ccacagggtg	acaccctgcc	cccatcccgg	420
gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc	480
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	540
cccggtgctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctctacagca	agctcaccgt	ggacaagagc	600
aggtggcagc	agggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac	660
tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaataa			699

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>

<223> Glu-Glu (CEE) Peptide Tag Пептидна мітка

<400> 15

Glu Tyr Met Pro Met Glu

1	5
---	---

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>

<223> Glu-Glu (CEE) Peptide Tag with spacer Пептидна мітка із спейсером

<400> 16

Gly Ser Gly Gly Glu Tyr Met Pro Met Glu

1	5	10
---	---	----

<210> 17

<211> 20 ДНК

<212> DNA

<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC39289 Олігонуклеотидний праймер

<400> 17

tccgaggagt caatgctaag

20

<210> 18

<211> 20 ДНК

<212> DNA

<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>

<223> Oligonucleotide Primer ZC39290 Олігонуклеотидний праймер

<400> 18

215	96122	216
tccaagcttt ttcactgtct		20
<210> 19		
<211> 16 ДНК		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність		
<220>		
<223> Oligonucleotide Primer ZC39776 Олігонуклеотидний праймер		
<400> 19		
gggcccgcta gcacct		16
<210> 20		
<211> 16 ДНК		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність		
<220>		
<223> Oligonucleotide Primer ZC39777 Олігонуклеотидний праймер		
<400> 20		
gggtgatccg ctggca		16
<210> 21		
<211> 36 ДНК		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність		
<220>		
<223> IL-20 FAM/TAMRA labeled TaqMan probe ZC38752 FAM/TAMPA мічений TaqMan зонд		
<400> 21		
ccagccactt tctctctccg tatttcttat attcca		36
<210> 22		
<211> 16 ДНК		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність		
<220>		
<223> forward primer, ZC42459 передній праймер		
<400> 22		
tggccaggct cagcaa		16
<210> 23		
<211> 21 ДНК		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність		
<220>		
<223> reverse primer, ZC42458 задній праймер		
<400> 23		
gcacattcct ctggatatgc a		21
<210> 24		
<211> 31 ДНК		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність		
<220>		
<223> IL-22 TaqMan probe, ZC42460 IL-22 TaqMan зонд		
<400> 24		

217	96122	218	
aggctaagca catgtcatat tgaagtgat g			31
<210> 25			
<211> 21			
<212> DNA ДНК			
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність			
<220>			
<223> forward primer, ZC40541 передній праймер			
<400> 25			
tcgccaattc ctttcttacc a			21
<210> 26			
<211> 20			
<212> DNA ДНК			
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність			
<220>			
<223> reverse primer, ZC40542 задній праймер			
<400> 26			
cccacaatgg catgtcatgt			20
<210> 27			
<211> 25			
<212> DNA ДНК			
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність			
<220>			
<223> IL-20 TaqMan® probe ZC40544 IL-20 TaqMan зонд			
<400> 27			
agaaggacct ccggctctgt catgc			25
<210> 28			
<211> 57			
<212> DNA ДНК			
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність			
<220>			
<223> Oligonucleotide primer ZC45,593 Олігонуклеотидний праймер			
<400> 28			
caggaaatcc atgccgagtt gagacgcttc cgtagacacg cccctgagga cccctcg			57
<210> 29			
<211> 63			
<212> DNA ДНК			
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність			
<220>			
<223> Oligonucleotide primer ZC45,592 Олігонуклеотидний праймер			
<400> 29			
tctgggctca ccgcttcag acccgcttcc agaccgctt cctgtccggt ctggcagtg			60
ctt			63
<210> 30			
<211> 63			
<212> DNA ДНК			
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність			
<220>			
<223> Oligonucleotide primer ZC45,591 Олігонуклеотидний праймер			

219

96122

220

<400> 30
 gaccggacag gaagcgggtc tggaagcggg tctggaagcg gtgagcccag agggccca 60
 atc 63

<210> 31
 <211> 57
 <212> DNA ДНК
 <213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC45,594 Олігонуклеотидний праймер

<400> 31
 agagctgttt taaggcgcgc ctctagatta tttttattta cccggagtcc gggagaa 57

<210> 32
 <211> 531
 <212> DNA ДНК
 <213> Mus musculus Миша домовая

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(531)

<400> 32
 atg aaa ggc ttt ggt ctt gcc ttt gga ctg ttc tcc gct gtg ggt ttt 48
 Met Lys Gly Phe Gly Leu Ala Phe Gly Leu Phe Ser Ala Val Gly Phe
 1 5 10 15
 .
 ctt ctc tgg act cct tta act ggg ctc aag acc ctc cat ttg gga agc 96
 Leu Leu Trp Thr Pro Leu Thr Gly Leu Lys Thr Leu His Leu Gly Ser
 20 25 30
 ,
 tgt gtg att act gca aac cta cag gca ata caa aag gaa ttt tct gag 144
 Cys Val Ile Thr Ala Asn Leu Gln Ala Ile Gln Lys Glu Phe Ser Glu
 35 40 45
 .
 att cgg gat agt gtg caa gct gaa gat aca aat att gac atc aga att 192
 Ile Arg Asp Ser Val Gln Ala Glu Asp Thr Asn Ile Asp Ile Arg Ile
 50 55 60
 .
 tta agg acg act gag tct ttg aaa gac ata aag tct ttg gat agg tgc 240
 Leu Arg Thr Thr Glu Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ser Leu Asp Arg Cys
 65 70 75 80
 .
 tgc ttc ctt cgt cat cta gtg aga ttc tat ctg gac agg gta ttc aaa 288
 Cys Phe Leu Arg His Leu Val Arg Phe Tyr Leu Asp Arg Val Phe Lys
 85 90 95
 .
 gtc tac cag acc cct gac cac cat acc ctg aga aag atc agc agc ctc 336
 Val Tyr Gln Thr Pro Asp His His Thr Leu Arg Lys Ile Ser Ser Leu
 100 105 110
 .
 gcc aac tcc ttt ctt atc atc aag aag gac ctc tca gtc tgt cat tct 384
 Ala Asn Ser Phe Leu Ile Ile Lys Lys Asp Leu Ser Val Cys His Ser
 115 120 125
 .
 cac atg gca tgt cat tgt ggg gaa gaa gca atg gag aaa tac aac caa 432
 His Met Ala Cys His Cys Gly Glu Glu Ala Met Glu Lys Tyr Asn Gln
 130 135 140
 .
 att ctg agt cac ttc ata gag ttg gaa ctt cag gca gcg gtg gta aag 480
 Ile Leu Ser His Phe Ile Glu Leu Glu Leu Gln Ala Ala Val Val Lys
 145 150 155 160
 .
 gct ttg gga gaa cta ggc att ctt ctg aga tgg atg gag gag atg cta 528

221

96122

222

Ala Leu Gly Glu Leu Gly Ile Leu Leu Arg Trp Met Glu Glu Met Leu
 165 170 175

tag

531

*

<210> 33

<211> 176

<212> PRT

<213> Mus musculus Миша домовая

<400> 33

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> 34

<211> 21

<212> DNA ДНК

<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC22901 Олігонуклеотидний праймер

<400> 34

catcaaaccg cctgatgtga c

21

<210> 35

<211> 21

<212> DNA ДНК

<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC45039 Олігонуклеотидний праймер

<400> 35

attaggcttg ggagggaatg g

21

<210> 36

<211> 23

<212> DNA ДНК

<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC38573 Олігонуклеотидний праймер

<400> 36
tggc gatgcc tgcttgccga ata 23

<210> 37

<211> 22

<212> DNA ДНК

<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC25223 Олігонуклеотидний праймер

<400> 37
gtcttcctca catctgttat cg 22

<210> 38

<211> 24

<212> DNA ДНК

<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC40128 Олігонуклеотидний праймер

<400> 38
ggcttgaact ttgagaaagg cagt 24

<210> 39

<211> 1473

<212> DNA ДНК

<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>

<223> IL-22RA Extracellular domain with tPA leader and
fused to murine gamma 2a heavy chain Fc region
(mG2a)

IL-22RA Позаклітинний домен з лідером tPA
та злитий з Fc-зоною важкого ланцюга гамма 2a мишей (mG2a)

<221> CDS

<222> (1)...(1473)

<400> 39
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc 48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc 96
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
20 25 30

ttc cgt aga cac gcc cct gag gac ccc tcg gat ctg ctc cag cac gtg 144
Phe Arg Arg His Ala Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Gln His Val
35 40 45

aaa ttc cag tcc agc aac ttt gaa aac atc ctg acg tgg gac agc ggg 192
Lys Phe Gln Ser Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp Asp Ser Gly
50 55 60

cca gag ggc acc cca gac acg gtc tac agc atc gag tat aag acg tac 240
Pro Glu Gly Thr Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr Lys Thr Tyr
65 70 75 80

gga gag agg gac tgg gtg gca aag aag ggc tgt cag cgg atc acc cgg 288
Gly Glu Arg Asp Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg Ile Thr Arg
85 90 95

aag tcc tgc aac ctg acg gtg gag acg ggc aac ctc acg gag ctc tac 336

225							96122							226						
Lys	Ser	Cys	Asn	Leu	Thr	Val	Glu	Thr	Gly	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Tyr					
			100					105					110							
tat	gcc	agg	gtc	acc	gct	gtc	agt	gcg	gga	ggc	cgg	tca	gcc	acc	aag	384				
Tyr	Ala	Arg	Val	Thr	Ala	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Arg	Ser	Ala	Thr	Lys					
		115					120					125								
atg	act	gac	agg	ttc	agc	tct	ctg	cag	cac	act	acc	ctc	aag	cca	cct	432				
Met	Thr	Asp	Arg	Phe	Ser	Ser	Leu	Gln	His	Thr	Thr	Leu	Lys	Pro	Pro					
		130				135						140								
gat	gtg	acc	tgt	atc	tcc	aaa	gtg	aga	tcg	att	cag	atg	att	gtt	cat	480				
Asp	Val	Thr	Cys	Ile	Ser	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Gln	Met	Ile	Val	His					
					150					155					160					
cct	acc	ccc	acg	cca	atc	cgt	gca	ggc	gat	ggc	cac	cgg	cta	acc	ctg	528				
Pro	Thr	Pro	Thr	Pro	Ile	Arg	Ala	Gly	Asp	Gly	His	Arg	Leu	Thr	Leu					
				165					170				175							
gaa	gac	atc	ttc	cat	gac	ctg	ttc	tac	cac	tta	gag	ctc	cag	gtc	aac	576				
Glu	Asp	Ile	Phe	His	Asp	Leu	Phe	Tyr	His	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Asn					
			180					185					190							
cgc	acc	tac	caa	atg	cac	ctt	gga	ggg	aag	cag	aga	gaa	tat	gag	ttc	624				
Arg	Thr	Tyr	Gln	Met	His	Leu	Gly	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Tyr	Glu	Phe					
		195					200					205								
ttc	ggc	ctg	acc	cct	gac	aca	gag	ttc	ctt	ggc	acc	atc	atg	att	tgc	672				
Phe	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Thr	Glu	Phe	Leu	Gly	Thr	Ile	Met	Ile	Cys					
		210				215					220									
gtt	ccc	acc	tgg	gcc	aag	gag	agt	gcc	ccc	tac	atg	tgc	cga	gtg	aag	720				
Val	Pro	Thr	Trp	Ala	Lys	Glu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Met	Cys	Arg	Val	Lys					
					230					235					240					
aca	ctg	cca	gac	cgg	aca	gga	agc	ggg	tct	gga	agc	ggg	tct	gga	agc	768				
Thr	Leu	Pro	Asp	Arg	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser					
				245					250					255						
ggg	gag	ccc	aga	ggc	ccc	aca	atc	aag	ccc	tgt	cct	cca	tgc	aaa	tgc	816				
Gly	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys					
			260					265					270							
cca	gca	cct	aac	ctc	ttg	ggg	gga	cca	tcc	gtc	ttc	atc	ttc	cct	cca	864				
Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		Phe	Pro	Pro					
		275				280						285								
aag	atc	aag	gat	gta	ctc	atg	atc	tcc	ctg	agc	ccc	ata	gtc	aca	tgt	912				
Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys					
		290				295					300									
gtg	gtg	gtg	gat	gtg	agc	gag	gat	gac	cca	gat	gtc	cag	atc	agc	tgg	960				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp										

227

96122

228

```

aaa gac ctc cca gcg ccc atc gag aga acc atc tca aaa ccc aaa ggg 1152
Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
370 375 380

tca gta aga gct cca cag gta tat gtc ttg cct cca cca gaa gaa gag 1200
Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
385 390 395 400

atg act aag aaa cag gtc act ctg acc tgc atg gtc aca gac ttc atg 1248
Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
405 410 415

cct gaa gac att tac gtg gag tgg acc aac aac ggg aaa aca gag cta 1296
Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
420 425 430

aac tac aag aac act gaa cca gtc ctg gac tct gat ggt tct tac ttc 1344
Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
435 440 445

atg tac agc aag ctg aga gtg gaa aag aag aac tgg gtg gaa aga aat 1392
Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
450 455 460

agc tac tcc tgt tca gtg gtc cac gag ggt ctg cac aat cac cac acg 1440
Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
465 470 475 480

act aag agc ttc tcc cgg act ccg ggt aaa taa 1473
Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys *
485 490

```

<210> 40

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>

<223> IL-22RA Extracellular domain with tPA leader and
fused to murine gamma 2a heavy chain Fc region
(mG2a)

IL-22RA Позаклітинний домен з лідером tPA

та злитий з Fc-зоною важкого ланцюга гамма 2a мишей (mG2a)

<400> 40

```

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

```

229

96122

230

Glu Asp Ile Phe 165 His Asp Leu Phe Tyr 170 His Leu Glu Leu Gln Val Asn 175
 Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe 190
 Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys 205
 Val Pro Thr Trp Ala Lys 215 Glu Ser Ala Pro Tyr Met Cys Arg Val Lys 240
 Thr Leu Pro Asp Arg Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser 255
 Gly Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys 270
 Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro 285
 Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys 300
 Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp 320
 Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg 335
 Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln 350
 His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn 365
 Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly 380
 Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu 400
 Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met 415
 Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu 430
 Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe 445
 Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn 460
 Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr 480
 Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys 490
 485

<210> 41

<211> 1834

<212> DNA ДНК

<213> Mus musculus Миша домова

<220>

<221> CDS

<222> (43)...(1788)

<400> 41

ttggtccaga gccgaggccc gaaggggccc tggaggggacc ca atg aag aca cta 54
 Met Lys Thr Leu
 1

ctg acc atc ctg acg gtg gga tcc ctg gcc gct cac acc act gtg gac 102
 Leu Thr Ile Leu Thr Val Gly Ser Leu Ala Ala His Thr Thr Val Asp
 5 10 15 20

aca tcc ggt ctc ctt caa cac gtg aaa ttc cag tcc agc aac ttt gag 150
 Thr Ser Gly Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser Ser Asn Phe Glu
 25 30 35

aac atc ttg acg tgg gat ggt ggg ccc gct agc acc tct gac acc gtc 198

231	96122	232
Asn Ile Leu Thr Trp Asp Gly Gly Pro Ala Ser Thr Ser Asp Thr Val 40 45 50		
tac agt gtg gaa tat aag aaa tac gga gag aga aag tgg ctg gcc aag Tyr Ser Val Glu Tyr Lys Lys Tyr 60 Gly Glu Arg Lys Trp Leu Ala Lys 55 65		246
gcg ggc tgc cag cgg atc acc cag aag ttc tgc aac ctg act atg gag Ala Gly Cys Gln Arg Ile Thr 75 Gln Lys Phe Cys Asn Leu Thr Met Glu 70 80		294
acc cgc aac cac act gag ttt tac tac gcc aag gtc acg gca gtc agc Thr Arg Asn His Thr Glu Phe Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Ala Val Ser 85 90 95 100		342
gca gga ggc cca cca gtc aca aag atg act gat cgt ttc agc tcg ctg Ala Gly Gly Pro Val Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe Ser Ser Leu 105 110 115		390
cag cac act acc atc aaa ccg cct gat gtg acc tgt atc ccc aaa gtg Gln His Thr Thr Ile Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Pro Lys Val 120 125 130		438
agg tcc att cag atg ctg gtc cac ccc aca ctc aca ccg gtc ctc tcg Arg Ser Ile Gln Met Leu Val His Pro Thr Leu Thr Pro Val Leu Ser 135 140 145		486
gaa gat ggc cac cag cta acc ctg gag gag att ttc cat gac ctg ttc Glu Asp Gly His Gln Leu Thr 155 Glu Glu Ile Phe His Asp Leu Phe 150 160		534
tac cgc tta gag ctc cac gtc aac cac acc tac cag atg cac ctt gaa Tyr Arg Leu Glu Leu His Val Asn His Thr Tyr 175 Gln Met His Leu Glu 165 170 180		582
ggc aaa cag aga gaa tac gag ttc ctt ggc ctg act ccc gac aca gag Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Leu Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu 185 190 195		630
ttc ctc ggc tcc atc aca att ttg act ccg ata ttg tcc aag gaa agt Phe Leu Gly Ser Ile Thr Ile Leu Thr 205 Pro Ile Leu Ser Lys Glu Ser 200 210		678
gcc ccc tac gtg tgc cga gtg aag acg ctg ccc gat cgg acg tgg gcc Ala Pro Tyr Val Cys Arg Val Lys 220 Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Ala 215 225		726
tac tcc ttc tcg ggc gcc gtg ctc ttt tcc atg ggt ttc ctc gtc ggc Tyr Ser Phe Ser Gly Ala Val Leu Phe Ser Met Gly Phe Leu Val Gly 230 235 240		774
ttg ctc tgt tat ctg ggc tac aaa tac atc acc aag cca cct gta cct Leu Leu Cys Tyr Leu Gly Tyr Lys Tyr Ile Thr Lys Pro Pro Val Pro 245 250 255 260		822
cct aac tcc ctg aac gtc caa cgt gtc ctg acc ttt caa ccc cta cgc Pro Asn Ser Leu Asn Val Gln Arg Val Leu Thr Phe Gln Pro Leu Arg 265 270 275		870
ttc atc caa gaa cac gta ctg atc cct gtc ttg gac ctc agt ggc ccc Phe Ile Gln Glu His Val Leu Ile Pro Val Leu Asp Leu Ser Gly Pro 280 285 290		918
agc agt ctg cct cag ccc atc cag tac tcc caa gtg gtg gtg tct ggg Ser Ser Leu Pro Gln Pro Ile Gln Tyr Ser Gln Val Val Val Ser Gly 295 300 305		966

233	96122	234
ccc agg gag cct cct gga gct gtg tgg cgg cag agc ctg tct gac ctc Pro Arg Glu Pro Pro Gly Ala Val Trp Arg Gln Ser Leu Ser Asp Leu 310 315 320		1014
acc tac gta ggg cag tca gat gtc tcc atc ctg caa cct acc aac gtg Thr Tyr Val Gly Gln Ser Asp Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Asn Val 325 330 335 340		1062
cca gct cag cag aca ctg tcc cca cca tcc tac gct ccg aag gct gtc Pro Ala Gln Gln Thr Leu Ser Pro Pro Ser Tyr Ala Pro Lys Ala Val 345 350 355		1110
cct gag gtc cag ccc cct tcc tat gcg cct cag gta gcc tcg gat gcc Pro Glu Val Gln Pro Pro Ser Tyr Ala Pro Gln Val Ala Ser Asp Ala 360 365 370		1158
aaa gct ctg ttc tac tca cca caa cag ggg atg aag acc agg cct gcc Lys Ala Leu Phe Tyr Ser Pro Gln Gln Gly Met Lys Thr Arg Pro Ala 375 380 385		1206
acc tat gac ccg cag gac att ctg gac agc tgc cct gct tct tat gct Thr Tyr Asp Pro Gln Asp Ile Leu Asp Ser Cys Pro Ala Ser Tyr Ala 390 395 400		1254
gtg tgt gtg gaa gac tct ggc aaa gac tct acc cca ggc atc ctc tcc Val Cys Val Glu Asp Thr Gly Lys Asp Ser Thr Pro Gly Ile Leu Ser 405 410 415 420		1302
act ccc aaa tac ctc aag aca aaa ggt cag ctc cag gaa gac aca ctt Thr Pro Lys Tyr Leu Lys Thr Lys Gly Gln Leu Gln Glu Asp Thr Leu 425 430 435		1350
gtt aga agc tgt ctc cca ggg gac ctt tct cta cag aaa gtc acc tcc Val Arg Ser Cys Leu Pro Gly Asp Leu Ser Leu Gln Lys Val Thr Ser 440 445 450		1398
tta ggt gaa ggg gag aca cag aga cca aaa tca ctc ccc tca cct ctg Leu Gly Glu Gly Glu Thr Gln Arg Pro Lys Ser Leu Pro Ser Pro Leu 455 460 465		1446
gga ttt tgc aca gac aga gga cct gac ctt cac aca ctg cgc agt gag Gly Phe Cys Thr Asp Arg Gln Pro Asp Leu His Thr Leu Arg Ser Glu 470 475 480		1494
gaa cca gag aca cca cgg tac ctg aag ggg gcg ctg tct ctc ctg tcc Glu Pro Glu Thr Pro Arg Tyr Leu Lys Gly Ala Leu Ser Leu Leu Ser 485 490 495 500		1542
tct gtg cag atc gag ggc cac cct gtc tcc ctc cct ttg cac gtc cat Ser Val Gln Ile Glu Gly His Pro Val Ser Leu Pro Leu His Val His 505 510 515		1590
tct gtc tca tgt tcc ccc tca gac gag gga cca agt ccc tgg ggc ctg Ser Val Ser Cys Ser Pro Ser Asp Glu Gly Pro Ser Pro Trp Gly Leu 520 525 530		1638
ctg gac tcc ctt gtg tgt cca aag gat gag ggt ccc gcg gtt gag act Leu Asp Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Glu Gly Pro Ala Val Glu Thr 535 540 545		1686
gag gcc atg tgc ccc agt gct gca gcc tct gag ctg gag cag tcc aca Glu Ala Met Cys Pro Ser Ala Ala Ala Ser Glu Leu Glu Gln Ser Thr 550 555 560		1734
gaa ctg gac tct ctt ttc aaa ggc ttg gcc ctg act gtg cag tgg gaa		1782

235

96122

236

Glu Leu Asp Ser Leu Phe Lys Gly Leu Ala Leu Thr Val Gln Trp Glu
 565 570 575 580

tcc tga agggagatcg gagcaagcag gcctaagttt cctccccgcc caccta
 Ser *

1834

<210> 42

<211> 581

<212> PRT

<213> Mus musculus Миша домова

<400> 42

Met Lys Thr Leu Leu Thr Ile Leu Thr Val Gly Ser Leu Ala Ala His
 1 5 10 15
 Thr Thr Val Asp Thr Ser Gly Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser
 20 25 30
 Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp Asp Gly Gly Pro Ala Ser Thr
 35 40 45
 Ser Asp Thr Val Tyr Ser Val Glu Tyr Lys Lys Tyr Gly Glu Arg Lys
 50 55 60
 Trp Leu Ala Lys Ala Gly Cys Gln Arg Ile Thr Gln Lys Phe Cys Asn
 65 70 75 80
 Leu Thr Met Glu Thr Arg Asn His Thr Glu Phe Tyr Tyr Ala Lys Val
 85 90 95
 Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Pro Pro Val Thr Lys Met Thr Asp Arg
 100 105 110
 Phe Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Ile Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys
 115 120 125
 Ile Pro Lys Val Arg Ser Ile Gln Met Leu Val His Pro Thr Leu Thr
 130 135 140
 Pro Val Leu Ser Glu Asp Gly His Gln Leu Thr Leu Glu Glu Ile Phe
 145 150 155 160
 His Asp Leu Phe Tyr Arg Leu Glu Leu His Val Asn His Thr Tyr Gln
 165 170 175
 Met His Leu Glu Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Leu Gly Leu Thr
 180 185 190
 Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Ser Ile Thr Ile Leu Thr Pro Ile Leu
 195 200 205
 Ser Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Val Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp
 210 215 220
 Arg Thr Trp Ala Tyr Ser Phe Ser Gly Ala Val Leu Phe Ser Met Gly
 225 230 235 240
 Phe Leu Val Gly Leu Leu Cys Tyr Leu Gly Tyr Lys Tyr Ile Thr Lys
 245 250 255
 Pro Pro Val Pro Pro Asn Ser Leu Asn Val Gln Arg Val Leu Thr Phe
 260 265 270
 Gln Pro Leu Arg Phe Ile Gln Glu His Val Leu Ile Pro Val Leu Asp
 275 280 285
 Leu Ser Gly Pro Ser Ser Leu Pro Gln Pro Ile Gln Tyr Ser Gln Val
 290 295 300
 Val Val Ser Gly Pro Arg Glu Pro Pro Gly Ala Val Trp Arg Gln Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Asp Leu Thr Tyr Val Gly Gln Ser Asp Val Ser Ile Leu Gln
 325 330 335
 Pro Thr Asn Val Pro Ala Gln Gln Thr Leu Ser Pro Pro Ser Tyr Ala
 340 345 350
 Pro Lys Ala Val Pro Glu Val Gln Pro Pro Ser Tyr Ala Pro Gln Val
 355 360 365
 Ala Ser Asp Ala Lys Ala Leu Phe Tyr Ser Pro Gln Gln Gly Met Lys
 370 375 380
 Thr Arg Pro Ala Thr Tyr Asp Pro Gln Asp Ile Leu Asp Ser Cys Pro
 385 390 395 400
 Ala Ser Tyr Ala Val Cys Val Glu Asp Ser Gly Lys Asp Ser Thr Pro
 405 410 415

237

96122

238

Gly Ile Leu Ser Thr Pro Lys Tyr Leu Lys Thr Lys Gly Gln Leu Gln
 420 425 430
 Glu Asp Thr Leu Val Arg Ser Cys Leu Pro Gly Asp Leu Ser Leu Gln
 435 440 445
 Lys Val Thr Ser Leu Gly Glu Gly Glu Thr Gln Arg Pro Lys Ser Leu
 450 455 460
 Pro Ser Pro Leu Gly Phe Cys Thr Asp Arg Gly Pro Asp Leu His Thr
 465 470 475 480
 Leu Arg Ser Glu Glu Pro Glu Thr Pro Arg Tyr Leu Lys Gly Ala Leu
 485 490 495
 Ser Leu Leu Ser Ser Val Gln Ile Glu Gly His Pro Val Ser Leu Pro
 500 505 510
 Leu His Val His Ser Val Ser Cys Ser Pro Ser Asp Glu Gly Pro Ser
 515 520 525
 Pro Trp Gly Leu Leu Asp Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Glu Gly Pro
 530 535 540
 Ala Val Glu Thr Glu Ala Met Cys Pro Ser Ala Ala Ser Glu Leu
 545 550 555 560
 Glu Gln Ser Thr Glu Leu Asp Ser Leu Phe Lys Gly Leu Ala Leu Thr
 565 570 575
 Val Gln Trp Glu Ser
 580

<210> 43
 <211> 660
 <212> DNA ДНК
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(660)

<400> 43
 atg gcg tgg agt ctt ggg agc tgg ctg ggt ggc tgc ctg ctg gtg tca 48
 Met Ala Trp Ser Leu Gly Ser Trp Leu Gly Gly Cys Leu Leu Val Ser
 1 5 10 15
 gca ttg gga atg gta cca cct ccc gaa aat gtc aga atg aat tct gtt 96
 Ala Leu Gly Met Val Pro Pro Pro Glu Asn Val Arg Met Asn Ser Val
 20 25 30
 aat ttc aag aac att cta cag tgg gag tca cct gct ttt gcc aaa ggg 144
 Asn Phe Lys Asn Ile Leu Gln Trp Glu Ser Pro Ala Phe Ala Lys Gly
 35 40 45
 aac ctg act ttc aca gct cag tac cta agt tat agg ata ttc caa gat 192
 Asn Leu Thr Phe Thr Ala Gln Tyr Leu Ser Tyr Arg Ile Phe Gln Asp
 50 55 60
 aaa tgc atg aat act acc ttg acg gaa tgt gat ttc tca agt ctt tcc 240
 Lys Cys Met Asn Thr Thr Leu Thr Glu Cys Asp Phe Ser Ser Leu Ser
 65 70 75 80
 aag tat ggt gac cac acc ttg aga gtc agg gct gaa ttt gca gat gag 288
 Lys Tyr Gly Asp His Thr Leu Arg Val Arg Ala Glu Phe Ala Asp Glu
 85 90 95
 cat tca gac tgg gta aac atc acc ttc tgt cct gtg gat gac acc att 336
 His Ser Asp Trp Val Asn Ile Thr Phe Cys Pro Val Asp Asp Thr Ile
 100 105 110
 att gga ccc cct gga atg caa gta gaa gta ctt gat gat tct tta cat 384
 Ile Gly Pro Pro Gly Met Gln Val Glu Val Leu Asp Asp Ser Leu His
 115 120 125

239

96122

240

```

atg cgt ttc tta gcc cct aaa att gag aat gaa tac gaa act tgg act 432
Met Arg Phe Leu Ala Pro Lys Ile Glu Asn Glu Tyr Glu Thr Trp Thr
130 135 140

atg aag aat gtg tat aac tca tgg act tat aat gtg caa tac tgg aaa 480
Met Lys Asn Val Tyr Asn Ser Trp Thr Tyr Asn Val Gln Tyr Trp Lys
145 150 155 160

aac ggt act gat gaa aag ttt caa att act ccc cag tat gac ttt gag 528
Asn Gly Thr Asp Glu Lys Phe Gln Ile Thr Pro Gln Tyr Asp Phe Glu
165 170 175

gtc ctc aga aac ctg gag cca tgg aca act tat tgt gtt caa gtt cga 576
Val Leu Arg Asn Leu Glu Pro Trp Thr Thr Tyr Cys Val Gln Val Arg
180 185 190

ggg ttt ctt cct gat cgg aac aaa gct ggg gaa tgg agt gag cct gtc 624
Gly Phe Leu Pro Asp Arg Asn Lys Ala Gly Glu Trp Ser Glu Pro Val
195 200 205

tgt gag caa aca acc cat gac gaa acg gtc ccc tcc 660
Cys Glu Gln Thr Thr His Asp Glu Thr Val Pro Ser
210 215 220

```

<210> 44
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

```

<400> 44
Met Ala Trp Ser Leu Gly Ser Trp Leu Gly Gly Cys Leu Leu Val Ser
1 5 10 15
Ala Leu Gly Met Val Pro Pro Pro Glu Asn Val Arg Met Asn Ser Val
20 25 30
Asn Phe Lys Asn Ile Leu Gln Trp Glu Ser Pro Ala Phe Ala Lys Gly
35 40 45
Asn Leu Thr Phe Thr Ala Gln Tyr Leu Ser Tyr Arg Ile Phe Gln Asp
50 55 60
Lys Cys Met Asn Thr Thr Leu Thr Glu Cys Asp Phe Ser Ser Leu Ser
65 70 75 80
Lys Tyr Gly Asp His Thr Leu Arg Val Arg Ala Glu Phe Ala Asp Glu
85 90 95
His Ser Asp Trp Val Asn Ile Thr Phe Cys Pro Val Asp Asp Thr Ile
100 105 110
Ile Gly Pro Pro Gly Met Gln Val Glu Val Leu Asp Asp Ser Leu His
115 120 125
Met Arg Phe Leu Ala Pro Lys Ile Glu Asn Glu Tyr Glu Thr Trp Thr
130 135 140
Met Lys Asn Val Tyr Asn Ser Trp Thr Tyr Asn Val Gln Tyr Trp Lys
145 150 155 160
Asn Gly Thr Asp Glu Lys Phe Gln Ile Thr Pro Gln Tyr Asp Phe Glu
165 170 175
Val Leu Arg Asn Leu Glu Pro Trp Thr Thr Tyr Cys Val Gln Val Arg
180 185 190
Gly Phe Leu Pro Asp Arg Asn Lys Ala Gly Glu Trp Ser Glu Pro Val
195 200 205
Cys Glu Gln Thr Thr His Asp Glu Thr Val Pro Ser
210 215 220

```

<210> 45
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

241

96122

242

```

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

```

```

<210> 46
<211> 211
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 46
Ser Asp Ala His Gly Thr Glu Leu Pro Ser Pro Pro Ser Val Trp Phe
1      5      10      15
Glu Ala Glu Phe Phe His His Ile Leu His Trp Thr Pro Ile Pro Asn
20     25     30
Gln Ser Glu Ser Thr Cys Tyr Glu Val Ala Leu Leu Arg Tyr Gly Ile
35     40     45
Glu Ser Trp Asn Ser Ile Ser Asn Cys Ser Gln Thr Leu Ser Tyr Asp
50     55     60
Leu Thr Ala Val Thr Leu Asp Leu Tyr His Ser Asn Gly Tyr Arg Ala
65     70     75     80
Arg Val Arg Ala Val Asp Gly Ser Arg His Ser Asn Trp Thr Val Thr
85     90     95
Asn Thr Arg Phe Ser Val Asp Glu Val Thr Leu Thr Val Gly Ser Val
100    105    110
Asn Leu Glu Ile His Asn Gly Phe Ile Leu Gly Lys Ile Gln Leu Pro
115    120    125
Arg Pro Lys Met Ala Pro Ala Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Ile Phe Ser
130    135    140
His Phe Arg Glu Tyr Glu Ile Ala Ile Arg Lys Val Pro Gly Asn Phe
145    150    155    160
Thr Phe Thr His Lys Lys Val Lys His Glu Asn Phe Ser Leu Leu Thr
165    170    175
Ser Gly Glu Val Gly Glu Phe Cys Val Gln Val Lys Pro Ser Val Ala
180    185    190
Ser Arg Ser Asn Lys Gly Met Trp Ser Lys Glu Glu Cys Ile Ser Leu
195    200    205
Thr Arg Gln
210

```

<210> 47

243

96122

244

<211> 201
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 47
 Asp Glu Val Ala Ile Leu Pro Ala Pro Gln Asn Leu Ser Val Leu Ser
 1 5 10 15
 Thr Asn Met Lys His Leu Leu Met Trp Ser Pro Val Ile Ala Pro Gly
 20 25 30
 Glu Thr Val Tyr Tyr Ser Val Glu Tyr Gln Gly Glu Tyr Glu Ser Leu
 35 40 45
 Tyr Thr Ser His Ile Trp Ile Pro Ser Ser Trp Cys Ser Leu Thr Glu
 50 55 60
 Gly Pro Glu Cys Asp Val Thr Asp Asp Ile Thr Ala Thr Val Pro Tyr
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Val Arg Ala Thr Leu Gly Ser Gln Thr Ser Ala Trp Ser
 85 90 95
 Ile Leu Lys His Pro Phe Asn Arg Asn Ser Thr Ile Leu Thr Arg Pro
 100 105 110
 Gly Met Glu Ile Thr Lys Asp Gly Phe His Leu Val Ile Glu Leu Glu
 115 120 125
 Asp Leu Gly Pro Gln Phe Glu Phe Leu Val Ala Tyr Trp Arg Arg Glu
 130 135 140
 Pro Gly Ala Glu Glu His Val Lys Met Val Arg Ser Gly Gly Ile Pro
 145 150 155 160
 Val His Leu Glu Thr Met Glu Pro Gly Ala Ala Tyr Cys Val Lys Ala
 165 170 175
 Gln Thr Phe Val Lys Ala Ile Gly Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gln Thr
 180 185 190
 Glu Cys Val Glu Val Gln Gly Glu Ala
 195 200

<210> 48
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Mus musculus **Миша домовая**

<400> 48
 His Thr Thr Val Asp Thr Ser Gly Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Ser Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp Asp Gly Gly Pro Ala Ser
 20 25 30
 Thr Ser Asp Thr Val Tyr Ser Val Glu Tyr Lys Lys Tyr Gly Glu Arg
 35 40 45
 Lys Trp Leu Ala Lys Ala Gly Cys Gln Arg Ile Thr Gln Lys Phe Cys
 50 55 60
 Asn Leu Thr Met
 65

<210> 49
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> mus musculus **Миша домовая**

<400> 49
 Glu Thr Arg Asn His Thr Glu Phe Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Ala Val
 1 5 10 15
 Ser Ala Gly Gly Pro Pro Val Thr Lys Met
 20 25

<210> 50
 <211> 28
 <212> PRT

245

96122

246

<213> mus musculus Миша домова

<400> 50

Thr Asp Arg Phe Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Ile Lys Pro Pro Asp
 1 5 10 15
 Val Thr Cys Ile Pro Lys Val Arg Ser Ile Gln Met
 20 25

<210> 51

<211> 40

<212> PRT

<213> Mus musculus Миша домова

<400> 51

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

<210> 52

<211> 50

<212> PRT

<213> Mus musculus Миша домова

<400> 52

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

<210> 53

<211> 70

<212> PRT

<213> Mus musculus Миша домова

<400> 53

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

<210> 54

<211> 46

<212> PRT

<213> Mus musculus Миша домова

<400> 54

Glu Thr Arg Asn His Thr Glu Phe Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Ala Val
 1 5 10 15
 Ser Ala Gly Gly Glu Thr Arg Asn His Thr Glu Phe Tyr Tyr Ala Lys

247

96122

248

Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Pro Pro Val Thr Lys Met
 20 25 30
 35 40 45

<210> 55
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> mus musculus Миша домова

<220>
 <221> VARIANT ВАРИАНТ
 <222> 6, 11, 13,
 <223> Xaa = Any Amino Acid Будь-яка амінокислота

<400> 55
 Thr Asp Arg Phe Ser Xaa Leu Gln His Thr Xaa Ile Xaa Pro Xaa Asp
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Ile Thr Asp Arg Phe Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Ile
 20 25 30
 Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Pro Lys Val Arg Ser Ile Gln Met
 35 40 45

<210> 56
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 56
 Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser Ser
 1 5 10 15
 Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro
 20 25 30
 Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp
 35 40 45
 Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu
 50 55 60
 Thr Val Glu Thr Gly Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Ala Arg Val Thr
 65 70 75 80
 Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser Ala Thr Lys Met
 85 90

<210> 57
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 57
 Thr Asp Arg Phe Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Leu Lys Pro Pro Asp
 1 5 10 15
 Val Thr Cys Ile Ser Lys Val Arg Ser Ile Gln Met
 20 25

<210> 58
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu Phe Tyr His Leu Glu Leu
 20 25 30

Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met
35 40

<210> 59
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro
1 5 10 15
Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met
20 25

<210> 60
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Met
1 5 10

<210> 61
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr
1 5 10

<210> 62
<211> 212
<212> PRT
<213> Artificial Sequence Штучна послідовність

<220>
<223> A murine IL-22RA soluble receptor with cleavage
site (Leu Val Pro Arg) remaining on C-Terminus
IL-22RA розчинний рецептор з сайтом розщеплення
(Leu Val Pro Arg) на С-кінці

<400> 62
His Thr Thr Val Asp Thr Ser Gly Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln
1 5 10 15
Ser Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp Asp Gly Gly Pro Ala Ser
20 25 30
Thr Ser Asp Thr Val Tyr Ser Val Glu Tyr Lys Lys Tyr Gly Glu Arg
35 40 45
Lys Trp Leu Ala Lys Ala Gly Cys Gln Arg Ile Thr Gln Lys Phe Cys
50 55 60
Asn Leu Thr Met Glu Thr Arg Asn His Thr Glu Phe Tyr Tyr Ala Lys
65 70 75 80
Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Pro Pro Val Thr Lys Met Thr Asp
85 90 95
Arg Phe Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Ile Lys Pro Pro Asp Val Thr
100 105 110
Cys Ile Pro Lys Val Arg Ser Ile Gln Met Leu Val His Pro Thr Leu
115 120 125
Thr Pro Val Leu Ser Glu Asp Gly His Gln Leu Thr Leu Glu Glu Ile
130 135 140
Phe His Asp Leu Phe Tyr Arg Leu Glu Leu His Val Asn His Thr Tyr
145 150 155 160
Gln Met His Leu Glu Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Leu Gly Leu
165 170 175
Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Ser Ile Thr Ile Leu Thr Pro Ile
180 185 190
Leu Ser Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Val Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro
195 200 205
Leu Val Pro Arg
210