



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94221 (13) C2
(51) МПК
C07K 14/47 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) БІЛОК ЛІПОКАЛІН

1

(21) а200711037

(22) 08.03.2006

(24) 26.04.2011

(86) PCT/GB2006/000820, 08.03.2006

(31) 0504767.5

(32) 08.03.2005

(33) GB

(46) 26.04.2011, Бюл.№ 8, 2011 р.

(72) ЙОРКЕ-СМІТ МЕЛАНІ, СН, ПАУЕР КРІСТІН,
FR, БОШЕРТ УРСУЛА, СН

(73) АРЕС ТРЕЙДІНГ С.А., СН

(56) XU S ET AL: "Lipocalins as biochemical markers of disease." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. 18 OCT 2000, vol. 1482, no. 1-2, 18 October 2000 (2000-10-18), pages 298-307.

FLOWER D R ET AL: "The lipocalin protein family: structural and sequence overview." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. 18 OCT 2000, vol. 1482, no. 1-2, 18 October 2000 (2000-10-18), pages 9-24.

MALLBRIS LOTUS ET AL: "Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker for dysregulated keratinocyte differentiation in human skin." EXPERIMENTAL DERMATOLOGY. DEC 2002, vol. 11, no. 6, December 2002 (2002-12), pages 584-591 (abstract).

(57) 1. Поліпептид, який:

(i) містить або складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:66 або SEQ ID NO:70;

(ii) являє собою фрагмент, що є ліпокаліном або має спільну антигенну детермінанту з одним або декількома поліпептидами (i), або

(iii) являє собою функціональний еквівалент (i) або (ii).

2. Поліпептид, який є фрагментом за п. 1 (ii), який **відрізняється** тим, що вказаний поліпептид містить або складається з амінокислот 25-174, амінокислот 26-180, амінокислот 33-166 або амінокислот 41-189 з SEQ ID NO:18, або амінокислот 25-206 з SEQ ID NO:24 і являє собою ліпокалін.

3. Поліпептид, який є функціональним еквівалентом за п. 1 (iii), який **відрізняється** тим, що його послідовність гомологічна амінокислотній послідовності, представлений в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID

2

NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:66 або SEQ ID NO:70, і є ліпокаліном.

4. Поліпептид, який є фрагментом або функціональним еквівалентом за п. 1 або п. 2, і амінокислотна послідовність якого характеризується більше ніж 80 % ідентичністю з амінокислотою послідовністю, представленою в SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24 або SEQ ID NO:66, або з її активним фрагментом, переважно, ідентичністю на рівні послідовності більше ніж 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 98,5 %, 99 % або 99,5 %.

5. Поліпептид, який являє собою функціональний еквівалент за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що він має значну структурну гомологію з поліпептидом, який має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:66 або SEQ ID NO:70.

6. Поліпептид, який являє собою фрагмент за п. 1 або 4 і який має антигенну детермінанту, спільну з поліпептидом за п. 1 частини (i), і який складається з 7 або більше амінокислотних залишків амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:66 або SEQ ID NO:70.

7. Поліпептид за пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що вказаний поліпептид містить амінокислотні заміни N92T і/або G114S.

8. Поліпептид за п. 6, який має послідовність, представлену в SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58 або SEQ ID NO:60.

9. Гібридний білок, який містить поліпептид за кожним з попередніх пунктів.

10. Поліпептид за пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що вказаний поліпептид містить гістидинову мітку.

11. Поліпептид за п. 10, який має послідовність, представлену в SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ

(13) C2

(11) 94221

(19) UA

ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:68 або SEQ ID NO:72.

12. Очищена молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид за будь-яким з попередніх пунктів.

13. Очищена молекула нуклеїнової кислоти за п. 12, яка містить або складається з послідовності нуклеїнової кислоти, представленої в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71 або SEQ ID NO:72, або являє собою її надлишковий еквівалент або фрагмент.

14. Очищена молекула нуклеїнової кислоти, яка гібридується з молекулою нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 12 або 13 в умовах високої жорсткості.

15. Вектор, який містить молекулу нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 12-14.

16. Клітина-хазяїн, трансформована вектором за п. 15.

17. Ліганд, який являє собою антитіло і який специфічно зв'язується з поліпептидом за будь-яким з пп. 1-11 і, переважно, модулює його активність.

18. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-11, молекула нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 12-14, вектор за п. 15, клітина-хазяїн за п. 16 або ліганд за п. 17 для використання в терапії або в діагностиці захворювання.

19. Спосіб *in vitro* діагностики захворювання в пацієнта, що включає оцінку рівня експресії природного гена, який кодує поліпептид за будь-яким з пп. 1-11, або оцінку активності поліпептиду за будь-яким з пп. 1-11 у тканині вказаного пацієнта, і порівняння вказаного рівня експресії або активності з контрольним рівнем, де рівень, який відрізняється від вказаного контрольного рівня, є ознакою наявності захворювання.

20. Спосіб за п. 19, що включає стадії: (а) контактування ліганду за п. 17 з біологічним зразком в умовах, які придатні для утворення комплексу ліганд-поліпептид; і (b) детекції вказаного комплексу.

21. Спосіб за п. 19, що включає стадії:

а) контактування зразка тканини, взятої в пацієнта, з нуклеїновокислотним зондом у жорстких умовах, які сприяють утворенню гібридного комплексу між молекулою нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 12-14 і вказаним зондом;

б) контактування контрольного зразка із вказаним зондом в умовах, аналогічних умовам стадії (а); і детекції присутності гібридних комплексів у вказаних зразках, де детекція рівнів вказаного гібридного комплексу в зразку, узятому в даного пацієнта, які відрізняються від рівнів гібридного комплексу в

контрольному зразку, вказує на наявність захворювання.

22. Спосіб за п. 19, що включає:

а) контактування зразка нуклеїнової кислоти тканини, взятої в пацієнта, з нуклеїновокислотним праймером у жорстких умовах, які сприяють утворенню гібридного комплексу між молекулою нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 12-14 і вказаним праймером;

б) контактування контрольного зразка із вказаним праймером в умовах, аналогічних умовам стадії (а);

с) ампліфікацію вказаного зразка нуклеїнової кислоти; і

д) детекцію рівня ампліфікованої нуклеїнової кислоти в зразках, узятих у пацієнта, і в контрольних зразках, де детекція рівнів ампліфікованої нуклеїнової кислоти в узятому в пацієнта зразку, які значно відрізняються від рівнів ампліфікованої нуклеїнової кислоти в контрольному зразку, вказує на наявність захворювання.

23. Спосіб за п. 19, що включає:

а) одержання зразка тканин від пацієнта, обстежуваного на наявність захворювання;

б) виділення молекули нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 12-14 із вказаного зразка тканини; і

с) установлення діагнозу захворювання даному пацієнтові шляхом детекції присутності мутації в молекулі нуклеїнової кислоти, де вказана мутація асоціюється із вказаним захворюванням, і де присутність такої мутації вказує на наявність захворювання.

24. Спосіб за п. 23, що, крім того, включає ампліфікацію вказаної молекули нуклеїнової кислоти з утворенням ампліфікованого продукту і детекцію присутності або відсутності мутації у вказаному ампліфікованому продукті.

25. Спосіб за будь-яким з пп. 23 або 24, де присутність або відсутність мутації у пацієнта визначають шляхом здійснення контакту вказаної молекули нуклеїнової кислоти з нуклеїновокислотним зондом, що гібридується із вказаною молекулою нуклеїнової кислоти в жорстких умовах з утворенням гібридної дволанцюжкової молекули, де вказана гібридна дволанцюжкова молекула має негібридизовану частину ланцюга нуклеїновокислотного зонда в будь-якій ділянці, яка відповідає мутації, асоційованій із захворюванням; і детекції присутності або відсутності негібридизованої частини ланцюга вказаного зонда як показника присутності або відсутності асоційованої із захворюванням мутації.

26. Спосіб за будь-яким з пп. 19-25, де вказаними захворюваннями є, але не обмежуються ними: розлад зору (наприклад нічна сліпота), розлади імунної системи (наприклад аутоімунні розлади), запальні стани, запальне захворювання кишечника (IBD), виразковий коліт (UC), хвороба Крона (CD), проктит, клітинно-проліферативні розлади, рак (наприклад рак молочної залози, шкірна Т-клітинна лімфома, плоскоклітинна карцинома і/або базальноклітинна карцинома), мікробні інфекції (наприклад, вірусні, бактеріальні та грибні інфекції), шкірні хвороби (наприклад шкірне захворювання, асоційоване з Th1, таке як псоріаз або гіперкератоз).

тозний дерматоз; шкірне захворювання, асоційоване з Th2, таке як atopічний дерматит, контактний дерматит, контактна алергія, наприклад, до нікелю або золота, шкірна Т-клітинна лімфома, atopічна екзема, гостра екзема та/або хронічна екзема), репродуктивні розлади (наприклад безпліддя, зокрема, чоловіче безпліддя), дисфункція нирки, інфаркт міокарда, артрит, розсіяний склероз, кістозно-фіброзна мастопатія, регуляція розвитку нервової системи, діабет типу I, хвороба Хашимото, хвороба Грейвса (тироїдит), ревматоїдний артрит, проліферативний гломерулонефрит і гломерулонефрит із клубочками напівмісяцевої форми, увеїт заднього відділу очного яблука, загоєння рани та/або саркоїдоз, червоний пітиріаз і/або порокератоз, алергічні розлади, такі як алергічний риніт, астма, червоний плоский лишай, хронічний синусит, синдром Сезарі, променевий кератоз, гепатит С, виразковий коліт, мембранозний гломерулонефрит і/або вірусні інфекції.

27. Фармацевтична композиція, яка містить поліпептид за будь-яким з пп. 1-11, молекулу нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 12-14, вектор за п. 15, клітину-хазяїна за п. 16 або ліганд за п. 17.

28. Вакцинна композиція, яка містить поліпептид за будь-яким з пп. 1-11 або молекулу нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 12-14.

29. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-11, молекула нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 12-14, вектор за п. 15, клітина-хазяїн за п. 16, ліганд за п. 17 або фармацевтична композиція за п. 27, використовувані для одержання лікарського засобу для лікування певного захворювання, якими є, але не обмежуються ними, наступні захворювання: розлад зору (наприклад нічна сліпота), розлади імунної системи (наприклад аутоімунні розлади), запальні стани, запальне захворювання кишечника (IBD), виразковий коліт (UC), хвороба Крона (CD),

проктит, клітинно-проліферативні розлади, рак (наприклад рак молочної залози, шкірна Т-клітинна лімфома, плоскоклітинна карцинома і/або базальноклітинна карцинома), мікробні інфекції (наприклад вірусні, бактеріальні та грибні інфекції), шкірні хвороби (наприклад шкірне захворювання, асоційоване з Th1, таке як псоріаз або гіперкератозний дерматоз; шкірне захворювання, асоційоване з Th2, таке як atopічний дерматит, контактний дерматит, контактна алергія, наприклад, до нікелю або золота, шкірна Т-клітинна лімфома, atopічна екзема, гостра екзема і/або хронічна екзема), репродуктивні розлади (наприклад безпліддя, зокрема, чоловіче безпліддя), дисфункція нирки, інфаркт міокарда, артрит, розсіяний склероз, кістозно-фіброзна мастопатія, регуляція розвитку нервової системи, діабет типу I, хвороба Хашимото, хвороба Грейвса (тироїдит), ревматоїдний артрит, проліферативний гломерулонефрит і гломерулонефрит із клубочками напівмісяцевої форми, увеїт заднього відділу очного яблука, загоєння рани та/або саркоїдоз, червоний пітиріаз і/або порокератоз, алергічні розлади, такі як алергічний риніт, астма, червоний плоский лишай, хронічний синусит, синдром Сезарі, променевий кератоз, гепатит С, виразковий коліт, мембранозний гломерулонефрит і/або вірусні інфекції.

30. Спосіб моніторингу терапевтичного лікування захворювання у пацієнта, що включає моніторинг рівня експресії або активності поліпептиду за будь-яким з пп. 1-11 або рівня експресії молекули нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 12-14 у тканині вказаного пацієнта, проведений протягом певного періоду часу, де зміна вказаного рівня експресії або активності за певний проміжок часу в порівнянні з контрольним рівнем є показником рецидиву вказаного захворювання.

Даний винахід стосується нового білка (позначеного як INSP181) і його похідних, ідентифікованого в даній заявці як ліпокалін, і застосування цього білка та послідовностей нуклеїнової кислоти, яка містить гени, що кодують вказаний білок, для діагностики, профілактики та лікування захворювань.

Всі цитовані в даному описі публікації, патенти та патентні заявки включені в опис за допомогою посилання в повному обсязі.

У даний час в галузі розробки лікарських засобів відбуваються фундаментальні зміни у зв'язку із приходом ери функціональної геноміки. Термін "функціональна геноміка" застосовується до способів використання засобів біоінформатики для приписування функцій послідовностям білків, які представляють інтерес для фахівців. Такі засоби стають усе більше необхідними, і це пов'язано з тим, що оснащення науково-дослідних лабораторій, які займаються визначенням функцій послідовностей цих білків, поки не дає можливості швидко

обробляти все наростаючий потік даних про послідовності цих білків.

Оскільки ефективність і точність методів біоінформатики зростає, то ці методи швидко витісняють стандартні методи біохімічної характеристики. Дійсно, сучасні засоби біоінформатики, використовувані для ідентифікації білків за винаходом, дозволяють одержувати остаточні результати з досить високим ступенем вірогідності.

Різні інститути та комерційні організації займаються обробкою даних про послідовності, які надходять безперервно, і на основі отриманих результатів вони приходять до важливих відкриттів. Однак необхідність в ідентифікації та характеристиці інших генів і поліпептидів, які кодуються цими генами, з метою їх подальшого дослідження та пошуку нових лікарських засобів, усе ще залишається актуальною.

Ліпокаліни являють собою невеликі секретовані білки, які, як вважають, залучаються в транспортування невеликих гідрофобних молекул. Ліпокаліни характеризуються мультидоменною

структурою, що включає домен зв'язування ліганду, що у типовому випадку залучається в процес зв'язування малих гідрофобних молекул, і консервативний домен зв'язування з рецептором клітинної поверхні, що у типовому випадку залучається в процес зв'язування можливого рецептора на клітинній поверхні, що може бути загальним більше ніж для одного ліпокаліну, і відкритий кінець складчастої структури, що формує макромолекулярний комплекс, що залучає, можливо, рецептор клітинної поверхні.

Незважаючи на велике різноманіття на рівні послідовності, ліпокаліни характеризуються структурною гомологією: один восьмиланцюжковий антипаралельний β -циліндр із приєднаною α -спіраллю чітко формує характерну «складчасту структуру ліпокаліну». Один кінець циліндра відкритий для надходження розчинника та містить сайт зв'язування ліганду. Сукупність чотирьох петель з'єднувальних ланцюгів надає специфічність процесу зв'язування ліганду.

Найближче споріднені представники сімейства ліпокалінів відрізняються наявністю трьох характерних мотивів у послідовності. Представники даної групи включають: ретинол-зв'язувальний білок; пурпурин; білок, який зв'язує ретиноєву кислоту; альфа-2-мікроглобін; великий білок сечі; білін-зв'язувальний білок; альфа-крустаціанін; білок 14, характерний для вагітності, бета-лактоглобін; нейтрофільний ліпокалін і білок choroid plexus. Ліпокаліни Outlier класифікуються як такі, оскільки вони містять 2 або менше консервативних мотивів послідовності, і вказані білки включають: одорант-зв'язувальний білок, білок залози фон Ебнера, пробазин і афродизин.

У зв'язку з вищесказаним ідентифікація ліпокалінів надзвичайно важлива у світлі зростаючого розуміння шляхів, які лежать в основі розвитку деяких хворобливих станів і асоційованих з ними хворобливих станів, і для розробки більш ефективних підходів у генній і/або лікарській терапії для лікування вказаних розладів.

Даний винахід оснований на виявленні того факту, що білок людини, що називається в даному описі як INSP181, являє собою ліпокалін.

Даний винахід оснований на виявленні того факту, що поліпептиди за даним винаходом здійснюють позитивну регуляцію Т-хелперних цитокінів 2 (Th2), більш конкретно, - інтерлейкіну-10 (IL-10), інтерлейкіну-4 (IL-4) і інтерлейкіну-5 (IL-5). Поліпептид INSP181 був досліджений на його здатність впливати на секрецію цитокінів мононуклеарними клітинами периферичної крові людини (МКПК), стимульованими мітогеном - конкаваліном А (ConA). Було показано, що даний поліпептид стимулює секрецію IL-10, IL-4 і IL-5 з ConA-стимульованих МКПК людини при тестуванні в розведенні 1/10 (46,2мкг у тесті). Не був виявлений ефект на рівні IFN- γ , TNF- α або IL-2.

Крім того, несподівано було виявлено, що поліпептиди за даним винаходом демонструють несподівано обмежену експресію в зразках біопсії шкіри і, особливо, у зразках біопсії шкіри, взятих при псоріазі. Загалом процедура полягала в тому, що праймери, специфічні для INSP181, досліджу-

вали з використанням набору приблизно з 100 зразків нормальної тканини людини і уражених захворюванням, що представляють первинні клітини та клітинні лінії, а також 44 зразків біопсії ободової кишки та клубової кишки від індивідумів із запальним захворюванням кишечника та 39 зразків біопсії, взятих з варіантів клінічного випробування IL-18-зв'язувального білка (IL18BP). Отримані результати показані в таблицях 3 і 4 і проілюстровані графічно на Фіг.12 і 13. Несподівано виявилось, що експресія INSP181 відзначається на низькому рівні тільки в зразках шкіри (0,16% від GAPDH) (таблиця 5, Фіг.12) і в зразках біопсії шкіри від пацієнтів із псоріазом (позитивна відповідь у випадку 19/39 зразків) (таблиця 4, Фіг.13). Результати, отримані з використанням другої пари праймерів, специфічних для екзону 4/6 (прямий праймер в екзоні 4 і зворотний праймер в екзоні 6), підтвердили специфічність ефекту для шкіри.

У першому аспекті даний винахід стосується поліпептиду, де вказаний поліпептид:

(i) включає амінокислотну послідовність або складається з амінокислотної послідовності, що представлена у вигляді SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:66 або SEQ ID NO:70;

(ii) являє собою фрагмент, що є ліпокаліном або має спільну антигенну детермінанту з одним або декількома поліпептидами за пунктом (i); або

(iii) являє собою функціональний еквівалент за пунктом (i) або (ii).

Переважно, поліпептид за першим аспектом винаходу складається з амінокислотної послідовності або включає амінокислотну послідовність, що представлена у вигляді SEQ ID NO:18 або SEQ ID NO:24, являє собою її фрагмент, який функціонує як ліпокалін, або має спільну антигенну детермінанту з таким поліпептидом; або є функціональним еквівалентом такого поліпептиду.

Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:2, називається далі в тексті як «поліпептид екзону 1 INSP181». Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:4, називається далі в тексті як «поліпептид екзону 2 INSP181». Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:6, називається далі в тексті як «поліпептид екзону 3 INSP181». Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:8, називається далі в тексті як «поліпептид екзону 3 INSP181-SV1». Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:10, називається далі в тексті як «поліпептид екзону 4 INSP181-SV1». Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:12, називається далі в тексті як «поліпептид екзону 4 INSP181». Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:14, називається далі в тексті як «поліпептид екзону 5 INSP181». Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:16, називається далі в тексті як «поліпептид екзону 6 INSP181».

SEQ ID NO:18 одержують шляхом об'єднання SEQ ID NONO: 2, 4, 6, 12, 14 і 16. Поліпептид, який

має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:18, називається далі в тексті як «поліпептид INSP181».

SEQ ID NO:24 одержують шляхом об'єднання SEQ ID NONO: 2, 4, 8, 10, 14 і 16. Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:18, називається далі в тексті як «поліпептид INSP181-SV1». Білок INSP181-SV1 містить 25 амінокислотних вставок у стартовому кодоні 4.

Другий клон INSP181-SV1 (INP3P181-8Y1-поліморф) був ідентифікований при дослідженні пула, що містить кДНК, отримані зі слинної залози, надниркової залози, ока та універсальної еталонної матриці PHK Stratagene, що містить кДНК INSP181-SV1. Вказаний клон містить нуклеотидні заміщення A275C і G340A, які призводять до амінокислотних заміщень N92T і G114S. Вказані варіанти розглядаються як прояви поліморфізму у послідовності INSP181.

Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:36, називається далі в тексті як «поліпептид-поліморф N92T екзону 3 INSP181» і включає амінокислотне заміщення N92T. Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:38, називається далі в тексті як «поліпептид-поліморф N92T екзону 3 INSP181-SV1» і включає амінокислотне заміщення N92T.

Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:40, називається далі в тексті як «поліпептид-поліморф INSP181N92T». SEQ ID NO:40 одержують шляхом об'єднання SEQ ID NONO: 2, 4, 36, 12, 14 і 16.

Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:44, називається далі в тексті як «поліпептид-поліморф INSP181-SV1 N92T». SEQ ID NO:44 одержують шляхом об'єднання SEQ ID NONO: 2, 4, 38, 10, 14 і 16.

Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:56, називається далі в тексті як «поліпептид-поліморф G114S екзону 3 INSP181-SV1» і включає амінокислотне заміщення G114S.

Поліпептид, який має послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:58, називається далі в тексті як «поліпептид-поліморф INSP181-SV1 G114S». SEQ ID NO:58 одержують шляхом об'єднання SEQ ID NONO: 2, 4, 8, 56, 14 і 16.

Не претендуючи на будь-яку теорію, заявники лише припускають, що поліпептид INSP181, поліпептид INSP181-SV1, поліпептид-поліморф INSP181 N92T, поліпептид-поліморф INSP181-SV1 N92T і поліпептид-поліморф INSP181-SV1 G114S можуть включати HaN-кінці сигнальний пептид з 20 амінокислот.

Екзон 1 у поліпептиді INSP181 і в поліпептиді INSP181-SV1 без цієї передбачуваної сигнальної послідовності показаний у вигляді SEQ ID NO:20 і далі в тексті називається як «зрілий поліпептид екзону 1 INSP181». Послідовність поліпептиду INSP181 без цієї передбачуваної сигнальної послідовності показана у вигляді SEQ ID NO:22 і далі в тексті називається як «зрілий поліпептид INSP181». Послідовність поліпептиду INSP181-SV1 без цієї передбачуваної сигнальної послідовності показана у вигляді SEQ ID NO:26 і далі в тек-

сті називається як «зрілий поліпептид INSP181-SV1». Послідовність поліпептиду-поліморфу INSP181 N92T без цієї передбачуваної сигнальної послідовності показана у вигляді SEQ ID NO:42 і далі в тексті називається як «зрілий поліпептид-поліморф INSP181 N92T». Послідовність поліпептиду-поліморфу INSP181-SV1-N92T без цієї передбачуваної сигнальної послідовності показана у вигляді SEQ ID NO:46 і далі в тексті називається як «зрілий поліпептид INSP181-SV1-N92T». Послідовність поліпептиду-поліморфу INSP181-SV1-G114S без цієї передбачуваної сигнальної послідовності показана у вигляді SEQ ID NO:60 і далі в тексті називається як «зрілий поліпептид INSP181-SV1-N92T».

Послідовність поліпептиду, показана у вигляді SEQ ID NO:66, називається далі в тексті як «поліпептид домену ліпокаліну INSP181» і включає домен ліпокаліну. Послідовність поліпептиду, показана у вигляді SEQ ID NO:70, називається далі в тексті як «поліпептид домену ліпокаліну INSP181-SV1» і включає сплайсинг-варіант домену ліпокаліну.

Поліпептиди за першим аспектом даного винаходу можуть додатково містити гістидинову мітку. Така гістидиніва мітка, переважно, є присутньою у С-кінця даного поліпептиду. Переважно, така гістидиніва мітка містить 1-10 гістидинових залишків (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 залишків). Більш переважно, вказана гістидиніва мітка містить 6 гістидинових залишків. Відповідно, переважними поліпептидами є такі поліпептиди, які включають послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68 і/або SEQ ID NO:72.

Поліпептид, який має послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO:28, називається далі в тексті як «поліпептид INSP181 з гістидиновою міткою». Поліпептид, який має послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO:30, називається далі в тексті як «зрілий поліпептид INSP181 з гістидиновою міткою». Поліпептид, який має послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO:32, називається далі в тексті як «поліпептид INSP181-SV1 з гістидиновою міткою». Поліпептид, який має послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO:34, називається далі в тексті як «зрілий поліпептид INSP181-SV1 з гістидиновою міткою». Поліпептид, який має послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO:48, називається далі в тексті як «поліпептид-поліморф INSP181 N92T з гістидиновою міткою». Поліпептид, який має послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO:50, називається далі в тексті як «зрілий поліпептид-поліморф INSP181 N92T з гістидиновою міткою». Поліпептид, який має послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO:52, називається далі в тексті як «поліпептид-поліморф INSP181-SV1 N92T з гістидиновою міткою». Поліпептид, який має послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO:54, називається далі в тексті як «зрілий поліпептид-поліморф INSP181-SV1 N92T з гістидиновою міткою». Поліпептид, який має послідовність, пред-

ставлену у вигляді SEQ ID NO:62, називається далі в тексті як «поліпептид-поліморф INSP181-SV1 G114S з гістидиновою міткою». Поліпептид, який має послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO:64, називається далі в тексті як «зрілий поліпептид-поліморф INSP181-SV1 G114S з гістидиновою міткою». Поліпептид, який має послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO:68, називається далі в тексті як «поліпептид домену ліпокаліну INSP181 з гістидиновою міткою» і включає домен ліпокаліну з гістидиновою міткою. Поліпептид, який має послідовність, представлену у вигляді SEQ ID NO:72, називається далі в тексті як «поліпептид домену ліпокаліну INSP181-SV1 з гістидиновою міткою» і включає сплайсинг-варіант домену ліпокаліну з гістидиновою міткою.

Термін «поліпептиди INSP181» у контексті даного опису означає поліпептиди, що включають зрілий поліпептид екзону 1 INSP181, поліпептид INSP181, зрілий поліпептид INSP181, поліпептид INSP181-SV1, зрілий поліпептид INSP181-SV1, поліпептид INSP181 з гістидиновою міткою, зрілий поліпептид INSP181 з гістидиновою міткою, поліпептид INSP181-SV1 з гістидиновою міткою, зрілий поліпептид INSP181-SV1 з гістидиновою міткою, поліпептид-поліморф INSP181 N92T, зрілий поліпептид-поліморф INSP181 N92T, поліпептид-поліморф INSP181-SV1-N92T, зрілий поліпептид-поліморф INSP181-SV1-N92T, поліпептид-поліморф INSP181 N92T з гістидиновою міткою, зрілий поліпептид-поліморф INSP181 N92T з гістидиновою міткою, поліпептид-поліморф INSP181-SV1 N92T з гістидиновою міткою, зрілий поліпептид-поліморф INSP181-SV1 N92T з гістидиновою міткою, поліпептид-поліморф INSP181-SV1 G114S з гістидиновою міткою, зрілий поліпептид-поліморф INSP181-SV1 G114S з гістидиновою міткою, поліпептид домену ліпокаліну INSP181 і поліпептид домену лішжаліну INSP181-SV1 і його варіант із гістидиновою міткою. Поліпептиди, включаючи поліпептиди домену ліпокаліну, які містять і N92T, і G114S поліморфні варіанти, також є аспектами даного винаходу.

Поліпептиди INSP181 і INSP181-SV1 містять, як передбачається, однаковий сайт глікозилування за амінокислотою 92 (Фіг.10), що також є місцем локалізації передбачуваного N92T поліморфізму. Заміщення аспарагіну в положенні 92 буде перешкоджати здійсненню N-глікозилування. Наявність або відсутність цукрових фрагментів може впливати на функціонування поліпептидів INSP181.

Автори винаходу відзначили наявність дисульфідного зв'язку між цистеїновими амінокислотними залишками 90 і 181. Поліпептиди за даним винаходом, в яких вказані цистеїнові залишки зв'язані дисульфідним зв'язком, включаються в галузь даного винаходу.

Термін «ліпокалін» стосується молекули, яка містить щонайменше один домен ліпокаліну.

Переважно, термін «ліпокалін» стосується молекули, що містить домен ліпокаліну, яка виявляє з показником е-значення, менше ніж 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,0002, 0,00001, 0,000001 або 0,0000001.

Переважно, термін «ліпокалін» стосується молекули, яка спарюється із HMM, створеним на основі бази даних Pfam entry, що виявляється з показником е-значення, менше ніж 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,0002, 0,00001, 0,000001 або 0,0000001.

Переважно, поліпептид за кожним з вказаних вище аспектів даного винаходу функціонує як ліпокалін. Переважно, домен ліпокаліну кодується ділянкою, що відповідає залишкам 41-189 в амінокислотній послідовності INSP181. Послідовність домену ліпокаліну показана у вигляді SEQ ID NO:66.

Інші поліпептиди за даним винаходом включають фрагменти, які важливі для збереження активності ліпокаліну, і поліпептиди, які включають домен ліпокаліну або складаються з домену ліпокаліну, як показано на Фіг.14 (наприклад, амінокислотні залишки 25-174 або амінокислотні залишки 26-180, або амінокислотні залишки 33-166) і на Фіг.11 (наприклад, амінокислотні залишки 41-189), а також фрагмент, який містить цистеїнові залишки, що формують дисульфідний зв'язок (наприклад, амінокислотні залишки 96-187).

Інший поліпептид за даним винаходом являє собою домен ліпокаліну, розташований між залишками 25 і 181 в INSP181. У поліпептиді INSP181-SV1 домен ліпокаліну розташований між залишками 25 і 206 і включає послідовність, показану у вигляді SEQ ID NO:70.

Термін «функція ліпокаліну» використовується в контексті даного опису для позначення поліпептидів, що включають амінокислотну послідовність або структурні особливості, які можуть бути ідентифіковані як консервативні властивості в поліпептидах сімейства білків ліпокалінів, так що взаємодія такого поліпептиду з його біологічним партнером по суті не буде робити шкідливого впливу в порівнянні з функціонуванням повнорозмірного поліпептиду дикого типу. Зокрема, автори відносять до таких властивостей наявність цистеїнових залишків у певних положеннях поліпептиду, що створює можливість утворення дисульфідних зв'язків.

Ліпокаліни використовуються як діагностичні і прогностичні маркери при різних хворобливих станах. Плазмовий рівень AGP відслідковують у ході вагітності та при проведенні діагностичної та прогностичної оцінки станів, що включають хіміотерапію раку, дисфункцію нирок, інфаркт міокарду, артрит і розсіяний склероз. Ретинол-зв'язувальний білок (RBP) використовують у клінічній практиці як маркер каналцевої реабсорбції в нирці, і аро D є маркером кістозно-фіброзної мастопатії.

Білок залози фон Ебнера також відомий як слізний ліпокалін, слізний преальбумін або VEGP. Аналогічно іншим ліпокалінам VEGP є переносником ретинолу або інших малих гідрофобних сполук. VEGP зв'язує ретинол *in vitro* і, як вважається, виконує антимікробну функцію в оці частково, оскільки він зв'язує довголанцюжкові жирні кислоти, які інгібують активацію лізоциму (Glasgow, 1995 Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 233: 513-522). Даний білок можуть також інактивувати оболонкові віруси, сприяти розподілу по поверхні ліпідної плівки в оці та/або захищати епітелій.

Інший член сімейства ліпокалінів включає білок зв'язування ретиноєвої кислоти в яєчках (ERBP), який гомологічний за просторовою структурою ретинол-зв'язувальному білку в сироватці крові (Newcomer et al. 1990 J. Biol. Chem. 265: 12876-12879). Вважається, що ERBP відіграє важливу роль у дозріванні сперми та проходить через яєчки. Було показано, що ERBP зв'язує великий перелік ретиноїдів, які включають ретинол (вітамін А), ретиналь, ретиніл ацетат, бета-іонон, цис-ретиноїди, бета-каротин, холестерин, терпеноїди, бета-лоніліденацетат, довголанцюжкові складні ефіри ретинолу та ретиноєвої кислоти (Flower, 1996 Biochem. J 318:1-14) *in vivo* і/або *in vitro*. Як було показано, ретиноїди виконують важливу роль у процесах клітинного диференціювання та проліферації, а також у функції зору, у біології розмноження та у секреції слизу. Огляд матеріалів, присвячених ретиноїдам і їх ролі в розвитку захворювань і в підтримці гомеостазу, наведений у роботі Гудмана (Goodman, D., 1984 N. Engl. J. Med. 310: 1023-1031).

Синтаза простагландину D2, будучи членом сімейства ліпокалінів, залучається в синтез простагландину D2 у мозку за рахунок каталізу перетворення простагландину H2 у простагландин D2. Як і інші ліпокаліни, синтаза PD2 є переносником гідрофобних сполук. Синтаза PD2 зв'язує ретинол *in vitro* і, як передбачається, виконує функцію транспортної молекули для секретованих ретиноїдів, які циркулюють у різних рідинах організму, доставляючи їх до відповідних внутрішньоклітинних переносників. Потрапляючи всередину клітин, ретиноїди зв'язуються з димеризованим рецептором, виконуючи в підсумку свою біологічну роль з регуляції різноманітних процесів, таких як морфогенез, диференціювання та мітогенез (Tanaka et al., 1997, *ibid*).

Інші види активності, асоційовані з членами сімейства ліпокалінів, включають антимікробну активність, транспортування феромонів, активність як модуляторів запалення, участь у функції нюху та регуляцію імунної відповіді, а також регуляцію розвитку нервової системи та антибактеріальну активність.

Один з ліпокалінів, асоційованих з модуляцією імунної функції, являє собою ліпокалін, асоційований з желатиназою нейтрофілів (NGAL). NGAL локалізований у специфічних гранулах у нейтрофілах, будучи як у вигляді мономерів, так і димерів (Bartsch et al., 1995 FEBS Letters 357: 255-259). NGAL є типовим ліпокаліном за своєю здатністю зв'язувати малі гідрофобні молекули для транспортування їх через гідрофільні рідини. Хоча фізіологічний ліганд для NGAL ще не ідентифікований, було показано, що він зв'язує бактеріальний фактор хемотаксису FMLP, і це вказує на те, що, як передбачається, дана молекула зв'язує ліпофільні запальні медіатори (Bungaard et al., 1994 Biochem. Biophys. Res. Comm. 202: 1468-1475).

Даний винахід оснований на відкритті того факту, що описувані у винаході поліпептиди здійснюють позитивну регуляцію Th2, більш конкретно, - інтерлейкіну-10 (IL-10), інтерлейкіну-4 (IL-4) і інтерлейкіну-5 (IL-5). Крім того, несподівано було ви-

явлено, що поліпептиди за даним винаходом демонструють несподівано обмежену експресію в зразках біопсії шкіри та, особливо, у зразках біопсії шкіри, взятих при псоріазі.

Імунні захворювання можуть бути розділені на такі, при яких відзначається домінування Т хелперних клітин 1 (Th1) або Т хелперних клітин 2 (Th2). Лікарські засоби можуть впливати на Th1/Th2 баланс, що можна використовувати для модифікації розглянутого аутоімунного захворювання.

У контексті даного опису Th1 захворювання визначається як захворювання, вибране із хвороби Крона, діабету типу I, хвороби Хашимото, хвороби Грейвса (тироїдит), шкірного захворювання Th1 типу, такого як псоріаз або гіперкератозний дерматоз, ревматоїдного артриту, проліферативного гломерулонефриту та гломерулонефриту із клубочками напівмісяцевої форми, розсіяного склерозу, увеїту заднього відділу очного яблука, загоєння рани та/або саркоїдозу.

Переважає, Th1 захворювання являє собою псоріаз.

Переважає, гіперкератозний дерматоз вибирають із псоріазу, червоного пітиріазу та/або порокератозу.

У контексті даного опису Th2 захворювання визначається як захворювання, вибране з алергічних станів, таких як алергічний риніт, астма, шкірного захворювання Th2 типу, такого як плоский червоний лишай, хронічного синуситу, синдрому Сезарі, раку, променевого кератозу, гепатиту С, виразкового коліту, мембранозного гломерулонефриту та/або вірусної інфекції.

Переважає, Th2 захворювання вибирають із atopічного дерматиту, контактного дерматиту, контактної алергії, наприклад, до нікелю або золота, шкірної Т-клітинної лімфоми, atopічної екземи, гострої екземи та/або хронічної екземи.

Переважає, atopічний дерматит являє собою гострий atopічний дерматит.

Переважає, Th2 захворювання являє собою atopічний дерматит.

Переважає, рак вибирають зі шкірної Т-клітинної лімфоми, плоскоклітинної карциноми та/або базальноклітинної карциноми.

Не претендуючи на будь-яку теорію, заявники лише припускають, що поліпептид за даним винаходом, один або як частина білка злиття та/або як фрагмента, може перемикає зсув Т-клітинних цитокінів з Th1 на Th2.

Як такий поліпептид за даним винаходом, один або як частина білка злиття та/або його фрагмента, може використовуватися для лікування Th1 захворювання.

Не претендуючи на будь-яку теорію, заявники лише припускають, що антагоніст, наприклад, антитіло проти поліпептиду за даним винаходом, може перемикає зсув Т-клітинних цитокінів з Th2 на Th1.

Як такий антагоніст, наприклад, антитіло проти поліпептиду за даним винаходом, може використовуватися для лікування Th2 захворювання. Наприклад, посилена Th2 імунна відповідь і утворення цитокінів, таких як IL-4, IL-5 і IL-13, будуть діяти в напрямку індукції алергії та астми (Ngoc et al.

Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2005 Apr; 5(2): 161-6). Як такий антагоніст, наприклад, антитіло проти поліпептиду за даним винаходом, може використовуватися для лікування астми та/або алергії.

Крім стратегії спрямованого впливу на клітинні механізми, при лікуванні псоріазу використовують методи терапії, пов'язані з гуморальною імунотуляцією, здійснюваної за рахунок впливу на наявне в дисбалансі цитокінів домінування цитокінів типу 1 з підвищеним рівнем IL-2, -6, -8, TNF- α або TNF- γ . Вказана модуляція може бути досягнута шляхом введення екзогенних дефіцитних цитокінів типу 2 із протилежним регулюючим впливом, таких як IL-4, -10 і -11, для відхилення процесу диференціювання від продукції Т-клітинних цитокінів типу I до продукції Т-клітинних цитокінів типу II, що стимулює ендogenous диференціювання лімфоцитів типу I до досягнення нормальної відповіді. Не претендуючи на будь-яку теорію, заявники лише припускають, що поліпептиди за даним винаходом можуть функціонувати в такий спосіб.

Лікарські препарати, що модулюють продукцію цитокінів, таких як IL-4 або IL-10, відомі в даній галузі, а введення рекомбінатних цитокінів, таких як IL-4, IL-10 і IL-11, розглядається як спосіб лікування псоріазу (Schleyer et al., J Eur Acad Dermatol Venerol., 2005 Jan; 19(1): 1-20).

Наприклад, на початковій фазі випробувань Ib з використанням різних доз рекомбінатного IL-4 були отримані вражаючі результати, що вказують на анти-псоріатичний ефект препарату (Schleyer et al.). Двадцять людей з 22 пацієнтів, яким протягом 6 тижнів проводилися щотижневі ін'єкції IL-4 у п'ятьох різних дозах, завершили випробування, і в одного пацієнта відзначалися побічні реакції II ступеня. В 18 пацієнтів показник PASI знизився на 60-80% протягом 6 тижнів і протягом 6-тижневого періоду спостережень не відрізнявся. Відзначалася залежність від дози поліпшення у хворих із псоріазом, асоційовані зі зниженням інфільтрації шкіри та з нормалізацією структури епідермісу. Такого роду перші результати випробувань дозволяють думати, що описаний підхід шляхом зсуву імунного дисбалансу може бути дуже вдалою стратегією в лікуванні псоріазу, оскільки торкається винятково недавно активованих Т клітин.

У зоні псоріатичних уражень відзначається відносна недостатність експресії шкірного IL-10. Вказаний Th2 цитокін є потужним інгібітором функцій APC, таких як проліферація Т клітин. Він також пригнічує продукцію цитокіну типу I, включаючи TNF- γ або TNF- α , і в цьому зв'язку, виконує необхідну роль у контролі запальних відповідей шкіри.

Можна вважати, що системне введення IL-10, як і у випадку інших видів традиційної терапії, такої як лікування з використанням похідних складних ефірів фумарової кислоти, місцевого введення аналогів вітаміну D3 і УЧ-опромінення, які діють, серед інших, за механізмом позитивної регуляції ендogenous IL-10, буде ефективним при лікуванні псоріазу за рахунок відносного відновлення балансу цитокінів.

Проведені дослідження показали, що ліпокаліни можуть бути корисні для лікування наступних

захворювань: розлад зору (наприклад, нічна сліпота), розладу імунної системи (наприклад, аутоімунні розлади), запальні стани, запальне захворювання кишечника (IBD), виразковий коліт (UC), хвороба Крона (CD), проктит, клітинно-проліферативні розлади, рак (наприклад, рак молочної залози, шкірна Т-клітинна лімфома, плоскоклітинна карцинома та/або базальноклітинна карцинома), мікробні інфекції (наприклад, вірусні, бактеріальні та грибні інфекції), нашірні хвороби (наприклад, шкірне захворювання, асоційоване з Th1, таке як псоріаз або гіперкератозний дерматоз; шкірне захворювання, асоційоване з Th2, таке як atopічний дерматит, контактний дерматит, контактна алергія, наприклад, до нікелю або золота, шкірна Т-клітинна лімфома, atopічна екзема, гостра екзема та/або хронічна екзема), репродуктивні розлади (наприклад, безпліддя, зокрема, чоловіче безпліддя), дисфункція нирки, інфаркт міокарда, артрит, розсіяний склероз, кістозно-фіброзна мастопатія, регуляція розвитку нервової системи, діабет типу I, хвороба Хашимото, хвороба Грейвса (тироїдит), ревматоїдний артрит, проліферативний і гломерулонефрит із клубочками напівмісяцевої форми, увеїт заднього відділу очного яблука, загоєння рани та/або саркоїдоз, червоний пітіріаз і/або порокератоз, алергічні розлади, такі як алергічний риніт, астма, червоний плоский лишай, хронічний синусит, синдром Сезарі, променевий кератоз, гепатит С, виразковий коліт, мембранозний гломерулонефрит і/або вірусні інфекції.

Вважається, що INSP181 може належати до підродини імунокалінів і що йому властиві всі функціональні властивості імунокалінів, більш конкретно, - властивості глікоделіну (див., наприклад, огляд Logdberg and Wester. Biochim Biophys Acta, 2000 1482 (1-2): 284-97). Члени цього сімейства кодуються генним кластером на ділянці q32-34 хромосоми 9 геному (INSP181) людини на ділянці q34). Глікоделін залучається в процеси запліднення, імунотуляції та диференціювання. Можуть бути виявлені три основні ізоформи глікоделіну (GdA, GdS і GdF), що надають специфічні функціональні властивості та визначають важливість глікозилування для прояву біологічної активності членів підродини імунокалінів.

У документі WO 02/053701 описуються молекули нуклеїнової кислоти, що кодують ліпокалін, і поліпептиди ліпокаліну (більш конкретно - ген EP17 людини), які можуть використовуватися для створення на мишах моделі чоловічого безпліддя, для скринінга розроблювальних лікарських засобів і лікування станів, пов'язаних з безпліддям. У документі DE19807389 описуються моноклональні антитіла проти глікоделіну A, використовувані при лікуванні раку.

Переважаю, активність поліпептиду за даним винаходом, одного або як частини білка злиття або його фрагмента та/або його антагоніста, може бути підтверджена з використанням щонайменше одного з наступних тестів:

а) на моделях раку шкіри, описаних в огляді Одаширо із співавт. (Odashiro et al., Drug Discovery Today: Disease Models 2005; у пресі), або

b) на моделях контактного дерматиту або atopічного екзему, описаних в огляді Гутермута із співавт. (Gutermuth et al., *Drug Discovery Today: Disease Models* 2005; у пресі), або

c) на моделях atopічного дерматиту, описаних в огляді Женга та Жу (Zheng and Zhu, *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005 Jul; 5(4):291-7), або

d) на моделі мишей D6, описаної в роботі Джемисона із співавт. (Jamieson et al., *Nat Immunol.* 2005 Apr; 6(4): 403-11), або

e) за процедурою кількісного тесту, що дозволяє визначити рівень цитокінової секреції клітинами МКПК, стимульованими Con A, описаної в прикладі 5. Більш конкретно, активність поліпептиду за даним винаходом, одного або як частини білка злиття або його фрагмента та/або його антагоніста, може бути підтверджена, якщо виявляється модуляція щонайменше одного з наступних цитокінів: IL-4, IL-5 і/або IL-10. Переважно, модуляції піддаються два (наприклад, IL-4 і IL-5; IL-4 і IL-10; або IL-5 і IL-10) або всі три цитокіни. Переважно, поліпептид за даним винаходом, один або як частина білка злиття або його фрагмента, здійснює позитивну регуляцію одного або декількох вказаних вище цитокінів. Переважно, антагоніст, наприклад, антитіло проти поліпептиду за даним винаходом, здійснює негативну регуляцію одного або декількох вказаних вище цитокінів.

Активність поліпептидів за даним винаходом, наприклад, INSP181, може бути визначена за кожним з методів, наведених у даному описі або відомих у даній галузі.

Поліпептиди за першим аспектом даного винаходу можуть додатково містити гістидинову мітку. Така гістидинова мітка, переважно, є присутньою у С-кінці даного поліпептиду. Переважно, така гістидинова мітка містить 1-10 гістидинових залишків (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 залишків). Більш переважно, вказана гістидинова мітка містить 6 гістидинових залишків.

"Антигенна детермінанта" за винаходом може являти собою частину поліпептиду за винаходом, що зв'язується з антигензв'язуючим сайтом антитіла або з Т-клітинним рецептором (TC). Альтернативно, "антигенна детермінанта" може являти собою сайт на поверхні поліпептиду за винаходом, з яким зв'язується одна молекула антитіла. Загалом кажучи, антиген має декілька або множину різних антигенних детермінант і реагує з антитілами, які мають множину різних специфічностей. Таке антитіло, переважно, є імуноспецифічним до поліпептиду за винаходом. Переважно, вказане антитіло є імуноспецифічним до поліпептиду за винаходом, який не складає частину гібридного білка. Переважно, вказане антитіло є імуноспецифічним до INSP181, INSP181-SV або до його фрагмента. Антигенні детермінанти зазвичай складаються з хімічно активних поверхневих груп молекул, таких як бокові ланцюги амінокислот або цукрів, і можуть мати специфічні тривимірні структури, а також певний заряд. Переважно, термін "антигенна детермінанта" означає конкретну хімічну групу на поліпептиді за винаходом, що є антигенною, тобто виробляє специфічну імунну відповідь.

У другому своєму аспекті даний винахід стосується очищеної молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид за першим аспектом винаходу.

Термін "очищена молекула нуклеїнової кислоти", переважно, означає молекулу нуклеїнової кислоти за винаходом, що (1) відділена щонайменше приблизно від 50% білків, ліпідів, вуглеводів або інших сполук, з якими асоціюється природна повнорозмірна нуклеїнова кислота при її виділенні із клітин-джерел; (2) не зв'язана з усіма полінуклеотидами або з їх частиною, з якими вказана "очищена молекула нуклеїнової кислоти" асоціюється в природі; (3) функціонально приєднана до полінуклеотиду, з яким вона не асоціюється в природі; або (4) не зустрічається в природі як частина більшої полінуклеотидної послідовності. Переважно, виділена молекула нуклеїнової кислоти за винаходом, по суті, не містить кожної(их) іншої(их) домішкової(их) молекули (молекул) нуклеїнової кислоти або інших домішок, які присутні в її природному оточенні та можуть перешкоджати використанню цієї нуклеїнової кислоти для продукування поліпептидів або її терапевтичному, діагностичному або профілактичному застосуванню, або застосуванню з метою дослідження. Переважний варіант винаходу, зокрема, стосується геномних ДНК, які не входять в обсяг даного винаходу. Переважно, геномна ДНК, зокрема, яка має розмір більше ніж 10т.п.н. (тисяч пар нуклеотидів), 50т.п.н., 100т.п.н., 150т.п.н., 200т.п.н., 250т.п.н. або 300т.п.н., не входить в обсяг винаходу. При цьому, переважно, якщо така "очищена молекула нуклеїнової кислоти" складається тільки із кДНК.

Переважно, очищена молекула нуклеїнової кислоти складається з або включає послідовність(ті) нуклеїнової кислоти, представлену в SEQ ID NO:1 (кодує поліпептид екзону 1 INSP181), SEQ ID NO:3 (кодує поліпептид екзону 2 INSP181), SEQ ID NO:5 (кодує поліпептид екзону 3 INSP181), SEQ ID NO:7 (кодує поліпептид екзону 3 INSP181-SV1), SEQ ID NO:9 (кодує поліпептид екзону 4 INSP181-SV1), SEQ ID NO:11 (кодує поліпептид екзону 4 INSP181), SEQ ID NO:13 (кодує поліпептид екзону 5 INSP181), SEQ ID NO:15 (кодує поліпептид екзону 6 INSP181), SEQ ID NO:17 (кодує поліпептид INSP181), SEQ ID NO:19 (кодує зрілий поліпептид екзону 1 INSP181), SEQ ID NO:21 (кодує зрілий поліпептид INSP181), SEQ ID NO:23 (кодує поліпептид INSP181-SV1), SEQ ID NO:22 (кодує поліпептид INSP181-SV1), SEQ ID NO:27 (кодує поліпептид INSP181 з гістидиновою міткою), SEQ ID NO:29 (кодує зрілий поліпептид INSP181-SV1 з гістидиновою міткою), SEQ ID NO:31 (кодує поліпептид INSP181-SV1 з гістидиновою міткою), SEQ ID NO:33 (кодує зрілий поліпептид INSP181-SV1 з гістидиновою міткою), SEQ ID NO:35 (кодує поліпептид-поліморф N92T екзону 3 INSP181), SEQ ID NO:37 (кодує поліпептид-поліморф N92T екзону 3 INSP181-SV1), SEQ ID NO:39 (кодує поліпептид-поліморф INSP181-N92T), SEQ ID NO:41 (кодує зрілий поліпептид-поліморф INSP181-N92T), SEQ ID NO:43 (кодує поліпептид-поліморф INSP181-SV1 N92T), SEQ ID NO:45 (кодує зрілий поліпептид-поліморф INSP181-SV1 N92T).

пептид-поліморф INSP181-SV1 N92T), SEQ ID NO:47 (кодуючої поліпептид-поліморф INSP181 N92T з гістидиновою міткою), SEQ ID NO:49 (кодуючої зрілий поліпептид-поліморф INSP181 N92T з гістидиновою міткою), SEQ ID NO:51 (кодуючої поліпептид-поліморф INSP181-SV1 N92T з гістидиновою міткою), SEQ ID NO:53 (кодуючої зрілий поліпептид-поліморф INSP181-SV1 N92T з гістидиновою міткою), SEQ ID NO:55 (кодуючої поліпептид-поліморф G114S екзону 4 INSP181-SV1), SEQ ID NO:57 (кодуючої поліпептид-поліморф INSP181-SV1 G114S), SEQ ID NO:59 (кодуючої зрілий поліпептид-поліморф INSP181-SV1 G114S), SEQ ID NO:61 (кодуючої поліпептид-поліморф INSP181-SV1 G114S з гістидиновою міткою), SEQ ID NO:63 (кодуючої зрілий поліпептид-поліморф INSP181-SV1 G114S з гістидиновою міткою), SEQ ID NO:65 (альтернативний нуклеотид екзону 2), SEQ ID NO:67 (кодуючої поліпептид домену ліпокаліну INSP181), SEQ ID NO:69 (кодуючої поліпептид домену ліпокаліну INSP181 з гістидиновою міткою), SEQ ID NO:71 (кодуючої поліпептид домену ліпокаліну INSP181-SV1) і/або SEQ ID NO:73 (кодуючої поліпептид домену ліпокаліну INSP181-SV1 з гістидиновою міткою).

У своєму третім аспектом даний винахід стосується очищеної молекули нуклеїнової кислоти, яка гібридизується в умовах високої жорсткості з молекулою нуклеїнової кислоти другого аспекту даного винаходу. Умови гібридизації високої жорсткості визначають як умови інкубування протягом ночі при 42°C у розчині, що містить 50% формамід, 5XSSC (150mM NaCl, 15mM тринатрійцитрат), 50mM фосфат натрію (pH7,6), 5x розчин Денхардта, 10% сульфат декстрану та 20 мікрограм/мл денатурованої фрагментованої ДНК сперми лосося, з наступним промиванням фільтрів в 0,1X SSC приблизно при 65°C.

У своєму четвертому аспекті даний винахід стосується вектора, такого як експресуючий вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти другого або третього аспекту даного винаходу.

У своєму п'ятому аспекті даний винахід стосується клітини-хазяїна, трансформованого вектором четвертого аспекту даного винаходу.

У своєму шостому аспекті даний винахід стосується ліганду, що специфічно зв'язується з поліпептидом за першим аспектом винаходу і який, переважно, інгібує здатність поліпептиду за першим аспектом винаходу переносити малі гідрофобні молекули.

Ліганди для поліпептидів за винаходом можуть мати різні форми, включаючи природні або модифіковані субстрати, ферменти, рецептори, невеликі органічні молекули, такі як невеликі природні або синтетичні органічні молекули розміром до 2000Да, а переважно, 800Да або менше, пептидоміметики, неорганічні молекули, пептиди, поліпептиди, антитіла і їх структурні або функціональні міметики.

Такі сполуки можуть бути ідентифіковані з використанням описаних вище методів аналізу та скринінга.

У своєму сьомому аспекті даний винахід стосується сполуки, яка є ефективною з погляду зміни

експресії природного гена, який кодує поліпептид за першим аспектом винаходу, або з погляду регуляції активності поліпептиду за першим аспектом винаходу.

Сполука за сьомим аспектом винаходу може або підвищувати (служити агоністом), або знижувати (служити антагоністом) рівень експресії гена або активності поліпептиду.

Важливо відзначити, що ідентифікація функції поліпептидів INSP181 дає можливість розробити способи скринінга, що дозволяють ідентифікувати сполуки, ефективні для лікування та/або діагностики захворювань. Ліганди та сполуки за шостим та сьомим аспектами винаходу можуть бути ідентифіковані з використанням таких способів. Ці способи також є аспектами даного винаходу.

Сполуки, ідентифіковані як агоністи поліпептидів за даним винаходом, можуть використовуватися для транспортування малих гідрофобних молекул, *in vitro* або *in vivo*. Наприклад, сполуки-агоністи можуть використовуватися як компоненти деяких відомих середовищ для культивування клітин, для доставки малих гідрофобних молекул у клітини та для захисту їх від руйнування ферментами, які є присутніми у сироватці крові.

Антагоністи (наприклад, антитіла) INSP181, INSP181-SV1, поліморфу INSP181 N92T, поліморфу INSP181-SV1 N92T і/або поліморфу INSP181-G114S можуть використовуватися при лікуванні раку, більш конкретно, - раку, що вражає головний мозок, яєчники, яєчко, селезінку, підшлункову залозу, матку, кров і/або легень.

Переважно, антагоністи (наприклад, антитіла) INSP181-SV1, поліморфу INSP181-SV1 N92T або поліморфу INSP181-SV1 G114S (отримані з використанням кДНК слинної залози, надниркової залози та ока) можуть використовуватися при лікуванні раку, зокрема, раку, що вражає слинні залози, надниркової залози і/або ока.

В іншому своєму аспекті даний винахід стосується застосування гена або поліпептиду INSP181 як мішені для скринінга кандидатів на лікарські засоби-модулятори, а зокрема, лікарських засобів-кандидатів, які мають активність, спрямованої проти розладів, асоційованих з ліпокаліном.

В іншому своєму аспекті даний винахід стосується способів скринінга сполук на можливість їх застосування для лікування розладів, асоційованих з ліпокаліном, де вказані способи включають виявлення здатності вказаної сполуки зв'язуватися з геном або поліпептидом INSP181, або з їхніми фрагментами.

У ще одному своєму аспекті даний винахід стосується способів скринінга сполук на можливість їх застосування для лікування розладів, асоційованих з ліпокаліном, де вказані способи включають аналіз на модуляцію активності гена або поліпептиду INSP181, або їх фрагментів.

У своєму восьмому аспекті даний винахід стосується поліпептиду за першим аспектом даного винаходу або до молекули нуклеїнової кислоти за другим або третім аспектом даного винаходу, або вектора за четвертим аспектом даного винаходу, або клітини-хазяїна за п'ятим аспектом даного винаходу, або ліганду за шостим аспектом даного

винаходу, або сполуки за сьомим аспектом даного винаходу, які можуть бути використані для лікування або діагностики.

Фрагменти сполук за даним винаходом можуть знайти застосування у виробництві лікарського засобу для лікування деяких захворювань, що включають, без обмеження, розлад зору (наприклад, нічну сліпоту), розлади імунної системи (наприклад, аутоімунні розлади), запальні стани, запальне захворювання кишечника (IBD), виразковий коліт (UC), хвороба Крона (CD), проктит, клітинно-проліферативні розлади, рак (наприклад, рак молочної залози, шкірна Т-клітинна лімфома, плоскоклітинна карцинома та/або базальноклітинна карцинома), мікробні інфекції (наприклад, вірусні, бактеріальні та грибові інфекції), емфізему, шкірні хвороби (наприклад, шкірне захворювання, асоційоване з Th1, таке як псоріаз або гіперкератозний дерматоз; шкірне захворювання, асоційоване з Th2, таке як атопічний дерматит, контактний дерматит, контактна алергія, наприклад, до нікелю або золота, шкірна Т-клітинна лімфома, атопічна екзема, гостра екзема та/або хронічна екзема), репродуктивні розлади (наприклад, безпліддя, зокрема, чоловіче безпліддя), дисфункція нирки, інфаркт міокарда, артрит, кістозно-фіброзна мастопатія, регуляція розвитку нервової системи, діабет типу I, хвороба Хашимото, хвороба Грейвса (тироїдит), ревматоїдний артрит, проліферативний гломерулонефрит і гломерулонефрит із клубочками напівмісяцевої форми, увеїт заднього відділу очного яблука, загоєнні рани та/або саркоїдоз, червоний пітиріаз і/або порокератоз, алергічні розлади, такі як алергічний риніт, астма, плоский червоний лишай, хронічний синусит, синдром Сезарі, актинічний кератоз, гепатит С, виразковий коліт, мембранозний гломерулонефрит і/або вірусні інфекції.

Наведені далі в прикладах аналізи можуть використовуватися для ідентифікації терапевтично активних фрагментів.

У своєму дев'ятому аспекті даний винахід стосується способу діагностики захворювань у пацієнта, що включає оцінку рівня експресії природного гена, який кодує поліпептид за першим аспектом винаходу, або оцінку активності поліпептиду за першим аспектом винаходу в тканині вказаного пацієнта та порівняння вказаного рівня експресії або активності з контрольним рівнем, де рівень, який відрізняється від вказаного контрольного рівня, є показником захворювання. Такий спосіб, переважно, здійснюють *in vitro*. Аналогічні способи можуть бути використані для моніторингу терапевтичного лікування захворювання в пацієнта, де зміна рівня експресії або активності молекули поліпептиду або нуклеїнової кислоти протягом певного періоду часу в порівнянні з контрольним рівнем служить показником рецидиву захворювання.

Більш висока експресія ліпокалінів може бути виявлена в пацієнтів зі шкірними захворюваннями, такими як псоріаз, у порівнянні з пацієнтами, які не мають такого захворювання, або в пацієнтів, які піддавалися впливу алергенів. Наприклад, у пацієнтів, які піддавалися впливу нікелю або золота (контактна алергія) визначають значне підвищення

рівню желатинази нейтрофілів, асоційованої з ліпокаліном (NGAL) (Moller et al. Contact Dermatitis. 1999 Apr; 40(4):200-4). Позитивна регуляція пептидів/поліпептидів, таких як NGAL, також виявляється при загоєнні рани та може служити поясненням експресії цих пептидів/поліпептидів при псоріазі та загоєнні рани (Sorensen et al. J. Immunol. 2003 Jun 1; 170 (11): 5583-9). Крім того, виражена індукція NGAL в епідермісі спостерігається у випадку багатьох шкірних розладів, які характеризуються розбалансуванням процесу диференціації епітелію, таких як псоріаз, червоний пітиріаз і плоскоклітинна карцинома (Mallbris et al. Exp Dermatol. 2002 Dec; 11(6): 584-91). Так, Маллбріс із співавт. (Mallbris et al.) роблять висновок про те, що NGAL є маркером розбалансування процесу диференціації кератиноцитів у шкірі людини.

Таким чином, суперекспресія деяких поліпептидів за даним винаходом може корелювати із прогресуванням захворювання та/або може служити прогностичним показником його плинності.

Вважається, що деякі тканини ссавців при захворюванні Th1 типу або при захворюванні Th2 типу містять більш високу кількість копій гена для білка INSP181 і експресують істотно підвищені рівні білка INSP181 і мПНК, що кодує білок INSP181, у порівнянні з відповідним, «стандартним» ссавцем, тобто зі ссавцем того ж виду, але який не має захворювання Th1 типу або захворювання Th2 типу. Підвищені рівні білка INSP181 визначаються в деяких рідинах організму (наприклад, у сироватці крові, плазмі, сечі, синовіальній рідині та спінальній рідині) і/або в шкірі ссавців, які мають захворювання Th1 типу або захворювання Th2 типу, у порівнянні з його рівнем у сироватці/шкірі ссавців того ж виду, але які не мають захворювання Th1 типу або захворювання Th2 типу. Таким чином, даний винахід стосується способу, використововуваного при діагностиці захворювання Th1 типу або захворювання Th2 типу, що включає аналіз рівня експресії гена, який кодує білок INSP181, або кількості копій гена в клітинах ссавця, зокрема, у шкірі або в рідині організму, і порівняння рівня експресії даного гена або кількості копій гена зі стандартними значеннями рівня експресії гена або кількості копій гена, де підвищений рівень експресії гена або кількості копій гена в порівнянні зі стандартними значеннями є показником деяких захворювань Th1 типу або захворювань Th2 типу.

У тому випадку, коли захворювання Th1 типу або захворювання Th2 типу вже діагностовано традиційними методами, то даний винахід може використовуватися для цілей прогнозу.

Фраза «аналіз рівня експресії гена, що кодує білок INSP181» стосується якісного або кількісного вимірювання або оцінки рівня білка INSP181 або рівня мПНК, що кодує INSP181, у першому біологічному зразку або безпосередньо (наприклад, шляхом визначення або оцінки абсолютного рівня білка або рівня мПНК), або опосередковано (наприклад, шляхом порівняння з рівнем білка або рівнем мПНК у другому біологічному зразку). Фраза «аналіз кількості копій гена, що кодує білок INSP181» стосується якісного або кількісного вимі-

рювання, або оцінки кількості копій гена, що кодує INSP181, у першому біологічному зразку або безпосередньо (наприклад, шляхом визначення або оцінки абсолютного значення копій гена), або опосередковано (наприклад, шляхом порівняння з кількістю копій гена, що кодує білок INSP181, у другому біологічному зразку).

Переважно, рівень білка INSP181, рівень мРНК або кількість копій гена в першому біологічному зразку вимірюють або оцінюють і порівнюють зі стандартним значенням рівня білка INSP181, рівня мРНК або кількості копій гена, де стандарт відбирають із другого біологічного зразка, отриманого від індивідуума, який не має захворювання Th1 типу або захворювання Th2 типу. Альтернативно, у тому випадку, коли даний спосіб використовують як прогностичний показник, і перший, і другий біологічний зразки можуть бути відібрані від індивідуумів, які мають захворювання Th1 типу або захворювання Th2 типу, і можуть бути виміряні відповідні значення рівнів експресії або кількості копій для визначення прогнозу захворювання. Як відомо в даній галузі, коли відомо стандартне значення рівня білка INSP181, рівня мРНК або кількості копій гена, вказане значення може використовуватися повторно, як стандарт, для порівняння.

Термін «біологічний зразок» означає будь-який біологічний зразок, отриманий від індивідуума, з клітинної лінії, культури тканини або іншого джерела, що містить білок INSP181 або відповідну мРНК, переважно, зі шкіри. Способи одержання зразків біопсії із тканини та рідин тіла ссавців відомі в даній галузі. У тому випадку, коли біологічний зразок повинен включати мРНК, зразок біопсії тканини є переважним джерелом.

Даний винахід використовується для виявлення захворювання Th1 типу або захворювання Th2 типу в ссавців. Зокрема, даний винахід використовується при діагностиці або для прогностичної оцінки у ссавців вказаних вище типів Th1 захворювання або Th2 захворювання. Переважні ссавці включають мавп, бджіл, кішок, собак, корів, свиней, коней, кроликів і людей. Особливо переважними є люди.

Один можливий спосіб детекції поліпептидів за першим аспектом винаходу включає стадії: (a) контактування ліганду за шостим аспектом винаходу, такого як антитіло, з біологічним зразком в умовах, які підходять для утворення комплексу ліганд-поліпептид; і (b) детекції вказаного комплексу.

Що стосується дев'ятого аспекту винаходу, то в цьому зв'язку слід зазначити, що для детекції аномальних рівнів білка існують різні методи, відомі читачу-фахівцю, такі як методи гібридизації нуклеїнової кислоти з короткими зондами, методи аналізу на точкову мутацію, метод ампліфікації за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і методи з використанням антитіл. Подібні методи можуть бути використані в короткий або тривалий період часу, що дозволяє проводити моніторинг терапевтичного лікування захворювання у пацієнта. Даний винахід також стосується наборів, які можуть бути використані у вказаних методах діагностики захворювання.

У своєму десятому аспекті даний винахід стосується використання поліпептиду за першим аспектом винаходу як ліпокаліну.

Поліпептиди за даним винаходом можуть використовуватися для зв'язування невеликих молекул жирних кислот, наприклад, у крові або тканинах, для модуляції їх біологічної функції. Поліпептиди за даним винаходом можуть використовуватися для транспортування ретиноїдів або стероїдів до рецепторів, зокрема, як складова частина терапії при раці молочної залози, емфіземі та захворюваннях шкіри і відіграють важливу роль у репродуктивному процесі. Інші варіанти використання включають модуляцію протизапальних відповідей, активність як мікробного агента, або як підсилювача ферментативної функції, або як самої ферментоподібної молекули.

Поліпептиди за даним винаходом можуть використовуватися завдяки своїм протимікробним властивостям. Протимікробна активність може бути вимірювана *in vitro* з використанням культури клітин або *in vivo* шляхом введення молекул за даним винаходом в організм тварини відповідної моделі. Аналізи на виявлення протимікробної активності є специфічними для конкретних мікробів і в основному відомі фахівцям у даній галузі. Наприклад, аналіз *in vivo* на протимікробну активність проводиться шляхом внутрішньочеревинної інюкуляції мишам патогенних мікроорганізмів у відповідному бульйонному середовищі. Одразу після інюкуляції вводять композицію, яка містить даний поліпептид, і реєструють рівень смертності протягом 7 наступних днів. В основному введення проводять внутрішньовенним, підшкірним, внутрішньочеревинним способом або через рот. Див., наприклад, роботу Musiek et al., *Antimicrobial Agents Chemother.* 3:40, 1973, в якій міститься обговорення методів аналізу протимікробних агентів *in vivo* та *in vitro*.

Активність поліпептидів за даним винаходом може бути виміряна з використанням великої кількості методів аналізу, які дозволяють визначити їх здатність зв'язувати малі гідрофобні молекули. Такі методи аналізу включають, без обмеження, методи аналізу, оснований на визначенні змін в інтенсивності флуоресценції (Cogan et al., *Eur. J. Biochem.* 65: 71-78, 1976) і рівноважний діаліз водорозчинних сполук (Hase et al., *J. Biochem.* 79: 373-380, 1976).

Інші варіанти використання молекул за даним винаходом включають використання їх як системи доставки для транспортування та/або стабілізації малих ліпофільних молекул. Наприклад, молекули за даним винаходом можуть використовуватися для мікроінкапсулювання малої ліпофільної молекули, яка утворює активний фармакологічний агент, і в такий спосіб захищають даний агент від впливів екстремальних значень рН у кишці від впливу потужних травних ферментів і наслідків непроникувості мембран шлунково-кишкового тракту для активного інгредієнта. Інші переваги інкапсулювання фармакологічного агента включають попередження передчасної активації агента або захист його від агресивного середовища шлунка.

Останнім часом стали використовувати складчасту структуру ліпокаліну для створення білків, які мають специфічність для неприродних лігандів. Такі сконструйовані ліпокаліни можуть розглядатися як міметики антитіл і одержали, у цьому зв'язку, назву «антикаліни» (див. огляд у роботі Skerra, *Biochim Biophys Acta*. 2000 Oct 18; 1482(1-2): 337-50). Відповідно, поліпептиди за даним винаходом можуть знайти застосування в синтезі «антикалінів».

У своєму одинадцятому аспекті даний винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить поліпептид за першим аспектом винаходу або молекулу нуклеїнової кислоти за другим або третім аспектом винаходу, або вектор за четвертим аспектом винаходу, або клітини-хазяїна за п'ятим аспектом винаходу, або ліганд за шостим аспектом винаходу, або сполуку за сьомим аспектом даного винаходу, у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

У своєму дванадцятому аспекті даний винахід стосується поліпептиду за першим аспектом винаходу або молекули нуклеїнової кислоти за другим або третім аспектом винаходу, або вектора за четвертим аспектом винаходу, або клітини-хазяїна за п'ятим аспектом винаходу, або ліганду за шостим аспектом винаходу, або сполуки за сьомим аспектом винаходу, які можуть бути використані з метою готування лікарського засобу для діагностики або лікування захворювань, включаючи розлад зору (наприклад, нічну сліпоту), імунні системні розлади (наприклад, аутоімунні розлади), запальну хворобу кишечника (IBD), виразковий коліт (UC), хворобу Крона (CD), проктит, клітинно-проліферативні розлади, рак (наприклад, рак молочної залози), мікробні інфекції (наприклад, вірусні, бактеріальні та грибові інфекції), емфізему, захворювання шкіри, репродуктивні розлади (наприклад, безпліддя, зокрема, чоловіче безпліддя), дисфункцію нирки, інфаркт міокарда, артрит, розсіяний склероз, кісточно-фіброзну мастопатію та регуляцію нервової системи.

У своєму тринадцятому аспекті даний винахід стосується способу лікування захворювання в пацієнта, який передбачає введення вказаному пацієнту поліпептиду за першим аспектом винаходу, або молекули нуклеїнової кислоти за другим або третім аспектом винаходу, або вектора за четвертим аспектом винаходу, або клітини-хазяїна за п'ятим аспектом винаходу, або ліганду за шостим аспектом винаходу, або сполуки за сьомим аспектом винаходу.

Поліпептиди за даним винаходом можуть використовуватися самі по собі як компоненти гібридних білків, таких як гібридний білок Fc, і/або в поєднанні з одним або декількома агентами, які діють як негативні регулятори Th1. Антагоністи, наприклад, антитіло проти поліпептиду за даним винаходом, можуть використовуватися самі по собі або в поєднанні з одним або декількома агентами, які діють як негативні регулятори Th2.

Агенти, які діють як негативні регулятори Th1 або Th2, відомі в даній галузі та не обмежуються вказаними нижче агентами.

Переважно, агент, який діє як негативний регулятор Th1, вибирають із клітинних імуномодуляторів, гуморальних імуномодуляторів, поліпептиду T, *Mycobacterium vaccae*, тазаротену, бексаротену, троглітазону, ліарозолу, рамбазолу, аргініну, оксиду азоту, циклоспорину, метотрексату, аналогів вітаміну D3, ретиноїдів, кортикостероїдів, антраліну, дьогтю, псоралену плюс UVA (PUVA), куркуміну, поліподіуму, лейкотомасу, глюкостероїду, такого як преднізон і/або засобів, що спричиняють вплив на баланс Th1/Th2 (адаптогени), таких як ізофлавоної сої, рослинні стероли, стероліни, пробіотики та/або прегненолон.

Переважно, клітинний імуномодулятор вибирають із DAB389IL-2, мікофеноляту мофетилу, VX-497, лефлуноміду, ефалізумабу, OKTcd4a, CTLA4-Ig, MEDI 507, LFA3TIP, даклізумабу, базиліксимабу, такролімусу, пімекролімусу та/або сиролімусу.

Переважно, гуморальний імуномодулятор вибирають із IL-4, IL-10, IL-11, інфліксимабу, етанерцепту, онерцепту та/або адаліумабу.

Переважно, агент, який діє як негативний регулятор Th2, вибирають із антагоністів (наприклад, антитіл) хемокінового рецептора CCR3 або CCR4, антагоністів CXCR4, анти-TARC, інгібіторів молекули адгезії VLA-4, агоністів PPAR-γ, циклопентанових простагландинів, тіазолодиніонів, SB203580, SB239063, RWJ67657, аналогів вітаміну D3, глюкостероїдів, мікобактерій, анти-IL-5/IL-13/IL-9, розчинного IL-4R, інгібіторів CD80/86, ліганду ICOS, агоніста Toll-подібного рецептора (TLR) 9, такого як CpG ДНК, CTLA4-Ig, антисмислових олігонуклеотидів GAT A3, *Mycobacterium bacillus Calmette-Guerin* (BCG), *Mycobacterium vaccae*, анти-Ig, агоністів бета рецептора, кортикостероїдів, насіння периллі, кверцетину, лютеоліну, ізофлавоноів, глюкостероїду, такого як преднізон і/або засобів, які гармонізують баланс Th1/Th2 (адаптогенів), таких як ізофлавоної сої, рослинні стероли, стероліни, пробіотики та/або прегненолон. У тому випадку, якщо захворювання, при яких у даного пацієнта рівень експресії природного гена, який кодує поліпептид за першим аспектом винаходу, або рівень активності поліпептиду за першим аспектом винаходу нижче, ніж відповідний рівень експресії або активності у здорового пацієнта, то поліпептид, молекула нуклеїнової кислоти, ліганд або сполука, які вводять вказаному пацієнту, повинні мати агоністичні властивості. І навпаки, у випадку, якщо захворювання, при яких у даного пацієнта рівень експресії природного гена, який кодує поліпептид за першим аспектом винаходу, або рівень активності поліпептиду за першим аспектом винаходу вище, ніж відповідний рівень експресії або активності у здорового пацієнта, то поліпептид, молекула нуклеїнової кислоти, ліганд або сполука, які вводять вказаному пацієнту, повинні мати антагоністичні властивості. Прикладами таких антагоністів є молекули антисмислової нуклеїнової кислоти, рибозими та ліганди, такі як антитіла.

Поліпептиди INSP181 являють собою ліпокаліни, а тому вони відіграють певну роль у розвитку багатьох патологічних станів. Антагоністи поліпептидів INSP181 складають особливий інтерес, оскі-

льки вони дозволяють сприятливо впливати на динаміку патологічних станів.

У своєму чотирнадцятому аспекті даний винахід стосується трансгенних тварин або тварин, які є дефіцитними за поліпептидом першого аспекту даного винаходу та не є людиною, і які були трансформовані так, що вони експресують більш високі або більш низькі рівні вказаного поліпептиду, або взагалі не експресують такого поліпептиду. Вказані трансгенні тварини є найбільш придатними моделями для дослідження захворювань і можуть бути також використані в способах скринінга з метою ідентифікації сполук, які є ефективними для лікування або діагностики даного захворювання.

Використовуваний тут термін "функціональний еквівалент" означає молекулу білка або нуклеїнової кислоти, що має функціональні або структурні властивості, в основному, аналогічні властивостям молекули поліпептиду або нуклеїнової кислоти за винаходом. Функціональний еквівалент білка може містити модифікації, якщо такі модифікації необхідні для здійснення конкретної функції. Термін "функціональний еквівалент" включає фрагменти, мутанти, гібриди, варіанти, аналоги або хімічні похідні молекули.

Переважно, "функціональним еквівалентом" може бути молекула білка або нуклеїнової кислоти, що має будь-яку одну або декілька функціональних активностей поліпептидів за винаходом.

Переважно, "функціональним еквівалентом" може бути молекула білка або нуклеїнової кислоти, що має активність, яка, по суті, аналогічна активності INSP181 або його фрагментів, вимірюваною у відповідному аналізі на біологічну активність або функцію. Переважно, "функціональним еквівалентом" може бути молекула білка або нуклеїнової кислоти, яка має активність, що ідентична активності або перевищує активність INSP181 або його фрагментів, вимірювану у відповідному аналізі на біологічну активність або функцію. Переважно, "функціональним еквівалентом" може бути молекула білка або нуклеїнової кислоти, яка має активність, що становить 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100% або більше від активності INSP181 або його фрагментів, вимірюваної у відповідному аналізі на біологічну активність або функцію.

Переважно, "функціональним еквівалентом" може бути білок або поліпептид, який має *in vivo* або *in vitro* активність, що, по суті, аналогічна активності поліпептидів за винаходом. Переважно, "функціональним еквівалентом" може бути білок або поліпептид, здатний взаємодіяти з іншими клітинними або позаклітинними молекулами за механізмом, який, по суті, аналогічний механізму взаємодії відповідної частини поліпептидів за винаходом. Так, наприклад, в імуноаналізі, "функціональний еквівалент" може сприяти зниженню здатності до зв'язування антитіла з відповідним пептидом (тобто пептидом, який має модифіковану амінокислотну послідовність, а тому є "функціональним еквівалентом") поліпептиду за винаходом, або із самим поліпептидом за винаходом, де вказане антитіло виробляється проти відповідного пептиду поліпептиду за винаходом. Еквімолярна

концентрація вказаного функціонального еквівалента буде знижувати рівень вищезгаданого зв'язування відповідного пептиду щонайменше приблизно на 5%, переважно, приблизно на 5%-10%, більш переважно, приблизно на 10%-25%, ще більш переважно, приблизно на 25%-30%, і найбільш переважно, приблизно на 40%-50%.

Так, наприклад, функціональні еквіваленти можуть бути повністю функціональними, або в них може бути відсутньою одна або декілька активностей. Таким чином, відповідно до даного винаходу, модифікації можуть впливати на функцію, наприклад, на активності поліпептиду, які підтверджують їх ідентифікацію як домену ліпокаліну.

Різні стандартні методи та процедури, які можуть застосовуватися для здійсненні винаходу, систематизовані нижче. При цьому слід зазначити, що даний винахід не обмежується описаними конкретними методами, протоколами, клітинними лініями, векторами та реагентами. Слід також зазначити, що використовується тут термінологія застосовується тільки для опису конкретних варіантів винаходу, і ця термінологія не повинна розглядатися як обмеження обсягу даного винаходу. Обсяг винаходу обмежений тільки прикладеною формулою винаходу.

У даному описі використовуються стандартні скорочення, прийняті для позначення нуклеотидів і амінокислот.

Якщо це не обговорено особливо, то для здійснення даного винаходу використовуються стандартні методи молекулярної біології та мікробіології, методи рекомбінантних ДНК і методи імунології, які добре відомі фахівцям у даній галузі.

Більш повний опис вказаних методів можна знайти в літературі. Так, наприклад, найбільш придатні описи, які можуть бути використані як консультація, наводяться в наступних роботах: Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989), DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription and Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A. Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the Methods in Enzymology series (Academic Press, Inc.), especially volumes 154 & 155; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer and Walker, eds. 1987, Academic Press, London); Scopes (1987) Protein Purification: Principles and Practice, Second Edition (Springer Verlag, N. Y.); and Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds. 1986).

Використовуваний тут термін "поліпептид" включає будь-який пептид або білок, який містить дві або більше амінокислоти, зв'язані одна з одною пептидними зв'язками або модифікованих пептидними зв'язками, тобто пептидними ізостерами. Цей термін стосується як коротких ланцюгів

(пептидів або поліпептидів), так і більш довгих ланцюгів (білків).

Поліпептид даного винаходу може бути присутнім у формі зрілого білка, або він може бути присутнім у вигляді пре-, про- або препро-білка, який може бути активований шляхом відщиплення пре-, про- або препро-частини цього білка із продукуванням активного зрілого поліпептиду. У таких поліпептидах пре-, про- або препро-послідовність може являти собою лідерну або секреторну послідовність, або вона може являти собою послідовність, використовувану для очищення зрілої поліпептидної послідовності.

Поліпептид за першим аспектом винаходу може утворювати частину гібридного білка. Так, наприклад, часто виявляється переважним, щоб даний поліпептид включав одну або декілька додаткових амінокислотних послідовностей, які можуть містити секреторну або лідерну послідовність, про-послідовність, послідовність, які полегшують очищення, або послідовності, які надають білку більш високу стабільність, наприклад, під час рекомбінантного продукування. Альтернативно або додатково, зрілий поліпептид може бути приєднаний до іншої сполуки, такої як сполука, яка збільшує час напівжиття вказаного поліпептиду (наприклад, поліетиленгліколю).

Зокрема, гібридний білок поліпептиду може містити одну або декілька додаткових амінокислотних послідовностей і фрагментів поліпептидів за даним винаходом. Переважно, вказаний фрагмент є доменом ліпокаліну, наприклад, представленим у вигляді SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:70 або у вигляді ділянки амінокислот 25-174, амінокислот 26-180, амінокислот 33-166 або амінокислот 41-189 в SEQ ID NO: 18 або ділянки амінокислот 25-206 в SEQ ID NO:24.

Переважно, поліпептид за даним винаходом, який містить послідовність, що гомологічна щонайменше на 85% поліпептиду INSP181, є гібридним білком. Такі гібридні білки можуть бути отримані шляхом клонування полінуклеотиду, який кодує поліпептид, що містить послідовність, яка гомологічна щонайменше на 85% поліпептиду INSP181, у рамці зчитування з послідовностями, що кодують гетеро логічну послідовність.

Використовуваний тут термін «гетерологічний» означає будь-який поліпептид, який відрізняється від поліпептиду INSP181 людини. Приклади гетерологічних послідовностей, які можуть міститися в гібридних білках, на аміно- або карбокси-кінці, включають: позаклітинні домени зв'язаного з мембраною білка, константні ділянки імуноглобуліну (Fc ділянки), домени мультимеризації, домени позаклітинних білків, сигнальні послідовності, експортні послідовності та послідовності, які дозволяють проводити очищення за методом афінної хроматографії.

Багато з наведених гетерологічних послідовностей комерційно доступні у вигляді плазмід експресії, оскільки вказані послідовності зазвичай включаються в гібридні білки, для того, щоб одержати додаткові властивості, не порушивши істотно специфічної біологічної активності злитого з ними білка (Terpe K., 2003, Appl Microbiol Biotechnol, 60:

523-33). Приклади таких додаткових властивостей включають збільшення напівжиття у фізіологічних рідинах, позаклітинну локалізацію або полегшення процедури очищення за рахунок наявності тяжа з гістидинів, які утворюють так звану «гістидинову мітку» (Gentz et al. 1989, Proc Natl Acad Sci USA, 86: 821-4), або «НА» мітки, епітопу, отриманого з білка гемаглютиніну вірусу грипу (Wilson et al. 1994, Cell, 37: 767-78). При необхідності гетерологічна послідовність може бути вилучена при протеолітичному розщепленні, наприклад, шляхом вбудовування сайту протеолітичного розщеплення між білком і гетерологічною послідовністю, з наступною обробкою очищеного гібридного білка відповідною протеазою. Вказані властивості особливо важливі у випадку гібридних білків, оскільки полегшують їх одержання та використання при виготовленні фармацевтичних композицій. Так, наприклад, використаний у прикладах білок (зрілий поліпептид INSP181; SEQ ID NO: 22) був очищений за процедурою, що включає приєднання гекса-гістидинового пептиду до карбокси-кінця INSP181. У тому випадку, коли гібридний білок включає ділянку імуноглобуліну, вказаний гібрид може бути отриманий шляхом прямого приєднання компонентів або шляхом їх приєднання за допомогою короткого лінкерного пептиду, довжина якого може становити щонайменше 1-3 амінокислотних залишки або більше, наприклад, 13 амінокислотних залишків. Вказаним лінкером може бути, наприклад, трипептид з послідовністю E-F-M (Glu-Phe-Met) або лінкерна послідовність, що складається з 13 амінокислот і містить послідовність Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, вбудовану між послідовністю речовин за даним винаходом та послідовністю імуноглобуліну. Отриманий гібридний білок має поліпшені властивості, такі як більш тривалий час його присутності у фізіологічних рідинах (наприклад, збільшений час напівжиття), підвищена питома активність, підвищений рівень експресії або здатність вказаного гібридного білка легко піддаватися очищенню.

У переважному варіанті винаходу білок приєднують до константної ділянки молекули Ig. Переважно, такий білок приєднують до ділянок важкого ланцюга, таких як домени CH2 і CH3, наприклад, IgG1 людини.

Для одержання гібридних білків за винаходом можуть бути також використані і інші ізоформи Ig, такі як ізоформи IgG2 або IgG4, і ізоформи інших класів Ig, таких як, наприклад, IgM або IgA. Гібридні білки можуть бути мономерними або мультимерними, а також гетеро- або гомомультимерними.

В іншому переважному варіанті винаходу функціональне похідне включає щонайменше один фрагмент, приєднаний до однієї або декількох функціональних груп, які представлені у вигляді одного або декількох бокових ланцюгів на амінокислотних залишках. Переважно, вказаним фрагментом є поліетиленовий фрагмент (ПЕГ). ПЕГілювання може бути проведене з використанням відомих методів, таких як методи, опрісані, наприклад, в WO 99/55377.

Поліпептиди можуть містити амінокислоти, які відрізняються від 20 амінокислот, що кодується генами, і які є модифікованими або в результаті природних процесів, таких як посттрансляційний процесинг, або в результаті застосування хімічних методів модифікації, добре відомих фахівцям. Прикладами відомих модифікацій, які можуть бути здійснені в поліпептидах даного винаходу, є глікозилювання, приєднання ліпиду, сульфонування, гамма-карбоксілювання, наприклад, залишків глутамінової кислоти, гідроксильовання та ADP-рибозильовання. Іншими можливими модифікаціями є ацетилювання, ацилювання, амідуювання, ковалентне приєднання флавіну, ковалентне приєднання молекули гему, ковалентне приєднання нуклеотиду або нуклеотидного похідного, ковалентне приєднання фосфатидилінозиту, перехресне зв'язування, циклізація, утворення дисульфідного зв'язку, деметилювання, утворення ковалентних перехресних зв'язків, утворення цистеїну, утворення піроглутамату, формілювання, утворення GPI-якоря, йодування, метилювання, міристоїлювання, окислювання, протеолітичний процесинг, фосфорильовання, пренілювання, рацемізація, селеноїлювання, приєднання амінокислот до білків, опосередковане переносом РІЖ, таке як аргінілювання, та убіхітинізація.

Модифікації можуть бути присутнім у будь-якій ділянці поліпептиду, включаючи пептидний кістяк, амінокислотні бокові ланцюги та аміно- або карбокси-кінці. Дійсно, блокування аміно- або карбокси-кінця в поліпептиді, або одного та іншого, за допомогою ковалентної модифікації є звичайним процесом, що відбувається в природних і синтетичних поліпептидах, і такі модифікації можуть бути присутнім у поліпептидах даного винаходу.

Модифікації, які присутні в поліпептиді, у більшості випадків будуть залежати від способу одержання даного поліпептиду. Для поліпептидів, отриманих рекомбінантним методом, природа та ступінь модифікації, по більшій частині, буде визначатися здатністю до посттрансляційної модифікації конкретної клітини-хазяїна та присутністю сигналів модифікації в амінокислотній послідовності розглянутого поліпептиду. Так, наприклад, характер глікозилювання може варіюватися у клітин-хазяїв різного типу.

Поліпептиди даного винаходу можуть бути отримані будь-яким придатним способом. Такими поліпептидами є виділені природні поліпептиди (наприклад, виділені із клітинної культури), поліпептиди, продуковані рекомбінантним методом (включаючи гібридні білки), синтетичні поліпептиди або поліпептиди, продуковані з використанням комбінації цих методів.

Функціонально еквівалентні поліпептиди першого аспекту даного винаходу можуть являти собою поліпептиди, гомологічні поліпептиду INSP181. Два поліпептиди можуть бути визначені використовуваним тут терміном "гомологічні", якщо послідовність одного із цих поліпептидів має досить високий ступінь ідентичності або подібності з послідовністю іншого поліпептиду. Термін "ідентичність" означає, що в будь-якому конкретному

положенні послідовностей, які співставляють, ці дві послідовності мають ідентичні амінокислотні залишки. Термін "подібність" означає, що в будь-якому конкретному положенні послідовностей, які співставляють, ці дві послідовності мають амінокислотні залишки аналогічного типу. Ступінь ідентичності та подібності може бути легко обчислений (Computational Molecular Biology, Lesk A. M. ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing Informatics and Genome Projects, Smith D. W. ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin A. M. & Griffin H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G. Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov M. & Devereux J. eds, M. Stockton Press, New York, 1991).

Тому гомологічними поліпептидами є природні біологічні варіанти (наприклад, алельні варіанти або варіанти поліпептидів, які утворилися в результаті географічних змін видів, від яких ці поліпептиди походять), і мутанти (такі як мутанти, що містять амінокислотні заміни, інсерції або делеції) поліпептидів INSP181. Такими мутантами можуть бути поліпептиди, в яких один або кілька амінокислотних залишків замінені консервативним або неконсервативним амінокислотним залишком (переважно, консервативним амінокислотним залишком), і такий замінений амінокислотний залишок може бути, а може і не бути, залишком, що кодується генетичним кодом. Зазвичай такі заміни відбуваються між Ala, Val, Leu і Ile; між Ser і Thr; між кислотними залишками Asp і Glu; між Asn і Gln; між основними залишками Lys і Arg; або між ароматичними залишками Phe і Tyr. Особливо переважними є варіанти, в яких декілька, тобто від 5 до 10, від 1 до 5, від 1 до 3, від 1 до 2 амінокислот або тільки одна амінокислота є заміненими, делетованими або доданими в будь-якій комбінації. Особливо переважними є "мовчазні" заміни, додавання та делеції, які не впливають на властивості та активність вказаного білка. Також переважними є консервативні заміни.

Такими мутантами також є поліпептиди, в яких один або декілька амінокислотних залишків мають групу-замісник.

Відповідно до даного винаходу, будь-яка заміна повинна бути, переважно, "консервативною" або "припустимою" заміною, що зазвичай визначають як заміну, що вводить амінокислоти, які мають аналогічні хімічні властивості (наприклад, основна позитивно заряджена амінокислота повинна бути замінена іншою основною, позитивно зарядженою амінокислотою), які є достатніми для збереження структури та біологічної функції даної молекули.

У літературі описана множина моделей, за допомогою яких може бути здійснений відбір консервативних амінокислотних замін, виходячи зі статистичних і фізико-хімічних досліджень послідовності та/або структури білків (Rogov S. I. і Nekrasov A. N., 2001). Експерименти з конструювання білків показали, що використання специфічних підпослідовностей амінокислот дозволяє продукувати білки з відповідною укладкою та активними білками і

класифікувати амінокислотні "синонімічні" заміни, які можуть легко адаптуватися до білкової структури, і які можуть бути використані для детекції функціональних і структурних гомологів і паралогів (Murphy L. R. et al., 2000). Групи синонімічних амінокислот і групи більш переважних синонімічних амінокислот представлені в таблиці 1.

У поліпептиди за винаходом також можуть бути введені в різних цілях специфічні неконсервативні мутації. Мутації, які знижують афінність CD24-подібного білка, допускають можливість повторного використання цих поліпептидів, а також їх застосування в інших цілях, що потенційно підвищує їх терапевтичну ефективність. (Robinson C. R., 2002). Імуногенні епітопи, фактично присутні в поліпептидах за винаходом, можуть бути використані для розробки вакцин (Stevanovic S., 2002), або вони можуть бути вилучені шляхом модифікації їх послідовності відомими методами відбору мутацій, які підвищують стабільність білка, і їх корекції (van den Burg B. & Eijssink V, 2002; WO 02/05146, WO 00/34317 і WO 98/52976).

Переважаючою альтернативою синонімічним групам для амінокислотних похідних, включених у пептидоміметики, є групи, визначені в таблиці 2. Невичерпний список амінокислотних похідних також включає аміноізомасляну кислоту (Aib), гідроксипролін (Hyp), 1,2,3,4-Тетрагідроізохінолін-3-СООН, індолін-2-карбонову кислоту, 4-дифторпролін, L-тіазолідин-4-карбонову кислоту, L-гомопролін, 3,4-дегідропролін, 3,4-дигідроксифенілаланін, циклогексилгліцин і фенілгліцин.

Термін "амінокислотне похідне" означає амінокислоту, яка не входить в 20 кодованих генетичним кодом природних амінокислот, або хімічну молекулу, подібну до такої амінокислоти. Зокрема, таке амінокислотне похідне може містити заміщені або незаміщені молекули, молекули із прямим ланцюгом, молекули з розгалуженим ланцюгом або циклоалкільні молекули, а також може включати один або декілька гетероатомів. Вказані амінокислотні похідні можуть бути отримані *de novo*, або вони можуть бути взяті з комерційно доступних джерел (Calbiochem-Novabiochem A. G., Switzerland; Bachem, USA).

Різні методи включення не-природних амінокислотних похідних у білки з використанням *in vitro* та *in vivo* систем трансляції для зондування та/або поліпшення структури та функції білків описані в літературі (Dougherty D. A., 2000). Методи синтезу та одержання пептид омиметиків, а також не-пептидоміметиків також добре відомі фахівцям (Golebiowski A. et al., 2001; Hruby V. J. & Balse P. M., 2000; Sawyer T. K. "Structure Based Drug Design", edited by Veerapandian P., Marcel Dekker Inc., pg. 557-663, 1997).

Зазвичай вважається, що два поліпептиди, які мають більше ніж 30%-у ідентичність, є функціонально еквівалентними. Переважно, щоб послідовності функціонально еквівалентних поліпептидів за першим аспектом винаходу були більш ніж на 70% або на 80% ідентичні послідовностям поліпептидів INSP181 або їх активних фрагментів. Більше переважними є поліпептиди, що мають ступінь

ідентичності більше ніж 85%, 90%, 95%, 98%, 98,5%, 99% або 99,5%, відповідно.

Функціонально еквівалентними поліпептидами за першим аспектом винаходу можуть бути також поліпептиди, які були ідентифіковані із застосуванням одного або декількох методів структурного співставлення первинних послідовностей шляхом їх вирівнювання. Так, наприклад, технологія інформаційної обробки потоку геномних даних (Inpharmatica Genome Threader™), яка становить один з аспектів способу пошуку, використовуваних для генерування бази даних пошуку Biopendium, може бути застосована (див. WO 01/67507) для ідентифікації поліпептидів з невідомими функціями, у відношенні яких, незважаючи на їх низький ступінь ідентичності у порівнянні з поліпептидами екзону INSP181 або поліпептидом INSP181 (SEQ ID NO:14 і SEQ ID NO:18), висловлюється припущення, що вони являють собою ліпокаліни, де вказане припущення ґрунтується на їх значній структурній гомології з поліпептидами екзону INSP181, поліпептидом INSP181, поліпептидом INSP-SV1, (поліпептидом INSP-SV1), зрілим поліпептидом INSP181, зрілим поліпептидом INSP-SV1, поліпептидом-поліморфом INSP181 N92T, зрілим поліпептидом-поліморфом INSP181, поліпептидом-поліморфом INSP181-SV1 N92T, зрілим поліпептидом-поліморфом INSP181 N92T, поліпептидом-поліморфом INSP181-SV1G114S або зрілим поліпептидом-поліморфом INSP181-SV1G114S.

Термін "значна структурна гомологія" означає, що технологія Inpharmatica Genome Threader™ дозволяє передбачити структурну гомологію двох білків з вірогідністю, принаймні, 10%, переважно, принаймні, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% і вище. Імовірнісне значення за технологією Inpharmatica Genome Threader™ обчислюють у такий спосіб. Спочатку проводять серію порівнянь у межах технології Inpharmatica Genome Threader™ із використанням тільки послідовностей з відомою структурою. Деякі з порівнянь проводять між білками, у відношенні яких відомо, що вони є близькоспорідненими білками (на основі їх структури). Для цього був використаний інформаційний потік по невральній мережі, який обробили відповідним чином, для того, щоб найкращим способом провести грань між близькоспорідненими та неспорідненими варіантами, використовуючи для цього структурну класифікацію CATH (www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath). У результаті, дані по невральній мережі були ранжовані за балами від 0 до 1. При цьому, оскільки кількість близькоспоріднених білків і кількість неспоріднених білків була відома, було можливо розподілити результати аналізу невральної мережі по пакетах і емпірично обчислити відсоток коректних результатів. Аналогічно, у випадку пошукової бази даних Biopendium, для будь-якого точного пророкування береться бал, взятий з результатів аналізу невральної мережі, і відсоток довірчості вказує, наскільки успішним було використання Inpharmatica Genome Threader™ для обробки/аналізу досліджуваної серії.

Поліпептиди за першим аспектом винаходу також включають фрагменти поліпептидів INSP181

і фрагменти функціональних еквівалентів поліпептидів INSP181, за умови, що ці фрагменти є ліпокалінами або мають загальну антигенну детермінанту з поліпептидом INSP181, зрілим поліпептидом INSP181, поліпептидом INSP181-SV1, зрілим поліпептидом INSP181-SV1, поліпептидом-поліморфом INSP181 N92T, зрілим поліпептидом-поліморфом INSP181, поліпептидом-поліморфом INSP181-SV1 N92T, зрілим поліпептидом-поліморфом INSP181 N92T, поліпептидом-поліморфом INSP181-SV1G114S, зрілим поліпептидом-поліморфом INSP181-SV1G114S, доменом ліпокаліну rNSP181 або доменом ліпокаліну INSP181-SV1.

Приклади фрагментів, які демонструють активність ліпокалінів, включають такі фрагменти, які містять або складаються з домен (домену) ліпокаліну, що представлений у вигляді SEQ IDNO: 66, або послідовності (послідовностей), як показано на Фіг.12 (тобто амінокислоти на ділянці 25-174, амінокислоти на ділянці 26-180 і/або амінокислоти на ділянці 33-166 повнорозмірних послідовностей INSP181), а також фрагменти (фрагментів), які містять цистеїнові залишки, що утворюють дисульфідні зв'язки (тобто амінокислоти на ділянці 96-187 кожної з повнорозмірних послідовностей INSP181). Переважно, дисульфідний зв'язок утворюється між цистеїновими залишками в положеннях амінокислот 90 і 181.

Використовуваний тут термін "фрагмент" означає поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка є ідентичною частині, але не всій, амінокислотної послідовності поліпептидів INSP181, або одному з їх функціональних еквівалентів. Ці фрагменти повинні містити, принаймні, η суміжних амінокислот даної послідовності, і залежно від конкретної послідовності, вказане число n , переважно, дорівнює 7 або більше (наприклад, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 або більше). Невеликі фрагменти можуть утворювати антигенну детермінанту.

Довжина фрагментів за даним винаходом становить 1-100 амінокислот, переважно, 5-50, більш переважно, 7-20 амінокислот.

Довжина молекул нуклеїнової кислоти за винаходом, становить переважно 10-1000 нуклеотидів, переважно 50-800 нуклеотидів, переважно 100-600 нуклеотидів, переважно 200-550 нуклеотидів, переважно 300-500 нуклеотидів.

Довжина поліпептидів за винаходом становить переважно 5-500 амінокислот, переважно 50-400 амінокислот, переважно 100-300 амінокислот, переважно 150-250 амінокислот.

Фрагменти повнорозмірних поліпептидів INSP181 можуть складатися з комбінацій 2 або 3, 4, 5... послідовностей суміжних екзонів у послідовностях поліпептидів INSP181, відповідно.

Вказані екзони можуть бути об'єднані з іншими зрілими фрагментами за даним винаходом. Такі комбінації включають, наприклад, екзони 1 і 2 і т.д. Вказані фрагменти включаються в обсяг даного винаходу. Фрагменти можуть також складатися з комбінацій різних доменів білка INSP181. Наприклад, фрагмент може складатися з комбінацій різних доменів ліпокаліну INSP181, як було відзначено

вище. Вказані фрагменти можуть бути присутніми у "вільній формі", тобто вони можуть не бути частиною іншого поліпептиду або не бути приєднаними до інших амінокислот або поліпептидів, або вони можуть входити до складу більшого поліпептиду, частину або ділянку якого вони утворюють. Якщо фрагмент даного винаходу входить до складу більшого поліпептиду, то найбільш переважно, щоб такий фрагмент утворював одну неперервну ділянку. Так, наприклад, деякі переважні варіанти даного винаходу стосуються фрагмента, який має пре- і/або про-поліпептидну ділянку, приєднану до аміно-кінця вказаного фрагмента, і/або додаткову ділянку, приєднану до карбоксильного кінця цього фрагмента. Однак до складу одного більшого поліпептиду можуть входити кілька фрагментів.

Поліпептиди даного винаходу або їх імуногенні фрагменти (які містять, принаймні, одну антигенну детермінанту) можуть бути використані для генерування лігандів, таких як поліклональні або моноклональні антитіла, які мають імуноспецифічність до таких поліпептидів. Вказані антитіла можуть бути використані для виділення або для ідентифікації клонів, які експресують поліпептиди даного винаходу, або для очищення даних поліпептидів афінною хроматографією. Як зовсім очевидно для будь-якого читача-фахівця, такі антитіла, крім інших застосувань, можуть бути також використані як діагностичні або терапевтичні засоби.

Термін "імуноспецифічний" означає, що дані антитіла мають, в основному, більш високу афінність до поліпептидів даного винаходу, ніж до інших споріднених поліпептидів, описаних раніше. Використовуваний тут термін "антитіло" означає інтактні молекули, а також їх фрагменти, такі як Fab, F(ab')₂ і Fv, які здатні зв'язуватися з розглянутою антигенною детермінантою. Такі антитіла зв'язуються з поліпептидами першого аспекту даного винаходу.

Під поняттям "значно більш висока афінність" автори розуміють помітно більш високу афінність до поліпептиду за винаходом у порівнянні з афінністю інших відомих споріднених поліпептидів, таких як ліпокаліни.

При цьому, переважно, щоб афінність стосовно поліпептиду за винаходом щонайменше в 1,5, 2, 5, 10, 100, 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ разів або більше перевищувала афінність у порівнянні з іншими спорідненими поліпептидами, відомими з рівня техніки.

При цьому, переважно, щоб афінність стосовно поліпептиду за винаходом значно перевищувала афінність стосовно відомих ліпокалінів.

При цьому, переважно, щоб афінність стосовно поліпептиду за винаходом значно перевищувала афінність стосовно природних ліпокалінів.

Якщо переважними є поліклональні антитіла, то вибраний ссавець, такий як миша, кролик, коза або кінь, може бути імунізований поліпептидом за першим аспектом винаходу. Поліпептид, використовуваний для імунізації тварини, може бути отриманий методами рекомбінантних ДНК, або він може бути синтезований методом хімічного синтезу. Якщо необхідно, то даний поліпептид може бути

кон'югований з білком-носієм. Зазвичай використовуваними носіями, до яких можуть бути хімічно приєднані дані поліпептиди, є альбумін бичачої сироватки, тироглобулін і гемоціанін лімфи равлика. Такий зв'язаний поліпептид може бути потім використаний для імунізації тварини. Сироватку, взятую в імунізованій тварини, збирають і обробляють відомими методами, наприклад, імуноафінною хроматографією.

Моноклональні антитіла проти поліпептидів за першим аспектом винаходу можуть бути легко отримані фахівцем у даній галузі. Загальна методика одержання моноклональних антитіл з використанням гібридомної технології добре відома фахівцям (див. наприклад, Kohler G. & Milstein, C. *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor et al., *Immunology Today* 4:72(1983); Cole et al., 77-96, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985)).

Панелі моноклональних антитіл, продукованих проти поліпептидів за першим аспектом винаходу, можуть бути скриновані на різні властивості, тобто на ізотоп, епітоп, афінність і т.п. Моноклональні антитіла є особливо придатними для очищення окремих поліпептидів, проти яких вони спрямовані. Альтернативно, гени, які кодують потрібні моноклональні антитіла, можуть бути виділені з гібридом, наприклад, методами ПЛР, відомими фахівцям, а також вони можуть бути клоновані та експресовані у відповідних векторах.

Можуть бути також використані і химерні антитіла, в яких варіабельні ділянки не-людини з'єднані або лігвані з константними ділянками людини (див. наприклад, Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3439 (1987)).

Ці антитіла можуть бути модифіковані так, щоб вони були менш імуногенними для індивідуума, наприклад, шляхом їх "гуманізації" (див., Jones et al., *Nature*, 321, 522 (1986); Verhoeyen et al., *Science*, 239, 1534 (1988); Kabat et al., *J. Immunol.*, 147, 1709 (1991); Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 10029 (1989); Gorman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 34181 (1991) and Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9, 421 (1991)). Використовуваний тут термін "гуманізоване антитіло" означає молекули антитіла, в яких амінокислоти CDR та інші вибрані амінокислоти у варіабельних доменах важкого та/або легкого ланцюгів донорного антитіла не-людини були замінені еквівалентними амінокислотами антитіла людини. Таким чином, гуманізоване антитіло має близьку подібність із антитілом людини, але, при цьому, воно має здатність зв'язуватися з донорним антитілом.

В іншому альтернативному варіанті винаходу таким антитілом може бути "біспецифічне" антитіло, тобто антитіло, яке має два різних антиген-зв'язуючих домени, кожний з яких має специфічність до різних епітопів.

Для відбору генів, які кодують антитіла, що мають здатність зв'язуватися з поліпептидами за винаходом, або з набору ПЛР-ампліфікованих V-генів лімфоцитів людини, скринюваних на здатність виробляти відповідні антитіла, або з бібліотеки "ненавчених" лімфоцитів може бути використана техніка фагового дисплею (McCafferty J. et al.

(1990), *Nature* 348, 552-554; Marks J. et al., (1992) *Biotechnology* 10, 779-783). Афінність цих антитіл може бути також підвищена шляхом перестановки ланцюгів (Clackson T. et al. (1991) *Nature* 352, 624-628).

Антитіла, генеровані вищеописаними методами, незалежно від того, чи є вони поліклональними або моноклональними, мають і інші цінні властивості, тобто вони можуть бути використані як реагенти в імуноаналізах, радіоімуноаналізах (RIA) або твердофазних імуноферментних аналізах (ELISA). Для використання в цих цілях, антитіла можуть бути позначені аналітично детектованим реагентом, таким як радіоізотоп, флуоресцентна молекула або фермент.

Переважними молекулами нуклеїнової кислоти за другим та третім аспектом винаходу є молекули, які кодують поліпептидні послідовності, представлені в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 i/або SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66 або SEQ ID NO:68 і функціонально еквівалентні поліпептиди. Ці молекули нуклеїнової кислоти можуть бути використані в способах і з метою, описаною у даній заявці. Молекули нуклеїнової кислоти за винаходом, переважно, містять, принаймні, п суміжних куклеотидів в описаних тут послідовностях, де п, залежно від конкретної послідовності, переважно, дорівнює 10 або більше (наприклад, 12, 14, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40 або більше).

Молекулами нуклеїнової кислоти за винаходом також є послідовності, комплементарні послідовностям молекул нуклеїнової кислоти, описаних вище (наприклад, для використання як антисмислові послідовності або як зонди).

Молекули нуклеїнової кислоти за винаходом можуть бути присутніми у формі РНК, такої як мРНК, або у формі ДНК, включаючи, наприклад, кДНК, синтетичну ДНК або геномну ДНК. Такі молекули нуклеїнової кислоти можуть бути отримані методами клонування, хімічного синтезу або їх комбінацією. Молекули нуклеїнової кислоти можуть бути отримані, наприклад, методом хімічного синтезу, таким як твердофазний фосфорамідитний хімічний синтез, виділення з геномних або кДНК-бібліотек або виділення з відповідного організму. РНК-молекули можуть бути, в основному, генеровані шляхом *in vitro*-або *in vivo*-транскрипції ДНК-послідовностей.

Молекули нуклеїнової кислоти можуть бути дволанцюжковими або одноланцюжковими. Одноланцюжковою ДНК може бути кодуючий ланцюг, так само відомий, як смислової ланцюг, або некодуючий ланцюг, яка також називається антисмисловим ланцюгом.

Термін "молекула нуклеїнової кислоти" також охоплює аналоги ДНК і РНК, такі як аналоги, які

містять модифіковані кістяки та зв'язані з пептидом нуклеїнові кислоти (PNA). Використовуваний тут термін "PNA" означає антисмислову молекулу або антиген, який містить олігонуклеотид, що складається, принаймні, з п'яти нуклеотидів і приєднаний до пептидного кістяка з амінокислотних залишків, які, переважно, закінчуються лізином. Цей кінцевий лізин надає даній композиції розчинність. PNA можуть бути ПЕГільовані для продовження їх часу життя в клітині, де вони переважно зв'язуються з комплементарною одноланцюжковою ДНК і РНК і припиняють елонгацію транскрипта (Nielsen P. E. et al. (1993) *Anticancer Drug Des.* 8:53-63).

Молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид за винаходом, може бути ідентична кодуєчій послідовності однієї або декількох описаних тут молекул нуклеїнової кислоти.

Ці молекули можуть також мати різкі послідовності, які, внаслідок виродженості генетичного коду, кодують поліпептид, представлений у кожній з послідовностей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66 або SEQ ID NO:68, і функціонально еквівалентні поліпептиди.

Такими молекулами нуклеїнової кислоти можуть бути, але не обмежуються ними, послідовність, яка кодує тільки зрілий поліпептид; послідовність, яка кодує зрілий поліпептид, і додаткові кодуєчі послідовності, такі як послідовності, які кодують лідерну або секреторну послідовність, таку як про-, пре- або препро-поліпептидну послідовність; послідовність, яка кодує зрілий поліпептид з вищезгаданими додатковими кодуєчими послідовностями, що кодують, або без них, або разом з іншими додатковими послідовностями, включаючи некодуєчі 5'- і 3'-послідовності, такі як транскрибовані нетрансльовані послідовності, які відіграють певну роль у транскрипції (включаючи сигнали термінації), у зв'язуванні з рибосомою та у забезпеченні стабільності мРНК. Молекулами нуклеїнової кислоти можуть бути також допоміжні послідовності, які кодують додаткові амінокислоти, такі як амінокислоти, що мають додаткові функціональні властивості.

Молекули нуклеїнової кислоти за другим та третім аспектам винаходу можуть також кодувати фрагменти або функціональні еквіваленти поліпептидів і фрагментів за першим аспектом винаходу. Вказана молекула нуклеїнової кислоти може являти собою природний варіант, такий як природний алельний варіант, або така молекула може являти собою варіант, який не зустрічається в природі. Вказані не-природні варіанти молекули нуклеїнової кислоти можуть бути отримані методами мутагенезу, включаючи методи, застосовувані до мо-

лекул нуклеїнової кислоти, до клітин або до цілих організмів.

Серед розглянутих варіантів є варіанти, які відрізняються від вищезгаданих молекул нуклеїнової кислоти тим, що вони мають нуклеотидні заміни, делеції або інсерції. Такі заміни, делеції або інсерції можуть бути зроблені в одному або декількох нуклеотидах. Вказані варіанти можуть бути модифіковані в кодуєчій або в не-кодуєчій ділянці, або в тій і іншій ділянці. Альтерації в кодуєчих ділянках можуть призводити до консервативних або неконсервативних амінокислотних заміні, делецій або інсерцій.

Молекули нуклеїнової кислоти за винаходом можуть бути також сконструйовані методами, в основному, відомими фахівцям, включаючи, залежно від цілей застосування, модифікацію клонування, процесинг і/або експресію генного продукту (поліпептиду). Перестановка ДНК шляхом рандомізованої фрагментації та повторної зборки генних фрагментів і синтетичних олігонуклеотидів за допомогою ПЛР являє собою технологію, що може бути використана для конструювання нуклеотидних послідовностей. Сайт-спрямований мутагенез може бути використаний для введення нових рестрикційних сайтів, зміни характеру глікозилювання, зміни переваги кодонів, продукування варіантів сплайсинга, введення мутацій і т.п.

Молекули нуклеїнової кислоти, які кодують поліпептид за першим аспектом винаходу, можуть бути лігровані з гетерологічною послідовністю так, щоб отримана комбінована молекула нуклеїнової кислоти кодувала гібридний білок. Такі комбіновані молекули нуклеїнової кислоти входять у другий або третій аспект даного винаходу. Так, наприклад, для скринінга пептидних бібліотек на інгібітори активності вказаного поліпептиду з використанням такої комбінованої молекули нуклеїнової кислоти може виявитися корисним здійснення експресії гібридного білка, який може розпізнаватися комерційно доступним антитілом. Гібридний білок може бути також сконструйований так, щоб він містив сайт розщеплення, локалізований між послідовністю поліпептиду за винаходом та послідовністю гетерологічного білка, і щоб такий поліпептид міг бути відщеплений і виділений із вказаного гетерологічного білка.

Молекулами нуклеїнової кислоти за винаходом можуть бути також антисмислові молекули, які є частково комплементарними молекулам нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептиди за винаходом, а тому вони гібридизуються з кодуєчими молекулами нуклеїнової кислоти (гібридизація). Відповідно до методів, відомих середньому фахівцю в даній галузі, такі антисмислові молекули, наприклад, олігонуклеотиди, можуть бути сконструйовані так, щоб вони розпізнавали потрібну нуклеїнову кислоту, що кодує поліпептид за винаходом, специфічно зв'язувалися з цією нуклеїновою кислотою та, тим самим, запобігали її транскрипції (див. наприклад, Cohen J. S., *Trends in Pharm. Sci.*, 10, 435 (1989), Okano, J. *Neurochem.* 56, 560 (1991); O'Connor, J. *Neurochem.* 56, 560 (1991); Lee et al. *Nucleic Acids Res* 6, 3073 (1979);

Cooney et al., Science 241, 456 (1988); Dervan et al., Science 251, 1360 (1991)).

Використовуваний тут термін "гібридизація" означає приєднання двох молекул нуклеїнової кислоти одна до одної за допомогою водневих зв'язків. Зазвичай одна молекула може бути фіксована на твердому носії, а інша молекула може перебувати в розчині у вільному стані. Потім ці дві молекули можуть бути піддані контакту одна з одною в умовах, які сприяють утворенню водневого зв'язку. Факторами, що впливають на утворення таких зв'язків, є: тип і об'єм розчинника; температура реакції; час гібридизації; перемішування; присутність агентів, які блокують неспецифічне зв'язування молекули в рідкій фазі із твердим носієм (реагент Денхардта або BLOTTO); концентрація молекул; використання сполук, які підвищують швидкість асоціації молекул (сульфату декстрану або поліетиленгіколю); і жорсткість умов промивання після гібридизації (Sambrook et al., [див. вище]).

Інгібування гібридизації повністю комплементарної молекули з молекулою-мішенню може бути оцінене з використанням гібридизаційного аналізу, відомого фахівцям (Sambrook et al. [див. вище]). У високій мірі гомологічна молекула буде потім конкурувати з повністю гомологічною молекулою за зв'язування з молекулою-мішенню та інгібувати це зв'язування в різних умовах жорсткості, як описано в Wahl G. M. і S. L. Berger (1987; Methods Enzymol. 152:399-407) і Kimmel A. R. (1987; Methods Enzymol. 152:507-511).

Термін "жорсткість" означає умови реакції гібридизації, які сприяють асоціації молекул з більшою подібністю, але не сприяють асоціації молекул, які відрізняються. Умови гібридизації високої жорсткості визначають як умови інкубування протягом ночі при 42°C у розчині, що містить 50% формамід, 5XSSC (150mM NaCl, 15mM тринатрійцитрат), 50mM фосфат натрію (pH7,6), 5x розчин Денхардта, 10% сульфат декстрану та 20 мікрограм/мл денатурованої фрагментованої ДНК сперми лосося, з наступним промиванням фільтрів в 0ДХ SSC приблизно при 65°C. Умови низької жорсткості передбачають реакцію гібридизації, здійснювану при 35°C (Sambrook et al. [див. вище]). Переважними умовами гібридизації є умови гібридизації високої жорсткості.

У переважних варіантах цього аспекту даний винахід стосується молекул нуклеїнової кислоти, які, по всій своїй довжині, принаймні, на 70% ідентичні молекулі нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид INSP181 (SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66 або SEQ ID NO:68), і молекулам нуклеїнової кислоти, які, в основному, комплементарні вказа-

ним молекулам нуклеїнової кислоти. Відповідно до цього аспекту даного винаходу, переважно, щоб молекула нуклеїнової кислоти містила ділянку, яка по всій своїй довжині щонайменше на 80% ідентична молекулі нуклеїнової кислоти, яка має послідовність, представлену в SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67 або SEQ ID NO:69, або, щоб молекула нуклеїнової кислоти була комплементарна вказаній молекулі. При цьому особливо переважно, щоб молекули нуклеїнової кислоти, по всій своїй довжині, були щонайменше на 90%, переважно щонайменше на 95%, більш переважно щонайменше на 98%, 98,5%, 99% або більше 99%, ідентичні молекулі нуклеїнової кислоти. Переважними варіантами цього аспекту є молекули нуклеїнової кислоти, які кодують поліпептиди, що мають, в основному, таку ж біологічну функцію або активність, як і поліпептид INSP181, зрілий поліпептид INSP181, поліпептид INSP181-SV1, зрілий поліпептид INSP181-SV1, поліпептид-поліморф INSP181 N92T, зрілий поліпептид-поліморф INSP181, поліпептид-поліморф INSP181-SV1 N92T, зрілий поліпептид-поліморф INSP181 N92T, поліпептид-поліморф INSP181-SV1G114S, зрілий поліпептид-поліморф INSP181-SV1G114S або поліпептид домену ліпокаліну HSTSP181.

Даний винахід стосується способу детекції молекули нуклеїнової кислоти за винаходом, що включає стадії: (а) контактування нуклеїнового зонда за винаходом з біологічним зразком в умовах гібридизації, які сприяють утворенню дуплексів; і (b) детекції кожного з таких утворених дуплексів.

Як буде додатково обговорюватися нижче у зв'язку з аналізами, які можуть бути використані відповідно до даного винаходу, молекула нуклеїнової кислоти, описана вище, може бути використана як гібридизаційний зонд для РНК, кДНК або геномної ДНК із метою виділення повнорозмірних кДНК і геномних клонів, які кодують поліпептиди INSP181, і з метою виділення кДНК і геномних клонів гомологічних та ортологічних генів, які мають високу міру подібності з генами, які кодують ці поліпептиди.

У цьому зв'язку, поряд з іншими відомими методами, можуть бути використані методи, описані та обговорювані нижче як ілюстрація. Методи секвенування та аналізу ДНК добре відомі та, в основному, доступні фахівцям, і можуть бути реально використані для здійснення багатьох варіантів за винаходом, обговорюваних у даній заявці. У вказаних методах можуть використовуватися ферменти, такі як фрагмент Кленова ДНК-полімерази I, секвеназа (US Biochemical Corp., Cleveland, OH), полімераза Taq (Perkin Elmer), термостабільна

полімераза T7 (Amersham, Chicago, IL), або комбінація таких полімераз і коригуючі екзонуклеази, такі як екзонуклеази, присутні в ELONGASE Amplification System, і які постачаються Gibco/BRL (Gaithersburg, MD). Спосіб секвенування може бути, переважно, автоматизований з використанням пристроїв, таких як апарат Hamilton Micro Lab 2200 (Hamilton, Reno, NV), термоямка Peltier Thermal Cycler (PTC200; MJ Research, Watertown, MA), каталізатор ABI і ДНК-секвенаторк 373 і 377 DNA Sequencers (Perkin Elmer).

Одним з методів виділення молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид з функцією, еквівалентною функції поліпептидів INSP181, є зондування бібліотеки геномних ДНК або кДНК природним, або штучно сконструйованим зондом відповідно до стандартних процедур, відомих фахівцям (див., наприклад, "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al. (eds). Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, 1989, 1992). Особливо придатними є зонди, які містять щонайменше 15, переважно щонайменше 30, а більш переважно щонайменше 50 основ, які безперервно ідуть одна за одною, які відповідають або комплементарні послідовностям нуклеїнової кислоти, яка походить від відповідного гена, що кодує (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67 і/або SEQ ID NO:69). Для полегшення ідентифікації такі зонди можуть бути позначені аналітично детектованим реагентом. Придатними реагентами є, але не обмежуються ними, радіоізотопи, флуоресцентні барвники та ферменти, здатні каталізувати утворення детектованого продукту. З використанням цих зондів середній фахівець у даній галузі може самостійно виділити комплементарні копії полінуклеотидів геномної ДНК, кДНК або РНК, які кодують білки, які представляють інтерес, що походять від різних джерел, наприклад, людини, ссавця або інших тварин, і скринувати ці джерела на присутність споріднених послідовностей, наприклад, окремих членів сімейства, типу та/або підтипу.

У багатьох випадках виділені кДНК-послідовності будуть неповними, тобто, у цих послідовностях, ділянка, яка кодує поліпептид, буде сильно обрізана, зазвичай у 5'-кінця. Для одержання повнорозмірних кДНК або для подовження коротких кДНК існує кілька методів. Такі послідовності можна подовжити з використанням неповної нуклеотидної послідовності та із застосуванням різних відомих методів детекції вище розташованих послідовностей, таких як промотори та регуляторні елементи. Так, наприклад, одним з методів, що може бути використаний у цьому випадку, є метод швидкої ампліфікації кДНК-кінців (RACE;

див., наприклад, Frohman et al., PNAS USA 85, 8998-9002, 1998). Недавно розроблені модифікації цієї технології, проілюстровані Marathon T. M. (Clontech Laboratories Inc.), значно спростили пошук більш довгих кДНК. Для пошуку невідомої послідовності нуклеїнової кислоти, яка є суміжною з відомим локусом, може бути використаний трохи модифікований метод, який називається "сайт-рестрикційною" ПЛР і передбачає використання універсальних праймерів (Sarkar G. (1993) PCR Methods Applic. 2:318-322). Для ампліфікації або для подовження послідовностей з використанням різних праймерів, отриманих на основі відомої галузі, може бути також використана зворотна ПЛР (Triglia T. et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:8186). Іншим методом, який може бути використаний у цьому випадку, є ПЛР "із захопленням", що являє собою ПЛР-ампліфікацію ДНК-фрагментів, суміжних з відомою послідовністю в штучній хромосомній ДНК людини та дріжджів (Lagerstrom M. et al., (1991) PCR Methods Applic. 1, 111-119). Іншим методом, що може бути використаний для пошуку невідомих послідовностей, є метод Parker J. D. et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:3055-3060). Крім того, можна використовувати ПЛР, "гніздові" праймери та бібліотеки PromoterFinder™ для "прогулянки" по геномній ДНК (Clontech, Palo Alto, CA). Цей спосіб дозволяє уникнути необхідності скринінга бібліотек і може бути використаний для виявлення ділянок стику інтрон/екзон.

При скринінзі на повнорозмірні ДНК переважно використовувати бібліотеки, які були відібрані за розмірами і містять більші кДНК. Переважними також є бібліотеки рандомізованих праймерів, які можуть включати додаткові послідовності, що містять 5'-ділянки генів. Використання бібліотеки рандомізованих праймерів може виявитися особливо переважним у тому випадку, якщо бібліотека oligo-d(T) не дає повнорозмірної кДНК. Геномні бібліотеки можуть бути використані для подовження послідовності з одержанням 5'-нетранскрибованих регуляторних ділянок.

В одному з варіантів здійснення винаходу молекули нуклеїнової кислоти за винаходом можуть бути використані для визначення локалізації в хромосомі. У цьому методі молекула нуклеїнової кислоти може бути націлена на конкретну ділянку, або вона може бути гібридизована з конкретною ділянкою на окремій хромосомі людини. Відповідно до даного винаходу, картування релевантних послідовностей у хромосомах є важливою стадією на підтвердження кореляції цих послідовностей з генноасоційованим захворюванням. Після картування послідовності з визначенням її точної локалізації фізичне положення послідовності на хромосомі може бути співставлене з даними генетичної карти. Ці дані можна знайти, наприклад, у роботі V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (наявної в даний час у бібліотеці Уельського медичного університету Джона Хопкінса) (John Hopkins University Welch Medical Library). Взаємозв'язок між генами, які можуть бути картовані на одній і тій самій ділянці хромосоми, і захворюваннями, асоційованими з ними, потім ідентифікують за допо-

могою аналізу на зчеплення генів (спільне наслідування фізично суміжних генів). Це дозволяє дослідникам одержати цінну інформацію, що може бути використана для пошуку генів, асоційованих з даним захворюванням, із застосуванням методу позиційного клонування або інших методів виявлення генів. Після попереднього визначення локалізації генів, асоційованих з даним захворюванням або синдромом, шляхом аналізу на зчеплення генів з конкретно ділянкою геному, будь-яке картування послідовностей на даній ділянці може дати інформацію про асоційовані або регуляторні гени, яка може бути використана для наступних досліджень. Молекула нуклеїнової кислоти може бути також використана для детекції розходжень у хромосомній локалізації, обумовлених транслокацією, інверсією та т.п., у нормальних індивідуумів, індивідуумів-носіїв і в індивідуумів, які страждають захворюванням.

Молекули нуклеїнової кислоти за винаходом також є цінним матеріалом для визначення локалізації в тканинах. Такі методи дозволяють визначати характер експресії поліпептиду в тканинах шляхом детекції мРНК, яка їх кодує. Такими методами є методи гібридизації *in situ* і методи ампліфікації нуклеотидів, такі як ПЛР. Результати цих досліджень дозволяють одержати певні відомості щодо нормальних функцій даного поліпептиду в організмі. Крім того, у цих дослідженнях порівняння нормального характеру експресії мРНК з експресією мРНК, кодованої мутантним геном, дозволяє одержати важливу інформацію про ролі мутантних поліпептидів у даному захворюванні. Така аномальна експресія може мати короточасну, просторову або кількісну природу.

Для інгібування ендогенної експресії гена, який кодує поліпептид за винаходом, можуть бути також використані методи "відключення" гена. Одним з методів, що може бути використаний для "відключення" послідовність-специфічного посттрапеліційного гена, є інтерференція РНК (RNAi) (Elbashir S. M. et al., Nature 2001, 411, 494-498). Короткі дцРНК-олігонуклеотиди синтезують *in vitro* і вводять у клітину. Послідовність-специфічне зв'язування цих дцРНК-олігонуклеотидів запускає процес деградації мРНК-мішені, що призводить до зниження рівня або до відміни експресії білка-мішені.

Ефективність методів "відключення" гена, описаних вище, може бути оцінена шляхом визначення рівня експресії поліпептидів (наприклад, за допомогою Вестерн-блотінга), а на РНК-рівні вона може бути оцінена за допомогою методики, основаної на TaqMan.

Вектори за винаходом містять молекули нуклеїнової кислоти та можуть являти собою клонуючі або експресуючі вектори. Клітини-хазяї за винаходом, які можуть бути трансформовані, трансфіковані або трансдуковані векторами за винаходом, можуть являти собою прокаріотичні або еукаріотичні клітини-хазяї.

Поліпептиди за винаходом можуть бути отримані в рекомбінантній формі за допомогою експресії молекул нуклеїнової кислоти, які кодують ці поліпептиди, у векторах, які містяться в клітині-

хазяїні. Такі методи експресії добре відомі фахівцям, і багато з них докладно описані в Sambrook et al. (див. вище) і Fernandez & Hoeffler (1998, eds. "Gene expression systems. Using nature for the art of expression". Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto).

Для продукування поліпептиду в потрібному хазяїні можуть бути використані, в основному, будь-які системи або будь-які вектори, які підходять для підтримки, ампліфікації або експресії молекул нуклеїнової кислоти. Придатна нуклеотидна послідовність може бути вбудована в експресійну систему кожним з добре відомих і рутинних методів, таких як методи, описані в Sambrook et al. (див. вище). Загалом кодуєчий ген, може бути поміщений під контроль регуляторного елемента, такого як промотор, сайт зв'язування з рибосомою (для експресії в бактеріях) і, необов'язково, оператор, так, щоб ДНК-послідовність, яка кодує потрібний поліпептид, транскрибувалася в РНК у трансформованій клітині-хазяїні.

Прикладами придатних систем експресії є, наприклад, хромосомна, епісомна та вірусна системи, включаючи, наприклад, вектори, які походять від бактеріальних плазмід, бактеріофагу, транспозонів, дріжджових епісом, інсерційних елементів, дріжджових хромосомних елементів, вірусів, таких як бакуловірус, паповавіруси, такі як SV40, віруси коров'ячої віспи, аденовіруси, віруси віспи домашнього птаха, віруси псевдосказу та ретровіруси або їх комбінації, а також вектори, які походять від плазмідних і бактеріофагових генетичних елементів, включаючи косміди та фагміди. Для доставки більших фрагментів ДНК, ніж ті, які можуть міститися та експресуватися у плазміді, можуть бути також використані штучні хромосоми людини (НАС). Переважними прикладами векторів, які можуть бути використані відповідно до аспектів даного винаходу, що відносяться до INSP181, є вектори pCR4-TOPO-INSP181, pCR4-TOPO-INSP181-SV1, pDONR221_INSP181-6HIS, pDONR221_INSP181SVI-HIS, pEAK_INSP181-6HIS, pEAK_INSP181SVI-6HIS, pDEST12.2_INSP181-6HIS і pDEST12.2_INSP181SVI-6HIS.

Особливо придатними експресійними системами є мікроорганізми, такі як бактерії, трансформовані рекомбінантним бактеріофагом, плазмідними або космідними ДНК-експресуючими векторами; дріжджі, трансформовані векторами для експресії в дріжджах; клітинні системи комах, інфіковані вірусними експресуючими векторами (наприклад, бакуловірусом); клітинні системи рослин, трансформовані вірусними експресуючими векторами (наприклад, вірусом мозаїки кольорової капусти, CaMV; вірусом мозаїки тютюну, TMV) або векторами для експресії в бактеріях (наприклад, плазмідами Ti або pBR322); або клітинні системи тварин. Для продукування поліпептидів за винаходом можуть бути також використані безклітинні системи трансляції.

Введення молекул нуклеїнової кислоти, які кодують поліпептид за винаходом, до клітин-хазяїв може бути здійснене методами, описаними в багатьох відомих лабораторних керівництвах, таких як керівництво Davis et al., Basic Methods in Molecular

Biology (1986) і Sambrook et al. [див. вище]. Особливо придатними методами є трансфекція з використанням фосфату кальцію; трансфекція, опосередкована DEAE-декстраном; трансфекція; мікроінжекція; трансфекція, опосередкована катіонним ліпідом; електропорація; трансдукція; завантаження шляхом зскрібка; введення методом біобалістики або інфікування (див., Sambrook et al., 1989, [див. вище], Ausubel et al., 1991 [див. вище], Spector, Goldman & Leinwald, 1998). В еукаріотичних клітинах експресійні системи, залежно від цілей їх використання, можуть бути або тимчасовими (наприклад, епісомними), або перманентними (хромосомна інтеграція).

Кодуюча молекула нуклеїнової кислоти може включати, а може і не включати послідовність, яка кодує регуляторну послідовність, таку як сигнальний пептид або літерна послідовність, якщо це необхідно, наприклад, для секреції трансльованого поліпептиду в просвіт ендоплазматичного ретикулула, у периплазматичний простір або у позаклітинний простір. Ці сигнали можуть бути ендогенними відносно поліпептиду, або вони можуть бути гетерологічними. Літерні послідовності можуть бути вилучені бактеріальним хазяїном при посттрансляційному процесінзі.

Крім регуляторних послідовностей може виявитися бажаним введення регуляторних послідовностей, які забезпечують регуляцію експресії поліпептиду залежно від росту клітини-хазяїна. Прикладами регуляторних послідовностей є послідовності, які забезпечують збільшення або зниження рівня експресії гена у відповідь на хімічну або фізичну стимуляцію, включаючи присутність регуляторної сполуки, або у відповідь на різні температурні або метаболічні умови. Регуляторними послідовностями є нетрансльовані ділянки вектора, такі як енхансери, промотори та 5'- і 3'-нетрансльовані ділянки. Ці послідовності взаємодіють із клітинними білками хазяїна, у результаті чого здійснюється транскрипція та трансляція. Такі регуляторні послідовності можуть варіюватися за своєю довжиною та специфічністю. Залежно від вибраної векторної системи та вибраного хазяїна можуть бути використані будь-які підходящі транскрипційні та трансляційні елементи, включаючи конститутивні та індукційні промотори. Так, наприклад, для клонування в бактеріальних системах можуть бути використані індукційні промотори, такі як гібридний промотор *lacZ* фагміди BlueScript (Stratagene, LaJolla, CA) або плазміди pSport1™ (Gibco BRL) і т. п. У клітинах комах може використовуватися бакуловірусний промотор поліедрину. Промотори або енхансери, які походять від геномів рослинних клітин (наприклад, гена білка теплового шоку, RUBISCO і гена запасних білків) або від вірусів рослин (наприклад, вірусних промоторів або літерних послідовностей), можуть бути клоновані у вказаний вектор. У клітинних системах ссавців кращими є промотори, які походять від генів ссавців або від вірусів ссавців. Якщо необхідно генерувати клітинну лінію, що містить множину копій даної послідовності, то можуть бути використані вектори на основі SV40 або EBV з відповідним селективним маркером.

Експресуючий вектор конструюють так, щоб конкретна кодуюча послідовність нуклеїнової кислоти була присутня у векторі разом з відповідними регуляторними послідовностями, і щоб положення та орієнтація кодуючої послідовності стосовно регуляторних послідовностей дозволяли такій кодуючій послідовності транскрибуватися під "контролем" регуляторних послідовностей, тобто так, щоб РНК-полімераза, яка зв'язується із ДНК-молекулою в регуляторних послідовностях, здійснювала транскрипцію кодуючої послідовності. У деяких випадках може виявитися необхідним модифікувати вказану послідовність так, щоб вона могла приєднуватися до регуляторних послідовностей у відповідній орієнтації, тобто зі збереженням рамки зчитування.

Вказані регуляторні послідовності та інші регуляторні послідовності можуть бути ліговані з кодуючою послідовністю нуклеїнової кислоти перед вбудовуванням у вектор. Альтернативно, така кодуюча послідовність може бути клонована безпосередньо в експресуючий вектор, що вже містить регуляторні послідовності та відповідний рестрикційний сайт.

Для тривалого вискоєфективного продукування рекомбінантного поліпептиду кращою є стабільна експресія. Так, наприклад, клітинні лінії, які стабільно експресують потрібний поліпептид, можуть бути трансформовані з використанням експресуючих векторів, які можуть містити вірусні сайти ініціації реплікації та/або ендогенні експресійні елементи та вибраний маркерний ген, який є присутнім на тому ж самому або на окремому векторі. Після введення цього вектора клітини можна залишити на 1-2 дні для росту в збагаченому середовищі, яке потім замінюють селективним середовищем. Селективний маркер необхідний для надання резистентності, використовуюваної з метою відбору, і його присутність дозволяє культивувати та виділяти клітини, які успішно експресують введені послідовності. Резистентні клони стабільно трансформованих клітин можуть бути піддані проліферації методами культивування тканини, які придатні для клітин такого типу.

Клітинні лінії ссавців, які підходять як хазяї для експресії, добре відомі фахівцям, і такими клітинними лініями є багато іморталізованих клітинних ліній, наявні в Американській колекції типових культур (ATCC), включаючи, але не обмежуючись ними, клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітини HeLa, клітини нирок дитинчати хом'ячка (BHK), клітини нирок мавпи (COS), клітини C127, клітини 3T3, клітини BHK, клітини HEK 293, клітини меланоми Боуеса, клітини гепатоцелюлярної карциноми людини (наприклад, Hep G2) і ряд інших клітинних ліній.

У бакуловірусній системі матеріали для одержання експерсійних систем бакуловірус/клітина комах є комерційно доступними та поставляються в наборах, *inter alia*, від Invitrogen, San Diego CA (набір "MaxBac"). Загалом ці методи відомі фахівцям і докладно описані в Summers & Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin №1555 (1987). Клітинами-хазяїнами, які особливо підходять для використання в даній системі, є клітини

комах, такі як клітини *Drosophila* S2 і клітини *Spodoptera* Sf9.

Фахівцям відома множина систем експресії генів у клітинних культурах рослин і в цілих рослинах. Прикладами придатних систем експресії генів у клітинах рослин є системи, описані в патентах США 5693506, 5659122 і 5608143. Інші приклади експресії генів у клітинних культурах рослин описані Zenk, *Phytochemistry* 30, 3861-3863 (1991).

Зокрема, можна використовувати будь-які рослини, з яких можуть бути виділені та культивовані протопласти з наступним продукуванням з них цілих регенерованих рослин, які містять перенесений ген. Зокрема, з культивованих клітин або тканин можуть бути регенеровані всі рослини, включаючи, але не обмежуючись ними, всі основні види цукрового очерету, цукрового буряка, бавовнику, плодових і інших дерев, бобових, а також овочевих рослин.

Прикладами особливо переважних бактеріальних клітин-хазяїв є клітини стрептококів, стафілококів, *E. coli*, *Streptomyces* і *Bacillus subtilis*.

Прикладами особливо придатних клітин-хазяїв для експресії в грибах є дріжджові клітини (наприклад, *S. cerevisiae*) і клітини *Aspergillus*.

Будь-які системи відбору, які можуть бути використані для виділення трансформованих клітинних ліній, відомі фахівцям. Прикладами є гени тимінкінази (Wigler M. et al. (1977) *Cell* 11:223-32) і аденін-фосфорибозилтрансферази вірусу простого Гермеса (Lowy I. et al. (1980) *Cell* 22:817-23), які можуть бути використані в tk- або apr^t-клітинах, відповідно.

Крім того, як основа для відбору можуть бути використані гени резистентності до антиметаболіту, антибіотику або до гербіциду, наприклад, ген дигідрофолат-редуктази (DHFR), який надає резистентність до метотрексату (Wigler M. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3567-70); ген npt, який надає резистентність до аміноглікозидів, неоміцину та до G-418 (Colbere-Garapin F. et al (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14), і гени als або pat, які надають резистентність до хлорсульфурон- і фосфінотрицин-ацетилтрансферази, відповідно. Були описані і інші селективні гени, приклади яких добре відомі фахівцям.

Хоча присутність або відсутність експресії маркерного гена дозволяє припустити, що є присутнім також і потрібний ген, однак його присутність і експресія ще мають потребу в підтвердженні. Так, наприклад, якщо відповідна послідовність була вбудована в послідовність маркерного гена, то трансформовані клітини, які містять відповідні послідовності, можуть бути ідентифіковані за відсутності функції маркерного гена. Альтернативно, маркерний ген може перебувати в тандемі з послідовністю, що кодує поліпептид за винаходом, який перебуває під контролем одного промотору. Експресія маркерного гена у відповідь на індуквання або відбір зазвичай вказує також на експресію тандемного гена.

Альтернативно, клітини-хазяї, які містять послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид за винаходом, і які експресують вказаний поліпептид, можуть бути ідентифіковані різними

методами, відомими фахівцям. Такими методами є, але не обмежуються ними, ДНК-ДНК або ДНК-РНК-гібридизація та біоаналізи на присутність білка, наприклад, сортування клітин за інтенсивністю флуоресценції (FACS) або імуноаналізи (такі як твердофазний імуноферментний аналіз [ELISA] і радіоімуноаналіз [RIA]), які передбачають використання мембран, розчинів або чіпів для детекції та/або кількісної оцінки нуклеїнової кислоти або білка (див. Hampton R. et al. (1990) *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, MN) і Maddox D. E. et al., (1983) *J. Exp. Med.* 158,1211-1216).

Існує широкий ряд методів мічення та кон'югування, відомих фахівцям, і ці методи можуть бути використані в різних аналізах на присутність нуклеїнових кислот і амінокислот. Методами, використовуваними з метою продукування мічених зондів для гібридизації або ПЛР-зондів для детекції послідовностей, споріднених до молекул нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептиди за винаходом, є мічення олігонуклеотидами, нік-трансляція, мічення за кінцями або ПЛР-ампліфікація з використанням міченого полінуклеотиду. Альтернативно, послідовності, які кодують поліпептид за винаходом, можуть бути клоновані у вектор для продукування мРНК-зонда. Такі вектори, відомі фахівцям, є комерційно доступними та можуть бути використані для синтезу РНК-зондів *in vitro* шляхом додавання відповідної РНК-полімерази, такої як T7, T3 або SP6, і мічених нуклеотидів. Ці процедури можуть бути проведені з використанням різних комерційно доступних наборів (Pharmacia & Upjohn (Kalamazoo, MI); Promega (Madison WI) і U. S. Biochemical Corp., Cleveland, OH)).

Придатними репортерками молекулами або мітками, які можуть бути використані для полегшення детекції, є радіонукліди, ферменти та флуоресцентні, хемілюмінісцентні або хромогенні агенти, а також субстрати, кофактори, інгібітори, магнітні частинки та т.п.

Молекули нуклеїнової кислоти за винаходом можуть бути також використані для генерування трансгенних тварин, а, зокрема, гризунів. Такі трансгенні тварини входять у додатковий аспект за винаходом. Це генерування може бути здійснене шляхом локальної модифікації соматичних клітин або маніпуляцій із зародковими лініями для введення наслідуваних модифікацій. Такі трансгенні тварини можуть бути, зокрема, використані для генерування тварин-моделей з метою пошуку молекул лікарських засобів, які є ефективними як модулятори поліпептидів за винаходом.

Поліпептид може бути виділений і очищений з рекомбінантних клітинних культур добре відомими методами, включаючи преципітацію сульфатом амонію або етанолом, екстракцію кислотою, аніонообмінну або катіонообмінну хроматографію, хроматографію на фосфоцелюлозі, гідрофобну хроматографію, афінну хроматографію, хроматографію на гідроксіапатитах і хроматографію на лектині. Для очищення найбільш придатною є високо-ефективна рідинна хроматографія. У випадку, якщо даний поліпептид був денатурований у процесі виділення і/або очищення, то для відновлення

активної конформації може бути використана добре відома техніка рефолдингу білків.

Якщо необхідно, то для полегшення очищення білків можуть бути також використані спеціальні векторні конструкції, отримані шляхом приєднання послідовностей, які кодують поліпептиди за винаходом, до нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептидний домен, який полегшує очищення розчинних білків. Прикладами таких доменів, які полегшують очищення білків, є пептиди, що утворюють хелатні комплекси з металами, такі як: гістидин-триптофанові модулі, які дозволяють проводити очищення на іммобілізованих металах; домени білка А, які дозволяють проводити очищення на іммобілізованому імуноглобуліні; і домен, використовуваний у системі подовження/очищення FLAGS (Immunex Corp., Seattle, WA). Для полегшення очищення між доменом для очищення та поліпептидом за винаходом можуть бути включені розщеплювальні лінкерні послідовності, такі як послідовності, специфічні до фактора ХА або ентерокинази (Invitrogen, San Diego, CA). Один з таких експресуючих векторів забезпечує експресію гібридного білка, який містить поліпептид за винаходом, приєднаний до декількох гістидинових залишків, за якими ідуть тіоредоксин або рестрикційний сайт ентерокинази. Гістидинові залишки полегшують проведення очищення за допомогою IMAC (афінної хроматографії на іммобілізованому іоні металу, описаної Porath J. et al. (1992), Prot. Exp. Purif. 3:263-281), тоді як тіоредоксин або рестрикційний сайт ентерокинази дозволяють виділяти поліпептид з гібридного білка. Обговорення векторів, які містять гібридні білки, можна знайти в Kroll D. J. et al. (1993; DNA Cell Biol. 12:441-453).

Якщо експресований поліпептид використовується в аналітичному скринінзі, то зазвичай переважно, щоб він був продукований на поверхні клітини-хазяїна, в якій він експресується. У цьому випадку клітини-хазяїні можуть бути зібрані до їх використання в скринінг-аналізі, наприклад, таким методом, як сортування клітин з порушенням флуоресценції (FACS) або імуноафінним методом. Якщо поліпептид секретується в середовище, то таке середовище може бути відновлене для виділення та очищення експресованого поліпептиду. Якщо поліпептид продукується всередині клітини, те, перед виділенням поліпептиду, ці клітини повинні бути спочатку піддані лізису.

Як вказувалося вище, даний винахід також стосується нових мішеней і способів скринінга на лікарські засоби-кандидати або інші потрібні речовини. Такі методи скринінга включають аналізи на зв'язування та/або функціональні аналізи та можуть бути здійснені *in vitro*, у клітинних системах і *in vivo* в організмі тварини.

У цьому зв'язку конкретною метою даного винаходу є застосування поліпептиду INSP181 як мішені для скринінга на лікарські засоби-кандидати, які можуть бути використані для лікування або профілактики розладів, асоційованих з ліпокаліном.

Іншою метою даного винаходу є розробка способів відбору біологічно активних сполук, де вказані способи включають контактування сполуки-

кандидата з геном або поліпептидом INSP181 і відбір сполук, які зв'язуються із вказаним геном або поліпептидом.

Іншою метою даного винаходу є розробка способів відбору біологічно активних сполук, де вказані способи включають контактування сполуки-кандидата з рекомбінантною клітиною-хазяїном, що експресує поліпептид INSP181, і відбір сполук, які зв'язуються із вказаним поліпептидом INSP181 на поверхні вказаних клітин, і/або які модулюють активність поліпептиду INSP181.

Термін "біологічно активна сполука" означає будь-яку сполуку, що має біологічну активність у індивідуума, переважно, терапевтичну активність; більш переважно, сполуку, яка має активність ліпокаліну, а ще більш переважно, сполуку, яка може бути використана для лікування INSP181-асоційованих розладів або як засіб для розробки лікарських препаратів, призначених для лікування розладів, асоційованих з ліпокаліном. "Біологічно активною сполукою", переважно, є сполука, яка модулює активність INSP181.

Вищеописані способи можуть бути здійснені *in vitro* із застосуванням різних пристроїв і різних умов, включаючи використання іммобілізованих реагентів, і ці способи можуть також включати додаткову стадію аналізу активності вибраних сполук у моделі, такий як тварина-модель із розладом, асоційованим з ліпокаліном.

Переважними сполуками, які вибираються, є агоністи INSP181, тобто сполуки, які можуть зв'язуватися з INSP181 та імітувати активність його ендogenousного ліганду.

Іншою метою даного винаходу є розробка способу відбору біологічно активних сполук, де вказаний спосіб включає контактування *in vitro* тестованої сполуки з поліпептидом INSP181 за винаходом та визначення здатності вказаної тестованої сполуки модулювати активність вказаного поліпептиду INSP181.

Іншою метою даного винаходу є розробка способу відбору біологічно активних сполук, де вказаний спосіб включає контактування *in vitro* тестованої сполуки з геном INSP181 за винаходом та визначення здатності вказаної тестованої сполуки модулювати експресію вказаного гена INSP181, а переважно, стимулювати його експресію.

В іншому своєму варіанті даний винахід стосується способу скринінга, відбору або ідентифікації активних сполук, і, зокрема, сполук, які мають активність, спрямовану на пригнічення розсіяного склерозу або асоційованих з ним розладів, де вказаний спосіб включає контактування тестованої сполуки з рекомбінантною клітиною-хазяїном, яка містить репортерну конструкцію, де вказана конструкція містить репортерний ген, який перебуває під контролем промотору гена INSP181, і відбір тестованих сполук, які модулюють (наприклад, які стимулюють або знижують, а переважно, які стимулюють) експресію вказаного репортерного гена.

Поліпептид за винаходом може бути використаний для скринінга бібліотек сполук у кожному з відомих методів, застосовуваних для пошуку лікарських засобів. Такі сполуки можуть стимулювати (служити агоністами) або інгібувати (служити

антагоністами) експресію гена або активність поліпептиду за винаходом, а тому вони становлять додатковий аспект даного винаходу. Переважними сполуками є сполуки, здатні впливати на експресію природного гена, який кодує поліпептид за першим аспектом винаходу, або регулювати активність поліпептиду за першим аспектом винаходу.

Сполуки-агоністи або сполуки-антагоністи можуть бути виділені, наприклад, із клітин, безклітинних препаратів, хімічних бібліотек або сумішей природних продуктів. Такими агоністами або антагоністами можуть бути природні або модифіковані субстрати, ліганди, ферменти, рецептори, або структурні або функціональні міметики. Придатний опис таких методів скринінга можна знайти в роботі Coligan et al, *Current Protocols in Immunology* 1(2):Chapter5(1991).

Зв'язування з геном або з поліпептидом-мішенню служить показником здатності вказаної сполуки модулювати активність вказаної мішені та, тим самим, впливати на шлях, що призводить до розвитку в індивідуума розладу, асоційованого з ліпокаліном. Детекція зв'язування може бути здійснена різними методами, такими як мічення сполуки-кандидата, аналіз на конкурентне зв'язування з відомим міченим лігандом і т.п. Для проведення аналізів на зв'язування *in vitro* вказані поліпептиди можуть бути використані, в основному, у чистій формі, у вигляді суспензії, у формі, іммобілізованій на носії, або у формі, експресованій у мембрані (у формі інтактної клітини, мембранного препарату, ліпосоми та т.п.).

Модуляція активності включає, але не обмежується ними, стимуляцію поверхневої експресії рецептора INSP181, модуляцію мультимеризації вказаного рецептора (наприклад, утворення мултимерних комплексів з іншими субодиницями) і т.п. Клітинами, використовуваними в таких аналізах, можуть бути будь-які рекомбінантні клітини (тобто будь-які клітини, які містять рекомбінантну нуклеїнову кислоту, що кодує поліпептид INSP181), або будь-які клітини, що експресують ендегенний поліпептид INSP181. Прикладами таких клітин є, але не обмежуються ними, прокаріотичні клітини (такі як бактерії) і еукаріотичні клітини (такі як клітини дріжджів, клітини ссавців, клітини комах, клітини рослин і т.п.). Конкретними прикладами є клітини *E. coli*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Shizosaccharomyces pombe*, дріжджові клітини *Kluyveromyces* або *Saccharomyces*, клітинні лінії ссавців (наприклад, клітини Vero, клітини CHO, клітини 3T3, клітини COS і т.п.), а також первинні та стабілізовані клітинні культури ссавців (наприклад, культури фібробластів, ембріональних клітин, епітеліальних клітин, нервових клітин, адипоцитів і т.п.).

Сполуки, які можуть розглядатися як найбільш імовірні кандидати на хороші антагоністи, являють собою молекули, які зв'язуються з поліпептидом за винаходом, але не індукують будь-які біологічні ефекти поліпептиду після зв'язування з ним. Потенційними антагоністами є невеликі органічні молекули, пептиди, поліпептиди та антитіла, які зв'язуються з поліпептидом за винаходом та, тим самим, інгібують або пригнічують його активність. Таким

чином, зв'язування поліпептиду з нормальними зв'язуваними клітинними молекулами може бути піддане інгібуванню, що буде призводити до пригнічення нормальної біологічної активності такого поліпептиду.

Поліпептид за винаходом, що використовується в такому методі скринінга, може перебувати в розчині у вільному стані, може бути іммобілізований на твердому носії або може бути присутнім на клітинній поверхні, або він може бути локалізований всередині клітини. Загалом кажучи, у таких процедурах скринінга можуть бути використані відповідні клітини або клітинні мембрани, які експресують поліпептид, що контактує з тестованою сполукою, що призводить до зв'язування, або до стимуляції або інгібування функціональної відповіді. Потім, функціональна відповідь клітин, контактованих з тестованою сполукою, порівнюють із відповіддю контрольних клітин, які не контактували з тестованою сполукою. Такий аналіз, проведений за допомогою придатної системи детекції, дозволяє визначити, чи може тестована сполука давати сигнал, генерований активацією вказаного поліпептиду. Інгібітори активації зазвичай аналізують у присутності відомого агоніста та оцінюють вплив цього агоніста на активацію в присутності тестованої сполуки.

Переважаючий спосіб ідентифікації сполуки, що є агоністом або антагоністом поліпептиду за винаходом включає:

(а) контактування клітини, що експресує (не обов'язково на своїй поверхні) поліпептид за першим аспектом винаходу, де вказаний поліпептид асоційований з другим компонентом, здатним давати детектований сигнал у відповідь на зв'язування сполуки з вказаним поліпептидом, де вказану сполуку скринують в умовах, які стимулюють зв'язування з вказаним поліпептидом;

(б) визначення події зв'язування вказаної сполуки із вказаним поліпептидом, або його активації або інгібування шляхом вимірювання рівня сигналу, генерованого в результаті взаємодії вказаної сполуки із вказаним поліпептидом.

Методи генерування детектованих сигналів в аналізах описаного тут типу добре відомі фахівцям. Конкретним прикладом є спільне введення конструкції, яка експресує поліпептид за винаходом або його фрагмент, такий як LBD, присутній у вигляді гібриду з ДНК-зв'язувальним доменом GAL4, у клітину разом з репортерною плазмідом, такою як, наприклад, pFR-Luc (Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands). Ця конкретна плазма дає містити синтетичний промотор з п'ятьма тандемними повторами GAL4-зв'язувальних сайтів, які регулюють експресію гена люциферази. При введенні потенційного ліганду в клітину він буде зв'язуватися з гібридом "GAL4-поліпептид" та індукувати транскрипцію гена люциферази. Моніторинг рівня експресії гена люциферази може бути проведений шляхом детекції його активності на пристрої для зчитування інтенсивності люмінесценції (див. наприклад, Lehman et al., JBC 270, 12953, 1995; Pawar et al, JBC, 277, 39243, 2002).

Ще більш переважний спосіб ідентифікації агоніста або антагоніста поліпептиду за винаходом включає:

(а) контактування міченої або неміченої сполуки з поліпептидом, іммобілізованим на будь-якому твердому носії (наприклад, на сферах, пластинах, матричному носії, чипі) і детекцію вказаної сполуки шляхом визначення присутності мітки або самої сполуки;

(б) контактування клітини, яка експресує на своїй поверхні поліпептид, шляхом її штучного закріплення на клітинній мембрані, або шляхом конструювання химерного рецептора, асоційованого із другим компонентом, здатним давати детектований сигнал у відповідь на зв'язування сполуки із вказаним поліпептидом, де вказану сполуку скрикують в умовах, що стимулюють зв'язування із вказаним поліпептидом; і

(с) визначення події зв'язування вказаної сполуки із вказаним поліпептидом, або його активації або інгібування шляхом порівняння рівня сигналу, генерованого в результаті взаємодії вказаної сполуки із вказаним поліпептидом, з рівнем сигналу, який виробляється під час відсутності даної сполуки.

Так, наприклад, може бути застосований такий спосіб, як FRET-детекції ліганду, зв'язаного з поліпептидом у присутності пептидних ко-активаторів (Norris et al., Science 285, 744, 1999).

Інший переважний спосіб ідентифікації агоніста або антагоніста поліпептиду за винаходом включає:

(а) контактування клітини, яка експресує (необов'язково на своїй поверхні) поліпептид, асоційований із другим компонентом, здатним давати детектований сигнал у відповідь на зв'язування сполуки із вказаним поліпептидом, де вказану сполуку скринують в умовах, які стимулюють зв'язування із вказаним поліпептидом; і

(б) визначення події зв'язування вказаної сполуки із вказаним поліпептидом, або його активації або інгібування шляхом порівняння рівня сигналу, генерованого в результаті взаємодії вказаної сполуки із вказаним поліпептидом, з рівнем сигналу, що виробляється під час відсутності даної сполуки.

В інших переважних варіантах винаходу загальні методи, описані вище, можуть, крім того, включати здійснення ідентифікації агоніста або антагоніста в присутності міченого або неміченого ліганду для поліпептиду.

В іншому варіанті винаходу спосіб ідентифікації агоніста або антагоніста поліпептиду за винаходом включає:

визначення факту інгібування зв'язування ліганду із клітинами, які експресують поліпептид за винаходом (і які, але необов'язково, містять на своїй поверхні поліпептид за винаходом), або із клітинними мембранами, які містять такий поліпептид, у присутності сполуки-кандидата в умовах, які стимулюють зв'язування із вказаним поліпептидом, і визначення кількості ліганду, зв'язаного із вказаним поліпептидом. Вважається, що сполуки, яка сприяє зниженню рівня зв'язування з лігандом,

є агоністом або антагоністом. При цьому, переважно, щоб вказаний ліганд був міченим.

Більш конкретно, спосіб скринінга на сполуку, яка є агоністом або антагоністом поліпептиду, включає стадії:

(а) інкубування міченого ліганду із цілою клітиною, що експресує на своїй поверхні поліпептид за винаходом, або із клітинною мембраною, яка містить поліпептид за винаходом;

(б) вимірювання кількості міченого ліганду, зв'язаного із цілою клітиною або із клітинною мембраною;

(с) додавання сполуки-кандидата до суміші міченого ліганду та цілої клітини або клітинної мембрани стадії (а) і доведення цієї суміші до стану рівноваги;

(д) вимірювання кількості міченого ліганду, зв'язаного із цілою клітиною або із клітинною мембраною, після проведення стадії (с); і

(е) порівняння розходження в кількостях зв'язаного міченого ліганду стадій (б) і (д), де сполука, яка викликає зниження рівня зв'язування на стадії (д), вважається агоністом або антагоністом.

Аналогічним чином, даний винахід стосується способу скринінга на сполуку, яка є агоністом або антагоністом поліпептиду, що включає стадії:

(а) інкубування міченого ліганду з поліпептидом за винаходом, іммобілізованим на будь-якому твердому носії або на клітинній поверхні, або із клітинною мембраною, що містить поліпептид за винаходом;

(б) вимірювання кількості міченого ліганду, зв'язаного з поліпептидом за винаходом, іммобілізованим на будь-якому твердому носії, або із цілою клітиною або із клітинною мембраною;

(с) додавання сполуки-кандидата до суміші міченого ліганду та поліпептиду, іммобілізованого на твердому носії, цілої клітини або клітинної мембрани стадії (а) і доведення цієї суміші до стану рівноваги;

(д) вимірювання кількості міченого ліганду, зв'язаного з іммобілізованим поліпептидом, із цілою клітиною або з клітинною мембраною, після проведення стадії (с); і

(е) порівняння розходження в кількостях зв'язаного міченого ліганду стадій (б) і (д), де сполука, яка викликає зниження рівня зв'язування на стадії (д), вважається агоністом або антагоністом.

Було виявлено, що поліпептиди INSP181 можуть також модулювати велику кількість фізіологічних і патологічних процесів, залежним від дози чином у вищеописаних аналізах. Таким чином, термін "функціональні еквіваленти" поліпептидів за даним винаходом включає поліпептиди, які мають кожний із вказаних дозозалежних модулюючих активностей у вищеописаних аналізах.

Хоча ступінь дозозалежної активності необов'язково повинна бути ідентична активності поліпептидів за даним винаходом, однак, переважно, щоб вказані "функціональні еквіваленти" мали, по суті, аналогічну дозозалежну активність, вимірювану в даному аналізі, у порівнянні з активністю поліпептидів за даним винаходом.

У деяких описані вище варіантах даного винаходу можуть бути використані прості аналізи на

зв'язування, в яких адгезію тестованої сполуки до поверхні, яка несе даний поліпептид, детектують за допомогою мітки, безпосередньо або опосередковано асоційованої з тестованою сполукою, або аналізу на конкуренцію з міченою сполукою-конкурентом. В іншому варіанті здійснення винаходу можуть бути використані конкурентні аналізи на скринінг лікарських засобів, в яких нейтралізуючі антитіла, здатні зв'язуватися з даним поліпептидом, специфічно конкурують за зв'язування з тестованою сполукою. Таким чином, вказані антитіла можуть бути використані для детекції на присутність будь-якої тестованої сполуки, яка має специфічну афінність зв'язування із вказаним поліпептидом.

Можуть бути також розроблені аналізи для детекції впливу доданих тестованих сполук на продукування мРНК, що кодує вказаний поліпептид, у клітинах. Так, наприклад, може бути розроблений такий аналіз ELISA, що дозволяє вимірювати секретування або клітинно-асоційовані рівні поліпептиду з використанням моноклональних або поліклональних антитіл стандартними методами, відомими фахівцям, і такий аналіз може бути використаний для пошуку сполук, які можуть інгібувати або підсилювати продукування поліпептиду з відповідним чином модифікованих клітин або тканин. Потім може бути визначений рівень утворення зв'язувальних комплексів між поліпептидом і тестованою сполукою.

Можуть бути також розроблені інші методи для детекції ефекту⁷ досліджуваних сполук, які додаються, на продукцію мРНК, що кодує даний поліпептид у клітині. Наприклад, за допомогою відомих стандартних процедур можна в такий спосіб адаптувати методику проведення імуноферментного аналізу ELISA, що дозволить визначати рівні секретованого або асоційованого із клітиною поліпептиду з використанням моноклональних або поліклональних антитіл, що, у свою чергу, можна буде використовувати для пошуку сполук, здатних інгібувати або підсилювати продукцію поліпептиду на основі відповідним чином оброблених клітин або тканин. Далі може бути проведена оцінка утворення зв'язаних комплексів між поліпептидом і досліджуваною сполукою.

Методи аналізу, охоплювані термінами, які використовуються в даному винаході, включають також такі методи, які задіюють використання генів і поліпептидів за даним винаходом в тестах на суперпродукцію або абляцію. Такі тести задіюють маніпуляцію рівнями вказаних генів/поліпептидів у клітинах і оцінку впливу такої маніпуляції на фізіологію задіяних при цьому клітин. Наприклад, такого роду експерименти дозволяють виявити деталі сигнальних і метаболічних шляхів, в яких беруть участь конкретні гени/поліпептиди, одержати інформацію, яка стосується природи поліпептидів, з якими взаємодіють досліджувані поліпептиди, і виявити можливі способи впливу на регуляцію споріднених генів і білків.

Інший метод, що може бути використаний для скринінга лікарських засобів, дозволяє здійснювати високоефективний скринінг сполук, які мають придатну афінність зв'язування з поліпептидом,

що представляє інтерес, (див. Міжнародну патентну заявку WO 84/03564). У цьому методі велику кількість різних невеликих тестованих сполук синтезують на твердому субстраті, що потім може бути підданий реакції з поліпептидом за винаходом та промиванню. Одним зі способів іммобілізації поліпептиду є використання не-нейтралізуючих антитіл. Зв'язаний поліпептид може бути потім детектований методами, добре відомими фахівцям. Очищений поліпептид також може бути безпосередньо нанесений на планшети для наступного використання у вищезгаданих способах скринінга на лікарські засоби.

Поліпептиди за винаходом можуть бути використані для ідентифікації мембранозв'язаних або розчинних рецепторів за допомогою стандартної техніки зв'язування з рецептором, відомої фахівцям, такої як аналізи на зв'язування та перехресне зв'язування з лігандом, в яких даний поліпептид мітять радіоактивним ізотопом, хімічно модифікують або приєднують до пептидної послідовності, що полегшує його детекцію або очищення, і інкубують із джерелом передбачуваного рецептора (наприклад, з композицією клітин, клітинними мембранами, клітинними супернатантами, тканинними екстрактами або з фізіологічними рідинами). Ефективність зв'язування може бути визначена біофізичними методами, такими як поверхневий плазмовий резонанс і спектроскопія. Аналізи на зв'язування можуть бути використані для очищення та клонування рецептора, але вони можуть бути також використані для ідентифікації агоністів і антагоністів вказаного поліпептиду, які конкурують із вказаним поліпептидом за зв'язування з рецептором. Стандартні методи проведення скринінг-аналізів добре відомі фахівцям.

В іншому своєму варіанті даний винахід стосується застосування поліпептиду INSP181 або його фрагмента, де вказаним фрагментом, переважно, є фрагмент, специфічний до гена INSP181, з метою виділення або генерування агоніста або стимулятора поліпептиду INSP181 для лікування імуноасоційованого розладу, де вказаний агоніст або стимулятор вибраний із групи, яка складається з:

1. специфічного антитіла або його фрагмента, включаючи:

- a) химерне,
- b) гуманізоване або
- c) повністю антитіло людини, а також

2. біспецифічного або мультиспецифічного антитіла,

3. одноланцюжкового антитіла (наприклад, scFv) або

4. однодоменного антитіла, або

5. пептидо- або не-пептидоміметика, що походить від вказаних антитіл, або

6. антитіло-міметика, такого як (a) антикалін або (b) зв'язувальна молекула на основі фібрoneктину (наприклад, тринектин або аднектин).

Одержання пептидо- або не-пептидоміметиків з антитіл відомо фахівцям (Saragovi et al., 1991 & Saragovi et al., 1992).

Антикаліни також відомі фахівцям (Vogt et al., 2004). Зв'язувальні молекули на основі фібрoneк-

тину описані в патенті США №6818418 і в WO 2004029224.

Крім того, тестованими сполуками можуть бути сполуки різного походження, природи та складу, такі як будь-які невеликі молекули, нуклеїнові кислоти, ліпіди, пептиди, поліпептиди, включаючи антитіла, такі як химерне, гуманізоване або повністю антитіло людини або його фрагмент, пептидо- або не-пептидоміметики, які походять від них, а також біспецифічні або мультиспецифічні антитіла, однокланцеві антитіла (наприклад, scFv), однокланні антитіла, антитіла-міметики, такі як антикалін або зв'язувальна молекула на основі фібронектину (наприклад, тринектин або аднектин) і т.п., в ізольованій формі або у вигляді їх суміші або комбінацій.

Даний винахід також стосується набору для скринінга, використовуваного в методах ідентифікації агоністів, антагоністів, лігандів, рецепторів, субстратів і ферментів, описаних вище.

Даний винахід також стосується агоністів, антагоністів, лігандів, рецепторів, субстратів, ферментів і інших сполук, які модулюють активність або антигенність поліпептиду за винаходом відповідно до описаних вище механізмів.

Як вказувалося вище, передбачається, що різні молекули за винаходом (тобто поліпептиди за першим аспектом даного винаходу, молекула нуклеїнової кислоти за другим або третім аспектом даного винаходу, вектор за четвертим аспектом даного винаходу, клітина-хазяїн за п'ятим аспектом даного винаходу, ліганд за шостим аспектом даного винаходу, і сполука за сьомим аспектом даного винаходу) можуть бути використані для лікування або діагностики захворювань. Для оцінки ефективності вказаних молекул за винаходом для лікування або діагностики захворювання можуть бути проведені один або декілька з описаних нижче аналізів. Слід зазначити, що хоча деякі з нижченаведених аналізів описані для тестованих сполук, що є білком/поліпептидом, однак фахівець у даній галузі може легко модифікувати ці аналізи для їх застосування до інших молекул за винаходом, які також можуть бути використані як "тестовані сполуки".

Даний винахід також стосується фармацевтичних композицій, які містять поліпептид, нуклеїнову кислоту, ліганд або сполуку за винаходом в комбінації з придатним фармацевтичним носієм. Ці композиції можуть бути використані як терапевтичні або діагностичні реагенти, як вакцини або як інші імуногенні композиції, докладно описані нижче.

Відповідно до використовуваної тут термінології, композиція, яка містить поліпептид, нуклеїнову кислоту, ліганд або сполуку [X], вважається "в основному, такою, що не містить" домішок [тут, Y], якщо, принаймні, 85 мас. % від усієї кількості X+Y у даній композиції становить X. Переважно, X становить, принаймні, як передбачається, 90%, а більш переважно, принаймні, як передбачається, 95%, 98%, 98,5% або навіть 99% мас. за загальною масою X+Y у даній композиції.

Переважно, фармацевтичні композиції повинні містити терапевтично ефективну кількість поліпеп-

тиду, молекули нуклеїнової кислоти, ліганду або сполуки за винаходом. Використовуваний тут термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість терапевтичного агента, необхідного для лікування, послаблення або попередження розглянутого захворювання або стану, або для досягнення детектованого терапевтичного або профілактичного ефекту. Для кожної сполуки терапевтично ефективна доза може бути спочатку оцінена або в аналізі клітинної культури, наприклад, пухлинних клітин, або на тваринах-моделях, зазвичай на мишах, кроликах, собаках або свинях. З використанням тварини-моделі може бути також визначений відповідний інтервал концентрацій і їх спосіб введення. Отримана інформація може бути потім використана для визначення придатних доз і способів їх введення людині.

Точна ефективна кількість сполуки для введення індивідууму буде залежати від тяжкості патологічного стану, загального стану здоров'я індивідуума, його віку, ваги, статі та режиму харчування, від часу та частоти введення лікарського засобу, від комбінації(й) лікарських засобів, а також від реактивної чутливості та толерантності/сприйнятливості даного індивідуума до проведеної терапії. Така кількість може бути визначена шляхом рутинного експериментування та може бути встановлена лікарем-клініцистом. Загалом ефективна доза може становити від 0,01мг/кг до 50мг/кг, а переважно, від 0,05мг/кг до 10мг/кг. Композиції можуть бути введені пацієнтові або окремо, або в комбінації з іншими агентами, лікарськими засобами або гормонами.

Фармацевтична композиція може також містити фармацевтично прийнятний носій, що підходить для введення терапевтичного агента. Такими носіями є антитіла та інші поліпептиди, гени та інші терапевтичні агенти, такі як ліпосоми, за умови, що даний носій сам по собі не індукує виробіток антитіл, що роблять негативний вплив на індивідуума, якому вводять вказану композицію, і не є надмірно токсичним. Придатними носіями можуть бути великі макромолекули з уповільненим метаболізмом, такі як білки, полісахариди, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти, полімерні амінокислоти, співполімери амінокислот і неактивні вірусні частинки.

Використовуваними тут фармацевтично прийнятними солями можуть бути, наприклад, солі мінеральних кислот, такі як гідрохлориди, гідроброміди, фосфати, сульфати та т.п., і солі органічних кислот, такі як ацетати, пропіонати, малонати, бензоати та т.п. Докладне обговорення фармацевтично прийнятних носіїв можна знайти в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J. 1991).

Фармацевтично прийнятні носії в терапевтичних композиціях можуть, крім того, містити рідини, такі як вода, фізіологічний розчин, гліцерин і етанол. Крім того, у вказаних композиціях можуть бути присутніми і допоміжними речовинами, такі як змочувальні або емульгуювальні агенти, рН-забуферювальні речовини та т.п. За допомогою таких носіїв можуть бути отримані фармацевтичні композиції у вигляді таблеток, пігулок, драже, кап-

сул, рідин, гелів, сиропів, наважок, суспензій і т.п. для перорального прийому пацієнтом.

Композиції за винаходом, після їх готування, можуть бути безпосередньо введені індивідууму. Індивідуумами, які піддаються лікуванню, можуть бути тварини, а зокрема, людина.

Фармацевтичні композиції, використовувані в даному винаході, можуть бути введені різними способами, включаючи, але не обмежуючись ними, пероральне, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, внутрішньоартеріальне, інтрамедулярне, інтратекальне, інтравентрикулярне, трансдермальне або чресшкірне введення (див., наприклад, WO 98/20734), а також підшкірне, внутрішньочеревинне, інтраназальне, внутрішньокишкове, місцеве, під'язичне, інтравагінальне або ректальне введення. Для введення фармацевтичних композицій за винаходом можуть бути також використані апарати для "вистрелювання" генів або безголчасті шприці. В основному, терапевтичні композиції можуть бути приготовлені у вигляді розчинів для ін'єкцій або рідких розчинів, або суспензій, або вони можуть бути отримані у вигляді твердих форм, які підходять для одержання розчинів або суспензій у рідких носіях перед їх ін'єкцією.

Вказані композиції можуть бути безпосередньо доставлені, в основному, шляхом підшкірної, внутрішньочеревинної, внутрішньовенної або внутрішньом'язової ін'єкції, або вони можуть бути доставлені в інтерстиційний простір тканини. Ці композиції можуть бути також введені в уражену ділянку. При цьому лікування може бути проведене за схемою введення разової дози або дробових доз.

Якщо активність поліпептиду за винаходом перевищує активність, необхідну для лікування конкретного патологічного стану, то в цьому випадку може бути розглянуто кілька підходів. Один з таких підходів передбачає введення індивідууму вищеописаної сполуки-інгібітора (антагоніста) разом з фармацевтично прийнятним носієм, де вказаний інгібітор вводять у кількості, ефективній для інгібування функції поліпептиду, наприклад, блокування зв'язування з лігандами, субстратами, ферментами або рецепторами, або для інгібування вторинного сигналу та, тим самим, ефективній для послаблення симптомів аномального стану. Такими антагоністами, переважно, є антитіла. Для мінімізації імуногенності антитіл, описаних вище, найбільше переважно, щоб такі антитіла були химерними та/або гуманізованими.

Відповідно до іншого підходу, можуть бути введені розчинні форми поліпептидів, які зберігають афінність зв'язування з розглянутим лігандом, субстратом, ферментом або рецептором. В основному, такий поліпептид може бути уведений у вигляді фрагментів, в яких зберігаються релевантні частини.

В альтернативному підході експресія гена, який кодує даний поліпептид, може бути інгібована методами блокування експресії, такими як використання молекул антисмислової нуклеїнової кислоти (описаних вище), які можуть бути генеровані ендогенно або введені окремо. Модифікації експресії генів можуть бути отримані шляхом конс-

трування комплементарних послідовностей або антисмислових молекул (ДНК, РНК або РНА) для здійснення регуляції, 5'-ділянок або регуляторних ділянок (сигнальної послідовності, промоторів, енансерів та інтронів) гена, який кодує даний поліпептид. Аналогічним чином, таке інгібування може бути здійснене з використанням методики спарювання основ з утворенням "потрійної спіралі". Спарювання з утворенням потрійної спіралі використовується тому, що воно призводить до порушення здатності подвійної спіралі розкриватися так, щоб це виявилось достатнім для зв'язування з полімеразами, факторами транскрипції або регуляторними молекулами. Успіхи в клінічній терапії, досягнуті за останній час завдяки використанню ДНК-триплекса, були описані в літературі (Gee J. E. et al. (1994); Huber B. E. & B. I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY). Комплементарна послідовність або антисмислова молекула можуть бути також сконструйовані з метою блокування трансляції мРНК за допомогою запобігання зв'язування транскрипта з рибосомами. Такі олігонуклеотиди можуть бути введені або генеровані *in situ* у результаті експресії *in vivo*.

Крім того, експресії поліпептиду за винаходом можна запобігти з використанням рибозимів, специфічних до мРНК-послідовності, яка кодує цей поліпептид. Рибозими являють собою каталітично активні РНК, які можуть бути природними або синтетичними (див. наприклад, Usman N. et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* (1996) 6(4), 527-33). Синтетичні рибозими можуть бути сконструйовані так, щоб вони специфічно розщеплювали мРНК у вибраних положеннях і, тим самим, запобігали трансляції мРНК у функціональний поліпептид. Рибозими можуть бути синтезовані з використанням природного рибозофосфатного кістяка та природних основ, зазвичай присутніх у РНК-молекулах. Альтернативно, рибозими можуть бути синтезовані з використанням не-природних кістяків, наприклад, 2'-О-метил-РНК, з метою захисту від розщеплення рибонуклеазою, і ці рибозими можуть містити модифіковані основи.

Молекули РНК можуть бути модифіковані з метою збільшення внутрішньоклітинної стабільності та часу напівжиття. Можливими модифікаціями є, але не обмежуються ними, приєднання фланкуючих послідовностей в 5'- і/або в 3'-кінців даної молекули або використання у вказаному кістяку молекули фосфортіоату або 2'-О-метилу замість фосфодіестеразних зв'язків. Ця концепція може розглядатися і при продукуванні РНА і може бути застосована до всіх вказаних молекул за допомогою включення нетрадиційних основ, таких як інозин, квеозин і бутозин, а також ацетил-, метил-, тіо- і аналогічні модифіковані форми аденіну, цитидину, гуаніну, тиміну та уридину, які не можуть легко розпізнаватися ендогенними ендонуклеазами.

Для лікування аномальних станів, асоційованих з недостатньою експресією поліпептиду за винаходом і його активності, є кілька способів. Один з таких способів передбачає введення індивідууму терапевтично ефективної кількості сполу-

ки, яка активує вказаний поліпептид, тобто сполука-агоніст, описана вище, з метою послаблення симптомів патологічного стану. Альтернативно, терапевтична кількість вказаного поліпептиду в комбінації з придатним фармацевтичним носієм може бути введена з метою збереження відповідної фізіологічної рівноваги даного поліпептиду.

Для здійснення ендogenous продукування даного поліпептиду відповідними клітинами індивідуума може бути застосована генотерапія. Генотерапію використовують для перманентного лікування захворювань, пов'язаних з аномальним продукуванням даного поліпептиду, шляхом заміни дефектного гена "правильним" терапевтичним геном.

Генотерапія за винаходом може бути здійснена *in vivo* або *ex vivo*. Для генотерапії *ex vivo* потрібне виділення та очищення клітин, взятих у пацієнта, введення терапевтичного гена та введення генетично модифікованих клітин назад пацієнтові. На противагу цьому генотерапія *in vivo* не вимагає виділення та очищення клітин пацієнтів.

Для введення пацієнтові зазвичай використовують "упакований" терапевтичний ген. Носії для доставки генів можуть бути не-вірусними, такі як ліпосоми, або вони можуть являти собою дефектні за реплікацією віруси, такі як аденовірус, описаний Berkner K. L., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158, 39-66 (1992), або вектори на основі аденоасоційованого вірусу (AAV), описані Muzyczka N. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158, 97-129 (1992) і в патенті США №5252479. Так, наприклад, молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид за винаходом, може бути сконструйована для експресії в дефектному за реплікацією ретровірусному векторі. Потім ця експресійна конструкція може бути виділена та введена в упаковувальну клітину, трансдуковану ретровірусним плазмідним вектором, який містить РНК, що кодує вказаний поліпептид, так, щоб вказана упаковувальна клітина продукувала інфекційні вірусні частинки, які містять потрібен ген. Ці клітини-продуценти можуть бути введені індивідууму для конструювання клітин *in vivo* і експресії поліпептиду *in vivo* (див. Chapter 20 *Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches* (і цитовані там посилання), Human Molecular Genetics (1996), T. Strachan & A. P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd).

Іншим способом є введення "оголеної ДНК", де терапевтичний ген безпосередньо ін'єктують у кровотоки або в м'язову тканину.

У випадку, коли поліпептидами або молекулами нуклеїнової кислоти за винаходом є агенти, які викликають захворювання, даний винахід стосується способу їх використання з метою одержання вакцин для вироблення антитіл проти вказаного агента, що викликає захворювання.

Вакцини за винаходом можуть бути або профілактичними (тобто призначеними для профілактики інфекції), або терапевтичними (тобто призначеними для лікування захворювань після інфікування). Такі вакцини містять імунізуючий(і) антиген(и), імуноген(и), поліпептид(и), білок(ки) або нуклеїнову кислоту, зазвичай у комбінації з описаними вище фармацевтично прийнятними

носіями, де вказаним носієм може бути будь-який носій, який сам по собі не індукуює вироблення антитіл, які роблять негативний вплив на індивідуума, якому вводять вказану композицію. Крім того, ці носії можуть діяти як імуностимулятори ("ад'юванти"). Більше того, антиген або імуноген може бути кон'югований з бактеріальним токсином, таким як токсин дифтерії, правця, холери, (*H. Pylori*) і інші патогени.

Оскільки поліпептиди можуть розкладатися в шлунку, то вакцини, які містять поліпептиди, переважно, вводять парентерально (наприклад, шляхом підшкірної, внутрішньом'язової, внутрішньовенної або чресшкірної ін'єкції). Композиціями, які підходять для парентерального введення, є водні та безводні стерильні розчини для ін'єкцій, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостати та розчинені речовини, які надають даній композиції ізотонічність із кров'ю реципієнта, а також водні та безводні стерильні суспензії, які можуть містити суспензуючі агенти або загусники.

Вакцинні композиції за винаходом можуть бути поміщені в ємності для разових лікарських форм або для дробових лікарських форм. Так, наприклад, ці лікарські форми можуть бути поміщені в запаяні ампули та посудини та можуть зберігатися в замороженому вигляді, в які, безпосередньо перед їх використанням, необхідно додати лише стерильний рідкий носій. Конкретна доза буде залежати від питомої активності даної вакцини та може бути легко визначена шляхом рутинного експериментування.

Генетична доставка антитіл, які зв'язуються з поліпептидами за винаходом, може бути здійснена, наприклад, як описано в Міжнародній патентній заявці WO 98/55607.

Для одержання вакцинних композицій може бути також використана технологія безголастого вприскування (див., наприклад, www.powderject.com).

Ряд придатних методів вакцинації та систем для доставки вакцин описані в Міжнародній патентній заявці WO 00/29428.

Даний винахід також стосується використання молекул нуклеїнової кислоти за винаходом як діагностичних реагентів. Детекція мутованої форми гена, що представляє собою молекули нуклеїнової кислоти за винаходом, які асоціюються з дисфункцією, застосовується як діагностичний засіб, що може полегшувати встановлення діагнозу захворювання або сприйнятливості до захворювання, що виникає в результаті зниженої експресії, надекспресії або зміненої просторової або тимчасової експресії даного гена. Індивідууми, які несуть мутації в даному гені, можуть бути ідентифіковані на ДНК-рівні різними методами.

Молекули нуклеїнової кислоти, використовувані для діагностики, можуть бути отримані із клітин даного індивідуума, таких як клітини крові, сечовини, слини, біоптату тканини або матеріалу, отриманого після аутопсії. Геномна ДНК може бути використана безпосередньо для детекції, або, перед проведенням аналізу, вона може бути ампліфікована ферментативним способом за допомогою ПЛР, лігазної ланцюгової реакції (ЛЛР),

ампліфікації із заміщенням ланцюга (SDA) або іншими методами ампліфікації (див. Saiki et al., *Nature*, 324, 163-166 (1986); Bej et al., *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.*, 26, 301-334 (1991); Birkenmeyer et al., *J. Virol. Meth.*, 35, 117-126 (1991); Van Brant, *J. Bio/Technology*, 8, 291-294 (1990)).

В одному зі своїх аспектів даний винахід стосується способу діагностики захворювання в пацієнта, що включає оцінку експресії природного гена, який кодує поліпептид за винаходом, і порівняння отриманого рівня експресії з контрольним рівнем, де рівень, який відрізняється від вказаного контрольного рівня, є ознакою наявності даного захворювання. Цей спосіб включає наступні стадії:

а) контактування зразка тканини, взятої в пацієнта, з нуклеїновокислотним зондом у жорстких умовах, у результаті чого утворюється гібридний комплекс між молекулою нуклеїнової кислоти за винаходом та вказаним зондом;

б) контактування контрольного зразка із вказаним зондом в умовах, аналогічних умовам стадії (а);

с) і детекцію присутності гібридних комплексів у вказаних зразках, де детекція рівнів гібридного комплексу у зразку, взятому в даного пацієнта, які відрізняються від рівнів гібридного комплексу в контрольному зразку, є ознакою наявності даного захворювання.

В іншому своєму аспекті даний винахід стосується способу діагностики, що включає наступні стадії:

а) одержання зразків тканин від пацієнта, досліджуваного на наявність захворювання;

б) виділення молекули нуклеїнової кислоти за винаходом із вказаного зразка тканини; і

с) встановлення діагнозу захворювання в даного пацієнта шляхом виявлення присутності мутації молекули нуклеїнової кислоти, яка асоціюється з даним захворюванням.

Для полегшення детекції молекул нуклеїнової кислоти в описаних вище способах може бути проведена стадія ампліфікації, наприклад, за допомогою ПЛР.

Делеції та інсерції можуть бути детектовані за зміною розміру ампліфікованого продукту в порівнянні з нормальним генотипом. Точкові мутації можуть бути ідентифіковані шляхом гібридизації ампліфікованої ДНК із міченою РНК за винаходом, або альтернативно, з міченими антисмисловими ДНК-послідовностями за винаходом. Повністю відповідні послідовності можуть бути диференційовані від дуплексів з помилковим спарюванням шляхом гідролізу РНКазою або шляхом оцінки розходжень у температурах плавлення. Присутність або відсутність мутації у пацієнта може бути визначена за допомогою контактування ДНК із нуклеїновокислотним зондом, що гібридується із ДНК у жорстких умовах, у результаті чого утворюється гібридна дволанцюжкова молекула, де вказана гібридна дволанцюжкова молекула має негібридизовану частину ланцюга нуклеїновокислотного зонда в будь-якій ділянці, що відповідає мутації, асоційованій із захворюванням; і встановлення присутності або відсутності не-

гібридизованої частини ланцюга нуклеїновокислотного зонда як показника наявності або відсутності асоційованої із захворюванням мутації у відповідній частині ДНК-ланцюга.

Такі способи діагностики є особливо цінними для проведення пренатальних і навіть неонатальних тестів.

Точкові мутації та інші відмінності послідовностей еталонного гена та "мутантних" генів можуть бути ідентифіковані іншими, добре відомими методами, такими як пряме секвенування ДНК або визначення конформаційного поліморфізму одноланцюжкових послідовностей (див. Orita et al., *Genomics*, 5, 874-879 (1989)). Так, наприклад, секвенуючий праймер може бути використаний разом із дволанцюжковим ПЛР-продуктом або з одноланцюжковою матричною молекулою, генерованою за допомогою модифікованої ПЛР. Визначення послідовності здійснюють відповідно до стандартних процедур з використанням радіоактивно мічених нуклеотидів або відповідно до процедур автоматичного секвенування з використанням флуоресцентних міток. Клоновані ДНК-сегменти можуть бути також використані як зонди для детекції специфічних ДНК-сегментів. Чутливість цього методу значно підвищується при використанні комбінованої ПЛР. Крім того, точкові мутації та інші модифікації послідовностей, такі як поліморфізм, можуть бути детектовані, як описано вище, наприклад, з використанням алель-специфічних олігонуклеотидів для ПЛР-ампліфікації послідовностей, які відрізняються одним нуклеотидом.

Розходження в ДНК-послідовностях можуть бути також детектовані за змінами електрофоретичної рухливості ДНК-фрагментів у гелях у присутності або під час відсутності денатуруючих агентів, або шляхом прямого секвенування ДНК (наприклад, Myers et al., *Science* (1985) 230:1242). Зміни в конкретних положеннях даних послідовностей можуть бути також виявлені або шляхом проведення аналізів на захист від нуклеази, таких як аналіз на захист від РНКаз або S1, або методом хімічного розщеплення (див. Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 85:4397-4401).

Крім стандартного гель-електрофорезу та секвенування ДНК, мутації, такі як мікрodelеції, анеупloidії, транслокації та інверсії, можуть бути також детектовані шляхом проведення аналізу *in situ* (див. наприклад, Keller et al., *DNA Probes*, 2nd Ed., Stockton Press, New York, N. Y., USA (1993)), тобто ДНК або РНК-послідовності в клітинах можуть бути проаналізовані на мутації, без їх виділення та/або іммобілізації на мембрані. У даний час найбільш широко використовуваним методом є гібридизація *in situ* із флуоресценцією (FISH), і в літературі вже з'явилася множина описів цього методу (див. наприклад, Trachuck et al., *Science* 250, 559-562 (1990) і Trask et al., *Trends, Genet.*, 7, 149-154 (1991)).

В іншому варіанті здійснення даного винаходу для проведення ефективного скринінга генетичних варіантів, мутацій і поліморфізму може бути створений масив олігонуклеотидних зондів, які містять молекулу нуклеїнової кислоти за винаходом. Технологія створення масивів добре відома фахівцям

і знаходить широке застосування; при цьому вона може бути використана для вирішення ряду проблем молекулярної генетики, які стосуються експресії генів, зчеплення генів і генетичної мінливості (див. наприклад, M. Chee et al., *Science* (1996) Vol. 274, pp. 610-613).

В одному з варіантів здійснення винаходу такий масив може бути отриманий і використаний відповідно до методів, описаних в заявці PCT WO 95/11995 (Chee et al.); Lockhart D. J. et al., (1996) *Nat. Biotech.* 14:1675-1680); і Schena M. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:10614-10619). Олігонуклеотидні пари можуть бути використані в кількості від двох пар до одного мільйона пар. Ці олігомери синтезують у відповідних ділянках на субстраті з використанням оптично спрямованого хімічного синтезу. Таким субстратом може бути папір, нейлон або мембрана іншого типу, фільтр, чіп, покритве скло або будь-який інший твердий носій. В іншому аспекті за винаходом олігонуклеотид може бути синтезований на поверхні субстрату з використанням процедури хімічного зв'язування та струминного апарата для нанесення шляхом розбризкування, як описано в заявці PCT WO 95/251116 (Balteschweiler et al.). В іншому своєму аспекті для визначення порядку розташування кДНК-фрагментів або олігонуклеотидів на поверхні субстрату та зв'язування цих фрагментів або олігонуклеотидів з поверхнею субстрату можуть бути використані "сітчасті" масиви, аналогічні масивам для дот (або слот)-блотів, із застосуванням вакуумної системи та процедур термічного, УФ-, механічного або хімічного зв'язування. Масив, такий як масиви, описані вище, може бути створений вручну або за допомогою придатних пристроїв (слот-блот або дот-блот-апарата), матеріалів (будь-якого твердого носія) і устаткування (включаючи роботизовану апаратуру), і цей масив може містити 8, 24, 96, 384, 1536 або 6144 олігонуклеотидів, або будь-яку іншу кількість від двох до більше ніж один мільйон, що є придатним для ефективного використання комерційно доступного устаткування.

Крім методів, описаних вище, захворювання можуть бути діагностовані методами, які передбачають визначення у зразку, взятому в індивідуума, аномально низького або аномально високого рівня поліпептиду або мРНК. Для кількісної оцінки поліпептидів знижений або підвищений рівень експресії може бути вимірюваний на РНК-рівні будь-якими методами, добре відомими фахівцям, наприклад, шляхом ампліфікації нуклеїнових кислот, наприклад, за допомогою ПЛР або ОТ-ПЛР, шляхом проведення аналізів на захист від РНКазі, Нозерн-блот-аналізів і інших методів гібридизації.

Аналітичні методи, які можуть бути використані для визначення рівнів поліпептиду за винаходом у зразку, взятому в хазяїна, добре відомі фахівцям і більш докладно обговорюються вище (включаючи радіоімунаналізи, аналізи на конкурентне зв'язування, Вестерн-блот-аналіз і ELISA-аналізи). У цьому аспекті даний винахід стосується способу діагностики, що включає стадії: (а) контактування ліганду, описаного вище, з біологічним зразком в умовах, які підходять для утворення комплексу;

ліганд-поліпептид; і (b) детекції вказаного комплексу.

Протоколи, такі як ELISA, PIA та FACS, розроблені для вимірювання рівнів поліпептидів, можуть бути, крім того, взяті за основу для визначення змінених або аномальних рівнів експресії поліпептиду. Нормальні або стандартні значення для експресії поліпептиду одержують шляхом об'єднання фізіологічних рідин або клітинних екстрактів, узятих у нормальних ссавців, переважно, у людини, з антитілом проти даного поліпептиду в умовах, які підходять для утворення комплексу. Кількість утвореного стандартного комплексу може бути оцінена різними методами, такими як фотометричні методи.

Антитіла, які специфічно зв'язуються з поліпептидом за винаходом, можуть бути використані для діагностики станів або захворювань, що характеризуються експресією поліпептиду, або в аналізах для спостереження за пацієнтами, яким було проведено лікування поліпептидами, молекулами нуклеїнової кислоти, лігандами та іншими сполуками за винаходом. Антитіла, які підходять для використання в діагностичних цілях, можуть бути отримані способом, аналогічним способу, описаному вище для терапії. Діагностичні аналізи на присутність поліпептиду здійснюють методами, які передбачають використання антитіла та мітки для детекції поліпептиду у фізіологічних рідинах, екстрактах клітин або тканин людини. При цьому можуть бути використані модифіковані або немодифіковані антитіла, і ці антитіла можуть бути позначені шляхом їх ковалентного або нековалентного зв'язування з репортерною молекулою. При цьому можуть бути використані репортерні молекули широкого ряду, відомі фахівцям, і деякі із цих молекул описані вище.

Кількості поліпептиду, експресованого в індивідуума, у контрольному зразку та зразку тканини, взятої при біопсії, порівнюють зі стандартними величинами. Відхилення величин, отриманих для даного індивідуума, від стандартних величин дозволяє визначити параметри для діагностики захворювання. Діагностичний аналіз може бути проведений для виявлення відсутності, присутності та надлишкової експресії поліпептиду та для моніторингу регуляції рівнів поліпептиду під час терапевтичного лікування. Такі аналізи можуть бути також проведені для оцінки ефективності конкретного курсу терапевтичного лікування при дослідженні тварин у клінічних випробуваннях або для спостереження за процесом лікування окремого пацієнта.

Діагностичний набір за винаходом може містити:

- (а) молекулу нуклеїнової кислоти за винаходом;
- (b) поліпептид за винаходом; або
- (с) ліганд за винаходом.

В одному з аспектів даного винаходу діагностичний набір може включати перший контейнер, який містить нуклеїновоокислотний зонд, що гібридується в жорстких умовах з молекулою нуклеїнової кислоти за винаходом; другий контейнер, що містить праймери, які підходять для ампліфікації молекули нуклеїнової кислоти; і інструкції з вико-

ристання зонда та праймерів для полегшення діагностики захворювання. Цей набір може, крім того, включати третій контейнер, що містить агент для гідролізу негібридизованої РНК.

В альтернативному аспекті даного винаходу діагностичний набір може містити масив молекул нуклеїнової кислоти щонайменше однієї з яких може бути молекула нуклеїнової кислоти за винаходом.

Для детекції поліпептиду за винаходом діагностичний набір може містити одне або кілька анти-тіл, які зв'язуються з поліпептидом за винаходом, і реагент, використовуваний для детекції реакції зв'язування між антитілом і поліпептидом.

Такі набори можуть бути використані для діагностики захворювання або сприйнятливості до захворювання, зокрема, деяких захворювань, які включають, але не обмежуються ними, розлади функції зору, розлади імунної системи (наприклад, аутоімунні розлади), запальні розлади, запальне захворювання кишечника (IBD), виразковий коліт (UC), хвороба Крона (CD), проктит, клітинно-проліферативні розлади, рак (наприклад, рак молочної залози), мікробні інфекції (наприклад, вірусні, бактеріальні та грибові інфекції), емфізему, шкірні захворювання, репродуктивні розлади (наприклад, безпліддя, зокрема, чоловіче безпліддя), дисфункцію нирок, інфаркт міокарда, артрит і розсіяний склероз, кістозно-фіброзну мастопатію та регуляцію розвитку нервової системи.

Різні аспекти та варіанти даного винаходу будуть більш докладно проілюстровані, наприклад, в описі, зокрема, що стосується поліпептидів INSP181.

При цьому слід зазначити, що в даний винахід можуть бути внесені конкретні модифікації, які не виходять за межі обсягу винаходи.

Короткий опис графічного матеріалу

Фіг.1: Результати аналізу INSP181 з використанням програми BLAST і доступної бази даних.

Фіг.2: Співставлення результатів аналізу top blast з INSP181.

Фіг.3: Результати аналізу INSP181 у межах методики Signal.

Фіг.4: Множинне співставлення послідовності INSP181 і споріднених послідовностей, що містять домен ліпокаліну.

Фіг.5: Послідовність ДНК і білка INSP181. Положення та смисловий статус ПЛР-праймерів вказані стрілками.

Фіг.6: Співставлення нуклеотидної послідовності кДНК, клонованої з використанням INSP181-CP3 і INSP181-CP4 ПЛР-праймерів, з передбаченою послідовністю INSP181.

Фіг.7: Співставлення за амінокислотною послідовністю кДНК, клонованою з використанням INSP181-CP3 і INSP181-CP4 ПЛР-праймерів, з передбаченою послідовністю INSP181.

Фіг.8: Аналіз нуклеотидної послідовності із проведенням трансляції продукту ПЛР INSP 181, клонованого з використанням INSP181-CP3 і INSP181-CP4 праймерів.

Фіг.9: Аналіз нуклеотидної послідовності із проведенням трансляції продукту ПЛР INSP181-SV, клонованого з використанням INSP181-CP3 і INSP181-CP4 праймерів.

Фіг.10: Результати аналізу INSP 181 з використанням програми NetNGyc. Сайт глікозилювання вказаний у положенні 92.

Фіг.11: Послідовність продукту трансляції та властивості INSP 181.

Фіг.12: Експресія INSP181 у більшості тканин людини за даними аналізу, проведеного за методом ОТ-ПЛР (TaqMan).

Фіг.13: Експресія INSP181 у біоптатах уражених захворюванням тканин, взятих з варіантів програми клінічного випробування, за результатами аналізу за методом ОТ-ПЛР (TaqMan).

Фіг.14: Доменний аналіз із використанням Domain Professor Information, що демонструє передвіщений домен ліпокаліну в INSP181.

Фіг.15: Результати аналізу домену ліпокаліну застосовно до сімейства/залишків, які стосуються передбаченої вторинної структури та положення дисульфідного містка.

Таблиця 1

Амінокислота	Синонімічні групи	Більш переважні синонімічні групи
Ser	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Arg	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Leu	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Pro	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Pro
Thr	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala, Ser	Gly, Ala
Val	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	Gly, Ala
Ile	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Phe	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys	Cys
His	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His

Gln	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Asn	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Lys	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Asp	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Glu	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp, Phe, Tyr	Trp

Таблиця 2

Амінокислота	Синонімічні групи
Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, алло-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Arg	D-Arg, Lys, D-Lys, гомо-Arg, D-гомо-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Leu	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, Ada, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Pro	D-Pro, L-I-тіазолідин-4-карбонова кислота, D- або L-1-оксазолідин-4-карбонова кислота
Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, ало-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Ala	D-Ala, Gly, Aib, B-Ala, Asp, L-Cys, D-Cys
Val	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, Ada, Ada
Gly	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, бера-Ala, Asp
Ile	D-Ile, Val, D-Val, Ada, Ada, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Phe	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-допа, His, D-His, Trp, D-Trp, транс-3,4- або 5-фенілпролін, Ada, Ada, цис-3,4- або 5-фенілпролін, Бра, D-Бра
Tyr	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-допа, His, D-His
Cys	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Gln	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Asn	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Lys	D-Lys, Arg, D-Arg, гомо-Arg, D-гомо-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Asp	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Glu	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Met	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val

Приклади

Приклад 1. INSP181

Використовують послідовність поліпептиду INSP181 як послідовність, що вводять для пошуку, з використанням програми BLAST у базі даних не-надлишкових послідовностей NCBI. На Фіг.1 показані десять головних спарюваних варіантів, виявлених при пошуку по програмі BLAST. На Фіг.2 наведені результати порівняльного аналізу послідовності, які вводять для пошуку, INSP181 у масиві, що включає десять основних варіантів top blast.

Клонування кДНК INSP181 дозволяє здійснити експресію білка INSP181 у прокаріотичних або еукаріотичних системах експресії і його наступне очищення з описом властивостей отриманого продукту. Так, наприклад, рекомбінантний INSP181 може використовуватися для створення INSP181-специфічних моноклональних або поліклональних антитіл, які далі можуть використовуватися для цілей характеристики INSP181. Альтернативно,

рекомбінантний INSP181 може використовуватися в широкому переліку скринінг-аналізів, включаючи описані вище тести та тести, наведені далі, у прикладі 5.

Приклад 2. Клонування INSP181 і INSP181SV

2.1 Одержання матриць кДНК людини

Перший ланцюг кДНК одержують зі зразків сумарної РНК, виділених з різних тканин людини (Clontech, Stratagene, Ambion, Biochan Institute і препарати для внутрішнього використання в компанії) з використанням Superscript II або Superscript III (Invitrogen) за інструкцією виробника.

У випадку Superscript II: поєднують в епендорфській пробірці на 1,5мл оліго (dT)₁₅ праймер (1мкл при концентрації 500мкг/мл) (Promega), 2мкг сумарної РНК людини, 1мкл 10мМ суміші dNTP (по 10мМ кожного з дАТФ, дГТФ, дЦТФ і дТТФ при нейтральному рН) і стерильну дистильовану воду, у кількості, потрібній для доведення до кінцевого об'єму 12мкл, нагрівають до 65°C протягом 5 хви-

лин і охолоджують на льоді. Вміст збирають при проведенні швидкого центрифугування та додають 4мкл 5X спеціального буфера для одержання першого ланцюга (First-Strand Buffer), 2мкл 0,1M ДТТ і 1мкл інгібітора рекомбінантної рибонуклеази RNaseOUT™ (40одиниць/мкл, Invitrogen). Вміст пробірки обережно перемішують і інкубують при температурі 42°C протягом 2 хвилин, після чого додають 1мкл (200 одиниць) ферменту Superscript II™ і обережно перемішують шляхом піпетування. Суміш інкубують при температурі 42°C протягом 50 хвилин і потім інактивують нагріванням при 70°C протягом 15 хвилин. Для видалення РНК, комплементарної до кДНК, додають 1мкл (2 одиниці) РНКазы Н. Е. coli (Invitrogen) і реакційну суміш інкубують при 37°C протягом 20 хвилин.

У випадку Superscript III: поєднують в епендорфській пробірці на 1,5мл 1мкл оліго (дТ)₂₀ праймера (50DM, Invitrogen), 2мкг сумарної РНК людини, 1мкл 10mM суміші dNTP (по 10mM кожного з дАТФ, дГТФ, дЦТФ і дТТФ при нейтральному рН) і стерильну дистильовану воду, у кількості, потрібній для доведення до кінцевого об'єму 10мкл, нагрівають до 65°C протягом 5 хвилин і охолоджують на льоді. Для кожної з реакцій RT суміш для синтезу кДНК готують у такий спосіб: поєднують в окремій пробірці 2мкл 10X RT буфера, 4мкл 25mM MgCl₂, 2мкл 0,1M ДТТ, 1мкл RNaseOUT™ (40Од/мл) і 1мкл від ферменту Superscript III™ і потім додають 10мкл даної суміші до пробірки, яка містить суміш РНК/праймер. Вміст пробірки обережно перемішують, збирають при проведенні швидкого центрифугування та інкубують при 50°C протягом 50 хвилин. Реакцію зупиняють шляхом інкубації при температурі 80°C протягом 5 хвилин, після чого реакційну суміш охолоджують на льоді та збирають при проведенні швидкого центрифугування. Для видалення РНК, комплементарної до кДНК, додають 1мкл (2 одиниці) РНКазы Н. Е. coli (Invitrogen) і реакційну суміш інкубують при 37°C протягом 20 хвилин.

Кінцеву реакційну суміш в об'ємі 21мкл розбавляють додаванням 179мкл стерильної води з доведенням загального об'єму до 200мкл. Зразки РНК збирають у сукупні пули, так щоб кожний з них містив до п'яти різних зразків кДНК. Використовують по 5мкл кожного з пулів кДНК як матрицю для ПЛР у кінцевому об'ємі реакційної суміші 50мкл, що включає 1мкл кожного зі зразків кДНК із даного пула. Це буде, у свою чергу, відповідати 20нг кожної індивідуальної матриці кДНК.

2. 2. Бібліотеки кДНК

Бібліотеки кДНК людини (у векторах бактеріофага ламбда) купують від Stratagene, Clontech або Invitrogen або створюють на базі Інституту Фармацевтичних Досліджень (Serono Pharmaceutical Research Institute) у векторах λ ZAP, λ GT10, λ GT11 або Triplex, відповідно до інструкції виробника (Stratagene або Clontech). ДНК бактеріофага λ виділяють із культур невеликих лусочок інфікованого хазяйського штаму E. coli з використанням системи очищення ДНК Wizard Lambda Preps, відповідно до інструкції виробника (Promega, Corporation, Madison WI).

2. 3. Геноспецифічне клонування праймерів для ПЛР

Створюють дві пари ПЛР-праймерів з довжиною від 18 до 30 основ для використання в реакції ампліфікації передвіщеного cds INSP181 з використанням програмного забезпечення Primer Designer Software (Scientific & Educational Software, PO Box 72045, Durham, NC 27722-2045, USA). ПЛР-праймери оптимізують до показника T_m, близького до 55±10°C, з досягненням вмісту ГЦ пар у діапазоні 40-60%. Відбирають праймери, які мають високу селективність для розглянутої послідовності (INSP181), при наявності невеликого, або взагалі за його відсутності, специфічного примування. Праймери генерують таким чином, щоб утворилися дві гніздові пари та при цьому праймери INSP181-CP3/INSP181-CP4 локалізувалися із внутрішньої сторони відносно праймерів INSP181-CP1/INSP181-CP2.

2. 4. ПЛР-ампліфікація INSP181 на основі матриць кДНК людини

Створюють геноспецифічні клонуєчі праймери INSP181-C1 і INSP181-CP2 (таблиця 1, Фіг.5) для ампліфікації фрагмента кДНК довжиною 540п.н., що містить INSP181 cds. Використовують пару праймерів у поєднанні з панеллю з бібліотеки кДНК і пулами зразків кДНК як матриці для ПЛР. Дану ПЛР1 проводять у середовищі з кінцевим обсягом 50мкл, що містить буфер 1X AmpliTaq™, 200мкM dNTP, 50пмоль кожного із клонуєчких праймерів, 2,5 одиниці AmpliTaq™ (Applied Biosystems) і приблизно 20нг матриці кДНК із вказаної бібліотеки або 100нг матриці кДНК із відповідного пула з використанням апарата для обробки ДНК MJ Research DNA Engine, запрограмованого на роботу в наступному режимі: 94°C, 2 хвилини; 40 циклів: 94°C, 1 хвилина, 55°C, 1 хвилина та 72°C, 1 хвилина; і потім 1 цикл при 72°C протягом 7 хвилин і цикл витримування при 4°C.

Потім кожний продукт ПЛР1 використовують як матрицю для проведення ПЛР2 з використанням ампліфікуючих праймерів INSP181-C3 і INSP181-CP4 (таблиця 4, Фіг.5-9), створених для цілей ампліфікації фрагмента кДНК довжиною 496п.н. у продукті INSP181-CP1/INSP181-CP2. Дану ПЛР2 проводять у середовищі з кінцевим обсягом 50мкл, що містить буфер 1X AmpliTaq™, 200мкM dNTP, 50 пмоль кожного із клонуєчких праймерів, 2,5 одиниці AmpliTaq™ (Applied Biosystems) і 1мкл продукту ПЛР1 з використанням апарата для обробки ДНК MJ Research DNA Engine, запрограмованого на роботу в наступному режимі: 94°C, 2 хвилини; 40 циклів: 94°C, 1 хвилина, 59°C, 1 хвилина та 72°C, 1 хвилина; і потім 1 цикл при 72°C протягом 7 хвилин і цикл витримування при 4°C.

Беруть по 30мкл кожного із продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР1 і ПЛР2, для візуалізації на 0,8% гелі агарози в буфері 1X TAE (Invitrogen). Продукти, що мають приблизно очікувану молекулярну масу (540п.н. - для ПЛР1, 496п.н. - для ПЛР2), виділяють із гелю та очищують із використанням системи очищення Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega), елюють в 50мкл води та піддають безпосередньому клонуванню.

2. 5 Субклонування продуктів ПЛР

Продукти ПЛР піддають субклонуванню в модифікованому клонуєчому векторі топоізомери I (pCR4-TOPO) з використанням набору для клонування TA від компанії Invitrogen Corporation в умовах, вказаних виробником. Загалом процедура обробки полягає в наступному: 4мкл виділеного з гелю та очищеного продукту ПЛР інкубують протягом 15 хвилин при кімнатній температурі з 1мкл вектора TOPO і 1мкл розчину солі. Потім вказану реакційну суміш використовують для трансформації E. coli штам TOP10 (Invitrogen) по за наступною процедурою: відтаюють на льоді аліквоту 50мкл клітин One Shot TOP10 і додають 2мкл реакційної суміші TOPO. Далі суміш інкубують протягом 15 хвилин на льоді, після чого проводять шоківу теплову обробку шляхом інкубації при 42°C точно протягом 30 секунд. Зразки знову поміщають на лід і додають 250мкл теплої (кімнатної температури) середовища SOC. Зразки інкубують при струшуванні (220об./хв.) протягом 1 години при 37°C. Далі трансформуючу суміш поміщають на чашки з L-бульйоном (LB), який містять ампіцилін (100мкг/мл), і інкубують протягом ночі при 37°C.

2. 6 ПЛР колонії

Колонії інокують в 50мкл стерильної води з використанням стерильної палички. Беруть аліквоту 10мкл інокуляту для проведення ПЛР у загальному об'ємі реакційної суміші 20мкл, що містить буфер 1X AmpliTaq™, 200мкМ dNTP, 20пмоль праймера T7, 20пмоль праймера T3, 1 одиницю AmpliTaq™ (Applied Biosystems) з використанням апарата для обробки ДНК MJ Research DNA Engine. Проводять цикл обробки в наступному режимі: 94°C, 2 хвилини; 30 циклів: 94°C, 30 секунд, 48°C, 30 секунд і 72°C протягом 1 хвилини. Після цього зразки зберігають при 4°C (цикл вимірювання).

Продукти ПЛР наносять для аналізу на 1% гель агарози в 1X TAE буфера. Колонії, які дають продукти ПЛР приблизно очікуваної молекулярної маси (540п.н. або 496п.н.+105п.н., за рахунок наявності сайту множинного клонування (MCS)), вирощують протягом ночі при 37°C в 5мл L-бульйону (LB), який містить ампіцилін (100мкг/мл) зі струшуванням при 220об./хв.

2. 7 Одержання та секвенування плазмідної ДНК

З 5мл культури одержують плазмідну ДНК Miniprep з використанням роботизованої системи Biorobot 8000 (Qiagen) або набору Wizard Plus SV Minipreps (Promega, номер за каталогом №1460), відповідно до інструкції виробника. Плазмідну ДНК елюють в 80мкл стерильної води. Вимірюють концентрацію ДНК із використанням фотометра Eppendorf BO або фотометра Spectramax 190 (Molecular Devices). Плазмідну ДНК (200-500нг) аналізують за процедурою секвенування ДНК із використанням секвенуючих праймерів T7 і T3 (таблиця 1) і системного устаткування BigDye Terminator system (Applied Biosystems, номер за каталогом №4390246), відповідно до інструкції виробника. Реакції секвенування проводять із використанням колонок Dye-Ex (Qiagen) або пластин для очищення Montage SEQ 96 (Millipore, номер за каталогом №LSKS09624), після чого аналізують на секвенаторі Applied Biosystems 3700.

При аналізі послідовності був ідентифікований клон, ампліфікований з пула, який містить кДНК, отриману з атеросклеротичної бляшки та базофілів, у ПЛР2, що містить очікувану послідовність продукту ПЛР INSP181-CP3/INSP181-CP4. Послідовність фрагмента клонованої кДНК показана на Фіг.8. Клонований продукт ПЛР міститься в плазміді pCR4-TOPO-INSP181.

Ідентифікують другий клон, ампліфікований з пула, який містить кДНК, отриману зі слизової залози, надниркової залози, ока та універсальної еталонної матричної PIЖ Stratagene у продукті ПЛР2, що містить очікуваний продукт INSP181-CP3/INSP181-CP4, але з наявністю інсерції з 25 амінокислот на старті екзону 4. Вказана інсерція призводить до амінокислотної заміни F113V. Порівняння з послідовністю геномної ДНК виявляє, що даний клон також містить амінокислотні заміни N92T і G114S, які можуть являти собою збої, викликані проведенням ПЛР, хоча на цій стадії не може бути виключене явище поліморфізму. Послідовність фрагмента клонованої ДНК показана на Фіг.9. Клонований продукт ПЛР міститься в плазміді pCR4-TOPO-INSP181-SV1.

Таблиця 1

Праймер	Послідовність (5'-3')
INSP181-CP1	CCC TGG AGA AAG GCC CGC TCC TG
INSP181-CP2	AGG GTG GGG GAC ATG GGC CAT C
INSP181-CP3	GCT GCT GGC CCT TGG CCT GG
INSP181-CP4	TAT GTT GAA GAC CGG GGC TTT CTG
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG

Приклад 3: Генерування Gateway-сумісної OPC INSP181, приєднаної до послідовності 6HIS-матриці з збереженням рамки зчитування

INSP181 клонують за процедурою гніздової ПЛР і, у цьому зв'язку, інсерція кДНК у клоні pCR4-TOPO (плазмідна pCR4-TOPO-INSP181) втрачає ділянку в 26п.н. на 5'-кінці та в 21п.н. на 3'-кінці

кодуєчій послідовності. Включення пропущених нуклеотидів, 6-HIS-mitkh та стоп-кодону, - усе досягається при вбудовуванні відповідних нуклеотидів у праймери, використовуваних в реакції ампліфікації за методом ПЛР. Послідовності ПЛР праймерів, які були використані для клонування, показані в таблиці 2.

Таблиця 2

Праймер	Послідовність (5'-3')
INSP181 MAT FP	GCC ACC ATG GCC CTG GAG AAA GGC CCG CTC CTG CTG CTG GCC CTT GGC
INSP181 MAT RP	GTG ATG GTG ATG GTG GGG TGG GGG TGG GCC ATC TAT GTT GAA GAC CGG
INSP181 ATTB1 FP	G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GCC ACC ATG GCC CTG
ATTB1 PCR RP	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TCA ATG GTG ATG GTG ATG GTG
INSP181 SV1 (T92N) FP	GGG TGT GTA AAG AAA CAA ACA TCA CCG TCC ATC CAA C
INSP181 SV1 (T92N) RP	GTT GGA TGG ACG GTG ATG T TTG TTT CTT TAC ACA CCC
INSP181SV1 (S114G) FP	TGG CAT GGG GGG GTC CAG G GCC TGG GGG ACG GAG GAG
INSP181SV1 (S114G) RP	CTC CTC CGT CCC CCA GGC C CTG GAC CCC CCC ATG CCA
21 M13 FP	CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13 RP	CAG GAA ACA GCT ATG AC
pEAK12 FP	AGC CTC AGA CAG TGG TTC AA
pEAK12 RP	GAT GGA GGT GGA CGT GTC AG

Підкреслена послідовність = послідовність Козака

Послідовність, виділена жирним шрифтом = стоп-кодон

Послідовність, виділена курсивом = His-мітка

Використовують плазмиду pCR4-TOPO-INSP181 як ПЛР-матрицю для генерування повнорозмірної OPC, яка містить С-кінцеву 6His-мітку та стоп-кодон. Перша стадія способу Gateway-клонування включає двостадійну ПЛР-реакцію, у результаті якої генерується повнорозмірна OPC INSP181, фланкована у 5'-кінця attB1-сайтом рекомбінації та послідовністю Козака, а у 3'-кінця - послідовністю, що кодує 6-гістидинову (6HIS) мітку зі збереженням рамки зчитування, стоп-кодоном і апB2-сайтом рекомбінації (Gateway-сумісна кДНК). Реакційна суміш для першої ПЛР (у кінцевому об'ємі 50мкл) містить, відповідно: 1мкл (25нг) плазмиди pCR4-TOPO-INSP181, 4,0мкл dNTP (10мМ), 5мкл 10X полімеразного буфера Pfx, 1мкл MgSO₄ (50мМ), 1,0мкл кожного геноспецифічного праймера (з досягненням кінцевої концентрації 100мкМ) (INSP181 MAT FP і INSP181 MAT RP) і 0,5мкл ДНК-полімерази Platinum Pfx (Invitrogen). ПЛР-реакцію здійснювали в наступному режимі: попередня стадія денатурації при 95°C протягом 2хв., потім 30 циклів при 94°C протягом 30сек., 64°C протягом 30сек. і 68°C протягом 2хв.; з наступним проведенням циклу подовження при 68°C протягом 5хв. і циклу витримування при 4°C. Ампліфікований продукт безпосередньо очищували з використанням набору для очищення ДНК Perfectprep Gel (Eppendorf) і розводили в 50мкл стерильної води, відповідно до інструкцій виробника. Використовують аліквоту 2мкл для візуалізації на 1,6% гелі агарози в 1X TAE буфера для підтвердження того, що даний продукт має очікувану молекулярну масу (543п.н.+24п.н.=567п.н.).

Реакційна суміш для другої ПЛР (у кінцевому обсязі 50мкл) містить 1мкл розведеного очищеного ПЛР 1-продукту (до кінцевої концентрації 10нг), 4,0мкл dNTP (10мМ), 5мкл 10X полімеразного буфера Pfx, 1мкл MgSO₄ (50мМ), 1,0мкл кожного

конвертуючого Gateway-праймера (з досягненням кінцевої концентрації 100пмоль) (NSP181 ATTB1 FP і ATTB1 PCR RP) і 0,5мкл ДНК-полімерази Platinum Pfx. Другу ПЛР-реакцію здійснювали в наступному режимі: 95°C протягом 2 хв., з наступними 30 циклами при 94°C, 30сек., 60°C, 30сек., і 68°C, 2хв.; з кінцевим циклом подовження при 68°C протягом 5хв. і циклом витримування при 4°C. Продукт ПЛР очищували в гелі з використанням набору для очищення ДНК Perfectprep Gel (Eppendorf) і розводили в 50мкл стерильної води, відповідно до інструкцій виробника. 2мкл-аліквоту візуалізували на 1,6% агарозному гелі в 1X TAE-буфері (Invitrogen) для підтвердження одержання продукту з очікуваною молекулярною масою (567п.н.+64п.н.=631п.н.).

3. 1. Субклонування Gateway-сумісної OPC INSP181-6HIS у вбудований Gateway-вектор pDONR221

Друга стадія процесу Gateway-клонування включає субклонування Gateway-модифікованого ПЛР-продукту у вбудований Gateway-вектор pDONR221 (Invitrogen), що проводили в такий спосіб: 5мкл екстрагованого з гелю ПЛР2-продукту інкубували з 1,5мкл вектора pDONR221 (0,1мкг/мкл), 2мкл буфера BP і 1,5мкл суміші клоназних ферментів BP (Invitrogen) у кінцевому об'ємі 10мкл при кімнатній температурі протягом 1 години. Реакцію припиняли додаванням 1мкл протеїнази К (2мкг/мл) та інкубували при 37°C ще 10 хвилин. Аліквоту цієї реакційної суміші (2мкл) використовували для трансформації клітин штаму DH5α (Invitrogen), проведеної в такий спосіб: 50мкл-аліквоту клітин DH5α відтавали на льоді та додавали 2мкл реакційної суміші. Суміш інкубували протягом 30хв. на льоді та потім піддавали шоківій тепловій обробці шляхом інкубації при 42°C точно протягом 30 секунд. Зразки знову переноси-

ли на лід і додавали 250мкл теплового середовища SOC (кімнатної температури). Зразки інкубували при струшуванні (250об./хв.) протягом 1 години при 37°C. Потім суміш для трансформації висівали на планшети з L-бульйоном (LB), що містить канаміцин (40мкг/мл), та інкубували протягом ночі при 37°C.

Відбирали п'ять трансформантів і висівали у вигляді плями на планшети з LB-агаром, який містить канаміцин (40мкг/мл), та інкубували протягом ночі при 37°C. Ложку культури, яка росте, із чашки з висівом ресуспендували в 50мкл води та кип'ятили протягом 5 хвилин для лізису клітин. Клітинний лізат центрифугували для видалення клітинних уламків і отриманий супернатант використовували як матрицю для ПЛР-скринінга колоній.

Суміш для проведення ПЛР (у кінцевому об'ємі 25мкл) містила 10мкл центрифугованого лізату клітин, 2,0мкл dNTP (10мм), 2,5мкл Taq-полімеразного буфера, 0,5мкл праймерів для скринінга (з досягненням кінцевої концентрації 100пікомоль) (21M13 FP і ATTb1 PCR RP) і 0,5мкл ДНК-полімерази Taq.

Умови для проведення ШІР-реакції скринінга були наступними: 95°C протягом 2хв., з наступним проведенням 30 циклів при 94°C протягом 30сек.; при 60°C протягом 30 секунд і при 72°C протягом 1хв.; і потім проводять кінцеву стадію подовження при 72°C протягом 5 хвилин і стадію витримування при 4°C. ПЛР-продукти наносили на 1,6% гель агарози для підтвердження очікуваного розміру фрагмента.

Відбирали один позитивний клон і мініпрепарат плазмідної ДНК виділяли з 5 мл-культури з використанням набору QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Плазмідну ДНК (150-200нг) піддавали секвенуванню з використанням праймерів 21M13 і M13Rev, із застосуванням системи термінації ланцюга набором CEQ Dye Terminator Cycle sequencing Quick Start kit (Beckman Coulter P/N 608120), що містить барвник, відповідно до інструкцій виробників. Послідовності праймерів представлені в таблиці 2. Реакційні суміші для секвенування аналізували з використанням системи аналізу ДНК CEO 2000 XL (Beckman Coulter P/N 608450). Після підтвердження наявності інсерції в послідовності використовують рDONR221_INSP181-6HIS для створення експресуючих клонів.

3. 2. Субклонування Gateway-сумісної OPCINSP181 в експресуючі Gateway-вектори рEAKPa¹ рDEST12.2

Потім, плазмідну ДНК (2мкл або приблизно 150нг) рDONR221_INSP181-6HIS використовували в реакційній суміші для рекомбінації, що містить 1,5мкл вектора рEAK12d або вектора рDEST12.2 (0,1мкг/мкл), 2мкл LR-буфера та 1,5мкл LR-клонази (Invitrogen) у кінцевому об'ємі 10мкл.

Реакцію припиняли додаванням 1мкл протеїнази K (2мкг/мл) та інкубували при 37°C ще 10 хвилин. Аліквоту цієї реакційної суміші (2мкл) використовували для трансформації клітин штаму DH5α (Invitrogen), проведеної в такий спосіб: 50мкл-аліквоту клітин DH5α віддавали на льоді та

додавали 2мкл реакційної суміші. Суміш інкубували протягом 30хв. на льоді та потім піддавали шоківій тепловій обробці шляхом інкубації при 42°C точно протягом 30 секунд. Зразки знову переносили на лід і додавали 250мкл теплового середовища SOC (кімнатної температури). Зразки інкубували при струшуванні (250об./хв.) протягом 1 години при 37°C. Потім суміш для трансформації висівали на планшети з L-бульйоном (LB), що містить ампіцилін (100мкг/мл), та інкубували протягом ночі при 37°C.

Відбирали п'ять трансформантів і висівали у вигляді плями на планшети з LB-агаром, що містить ампіцилін (100мкг/мл), та інкубували протягом ночі при 37°C. Ложку культури, що росте, із чашки з висівом ресуспендували в 50мкл води та кип'ятили протягом 5 хвилин для лізису клітин. Клітинний лізат центрифугували для видалення клітинних уламків і отриманий супернатант використовували як матрицю для ПЛР-скринінга колоній.

Суміш для проведення ПЛР (у кінцевому об'ємі 25мкл) містила 10мкл центрифугованого лізату клітин, 2,0мкл dNTP (10мм), 2,5мкл Taq-полімеразного буфера, 0,5мкл праймерів для скринінга (з досягненням кінцевої концентрації 100 пікомоль) і 0,5мкл ДНК-полімерази Taq. Клоні рEAK12d скринували з використанням праймерів рEAK12 FP і INSP181 MAT RP, і клони рDEST12.2 скринували з використанням праймерів 21M13FP і INSP181 MAT RP.

Умови для проведення ПЛР-реакції скринінга були наступними: 95°C протягом 2хв., з наступним проведенням 30 циклів при 94°C протягом 30сек.; при 60°C протягом 30 секунд і при 72°C протягом 1хв.; і потім проводили кінцеву стадію подовження при 72°C протягом 5 хвилин і стадію витримування при 4°C. ПЛР-продукти наносили на 1,6% гель агарози для підтвердження очікуваного розміру фрагмента.

Відбирали один позитивний клон і мініпрепарат плазмідної ДНК виділяли з 5мл-культури з використанням набору QIAprep Spin Miniprep (Qiagen).

Плазмідну ДНК (150-200нг) у векторі рEAK 12d піддавали секвенуванню ДНК з використанням секвенуючих праймерів рEAK12 FP і рEAK12 RP, як було описано вище. Плазмідну ДНК (150-200нг) у векторі рDEST12.2 піддають секвенуванню з використанням секвенуючих праймерів 21M13FP і M13Rev RP, як було описано вище.

Результати аналізу підтвердили наявність очікуваної послідовності рEAK12d_INSP181-6HIS і рDEST12.2JNSP181-6HIS.

Максипрепарат ДНК одержували з 500мл культури клону з підтвердженою послідовністю (рEAK12d_INSP181-6HIS) з використанням набору для одержання ДНК Qiagen Maxi prep, відповідно до інструкцій виробника. Плазмідну ДНК ресуспендували при концентрації 1мкг/мкл у ТІ буфері та зберігали при -20°C.

Максипрепарат ДНК, який не містить ендотоксину, одержували з 500мл культури клону з підтвердженою послідовністю (рDEST12.2_INSP181-6HIS) з використанням набору EndoFree Plasmid

Mega (Qiagen), відповідно до інструкцій виробників. Очищену плазмідну ДНК ресуспендували в Т-буфері, що не містить ендотоксину, при кінцевій концентрації щонайменше 3мкг/мкл, і зберігали при -20°C.

Приклад 4: Генерування Gateway-сумісної OPC INSP181SV1, приєднаної до послідовності 6HIS-mjtkh зі збереженням рамки зчитування

INSP181SV1 клонують за процедурою гніздової ПЛР і, у цьому зв'язку, інсерція кДНК у клоні рCR4-TOPO (плазміда рCR4-TOPO-INSP181-SV1) втрачає ділянку в 26п.н. на 5'-кінці та в 21п.н. на 3'-кінці кодуєвої послідовності. Крім того, вказані дві мутації, що призводять до амінокислотних замін (N92T і G114S), були виявлені при секвенуванні, і це вимагає корекції. Включення пропущених нуклеотидів, 6-HIS-мітки та стоп-кодону, - усе досягається при вбудовуванні відповідних нуклеотидів у праймери, використовувани в реакції ампліфікації за методом ПЛР. Проводять сайт-спрямований мутагенез для корекції двох мутацій після генерування повнорозмірно вбудовуваного клону INSP181SV1.

Використовують плазмиду рCR4-TOPO-INSP181-SV1 як ПЛР-матрицю для генерування повнорозмірної OPC, що містить С-кінцеву 6-HIS-мітку та стоп-кодон. Перша стадія способу Gateway-клонування включає двостадійну ПЛР-реакцію, у результаті якої генерується повнорозмірна OPC INSP181SV1, фланкована у 5'-кінця attB1-сайтом рекомбінації та послідовністю Козака, а у 3'-кінця - послідовністю, що кодує 6-гістидинову (6HIS) мітку зі збереженням рамки зчитування, стоп-кодоном і апB2-сайтом рекомбінації (Gateway-сумісна кДНК). Реакційна суміш для першої ПЛР (у кінцевому об'ємі 50мкл) містить, відповідно: 1мкл (25 нг) плазміди рCR4-TOPO-INSP181-SV1, 4,0мкл dNTP (10mM), 5мкл 10x полімеразного буфера Pfx, 1мкл MgSO₄ (50mM), 1,0мкл кожного геноспецифічного праймера (з досягненням кінцевої концентрації 100пмоль) (INSP181 MAT FP і INSP181 MAT RP) і 0,5мкл ДНК-полімерази Platinum Pfx (Invitrogen). ПЛР-реакцію здійснювали в наступному режимі: попередня стадія денатурації при 95°C, 2хв., потім 30 циклів при 94°C, 30сек., 64°C, 30сек. і 68°C, 2хв.; з наступним проведенням циклу подовження при 68°C протягом 5хв. і циклу витримування при 4°C. Ампліфікований продукт безпосередньо очищували з використанням набору для очищення ДНК Perfectprep Gel (Eppendorf) і розводили в 50мкл стерильної води, відповідно до інструкцій виробника. Використовують аліквоту 2мкл для візуалізації на 1,6% гелі агарози в 1X TAE буфера для підтвердження того, що даний продукт має очікувану молекулярну масу (618п.н.+24п.н.=642п.н.)

Реакційна суміш для другої ПЛР (у кінцевому об'ємі 50мкл) містить 1мкл розведеного очищеного ПЛР 1-продукту (до кінцевої концентрації 10нг), 4,0мкл dNTP (10mM), 5мкл 10X полімеразного буфера Pfx, 1мкл MgSO₄ (50mM), 1,0мкл кожного конвентуючого Gateway-праймера (з досягненням кінцевої концентрації 100пмоль) (NSP181 ATTB1 FP і ATTB1 PCR RP) і 0,5мкл ДНК-полімерази Platinum Pfx. Другу ПЛР-реакцію здійснювали в

наступному режимі: 95°C протягом 2хв., з наступними 30 циклами при 94°C протягом 30сек., 60°C протягом 30сек. і 68°C протягом 2хв.; з кінцевим циклом подовження при 68°C протягом 5хв. і циклом витримування при 4°C. Продукт ПЛР очищували в гелі з використанням набору для очищення ДНК Perfectprep Gel (Eppendorf) і розводили в 50мкл стерильної води, відповідно до інструкцій виробника. 2мкл-аліквоту візуалізували на 1,6% агарозному гелі в 1X TAE-буфері (Invitrogen) для підтвердження одержання продукту з очікуваною молекулярною масою (642п.н.+64п.н.=706п.н.).

4. 1. Субклонування Gateway-сумісної OPC INSP181SV1-6HIS у вбудовуючий Gateway-вектор pDONR221

Друга стадія процесу Gateway-клонування включає субклонування Gateway-модифікованого ПЛР-продукту у вбудовуючий Gateway-вектор pDONR221 (Invitrogen), що проводили в такий спосіб: 5мкл екстрагованого ПЛР2-продукту інкубували з 1,5мкл вектора pDONR221 (0,1мкг/мкл), 2мкл буфера BP і 1,5мкл суміші клоназних ферментів BP (Invitrogen) у кінцевому об'ємі 10мкл при кімнатній температурі протягом 1 години. Реакцію припиняли додаванням 1мкл протеїнази K (2мкг/?) та інкубували при 37°C ще 10 хвилин. Аліквоту цієї реакційної суміші (2мкл) використовували для трансформації клітин штаму DH5α (Invitrogen), проведеної в такий спосіб: 50мкл-аліквоту клітин DH5α відтавали на льоді та додавали 2мкл реакційної суміші. Суміш інкубували протягом 30хв. на льоді та потім піддавали шоківій тепловій обробці шляхом інкубації при 42°C точно протягом 30 секунд. Зразки знову переносили на лід і додавали 250мкл теплового середовища SOC (кімнатної температури). Зразки інкубували при струшуванні (250об./хв.) протягом 1 години при 37°C. Потім суміш для трансформації висівали на планшети з L-бульйоном (LB), що містить канаміцин (40мкг/мл), та інкубували протягом ночі при 37°C.

Відбирали п'ять трансформантів і висівали у вигляді плями на планшети з LB-агаром, що містить канаміцин (40мкг/мл), та інкубували протягом ночі при 37°C. Ложку культури, яка росте, із чашки з висівом ресуспендували в 50мкл води та кип'ятили протягом 5 хвилин для лізису клітин. Клітинний лізат центрифугували для видалення клітинних уламків, і отриманий супернатант використовували як матрицю для ПЛР-скринінга колоній.

Суміш для проведення ПЛР (у кінцевому об'ємі 25мкл) містила 10мкл центрифугованого лізату клітин, 2,0мкл dNTP (10mM), 2,5мкл Taq-полімеразного буфера, 0,5мкл праймерів для скринінга (з досягненням кінцевої концентрації 100пікомоль) (21M13 FP і ATTB1 PCR RP) і 0,5мкл ДНК-полімерази Taq.

Умови для проведення ПЛР-реакції скринінга були наступними: 95°C протягом 2хв., з наступним проведенням 30 циклів при 94°C протягом 30сек.; при 60°C протягом 30 секунд і при 72°C протягом 1хв.; і потім проводять кінцеву стадію подовження при 72°C протягом 5 хвилин і стадію витримування при 4°C. ПЛР-продукти наносили на 1,6% гель

агарози для підтвердження очікуваного розміру фрагмента.

Відбирали один позитивний клон і мініпрепарат плазмідної ДНК виділяли з 5мл-культури з використанням набору QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Плазмідну ДНК (150-200нг) піддавали секвенуванню з використанням праймерів 21M13 і M13Rev, із застосуванням системи термінації ланцюга набором CEQ Dye Terminator Cycle sequencing Quick Start kit (Beckman Coulter P/N 608120), що містить барвник, відповідно до інструкцій виробника. Послідовності праймерів представлені в таблиці 2. Реакційні суміші для секвенування аналізували з використанням системи аналізу ДНК CEQ 2000 XL (Beckman Coulter P/N 608450). Після підтвердження очікуваної послідовності використовують рDONR221_INSP181SV1 (N92T, G114S)-6HIS як матрицю для проведення сайт-спрямованого мутагенезу для корекції двох мутацій.

4. 2 Сайт-спрямований мутагенез INSP181SV1-6HIS

Послідовність INSP181SV1, клонована за методом ПЛР, відрізняється від передбаченої послідовності INSP181SV1 наявністю заміщення у двох положеннях (A275C і G340A), які ведуть до амінокислотних мутацій N92T і G114S. Можна думати, що ці мутації є результатом процедури ПЛР-клонування, оскільки вони не виявляються в геномній ДНК (Celera або Genbank). Для того, щоб створити клон рDONR221, який містить правильну послідовність INSP181SV1, використовують клон рDONR221_INSP181SV1-(N92T, G114S)-6HIS як матрицю для сайт-спрямованого мутагенезу.

4. 3 Геноспецифічні клонуєчі праймери для сайт-спрямованого мутагенезу INSP181SV1

Пари ПЛР-праймерів, INSP181SV1 (T92N) FP, INSP181SV1 (T92N) RP, INSP181SV1 (S114G) FP і INSP181SV1 (S114G) RP (таблиця 2) конструювали таким чином, щоб обидва праймери були відновлені шляхом відпалу на протилежних ланцюгах послідовності рDONR221_INSP181SV1-(N92T, G114S)-6HIS, і кожний праймер піддають відпалу до 15-25 основ з кожної сторони від мутованої амінокислоти. ПЛР-праймери конструювали з використанням набору, відповідно до інструкцій, наведених в керівництві виробника з сайт-спрямованого мутагенезу, QuickChange® II XL (Stratagene).

4. 4 Сайт-спрямований мутагенез INSP181SV1

Першу процедуру сайт-спрямованого мутагенезу проводили з використанням набору QuickChange® II XL (Stratagene), відповідно до інструкцій виробника. Контрольну реакцію проводили в середовищі кінцевого об'єму 50мкл, що містить 1X реакційний буфер, 10нг контрольної плазмиди рWhitescript розміром 4,5т.п.н., 125нг олігонуклеотидного контрольного праймера #1, 125 нг контрольного праймера #2, 1мкл суміші dNTP і 2,5 одиниць ДНК-полімерази PfuUltra HF. Реакцію з досліджуванним зразком проводили в середовищі кінцевого об'єму 50мкл, що містить 1X реакційний буфер, 10нг плазмідної ДНК-матриці (рDONR221_INSP181SV1-(N92T, G114S)-6HIS), 125нг INSP181SV1 (T92N) FP, 125нг INSP181SV1 (T92N) RP, 1мкл суміші dNTP і 2,5 одиниць ДНК-

полімерази PfuUltra HF. Цикл термічної обробки проводили на апараті MJ Research DNA Engine, запрограмованому у наступному режимі: 94°C протягом 1хв.; 18 циклів - 95°C протягом 30сек., 60°C протягом 1 хвилини 30сек. і 68°C протягом 3хв. 30 секунд із наступним проведенням циклу подовження при 68°C протягом 7хв. і циклу витримання при 4°C.

Обробку ферментом Dpn I використовували для розщеплення метильованої або полуметильованої вихідної ДНК-матриці (плазмиди рDONR221_INSP181SV1-6HIS у досліджуваній реакційній суміші). До продуктів контрольної і досліджуваної реакційних сумішей, отриманих після реакції ампліфікації, додавали 1мкл рестрикційного ферменту Dpn I (100Од/мл, Stratagene). Реакційні суміші обережно перемішували та інкубували протягом 1 години при 37°C. Потім кожну з реакційних сумішей використовували для трансформації суперкомпетентних клітин XL I-Blue (Stratagene) за наступною процедурою. 50мкл-аліквоту клітин XL I-Blue відтавали на льоді та додавали 1мкл Dpn I-обробленої ДНК. Суміш інкубували протягом 30 хвилин на льоді та потім піддавали шоківій теплової обробці шляхом інкубації при 42°C точно протягом 45 секунд. Потім зразки знову переносили на лід на 2хв. і додавали 250мкл попередньо нагрітого (42°C) середовища NZY. Зразки інкубували при струшуванні (220об./хв.) протягом 1 години при 37°C. Контрольну трансформуючу суміш, потім наносили на планшети з L-бульйоном (LB), що містить ампіцилін (100мкг/мл), X-gal (80мкг/мл) і 20мМ IPTG. Досліджувану трансформуючу суміш зі зразком (по 250мкл на кожному з 2 планшетів) наносили на планшети з L-бульйоном (LB), що містить канаміцин (40мкг/мл). Планшети інкубували протягом ночі при 37°C.

4. 5 Одержання та секвенування плазмідної ДНК

Відбирали один трансформант і виділяли міні-препарат плазмідної ДНК із 5 мл-культури з використанням набору QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Плазмідну ДНК (150-200 нг) піддавали секвенуванню за допомогою праймерів 21M13 і M13Rev і з використанням системи термінації ланцюга набором CEQ Dye Terminator Cycle sequencing Quick Start (Beckman Coulter P/N, 608120), що містить барвник, відповідно до інструкцій виробника. Послідовність праймера представлена в таблиці 2. Реакційні суміші для секвенування аналізували з використанням системи для аналізу ДНК CEQ 2000 XL (Beckman Coulter P/N, 608450). Після підтвердження наявності інсерції в послідовності використовували рDONR221_INSP181SV1-(G114S)-6HIS як матрицю для проведення другої корекції (S114G). Другу процедуру сайт-спрямованого мутагенезу проводили з використанням вказаних вище протоколу та умов. У даній процедурі сайт-спрямованого мутагенезу 2 використовували наступні праймери: INSP181SV1 (S114G) FP і INSP181SV1 (S114G) RP. Аналіз послідовності виявив клон, що містить очікувану послідовність вставки INSP181SV1(рDONR221_INSP181SV1-6HIS).

4. 6 Субклонування Gateway-сумісної OPC INSP181SV1 в експресуючі Gateway-вектори pEAK12d і pDEST12.2

Плазмідну ДНК (2мкл або приблизно 150нг) pDONR221_INSP181SV1-6HIS використовували в реакційній суміші для рекомбінації, що містить 1,5мкл вектора pEAK12d або вектора pDEST12.2 (0,1мкг/мкл), 2мкл LR-буфера та 1,5мкл LR-клонази (Invitrogen) у кінцевому об'ємі 10мкл.

Реакцію припиняли додаванням 1мкл протеїнази K (2мкг/мл) та інкубували при 37°C ще 10 хвилин. Аліквоту цієї реакційної суміші (2мкл) використовували для трансформації клітин штаму DH5α (Invitrogen), проведеної в такий спосіб: 50мкл-аліквоту клітин DH5α відтавали на льоді та додавали 2мкл реакційної суміші. Суміш інкубували протягом 30хв. на льоді та потім піддавали шок-овій тепловій обробці шляхом інкубації при 42°C точно протягом 30 секунд. Зразки знову переносили на лід і додавали 250мкл теплового середовища SOC (кімнатної температури). Зразки інкубували при струшуванні (250об./хв.) протягом 1 години при 37°C. Потім суміш для трансформації висівали на планшети з L-бульйоном (LB), що містить ампіцилін (100мкг/мл), та інкубували протягом ночі при 37°C.

Відбирали п'ять трансформантів і висівали у вигляді плями на планшети з LB-агаром, що містить ампіцилін (100мкг/мл), та інкубували протягом ночі при 37°C. Ложку культури, що росте, із чашки з висівом ресуспендували в 50мкл води та кип'ятили протягом 5 хвилин для лізису клітин. Клітинний лізат центрифугували для видалення клітинних уламків, і отриманий супернатант використовували як матрицю для ПЛР-скринінга колоній.

Суміш для проведення ПЛР (у кінцевому об'ємі 25мкл) містила 10мкл центрифугованого лізату клітин, 2,0мкл dNTP (10мм), 2,5мкл Taq-полімеразного буфера, 0,5мкл праймерів для скринінга (з досягненням кінцевої концентрації 100пікомоль) і 0,5мкл ДНК-полімерази Taq. Клоні pEAK12d скринували з використанням праймерів pEAK12 FP і INSP181 MAT RP, і клони pDEST12.2 скринували з використанням праймерів 21M13FP і INSP181 MAT RP.

Умови для проведення ПЛР-реакції скринінга були наступними: 95°C протягом 2хв., з наступним проведенням 30 циклів при 94°C протягом 30сек.; при 60°C протягом 30 секунд і при 72°C протягом 1хв.; і потім проводять кінцеву стадію подовження при 72°C протягом 5 хвилин і стадію витримування при 4°C. ПЛР-продукти наносили на 1,6% гель агарози для підтвердження очікуваного розміру фрагмента.

Відбирали один позитивний клон і мікіпрепарат плазмідної ДНК виділяли з 5мл-культури з використанням набору QIAprep Spin Miniprep (Qiagen).

Плазмідну ДНК (150-200нг) у векторі pEAK 12d піддавали секвенуванню DNR з використанням секвенуючих праймерів pEAK12 FP і pEAK12 RP, як було описано вище. Плазмідну ДНК (150-200нг) у векторі pDEST12.2 піддають секвенуванню з ви-

користанням секвенуючих праймерів 21M13FP і M13Rev RP, як було описано вище.

Результати аналізу підтвердили наявність очікуваної послідовності pEAK12d_INSP181SV1-6HIS і pDEST12.2_INSP181SV1-6HIS.

Максипрепарат ДНК одержували з 500мл культури клону з підтвердженою послідовністю реак12d_INSP181-6HIS з використанням набору для одержання ДНК Qiagen Maxi prep, відповідно до інструкцій виробника. Плазмідну ДНК ресуспендували при концентрації 1мкг/мкл у ТІ буфері та зберігали при -20°C.

Максипрепарат ДНК, який не містить ендотоксину, одержували з 500мл культури клону з підтвердженою послідовністю pDEST12.2_INSP181-6HIS з використанням набору EndoFree Plasmid Mega (Qiagen), відповідно до інструкцій виробників. Очищену плазмідну ДНК ресуспендували в Т-буфері, який не містить ендотоксину, при кінцевій концентрації щонайменше 3мкг/мкл, і зберігали при -20°C.

Приклад 5: Методи аналізу, що підходять для дослідження функції INSP181

Можна думати, що фрагменти за даним винаходом будуть особливо корисні при лікуванні або діагностиці розладів/захворювань репродуктивної системи та аутоімунних розладів/захворювань. Крім того, наведені нижче тести можуть використовуватися для аналізу прийнятності таких фрагментів за рахунок наявності корисних біологічних ефектів. Слід зазначити, що хоча деякі з описаних тестів стосуються досліджуваної сполуки, що представляє собою білок/поліпептид, будь-який фахівець у даній галузі зможе адаптувати їх для оцінки інших фрагментів за даним винаходом як такої «досліджуваної сполуки».

А. Тести на репродуктивний ефект Тест на здатність до імплантації клітин JEG-3

У межах даного тесту була використана 2-камерна система, в якій були створені умови для проникнення флуоресцентно мічених клітин JEG-3 через пористу мембрану з нанесеним шаром Matrigel з верхньої камери в нижню камеру, коли клітини Ishikawa або Ishikawa-кондиціоноване середовище помішували в нижню камеру. Кількість мігруючих при цьому клітин підраховували з використанням лічильника для планшетів. Метою даного методу є ідентифікація білків, які підвищують проникнення клітин JEG-3, для їх використання для поліпшення імплантації in vivo.

Тест зі сферами, покритими остеопонтином (клітини Ishikawa)

У межах даного тесту флуоресціюючі сфери, покриті шаром остеопонтину, служили моделлю бластоцисту, і клітини Ishikawa примували, для того, щоб адаптувати їх до зв'язування, шляхом обробки естрадіолом. Метою даного методу є ідентифікація білків, які підвищують здатність клітин Ishikawa зв'язуватися з покритими остеопонтином сферами, у плані використання їх як засіб, що підвищує рецептивні властивості ендометрії в момент імплантації.

Тест із використанням клітин HuF6

Метою даного тесту є ідентифікація білків, які підвищують продукцію PGE2 (маркера децидуалі-

зації) клітинами HuF6, як спосіб підвищення децидуалізації на ранній стадії вагітності.

Тест на ендометріоз

Перитонеальний TNF α виконує свою функцію в ендометрії за рахунок індукції відторгнених ендометріальних клітин з матки до прикріплення та проліферації на мезотеліальних клітинах очеревини. У межах даного тесту клітини BEND обробляли TNF α , що підвищував їх здатність зв'язувати покриті фібронектином флуоресціюючі сфери, як тест для оцінки адгезивних властивостей у процесі ендометріозу. Метою даного тесту є ідентифікація білків, які знижують або інгібують здатність TNF α стимулювати здатність клітин зв'язуватися зі сферами.

Тест на циклічний АМФ із використанням гранульозних клітин свині JC-410, стабільно трансфєкованих hLHR

При синдромі полікістозу яєчника рівень гіпофізарного ЛГ відносно високий і індукує вихід андрогену з оболонкових клітин яєчника. Автори застосовували даний тест для пошуку ікбїтора сигнальної функції ЛГ, що міг би використовуватися для зниження дії ЛГ на яєчник при синдромі полікістозу яєчника. Клітинна лінія гранульозних клітин свині JC-410 була піддана стабільній трансфєкції рецептором ЛГ людини. Лікування з використанням ЛГ призводило до продукції цАМФ.

Тест на циклічний АМФ із використанням гранульозних клітин свині JC-410, стабільно трансфєкованих hFSHR

Клітинна лінія гранульозних клітин свині JC-410 була піддана стабільній трансфєкції ФСГ-Р людини. Лікування з використанням ФСГ стимулювало продукцію цАМФ, рівень якого оцінювали в даному тесті. Метою дослідження є ідентифікація білків, які підсилюють дію ФСГ у гранульозних клітинах.

Тест із використанням клітин гіпофіза LbetaT2 (мишей)

LbT2 являє собою іморталізовану гонадотрофну клітинну лінію гіпофіза мишей. Стимуляція активіном, одним або поєднанням GnRH+активін, призводить до секреції ФСГ. При цьому можна обробити клітини з використанням GnRH+Bioscreen білків, для того, щоб знайти білки, що діють разом з GnRH у напрямку стимуляції продукції ФСГ, або вони могли бути оброблені тільки Bioscreen білками, для того, щоб знайти білки, які можуть стимулювати секрецію ФСГ, як один активін.

Тест на експансію stimulus

Може бути розроблений з використанням комплексів ооцит-stimulus для ідентифікації фрагментів, які стимулюють експансію.

Тест на проліферацію RWPE

Доброякісна гіперплазія простати характеризується ростом епітелію простати та строми, що не збалансована апоптозом, що призводить до збільшення розміру органа. RWPE являє собою клітинну лінію епітеліальних клітин звичайної простати людини, іморталізовану шляхом обробки HPV-18, що використовується замість епітеліальних клітин первинної простати людини, які не завжди доступні.

Тест на інвазію клітин фібросаркоми HT-1080

Флуоресцентно мічені клітини фібросаркоми людини HT-1080 вирощують у верхній камері 2-камерної системи, і проникнення цих клітин у нижню камеру через пористу мембрану, покриту шаром Matrigel, може стимулюватися, що визначається кількісно. Метою даного тесту є ідентифікація фрагмента, що буде стимулювати таке проникнення.

Тест із використанням первинних клітин гладких м'язів матки

Одним з показників фіброїдного ураження матки є відкладення колагену гладком'язовими клітинами матки, що перетворюється на лейоміому. Первинні гладком'язові клітини матки людини стимулюють для продукції колагену обробкою TGF β , що блокуваний Rebif. Метою даного тесту є ідентифікація білків, які будуть інгібувати вказаний фіброзний фенотип.

Тест на проліферацію клітин лейоміоми людини

Клітини лейоміоми людини використовують як модель фіброїдної хвороби матки в тесті на проліферацію. Клітини ростуть дуже повільно, але вони можуть бути стимульовані естрадіолом і факторами росту. Метою даного тесту є ідентифікація білків, які будуть інгібувати естрадіолзалежний ріст клітин лейоміоми.

Тест на міграцію клітин U937

Зони ураження ендометрія секретують цитокини, які рекрутують імунні клітини в очеревинну порожнину, які можуть потім задіяватися в прояв запальних симптомів захворювання, звичайних для ендометріозу. Було показано, що RANTES продукується стромальними клітинами ендометрії та присутні в перитонеальній рідині. Використовувана в даному тесті U937 являє собою моноцитарну клітинну лінію, яка є моделлю активованих макрофагів, що може бути індукована обробкою нижнього рівня 2-камерної культуральної системи для міграції з верхньої камери. Якщо клітини були попередньо оброблені флуоресцентним барвником, то їх кількість у нижній камері може бути визначена. Метою даного тесту є ідентифікація білків, які будуть інгібувати міграцію клітин U937.

Тест із використанням трофобластів JEG3 людини

Трофобласт бластоцисти продукує HLA-G, молекулу HLA-антигенів класу I, які, як вважається, важливі для запобігання реакції імунологічного відторгнення ембріона організмом матері. У ході пре-еклампсії рівень HLA-G низький або він взагалі відсутній. Клітинна лінія трофобластів JEG-3 людини продукує HLA-G і може використовуватися для ідентифікації фрагментів, які здатні підвищувати продукцію HLA-G.

Тест на розсіювання первинних клітин яєчника щура

Рівень продукції естрадіолу культурами клітин із цілих яєчників, взятих від незрілих щурів або інших гризунів, може бути визначений кількісно після обробки ФСГ і/або ЛГ. Метою даного тесту є ідентифікація білків, які будуть підвищувати стимульований гонадотропіном стероїдогенез, або

білків, які діють самі по собі у напрямку підвищення стероїдогенезу вказаними культурами.

Тест із використанням мишачих IVF

У даному тесті може бути оцінена функція сперми, обумовлена за її здатністю запліднювати ооцити для виявлення білків, які можуть стимулювати потенціал сперми відносно запліднення. Такий тест може бути проведений, наприклад, з використанням сперми та ооцитів миші.

Тест на проліферацію первинних стромальних клітин простати людини

Тест для оцінки епітеліального компонента BPH вже розроблений (див. наведений вище тест із використанням RWPE). У даному тесті викорис-

товують первинні стромальні клітини простати людини, які служать як модель проліферації цих клітин у ході BPH. Метою даного тесту є ідентифікація білків, які будуть інгібувати проліферацію цих клітин.

Тест на проліферацію гладком'язових клітин матки людини

Білки та інші фрагменти можуть бути проаналізовані для ідентифікації фрагментів, здатних інгібувати проліферацію первинних гладком'язових клітин матки людини. Проліферація гладком'язових клітин матки людини передуватиме розвитку пухлин при фіброїдному ураженні матки.

В. Аутоімунні тести

	Клітини та стимули	Спосіб оцінки	Біологія процесу	Цільові захворювання
Т-лімфоцити	Загибель Т клітин Jurkat, індукована Fas-лігандом	Вивільнення ЛДГ	Регуляція загибелі Т клітин	Аутоімунні захворювання
	МКПК людини, стимульовані суперантигеном TSST	Проліферація	Модуляція проліферації Т клітин	Аутоімунні захворювання
		Секреція цитокінів	Модуляція секреції Т клітинних цитокінів	Аутоімунні захворювання
Т лімфоцити та антиген-презентуючі клітини	MLR людини та миші	Проліферація	Модуляція проліферації Т клітин	Аутоімунні захворювання
		Секреція цитокінів	Модуляція секреції Т клітинних цитокінів	Аутоімунні захворювання
	МКПК людини, стимульовані ConA або PHA	Секреція цитокінів	Модуляція секреції Т клітинних цитокінів	Аутоімунні захворювання
Моноцити, макрофаги та гранулоцити	МКПК людини, стимульовані ЛПС	Секреція цитокінів	Модуляція секреції макрофагальних і гранулоцитарних цитокінів	Аутоімунні захворювання
Моноцити	RANTES-індукований потік кальцію в THP-1	Потік кальцію під дією Flip	Індукція активації моноцитів	Аутоімунні захворювання
Нейтрофіли	Нейтрофіли людини, стимульовані IL-8	Перебудова цитоскелету	Модуляція міграції нейтрофілів	Аутоімунні захворювання

В лімфоцити	В клітини людини, стимульовані козячим проти людським IgM антитілом і rhIL-4	Вживання	Модуляція вживання В клітин	Аутоімунні захворювання
	В клітини людини, стимульовані козячим протилюдським IgM антитілом, rhIL-4 і розчинний rhBAFF	Проліферація	Модуляція костимуляції В клітин	
Клітини мікроглії	М-КСФ-активована клітинна лінія мікроглії	Проліферація	Модуляція активації клітин мікроглії	MS

Тести, використовувані для оцінки відповідей Т лімфоцитів

- Загибель клітин, індукована Fas-лігандом. Даний тест дозволяє виявити нові модулятори загибелі клітин, опосередкованої рецептором. У межах цього тесту апоптоз Т клітин індукували шляхом стимуляції клітин Jurkat рекомбінантним Fas-лігандом з 6-гістидиновою міткою, об'єднаним з моноклональним анти-6-His антитілом. Загибель клітин оцінювали кількісно за вивільненням ЛДГ, цитоплазматичного ферменту, який вивільняє в культуральному середовищі при загибелі клітин. Було показано, що Т клітини, які є патогенними у випадку багатьох аутоімунних захворювань, можуть контролювати загибель антиген-специфічних Т клітин у терапевтичному режимі їх застосування.

- MLR людини: проліферація та секреція цитокінів. Даний тест, проведений у клітинах, дозволяє оцінити ефект нових білків на проліферацію лімфоцитів і секрецію цитокінів при стимуляції МКПК, взятими від іншого донора (алореактивність).

- МКПК людини, стимульовані суперантигеном, TSST. У межах даного клітинного тесту активація Т лімфоцитів може здійснюватися через TCR, але з іншими потребами, ніж це характерно для Т клітинної відповіді на класичні антигени, зокрема, у тому, що стосується ко-стимулюючих фрагментів.

- МКПК людини, стимульовані ConA або PHA. Дані клітинні тести дозволяють оцінити ефекти нових білків на секрецію цитокінів, індуковану двома різними стимулами, які впливають на різні клітини, за результатами аналізу масиву сфер із цитокіном (CBA) (IL-2, TNF- γ , TNF- α , IL-5, IL-4 і IL-10).

Тести, використовувані для оцінки відповідей моноцитів/макрофагів і гранулоцитів

- МКПК людини, стимульовані ЛПС. Даний клітинний тест дозволяє оцінити ефекти нових білків на секрецію цитокінів (TNF- γ , TNF- α), індуковану ЛПС, що впливає на моноцити/макрофаги та гранулоцити.

Тести, використовувані для оцінки відповідей нейтрофілів Інфільтрація нейтрофілів у тканині залежить від перебудови елементів цитоскелета,

асоційованої зі специфічними змінами в клітинній морфології вказаних клітин. Даний клітинний тест дозволяє оцінити ефект нових білків на перебудову цитоскелета нейтрофілів людини.

Тести, використовувані для оцінки відповідей В лімфоцитів

- Проліферація В клітин. Даний клітинний тест дозволяє оцінити ефект нових білків на вживання В клітин.

- Костимуляція В клітин. Даний клітинний тест дозволяє оцінити ефект нових білків на костимуляцію В клітин.

Тести, використовувані для оцінки відповідей моноцитів і клітин мікроглії

- Потік кальцію в THP-1. Потік Ca^{2+} у THP-1 клітинному тесті дозволяє оцінити ефекти нових білків на досліджувану здатність запускати внутрішньоклітинне вивільнення кальцію (друга месенджер-подія) з ендоплазматичного ретикулула.

- Проліферація клітин мікроглії. Відомо, що в процесі проліферації клітин-попередників мікроглії множина колонієстимулюючих факторів, що включають деякі цитокіни, грають ключові ролі. Серед них М-КСФ є найважливішим фактором на кінцевій стадії дозрівання макрофагів/клітин мікроглії, і він не може бути замінений іншим фактором. Оцінка цієї біологічної відповіді може мати відношення до способу впливу на активність клітин мікроглії та, у цьому зв'язку, дати можливість ідентифікувати молекули, які мають MS терапевтичним потенціалом. Будь-який фахівець у даній галузі здатний адаптувати клітинний тест для визначення проліферативної відповіді клітинної лінії мікроглії на М-КСФ.

Інші тести, які також можуть використатися, включають тест на оцінку модуляції експресії цитокінів. Загалом цей тест полягає в тому, що визначають ефекти досліджуваного білка (або іншого досліджуваного фрагмента) на секрецію цитокінів, індуковану конканаваліном А, що впливає на різні мононуклеарні клітини периферичної крові людини (hPBMC (лМКПК), за результатами тестування масиву сфер із цитокіном (CBA) на IL-2, TNF- γ ,

TNF- α , IL-5, IL-4 і IL-10. З використанням такого тесту може бути визначений «у найбільшій мірі інгібований» цитокін, а інформацію про захворювання, які корелюють із таким цитокіном, можна знайти в літературі. Приклад 5. Ефект INSP181 на секрецію цитокіну ConA-стимульованими МКПК

5.1. Короткий опис

У даному тесті оцінюють ефект INSP181 на секрецію цитокіну мононуклеарними клітинами периферичної крові людини (hPBMC (лМКПК)), стимульованими мітогеном, конкаваліном А (ConA). INSP181-6HIS стимулює секрецію IL-10, IL-4 і IL-5 з ConA-стимульованих МКПК при тестуванні в розведенні 1/10 (у тесті використовують 46,2мкг). Не відзначається ефекту на рівні TNF- γ , TNF- α або IL-2.

5.2. Матеріали та реагенти

Лейкоцитарна плівка;
DMEM GIBCO Ref: 21331-020;
Сироватка людини типу AB SIGMA Ref:H1513;
L-глутамін GIBCO Ref: 250030-020;
Пеніцилін-стрептоміцин GIBCO Ref: 150070-063;
Фікол PHARMACIA Ref: 17-1440-03;
96-ямковий мікротитраційний планшет для культивування клітин COSTAR Ref: 3596;
Конканавалін А SIGMA Ref: 30412;
Водорозчинний дексаметазон SIGMA Ref:D2915;
Набір, який містить СВА з Th1/Th2 людини і цитокінами, Becton-Dickinson Ref: 550749;
PBS GIBCO Ref: 14190-094;
50мл стерильного реагенту FALCON, Becton-Dickinson Ref: 2070;
Гліцерин MERCK Ref: 1-04092-2500;
96-ямковий мікротитраційний планшет з конічним дном NUNC Ref: 249570.

5.3. Метод

5.3.1 Очищення МКПК людини від лейкоцитарної плівки

Лейкоцитарну плівку розводять DMEM 1:2.

Повільно додають 25мл розведеної крові на 15мл-шар фіколу в 50 мілілітрову пробірку Фалькона.

Пробірки центрифугують (2000об./хв, 20хв., при кімнатній температурі без перерви).

Інтерфазу клітин (кільце клітин) збирають і клітини промивають 25мл DMEM, а потім проводять стадію центрифугування (1200об./хв., 5хв.). Цю процедуру повторюють 3 рази. Лейкоцитарна плівка повинна давати загальну кількість клітин приблизно 600×106.

5.3.2 Тест на активність

В 96-ямковий мікротитраційний планшет додають 80мкл 1,25×10⁶клітин/мл, розведених в DMEM +2,5% сироватки людини +1% L-глутаміну +1% пеніциліну-стрептоміцину.

Додають 10мкл/ямку (одна умова на ямку): А S902255/1 в PBS +20% гліцерин.

Додають 10мкл/ямку ConA у концентрації 50мкг/мл (кінцева концентрація ConA становить 5мкг/мл).

Через 48 годин, клітинні супернатанти збирають і цитокіни людини вимірюють із використанням

набору, що містить СВА з Th1/Th2 людини і цитокінами, Becton-Dickinson.

5.3.3 СВА-аналіз

Суміш сфер з іммобілізованими на них Th1/Th2 людини одержують відповідно до інструкцій постачальників (Набір СВА Becton-Dickinson Ref: 550749) у такий спосіб:

- Визначають кількість аналітичних пробірок, необхідних для проведення експерименту.

- Кожну суспензію сфер для іммобілізації інтенсивно струшують протягом декількох секунд, а потім змішують.

- Для кожного аналізу в одну пробірку, позначену як "змішані сфери для іммобілізації", додають 10мкл-аліквоту кожної сфери для іммобілізації.

- Суміш сфер інтенсивно струшують.

Одержання тест-зразків

- Супернатанти розводять 1:5 аналітичним розріджувачем (20мкл супернатантів + 60мкл аналітичного розріджувача).

- Розведені зразки змішують, а потім переносять в 96-ямковий мікротитраційний планшет з конічним дном (Nunc).

Процедура аналізу з використанням СВА, що містять Th1/Th2 людини цитокіни

- 50мкл розведених супернатантів додають в 96-ямковий мікротитраційний планшет з конічним дном (Nunc).

- Додають 50мкл змішаних сфер для іммобілізації.

- Додають 50мкл реагенту для ФЕ-детекції Th1/Th2 людини.

- Планшет інкубують протягом 3 годин при кімнатній температурі та захищають від прямого впливу світла.

- Центрифугують при 1500об./хв протягом 5 хвилин.

- Супернатант обережно видаляють.

- У кожну ямку додають 200мкл промивального буфера та центрифугують при 1500об./хв. протягом 5 хвилин.

- Супернатант обережно видаляють.

- У кожну ямку додають 200мкл промивального буфера та центрифугують при 1500об./хв. протягом 5 хвилин.

- Супернатант обережно видаляють.

- У кожну ямку додають 130мкл промивального буфера для ресуспендування осаджених сфер.

- Зразки аналізують на проточному цитометрі.

- Дані аналізують із використанням пакета прикладних програм СВА, Activity Base і Microsoft Excel.

- Результати виражають як відсоток секреції цитокінів у порівнянні з рівнем цитокінів, отриманим шляхом ConA-стимуляції (100%) стосовно рівня цитокінів, секретованих нестимульованими клітинами (0%).

5.4. Результати

В одному експерименті INSP181-6HIS стимулював секрецію IL-10 (196%) і Th2 цитокінів IL-4 (257%) і IL-5 (165%) з ConA-стимульованих МКПК, але не надавав ефекту на секрецію TNF- γ , TNF- α або IL-2, вимірювану в тесті з СВА (таблиця 3). Таким чином, даний винахід оснований на тому

виявленому факті, що поліпептиди за даним винаходом активують Th2 цитокіни, більш конкретно, - інтерлейкін-10 (IL-10), інтерлейкін-4 (IL-4) і інтерлейкін-5 (IL-5). Крім того, вказана позитивна регуляція специфічна для Th2 цитокінів, оскільки рівні Th1 цитокінів (наприклад, TNF- γ , TNF- α або IL-2)

залишаються незмінними. Даний специфічний профіль експресії цитокінів веде до можливості терапевтичного використання поліпептидів за даним винаходом у захворюваннях Th1-типу, а їх антагоністи можуть використовуватися при захворюваннях Th2-типу.

Таблиця 3

Ефект INSP181-6HIS на секрецію цитокіну ConA-стимульованими МКПК

Тест	Протокол дослідження	людини				
		Планшет/ямка	Кількість повторів	% стимуляції	Стандартне відхилення	Концентрація
CELL-CBA	CON-HPBL-IFN-10-02	MP-9089/G05	1	96,00%	N/A	. 1 розведення
CELL-CBA	CON-HPBL-IL10-10-02	MP-9089/G05	1	196,00 %	N/A	. 1 розведення
CELL-CBA	CON-HPBL-IL2-10-02	MP-9089/G05	1	107,00 %	N/A	. 1 розведення
CELL-CBA	CON-HPBL-IL4-10-02	MP-9089/G05	1	257,00 %	N/A	. 1 розведення
CELL-CBA	CON-HPBL-IL5-10-02	MP-9089/G05	1	165,00 %	N/A	. 1 розведення
CELL-CBA	CON-HPBL-TNF-10-02	MP-9089/G05	1	138,00 %	N/A	. 1 розведення

Приклад 6

6. 1 Аналіз рівнів експресії гена INSP181 методом ПЛР у масштабі реального часу (Taqman)

Повнорозмірну РНК від кожного зразка піддавали зворотній транскрипції з використанням системи синтезу першого ланцюга для RT-ПЛР Superscript III (Invitrogen, номер за каталогом №18080-051) у кінцевому реакційному об'ємі 20мкл. 2мкг повнорозмірної РНК поєднували з 50нг рандомізованих гексамерних праймерів, 10мМ кожного з dATP, dGTP, dCTP і dTTP і з DEPC-обробленою водою в об'ємі 10мкл. Суміш інкубували при 65°C протягом 5 хвилин, а потім охолоджували на льоді протягом 1 хвилини. В окремі пробірки одержували 10мкл निжченаведеної суміші для синтезу кДНК: 2мкл 10X RT-буфера, 4мкл 25мМ MgCl₂, 2мкл 0,1M DTT, 1мкл РНКазі RnaseOUT™ (40одиниць/мкл) і 1мкл ферменту RT Superscript™ III (200одиниць/мкл). Суміш для синтезу кДНК додавали до суміші РНК/праймер, злегка помішували, інкубували при 25°C протягом 10 хвилин, а потім при 50°C протягом 50 хвилин. Потім фермент RT інактивували шляхом інкубування при 85°C протягом 5 хвилин. Суміш охолоджували на льоді, а потім додавали 1мкл РНКазі H E. coli (2 одиниці/мкл), і суміш інкубували при 37°C протягом 20 хвилин. Суміш охолоджували на льоді, а потім розводили 1/250 стерильною водою. Потім, розведення реакційної суміші зворотної транскриптази аналізували за допомогою ПЛР у реальному часі на апараті TaqMan (PE Biosystems 7700). Праймери для проведення ПЛР INSP181 людини і гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназу (GAPDH) (контроль: гени "домашнього хазяйства") конструювали з використанням програми для експресії праймерів Primer Express (PE Biosystems). Прямий

праймер був сконструйований в екзоні 1. Зворотний праймер був сконструйований в екзоні 2. Вказаний праймер не відрізнявся для варіантів аналізу INSP181 і INSP181SV1.

Послідовності праймерів показані в таблиці 4. Специфічність і оптимальну концентрацію праймера для цілей використання в аналізі TaqMan визначали шляхом тестування праймерів на серії розведень плазмід pEAK12d-INSP181-6HIS і pEAK12d-INSP181SVI-6HIS. Потенційну домішану геномну ДНК видаляли шляхом проведення ПЛР-реакцій з використанням специфічних інтронних GAPDH-послідовностей. Відсутність неспецифічної ампліфікації підтверджували шляхом проведення аналізу ПЛР-продуктів за допомогою електрофорезу в 4% агарозному гелі для гарантії продукування однієї смуги з очікуваною молекулярною масою.

ПЛР у реальному часі із застосуванням сполуки SYBR, яка флуоресцює у зеленому діапазоні спектра, здійснювали в реакційній суміші в кінцевому об'ємі 50мкл із використанням 25мкл ПЛР-суміші Master Mix, яка містить SYBR, що флуоресцює у зеленому діапазоні спектра (PE Biosystems) (до якої попередньо була додана урацил-N-глікозилаза AmpErase (UNG, PE Biosystems)), 300нМ кожного з ампліфікуючих праймерів і 5мкл RT-ПЛР продукту. Цикл обробки проводили з використанням системи детекції ABI PRISM 7700 (TaqMan), запрограмованої на роботу в наступному режимі: 1 цикл при 50°C протягом 2хв.; 1 цикл при 95°C протягом 10хв.; 40 пиклів при 95°C протягом 15 секунд, при 60°C протягом 1 хв. Кожну реакцію проводили в подвійному повторі з наступним усередненням отриманих результатів.

Таким чином, праймер-специфічні ділянки зразків кДНК, піддані зворотній транскрипції, ампліфікували та визначали їх величини Ct (гранична кількість циклів). Всі величини Ct для кожного зразка кДНК були нормалізовані за величинами, отриманим для гена GAPDH (гена "домашнього хазяйства") у такий спосіб. Розходження рівнів експресії гена GAPDH і гена INSP181 у кожному зразку кДНК виражали як різницю величин Ct, тобто дельта (δ) $Ct = Ct(GAPDH) - Ct(INSP181)$. Результати для кожного зразка виражали як кратну різницю кількості циклів, необхідних для детектованої експресії гена INSP181 стосовно кількості циклів, необхідних для GAPDH, і обчислювали за формулою "кратна різниця $= 2^{(-\delta Ct)}$ ". І нарешті був визначений рівень експресії гена INSP181 у кожному зразку кДНК стосовно рівня експресії гена GAPDH, де рівень експресії GAPDH був прийнятий за 100%, шляхом розподілу 100 на кратну різницю для INSP181.

6. 2. Результати

Праймери, специфічні для INSP181, досліджували з використанням набору приблизно з 100 зразків нормальної тканини людини та уражених захворюванням, які представляють первинні клітини та клітинні лінії, а також 44 зразка біопсії з ободової кишки та клубової кишки від індивідумів із запальним захворюванням кишечника та 39 зразків біопсії псоріазу, взятих з варіантів клінічного випробування IL18BP. Отримані результати показані в таблицях 5 і 6 і проілюстровані графічно на

Фіг.12 і 13. Несподівано виявилось, що експресія INSP181 відзначається на низькому рівні тільки в зразках шкіри (0,16% від GAPDH) (таблиця 5, Фіг.12) і в зразках біопсії шкіри від пацієнтів із псоріазом (позитивна відповідь у випадку 19/39 зразків) (таблиця 6, Фіг.13). Результати, отримані з використанням другої пари праймерів, специфічних для екзону 4/6 (прямий праймер в екзоні 4 і зворотний праймер в екзоні 6), підтвердили специфічність ефекту для шкіри.

Результати аналізу експресії продемонстрували обмежену експресію INSP181 у зразках біопсії шкіри та у зразках біопсії шкіри, ураженої псоріазом.

Виявлений специфічний характер експресії підводить до висновку про участь INSP181 у захворюваннях шкіри. Переважно, вказане захворювання шкіри являє собою захворювання Th1 або Th2 типу. Переважно, захворюванням Th1 типу є псоріаз.

Несподівано виявлені властивості, які характеризують полінуклеотиди або відповідні поліпептиди за даним винаходом, роблять їх особливо придатними для використання при одержанні лікарського засобу або фармацевтичної композиції. У цьому зв'язку полінуклеотиди або відповідні поліпептиди за даним винаходом демонструють несподівану перевагу обмеженої експресії в специфічних тканинах.

Таблиця 4

Послідовності ПЛР-праймера для аналізу послідовностей за методом TaqMan

Праймер	Послідовність (5'-3')
h-INSP181-57F4	TGCCCAGAAGGCTCTGGAA
h-INSP181-199R4	GAGTGGAGAGCGAGCCTCAG
hGAPDH-F	CCACCCATGGCAAATTCC
hGAPDH-R	GATGGGATTTCCATTGATGACA
Інтрон-hGAPDH-F	CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT
Інтрон-hGAPDH-R	CTGTGCTCCCCTCCTGATTT

Таблиця 5

Експресія INSP181 в основних тканинах людини, вимірювана в рамках ОТ-ПЛР (TaqMan)

Нормальні тканини людини	Ct hGAPDH	Показник для hINSP181	Показник дельта Ct	Кратність розходжень	Відносно GAPDH (=100%)
S76 головний мозок	19,44	35,87	-16,43	88307,33	0,00
S77 серце	20,16	36,81	-16,65	102847,63	0,00
S78 нирка	19,41	34,71	-15,30	40248,46	0,00
S79 печінка	20,93	37,96	-17,03	133696,30	0,00
S80 легень	21,65	36,46	-14,81	28811,12	0,00
S81 плацента	21,71	33,42	-11,71	3345,11	0,03
S82 кістковий м'яз	15,59	37,22	-21,63	3251044,79	0,00

S83 тонкий кишечник	18,27	35,85	-17,59	196700,49	0,00
S84 селезінка	21,63	35,17	-13,54	11885,82	0,01
S85 вилочкова заліза	19,36	33,64	-14,28	19884,13	0,01
S86 матка	19,76	38,67	-18,91	493684,90	0,00
S89 спинний мозок	19,75	35,61	-15,87	59718,96	0,00
S90 шийка матки	22,17	34,98	-12,81	7179,00	0,01
S91 товста кишка	19,67	36,65	-16,99	129964,13	0,00
S92 яєчник	20,84	37,72	-16,88	120767,86	0,00
S93 передміхурова залоза	19,80	35,88	-16,08	69164,90	0,00
S94 яєчко	20,05	35,80	-15,75	55167,63	0,00
S95 шкіра	23,39	32,72	-9,33	641,93	0,16
S113 підшлункова залоза	21,12	36,18	-15,06	34140,49	0,00
S119 молочна залоза	20,28	39,91	-19,62	806755,23	0,00
S120 шлунок	21,80	38,54	-16,74	109334,52	0,00
S122 око	21,16	37,70	-16,54	95534,29	0,00
S147 сечовий міхур	19,21	33,69	-14,48	22777,41	0,00

Таблиця 6

Експресія INSP181 у біоптатах шкіри, ураженої захворюванням, взятих з
варіантів клінічного випробування, за результатами аналізу за процедурою ОТ-
ПЛІР (TaqMan)

Псоріаз	Показник Ct для hGAPDH	Показник Ct для pINSP181	Показник дельта Ct	Кратність розходжен ь	Відносно GAPDH (=100%)
#11 A2872102-2	20,90	34,36	-13,46	11306,74	0,01
#16 A2872103-1	24,39	29,31	-4,92	30,19	3,31
#28 A2872023-1	22,85	38,42	-15,57	48690,17	0,00
#36 A2872028-1	25,37	34,04	-8,67	406,67	0,25
#39 A2872025-1	22,41	34,00	-11,59	3089,02	0,03
#59 E1328972-3	23,46	31,89	-8,44	346,19	0,29
#60 E1328972-2	21,22	37,35	-16,12	71255,76	0,00
#61 E1329004	25,11	38,12	-13,00	8203,29	0,01
#63 E1328973-3	23,15	40,00	-16,85	118472,89	0,00
#64 E1329003-2	21,05	36,32	-15,27	39647,25	0,00
#66 E1328974-4	22,28	32,06	-9,78	881,12	0,11
#68 E1328975-3	22,80	28,83	-6,03	65,14	1,54

101

94221

102

#69 E1328975-4	23,75	39,20	-15,45	44792,00	0,00
#70 E1329006-1	25,60	36,62	-11,02	2075,71	0,05
#71 E1328976-3	24,41	32,68	-8,27	308,23	0,32
#72 E1328976-4	23,01	35,38	-12,37	5282,35	0,02
#73 E1329005-1	23,67	34,77	-11,10	2193,42	0,05
#74 E1328977-2	24,00	32,14	-8,14	282,24	0,35
#75 E1328977-3	21,88	32,04	-10,16	1146,47	0,09
#77 E1348411-3	23,19	31,49	-8,30	315,93	0,32
#78 E1348411-2	23,19	31,63	-8,44	346,92	0,29
#79 E1348411-1	18,93	35,83	-16,91	122965,58	0,00
#80 E1348414-2	21,24	29,00	-7,76	216,69	0,46
#81 E1348414-1	21,07	40,00	-18,93	500034,81	0,00
#82 E1348446-1	20,77	28,87	-8,10	274,63	0,36
#83 E1348415-3	20,77	29,81	-9,04	526,35	0,19
#84 E1348415-2	18,54	32,15	-13,60	12438,44	0,01
#85 E1348442-1	19,84	34,46	-14,61	25074,26	0,00
#86 E1348416-3	21,58	28,59	-7,02	129,48	0,77
#88 E1348445-1	21,55	39,17	-17,61	200512,76	0,00
#91 E1317749-2	24,51	32,70	-8,20	293,22	0,34
#95 E1317719-2	25,37	33,66	-8,29	312,71	0,32
#96 E1317719-3	23,52	40,00	-16,48	91584,99	0,00
#97 E1317751-2	22,80	35,40	-12,60	6201,23	0,02
#98 E1317723-2	25,21	35,90	-10,70	1657,76	0,06
#99 E1317723-3	23,86	32,91	-9,06	532,89	0,19
#101 E1317718-2	20,80	30,04	-9,24	606,53	0,16
#102 E1317718-3	22,86	36,13	-13,27	9887,33	0,01
#103 E1317750-2	20,94	35,46	-14,52	23478,87	0,00

Приклад 7: Дослідження з використанням мікромасивів

Звичайні мікромасиви одержують за технологією Agilent Technologies (Agilent Technologies Inc.,

Palo Alto, CA) у рамках неконтактного процесу синтезу *in situ*, що передбачає друкування 60-мірних олігонуклеотидних зондів, основа до основи, на основі цифрових файлів, які описують послідов-

ність. Це досягається з використанням процедури розпилення, що дозволяє здійснювати доставку надзвичайно малих точних об'ємів (піколітри) хімічних сполук у зону плями, що наноситься. Використовуваний у реакції метод фосфорамідатної хімії робить можливим здійснювати зв'язування з дуже високою ефективністю, що підтримується на кожній стадії синтезу всього повнорозмірного олігонуклеотиду. Точні кількості відтворено осаджуються «при розпиленні». Таке точне конструювання здійснюється без зупинки, дозволяючи підтримувати контакт із боковою поверхнею та не допускати аномалій у властивості поверхневого контакту, що дозволяє досягти незмінної однорідності плями, що наноситься, і її здатності до наступного знаходження (Hughes et al. (2001) *Nat. Biotech.* Apr; 19(4): 342-7. Профайл експресії з використанням мікрочипів був виконаний з використанням струминного олігонуклеотидного синтезатора).

Синтез зондів

Процедуру синтезу здійснюють відповідно до інструкцій Agilent. В основному, синтез кДНК і наступну ампліфікацію з використанням полімерази T7 ціанін-3(5)-СТР-міченого сРНК-зонда проводять за допомогою набору Agilent для лінійної ампліфікації РНК із низькою флуоресценцією на основі матриці сумарної РНК, 5мкг, відповідно до протоколу аналізу, прикладеного до набору (версія 2, серпень 2003р., Agilent, Palo Alto, CA). Потім кРНК піддають фрагментуванню з використанням плюснабору для гібридизації *in situ* від компанії Agilent з наступною гібридизацією, відповідно до прикладеного протоколу від компанії Agilent (протокол процесінга 60-мірних олігонуклеотидних мікромасивів, версія 4. 1, квітень 2004р., Agilent, Palo Alto, CA).

Конструювання чіпа з мікромасивом

- помішували 10,536 зондів на створюваний масив

- створювали 5557 зондів для специфічної детекції секретованих послідовностей, що представляють особливий інтерес

- створювали 1000 зондів як негативні контролю

- створювали 500 зондів як позитивні контролю

- зонди, які залишилися, створювали для одержання послідовностей доступного домену, у відношенні яких відомо, що вони або секретують розчинні позаклітинні білки, або стосуються мембранозв'язаних білків з позаклітинним доменом, що контактують із позаклітинним середовищем.

Дослідження, специфічні для INSP181

INSP181 утворюється з компонентів окремих екзонів. Автори припускають здійснити профайлінг чіпів з використанням зондів, синтезованих на основі 10 нормальних тканин, кісткового мозку, головного мозку, легені, яєчника, МКПК, плаценти, передміхурової залози, селезінки і яєчка. Дані з експресії будуть доступні в порядку їх аналізу, екзон за екзоном.

Усереднення даних проводять із використанням одностадійного алгоритму One-Step Tukey Bi-Weight Algorithm (Data Analysis and Regression: A Second Course in Statistics, Mosteller and Tukey, Addison-Wesley, 1977, pp.203-209; див. також алгоритм Affymetrix MAS5.0). Метою даного методу є встановлення твердого критерію для визначення середнього значення набору даних. Використовуваний у цьому випадку набір даних включає множини значень, що стосуються експресії зонда для одного екзона.

Даний звичайний масив використовували, виходячи з множини причин. По-перше, він дозволяє підтвердити наявність транскрипта і його послідовність. По-друге, може бути оцінений розподіл поліпептиду INSP181 за тканинами і, таким чином, прояснена його роль у розвитку захворювання. Такий масив може також використовуватися як діагностичний інструмент для діагностики частоти захворюваності у пацієнтів, що мають симптоми захворювання, з яким корелює даний поліпептид. Використання екзон-специфічних зондів дозволяє оцінити, в основному, будь-які варіації в експресії сплайсинг-варіантів послідовності даного поліпептиду в конкретних тканинах і при конкретних патологічних станах.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

АМІНОКИСЛОТИ, ЯКІ ОПИСУЮТЬСЯ КОДОНАМИ, ЩО ЙДУТЬ ЧЕРЕЗ МЕЖІ ЕКЗОНУ, ДОДАНІ ДО 5'-ЕКЗОНУ

<110> ARES TRADING S.A.

<120> Білок ліпокаліну

<130> P040084WO

<150> GB0504767.5

<151> 2005-03-08

<160> 73

<170> SeqWin, версія 1.02

<210> 1

<211> 111

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggccctgg	agaaaggccc	gctcctgctg	ctggcccttg	gcctgggcct	ggcgggtgcc	60
cagaaggctc	tggaagaggt	accggtacag	ccgggcttca	atgcgcagaa	g	111

<210> 2

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Pro	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly
1				5				10				15		

Leu	Ala	Gly	Ala	Gln	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Val	Pro	Val	Gln	Pro	Gly
			20					25					30		

Phe	Asn	Ala	Gln	Lys
				35

<210> 3

<211> 137

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 3

gtggaggggc	gctggctcac	cctgcagctg	gcagccaacc	acgcagacct	ggtctccccg	60
gccgaccccc	tgaggctcgc	tctccactcc	atccggacca	gggacggcgg	ggacgtggac	120
ttcgtgctgt	tctggaa					137

<210> 4

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val	Glu	Gly	Arg	Trp	Leu	Thr	Leu	Gln	Leu	Ala	Ala	Asn	His	Ala	Asp
1				5				10				15			

Leu	Val	Ser	Pro	Ala	Asp	Pro	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	His	Ser	Ile	Arg
			20					25				30			

108

```
<400>      10
His Gly Gly Val Gln Gly Leu Gly Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala
 1              5              10              15
```

109

94221

110

Ser Ala Gly Pro Gly Ser Pro Thr Val Glu Gly Gly Ser Met His Val
20 25 30

Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe
35 40 45

Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala
50 55 60

<210> 11
<211> 108
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 11
tcgagggcgg cagcatgcac gtatgcttcg tcagcaccga ctacagcaac ctcattcttt 60
acgtgcgctt tgaggatgat gagatcacca acctgtgggt gctgctgg 108

<210> 12
<211> 36
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser Asn
1 5 10 15

Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu Trp
20 25 30

Val Leu Leu Ala
35

<210> 13
<211> 96
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 13
cgagaagaat gctggaggac cccaaatggc tgggaagata cttggagtac gtggagaaat 60
tccacctgca gaaagccccg gtcttcaaca tagatg 96

<210> 14
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr
1 5 10 15

Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly
20 25 30

<210> 15
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 15
gcccattgtcc cccaccctga 20

111

94221

112

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Pro Cys Pro Pro Pro
 1 5

<210> 17
 <211> 546
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 atggccctgg agaaaggccc gctcctgctg ctggcccttg gcctgggcct ggcggggtgcc 60
 cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 120
 cgctggctca cctgcagct ggcagccaac cacgcagacc tggctctccc ggccgacccc 180
 ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga ctctcgtgctg 240
 ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaaccatca ccgtccatcc aaccagttg 300
 caaggccagt accaaggctc attcgagggc ggcagcatgc acgtatgctt cgtcagcacc 360
 gactacagca acctcattct ttacgtgcgc tttgaggatg atgagatcac caacctgtgg 420
 gtgctgctgg cgagaagaat gctggaggac cccaaatggc tgggaagata cttggagtac 480
 gtggagaaat tccacctgca gaaagccccg gtcttcaaca tagatggccc atgtcccca 540
 ccctga 546

<210> 18
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Met Ala Leu Glu Lys Gly Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Gly Ala Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly
 20 25 30
 Phe Asn Ala Gln Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala
 35 40 45
 Ala Asn His Ala Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala
 50 55 60
 Leu His Ser Ile Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu
 65 70 75 80
 Phe Trp Lys Gly Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Asn Ile Thr Val His
 85 90 95
 Pro Thr Gln Leu Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Phe Glu Gly Gly Ser
 100 105 110
 Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr
 115 120 125
 Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala
 130 135 140
 Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr
 145 150 155 160
 Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly
 165 170 175

113

94221

114

Pro Cys Pro Pro Pro
180

<210> 19
<211> 51
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 19
cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa g 51

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly Phe Asn Ala Gln
1 5 10 15

Lys

<210> 21
<211> 486
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 21
cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 60
cgctggctca cctgcagct ggcagccaac cagcagacc tggctctccc gcccgacccc 120
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga ctctgtgctg 180
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaacatca ccgtccatcc aaccagttg 240
caaggccagt accaaggctc attcgagggc ggcagcatgc acgtatgctt cgtcagcacc 300
gactacagca acctcattct ttacgtgctg tttgaggatg atgagatcac caacctgtgg 360
gtgctgctgg cgagaagaat gctggaggac cccaaatggc tgggaagata cttggagtac 420
gtggagaaat tccacctgca gaaagccccg gtcttcaaca tagatggccc atgtcccca 480
cctga 486

<210> 22
<211> 161
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly Phe Asn Ala Gln
1 5 10 15

Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala Ala Asn His Ala
20 25 30

Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala Leu His Ser Ile
35 40 45

Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu Phe Trp Lys Gly
50 55 60

Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Asn Ile Thr Val His Pro Thr Gln Leu
65 70 75 80

Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Phe Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys
85 90 95

115

94221

116

Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu
100 105 110

Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu
115 120 125

Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe
130 135 140

His Leu Gln Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro
145 150 155 160

Pro

<210> 23

<211> 618

<212> DHK

<213> Homo sapiens

<400> 23

```

atggccctgg agaaaggccc gctcctgctg ctggcccttg gcctgggcct ggcggtgccc 60
cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 120
cgctggctca ccctgcagct ggcagccaac cacgcagacc tggctctccc ggccgacccc 180
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 240
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaactca ccgtccatcc aaccagttg 300
caaggccaat accaaggctc atggcatggg ggggtccagg gcctggggga cggaggagag 360
aggcatcgtg catcagctgg cccggggtct ccaacagtgc agggcggcag catgcacgta 420
tgcttcgtca gcaccgacta cagcaacctc attctttacg tgcgctttga ggatgatgag 480
atcaccaacc tgtgggtgct gctggcgaga agaattgctg aggaccocaa atggctggga 540
agatacttgg agtacgtgga gaaattccac ctgcagaaaag ccccggtctt caacatagat 600
ggccccatgc ccccaccc

```

<210> 24

<211> 206

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Ala Leu Glu Lys Gly Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Gly
1 5 10 15

Leu Ala Gly Ala Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly
20 25 30

Phe Asn Ala Gln Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala
35 40 45

Ala Asn His Ala Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala
50 55 60

Leu His Ser Ile Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu
65 70 75 80

Phe Trp Lys Gly Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Asn Ile Thr Val His
85 90 95

Pro Thr Gln Leu Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Trp His Gly Gly Val
100 105 110

Gln Gly Leu Gly Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala Ser Ala Gly Pro
115 120 125

Gly Ser Pro Thr Val Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys Phe Val Ser

130 135 140
 Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu
 145 150 155 160
 Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro
 165 170 175
 Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe His Leu Gln
 180 185 190
 Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro Pro
 195 200 205
 <210> 25
 <211> 558
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 60
 cgctggctca ccctgcagct ggcagccaac cagcagacc tggctctccc ggccgacccc 120
 ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 180
 ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaaccatca ccgtccatcc aaccagttg 240
 caaggccagt accaaggctc atggcatggg ggggtccagg gcctggggga cggaggagag 300
 aggcacgtg catcagctgg cccgggggtct ccaacagtcg agggcggcag catgcacgta 360
 tgcttcgtca gcaccgacta cagcaacctc attctttacg tgcgctttga ggatgatgag 420
 atcaccaacc tgtgggtgct gctggcgaga agaattgctg aggaccccaa atggctggga 480
 agataacttg agtacgtgga gaaattccac ctgcagaaag ccccggtctt caacatagat 540
 ggcccatgtc ccccaccc 558
 <210> 26
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly Phe Asn Ala Gln
 1 5 10 15
 Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala Ala Asn His Ala
 20 25 30
 Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala Leu His Ser Ile
 35 40 45
 Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu Phe Trp Lys Gly
 50 55 60
 Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Asn Ile Thr Val His Pro Thr Gln Leu
 65 70 75 80
 Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Trp His Gly Gly Val Gln Gly Leu Gly
 85 90 95
 Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala Ser Ala Gly Pro Gly Ser Pro Thr
 100 105 110
 Val Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser
 115 120 125
 Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu
 130 135 140

119

94221

120

Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly
145 150 155 160

Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val
165 170 175

Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro Pro
180 185

<210> 27

<211> 561

<212> DHK

<213> Homo sapiens

<400> 27

atggccctgg agaaaggccc gctcctgctg ctggcccttg gcctgggcct ggcggtgccc 60
cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 120
cgctggctca cctgcagct gccagccaac cagcagacc tggctctccc ggctgacccc 180
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 240
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaaccatca ccgtccatcc aaccagttg 300
caaggccagt accaaggctc attcgagggc gccagcatgc acgtatgctt cgtcagcacc 360
gactacagca acctcattct ttacgtgctg tttgaggatg atgagatcac caacctgtgg 420
gtgctgctgg cgagaagaat gctggaggac cccaaatggc tggaagata cttggagtac 480
gtggagaaat tccacctgca gaaagccccg gtcttcaaca tagatggccc atgtcccca 540
ccccaccatc accatcacca t 561

<210> 28

<211> 187

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Ala Leu Glu Lys Gly Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Gly
1 5 10 15

Leu Ala Gly Ala Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly
20 25 30

Phe Asn Ala Gln Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala
35 40 45

Ala Asn His Ala Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala
50 55 60

Leu His Ser Ile Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu
65 70 75 80

Phe Trp Lys Gly Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Asn Ile Thr Val His
85 90 95

Pro Thr Gln Leu Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Phe Glu Gly Gly Ser
100 105 110

Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr
115 120 125

Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala
130 135 140

Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr
145 150 155 160

Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly
165 170 175

121

94221

122

Pro Cys Pro Pro Pro His His His His His His
180 185

<210> 29
<211> 501
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 29
cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgagagaa ggtggagggg 60
cgctggctca ccctgcagct ggcagccaac cagcagacc tggctctccc ggctgacccc 120
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 180
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaacatca ccgtccatcc aaccagttg 240
caaggccagt accaaggctc attcgagggc ggcagcatgc acgtatgctt cgtcagcacc 300
gactacagca acctcattct ttacgtgcgc ttgaggatg atgagatcac caacctgtgg 360
gtgctgctgg cgagaagaat gctggaggac cccaaatggc tgggaagata cttggagtac 420
gtggagaaat tccacctgca gaaagccccg gtcttcaaca tagatggccc atgtcccca 480
ccccaccatc accatcacca t 501

<210> 30
<211> 167
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

<210> 31
<211> 636
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

123

94221

124

```

<400> 31
atggcccttg agaaaggccc gctcctgctg ctggcccttg gcctgggcct ggcggtgccc 60
cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 120
cgctggctca ccctgcagct ggagccaac cacgcagacc tggctctccc ggccgacccc 180
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga ctctgtgctg 240
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaaccatca ccgtccatcc aaccagttg 300
caaggccagt accaaggctc atggcatggg ggggtccagg gcctggggga cggaggagag 360
aggcatcgct catcagctgg cccgggggtct ccaacagtcg agggcggcag catgcacgta 420
tgcttcgtca gcaccgacta cagcaacctc attctttacg tgcgctttga ggatgatgag 480
atcaccaacc tgtgggtgct gctggcgaga agaattgctg aggaccccaa atggctggga 540
agataacttg agtacgtgga gaaattccac ctgcagaaaag ccccggtctt caacatagat 600
ggcccatgtc cccaccccca ccatcaccat caccat 636

```

```

<210> 32
<211> 212
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 32
Met Ala Leu Glu Lys Gly Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Gly
1 5 10 15

Leu Ala Gly Ala Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly
20 25 30

Phe Asn Ala Gln Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala
35 40 45

Ala Asn His Ala Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala
50 55 60

Leu His Ser Ile Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu
65 70 75 80

Phe Trp Lys Gly Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Asn Ile Thr Val His
85 90 95

Pro Thr Gln Leu Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Trp His Gly Gly Val
100 105 110

Gln Gly Leu Gly Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala Ser Ala Gly Pro
115 120 125

Gly Ser Pro Thr Val Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys Phe Val Ser
130 135 140

Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu
145 150 155 160

Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro
165 170 175

Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe His Leu Gln
180 185 190

Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro Pro His His
195 200 205

His His His His
210

```

```

<210> 33
<211> 576
<212> ДНК

```

<213> Homo sapiens

<400> 33

```

cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 60
cgctggctca ccctgcagct ggcagccaac caccgagacc tggctctccc ggccgacccc 120
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 180
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaacatca ccgtccatcc aaccagttg 240
caaggccagt accaaggctc atggcatggg ggggtccagg gcctggggga cggaggagag 300
aggcatcgtg catcagctgg cccgggggtct ccaacagtcg agggcggcag catgcacgta 360
tgcttcgtca gcaccgacta cagcaacctc attctttacg tgcgctttga ggatgatgag 420
atcaccaacc tgtgggtgct gctggcgaga agaattgctg aggaccccaa atggctggga 480
agatacttgg agtacgtgga gaaattccac ctgcagaaag ccccggtctt caacatagat 540
ggcccatgtc cccacccca ccatcaccat caccat 576

```

<210> 34

<211> 192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

```

Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly Phe Asn Ala Gln
1          5          10          15

Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala Ala Asn His Ala
20        25        30

Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala Leu His Ser Ile
35        40        45

Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu Phe Trp Lys Gly
50        55        60

Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Asn Ile Thr Val His Pro Thr Gln Leu
65        70        75        80

Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Trp His Gly Gly Val Gln Gly Leu Gly
85        90        95

Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala Ser Ala Gly Pro Gly Ser Pro Thr
100       105       110

Val Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser
115       120       125

Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu
130       135       140

Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly
145       150       155       160

Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val
165       170       175

Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro Pro His His His His His His
180       185       190

```

<210> 35

<211> 74

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 35

```

gggagaaggg gtgtgtaaag aaacaacccat caccgtccat ccaacccagt tgcaaggcca 60

```

127

94221

128

gtaccaaggc tcat

74

<210> 36

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Gly Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Thr Ile Thr Val His Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Leu Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Phe
 20 25

<210> 37

<211> 74

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 37

gggagaaggg gtgtgtaaag aaacaaccat caccgtccat ccaacccagt tgcaaggcca 60
 gtaccaaggc tcat 74

<210> 38

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Gly Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Thr Ile Thr Val His Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Leu Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Trp
 20 25

<210> 39

<211> 546

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 39

atggcccttg agaaaggccc gtcctgctg ctggcccttg gcctgggcct ggcggtgccc 60
 cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 120
 cgctgggtca cctgcagct ggcagccaac caccgagacc tggctctccc gcccgacccc 180
 ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 240
 ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaccatca ccgtccatcc aaccagttg 300
 caaggccagt accaaggctc attcgagggc ggcagcatgc acgtatgctt cgtcagcacc 360
 gactacagca acctcattct ttacgtgcgc ttgaggatg atgagatcac caacctgtgg 420
 gtgctgctgg cgagaagaat gctggaggac cccaaatggc tgggaagata cttggagtag 480
 gtggagaaat tccacctgca gaaagccccg gtcttcaaca tagatggccc atgtcccca 540
 ccctga 546

<210> 40

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Ala Leu Glu Lys Gly Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15

Leu Ala Gly Ala Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly
 20 25 30

129

94221

130

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

Pro Cys Pro Pro Pro
 180

<210> 41
 <211> 485
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 60
 cgctggctca ccctgcagct ggcagccaac cacgcagacc tggctctccc ggccgacccc 120
 ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 180
 ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaccatca ccgtccatcc aacccagttg 240
 caaggccagt accaaggctc attcgagggc ggcagcatgc acgtatgctt cgtcagcacc 300
 gactacagca acctcattct ttacgtgcgc tttaggatg atgagatcac caacctgtgg 360
 gtgctgctgg cgagaagaat gctggaggac cccaaatggc tgggaagata cttggagtac 420
 gtggagaaat tccacctgca gaaagccccg gtcttcaaca tagatggccc atgtcccca 480
 ccctg 485

<210> 42
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly Phe Asn Ala Gln
 1 5 10 15
 Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala Ala Asn His Ala
 20 25 30
 Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala Leu His Ser Ile
 35 40 45
 Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu Phe Trp Lys Gly
 50 55 60

131

94221

132

Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Thr Ile Thr Val His Pro Thr Gln Leu
65 70 75 80

Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Phe Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys
85 90 95

Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu
100 105 110

Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu
115 120 125

Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe
130 135 140

His Leu Gln Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro
145 150 155 160

Pro

<210> 43
<211> 618
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 43
atggccctgg agaaaggccc gtcctgctg ctggcccttg gcctgggcct ggcggtgcc 60
cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 120
cgctggctca ccctgcagct ggcagccaac cacgcagacc tggctctccc ggccgacccc 180
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 240
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaccatca ccgtccatcc aaccagttg 300
caaggccagt accaaggctc atggcatggg ggggtccagg gcctggggga cggaggagag 360
aggcatcggt catcagctgg ccgggggtct ccaacagtcg agggcggcag catgcacgta 420
tgcttcgtca gcaccgacta cagcaacctc attctttacg tgcgctttga ggatgatgag 480
atcaccaacc tgtgggtgct gctggcgaga agaatgctgg aggaccccaa atggctggga 540
agatacttgg agtacgtgga gaaattccac ctgcagaaag ccccgtctt caacatagat 600
ggcccatgtc cccaccc 618

<210> 44
<211> 206
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Met Ala Leu Glu Lys Gly Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Gly
1 5 10 15
Leu Ala Gly Ala Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly
20 25 30
Phe Asn Ala Gln Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala
35 40 45
Ala Asn His Ala Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala
50 55 60
Leu His Ser Ile Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu
65 70 75 80
Phe Trp Lys Gly Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Thr Ile Thr Val His
85 90 95
Pro Thr Gln Leu Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Trp His Gly Gly Val

133

94221

134

100

105

110

Gln Gly Leu Gly Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala Ser Ala Gly Pro
115 120 125

Gly Ser Pro Thr Val Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys Phe Val Ser
130 135 140

Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu
145 150 155 160

Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro
165 170 175

Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe His Leu Gln
180 185 190

Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro Pro
195 200 205

<210> 45

<211> 558

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 45

```

cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 60
cgctgggtca ccctgcagct ggcagccaac cacgcagacc tggctctccc ggccgacccc 120
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 180
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaccatca ccgtccatcc aaccagttg 240
caaggccagt accaaggctc atggcatggg ggggtccagg gcctggggga cggaggagag 300
aggcatcgct catcagctgg cccgggggtct ccaacagtcg agggcggcag catgcacgta 360
tgcttcgtca gcaccgacta cagcaacctc attctttacg tgcgctttga ggatgatgag 420
atcaccaacc tgtgggtgct gctggcgaga agaattgctg aggaccccaa atggctggga 480
agatacttgg agtacgtgga gaaattccac ctgcagaaag ccccggtctt caacatagat 540
ggcccatgtc ccccaccc                                     558

```

<210> 46

<211> 186

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly Phe Asn Ala Gln
1 5 10 15

Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala Ala Asn His Ala
20 25 30

Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala Leu His Ser Ile
35 40 45

Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu Phe Trp Lys Gly
50 55 60

Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Thr Ile Thr Val His Pro Thr Gln Leu
65 70 75 80

Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Trp His Gly Gly Val Gln Gly Leu Gly
85 90 95

Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala Ser Ala Gly Pro Gly Ser Pro Thr
100 105 110

135

94221

136

Val Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser
115 120 125

Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu
130 135 140

Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly
145 150 155 160

Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val
165 170 175

Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro Pro
180 185

<210> 47
<211> 561
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 47
atggccctgg agaaaggccc gtcctgctg ctggcccttg gcctgggcct ggcggtgccc 60
cagaaggctc tggaagaggt accggtacag cggggttca atgcgcagaa ggtggagggg 120
cgctggctca ccctgcagct ggcagccaac cagcagacc tggctctccc ggctgacccc 180
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 240
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaccatca ccgtccatcc aaccagttg 300
caaggccagt accaaggctc attcgagggc ggcagcatgc acgtatgctt cgtcagcacc 360
gactacagca acctcattct ttacgtgctc tttgaggatg atgagatcac caacctgtgg 420
gtgctgctgg cgagaagaat gctggaggac cccaaatggc tgggaagata cttggagtac 480
gtggagaaat tccacctgca gaaagccccg gtcttcaaca tagatggccc atgtcccca 540
ccccaccatc accatcacca t 561

<210> 48
<211> 187
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Met Ala Leu Glu Lys Gly Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Gly
1 5 10 15
Leu Ala Gly Ala Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly
20 25 30
Phe Asn Ala Gln Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala
35 40 45
Ala Asn His Ala Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala
50 55 60
Leu His Ser Ile Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu
65 70 75 80
Phe Trp Lys Gly Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Thr Ile Thr Val His
85 90 95
Pro Thr Gln Leu Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Phe Glu Gly Gly Ser
100 105 110
Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr
115 120 125
Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala
130 135 140

137

94221

138

Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr
145 150 155 160

Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly
165 170 175

Pro Cys Pro Pro Pro His His His His His His
180 185

<210> 49
<211> 501
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 49
cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 60
cgctggctca ccctgcagct ggcagccaac cagcagacc tggctctccc ggctgacccc 120
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 180
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaccatca ccgtccatcc aaccagttg 240
caaggccagt accaaggctc attcgagggc ggcagcatgc acgtatgctt cgtcagcacc 300
gactacagca acctcattct ttacgtgcgc tttgaggatg atgagatcac caacctgtgg 360
gtgctgctgg cgagaagaat gctggaggac cccaaatggc tgggaagata cttggagtac 420
gtggagaaat tccacctgca gaaagccccg gtcttcaaca tagatggccc atgtcccca 480
ccccaccatc accatcacca t 501

<210> 50
<211> 167
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly Phe Asn Ala Gln
1 5 10 15

Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala Ala Asn His Ala
20 25 30

Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala Leu His Ser Ile
35 40 45

Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu Phe Trp Lys Gly
50 55 60

Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Thr Ile Thr Val His Pro Thr Gln Leu
65 70 75 80

Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Phe Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys
85 90 95

Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu
100 105 110

Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu
115 120 125

Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe
130 135 140

His Leu Gln Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro
145 150 155 160

Pro His His His His His His
165

<210> 51
 <211> 636
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 atggccctgg agaaaggccc gtcctgctg ctggcccttg gcctgggcct ggccgggtgcc 60
 cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 120
 cgctggctca cctgcagct gccagccaac cagcgagacc tggctctccc gcccgacccc 180
 ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 240
 ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaccatca ccgtccatcc aaccagttg 300
 caaggccagt accaaggctc atggcatggg ggggtccagg gcctggggga cggaggagag 360
 aggcacgtg catcagctgg cccgggtct ccaacagtcg agggcggcag catgcacgta 420
 tgcttcgtca gcaccgacta cagcaacctc attctttacg tgcgctttga ggatgatgag 480
 atcaccaacc tgtgggtgct gctggcgaga agaattgctg aggaccccaa atggctggga 540
 agatacttgg agtacgtgga gaaattccac ctgcagaaag ccccggtctt caacatagat 600
 ggcccatgtc cccaccccca ccatcaccat caccat 636

<210> 52
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Met Ala Leu Glu Lys Gly Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Gly Ala Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly
 20 25 30
 Phe Asn Ala Gln Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala
 35 40 45
 Ala Asn His Ala Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala
 50 55 60
 Leu His Ser Ile Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu
 65 70 75 80
 Phe Trp Lys Gly Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Thr Ile Thr Val His
 85 90 95
 Pro Thr Gln Leu Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Trp His Gly Gly Val
 100 105 110
 Gln Gly Leu Gly Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala Ser Ala Gly Pro
 115 120 125
 Gly Ser Pro Thr Val Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys Phe Val Ser
 130 135 140
 Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu
 145 150 155 160
 Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro
 165 170 175
 Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe His Leu Gln
 180 185 190
 Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro Pro His His
 195 200 205

His His His His
210

<210> 53
<211> 576
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 53
cagaaggtc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 60
cgctggctca ccctgcagct ggcagccaac cagcagacc tggctctccc ggccgacccc 120
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga ctctgtgctg 180
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaccatca ccgtocatcc aaccagttg 240
caaggccagt accaaggtc atggcatggg ggggtccagg gcctggggga cggaggagag 300
aggcatcgtg catcagctgg cccgggtctt ccaacagtcg agggcggcag catgcacgta 360
tgcttcgtca gcaccgacta cagcaacctc attctttacg tgcgctttga ggatgatgag 420
atcaccaacc tgtgggtgct gctggcgaga agaattgctg aggaccccaa atggctggga 480
agatacttgg agtacgtgga gaaattccac ctgcagaaaag ccccggtctt caacatagat 540
ggcccatgtc cccaccccca ccatcaccat caccat 576

<210> 54
<211> 192
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly Phe Asn Ala Gln
1 5 10 15
Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala Ala Asn His Ala
20 25 30
Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala Leu His Ser Ile
35 40 45
Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu Phe Trp Lys Gly
50 55 60
Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Thr Ile Thr Val His Pro Thr Gln Leu
65 70 75 80
Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Trp His Gly Gly Val Gln Gly Leu Gly
85 90 95
Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala Ser Ala Gly Pro Gly Ser Pro Thr
100 105 110
Val Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser
115 120 125
Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu
130 135 140
Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly
145 150 155 160
Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val
165 170 175
Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro Pro His His His His His His
180 185 190

<210> 55

143

94221

144

<211> 183
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 ggcatggggg ggtccagagc ctgggggacg gaggagagag gcacgtgtgca tcagctggcc 60
 cgggggtctcc aacagtcgag ggcggcagca tgcacgtatg cttcgtcagc accgactaca 120
 gcaacctcat tctttacgtg cgctttgagg atgatgagat caccaacctg tgggtgctgc 180
 tgg 183

<210> 56
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 His Gly Gly Val Gln Ser Leu Gly Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Gly Pro Gly Ser Pro Thr Val Glu Gly Gly Ser Met His Val
 20 25 30
 Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe
 35 40 45
 Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala
 50 55 60

<210> 57
 <211> 618
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 57
 atggcccttg agaaaggccc gtcctgtctg ctggcccttg gcctgggcct ggcggggtgcc 60
 cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgocagaaa ggtggagggg 120
 cgctggctca ccctgcagct ggagccaac cacgcagacc tggctctccc ggccgacccc 180
 ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 240
 ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaaccatca ccgtccatcc aaccagttg 300
 caaggccagt accaaggctc atggcatggg ggggtccaga gcctggggga cggaggagag 360
 aggcacgtg catcagctgg ccgggggtct ccaacagtcg agggcggcag catgcacgta 420
 tgcttcgtca gcaccgacta cagcaacctc attctttacg tgcgctttga ggatgatgag 480
 atcaccaacc tgtgggtgct gctggcgaga agaattgctg aggaccccaa atggctggga 540
 agatacttg agtacgtgga gaaattccac ctgcagaaaag ccccggtctt caacatagat 600
 ggcccatgtc cccacccc 618

<210> 58
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 Met Ala Leu Glu Lys Gly Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Gly Ala Gln Lys Ala Leu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly
 20 25 30
 Phe Asn Ala Gln Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala
 35 40 45
 Ala Asn His Ala Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala
 50 55 60

145

94221

146

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

<210> 59
 <211> 558
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 60
 cgctggctca ccctgcagct ggcagccaac cacgcagacc tggctctccc gcccgacccc 120
 ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 180
 ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaaccatca ccgtccatcc aaccagttg 240
 caaggccagt accaaggctc atggcatggg ggggtccaga gcctggggga cggaggagag 300
 aggcacgtg catcagctgg cccgggggtct ccaacagtcg agggcggcag catgcacgta 360
 tgcttcgtca gcaccgacta cagcaacctc attctttacg tgcgctttga ggatgatgag 420
 atcaccaacc tgtgggtgct gctggcgaga agaattgctg aggaccccaa atggctggga 480
 agatacttgg agtacgtgga gaaattccac ctgcagaaag ccccggtctt caacatagat 540
 ggcccatgtc cccacccc 558

<210> 60
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

147

94221

148

Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Trp His Gly Gly Val Gln Ser Leu Gly
85 90 95

Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala Ser Ala Gly Pro Gly Ser Pro Thr
100 105 110

Val Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser
115 120 125

Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu
130 135 140

Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly
145 150 155 160

Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val
165 170 175

Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro Pro
180 185

<210> 61
<211> 636
<212> DHK
<213> Homo sapiens

<400> 61
atggccctgg agaaaggccc gctcctgctg ctggcccttg gcctgggcct ggcgggtgcc 60
cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 120
cgctggctca cctgcagct ggcagccaac cacgcagacc tggctctccc gcccgacccc 180
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga ctctgtgctg 240
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaacatca ccgtccatcc aaccagttg 300
caaggccagt accaaggctc atggcatggg ggggtccaga gcctggggga cggaggagag 360
aggcatcgtg catcagctgg cccgggtctt ccaacagtcg agggcggcag catgcacgta 420
tgcttcgtca gcaccgacta cagcaacctc attctttacg tgcgctttga ggatgatgag 480
atcaccaacc tgtgggtgct gctggcgaga agaattgctg aggaccccaa atggctggga 540
agatacttgg agtacgtgga gaaattccac ctgcagaaag ccccggtctt caacatagat 600
ggcccatgtc cccaccccca ccacacccat caccat 636

<210> 62
<211> 212
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Met Ala Leu Glu Lys Gly Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Gly
1 5 10 15

Leu Ala Gly Ala Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly
20 25 30

Phe Asn Ala Gln Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala
35 40 45

Ala Asn His Ala Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala
50 55 60

Leu His Ser Ile Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu
65 70 75 80

Phe Trp Lys Gly Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Asn Ile Thr Val His
85 90 95

149

94221

150

Pro Thr Gln Leu Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Trp His Gly Gly Val
100 105 110

Gln Ser Leu Gly Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala Ser Ala Gly Pro
115 120 125

Gly Ser Pro Thr Val Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys Phe Val Ser
130 135 140

Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu
145 150 155 160

Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro
165 170 175

Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe His Leu Gln
180 185 190

Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro Pro His His
195 200 205

His His His His
210

<210> 63

<211> 576

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 63

cagaaggctc tggaagaggt accggtacag ccgggcttca atgcgcagaa ggtggagggg 60
cgctggctca ccctgcagct ggcagccaac cacgcagacc tggctctccc ggccgacccc 120
ctgaggctcg ctctccactc catccggacc agggacggcg gggacgtgga cttcgtgctg 180
ttctggaagg gagaaggggt gtgtaaagaa acaaacatca ccgtccatcc aaccagttg 240
caaggccagt accaaggctc atggcatggg ggggtccaga gcctggggga cggaggagag 300
aggcatcgtg catcagctgg cccgggggtct ccaacagtcg agggcggcag catgcacgta 360
tgcttcgtca gcaccgacta cagcaacctc attctttacg tgcgctttga ggatgatgag 420
atcaccaacc tgtgggtgct gctggcgaga agaattgctg aggaccccaa atggctggga 480
agatacttgg agtacgtgga gaaattccac ctgcagaaag ccccgggtctt caacatagat 540
ggcccatgtc cccacccca ccatcaccat caccat 576

<210> 64

<211> 192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Gln Lys Ala Leu Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly Phe Asn Ala Gln
1 5 10 15

Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala Ala Asn His Ala
20 25 30

Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala Leu His Ser Ile
35 40 45

Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu Phe Trp Lys Gly
50 55 60

Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Asn Ile Thr Val His Pro Thr Gln Leu
65 70 75 80

Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Trp His Gly Gly Val Gln Ser Leu Gly
85 90 95

151

94221

152

Asp Gly Gly Glu Arg His Arg Ala Ser Ala Gly Pro Gly Ser Pro Thr
 100 105 110

Val Glu Gly Gly Ser Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser
 115 120 125

Asn Leu Ile Leu Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu
 130 135 140

Trp Val Leu Leu Ala Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly
 145 150 155 160

Arg Tyr Leu Glu Tyr Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val
 165 170 175

Phe Asn Ile Asp Gly Pro Cys Pro Pro Pro His His His His His His
 180 185 190

<210> 65
 <211> 137
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 gtggaggggc gctggctcac cctgcagctg gcagccaacc acgcagacct ggtctccccg 60
 gctgaccccc tgaggctcgc tctccactcc atccggacca gggacggcgg ggacgtggac 120
 ttcgtgctgt tctggaa 137

<210> 66
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Phe Asn Ala Gln Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Asn His Ala Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala
 20 25 30

Leu His Ser Ile Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu
 35 40 45

Phe Trp Lys Gly Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Asn Ile Thr Val His
 50 55 60

Pro Thr Gln Leu Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Phe Glu Gly Gly Ser
 65 70 75 80

Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr
 85 90 95

Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala
 100 105 110

Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr
 115 120 125

Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly
 130 135 140

Pro Cys Pro Pro Pro

145

<210> 67
 <211> 450
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 67
 ttcaatgcgc agaaggtgga ggggcgctgg ctcaccctgc agctggcagc caaccacgca 60
 gacctggtct ccccggccga cccctgagg ctgctctctcc actccatccg gaccagggac 120
 ggcggggacg tggacttcgt gctgttctgg aagggagaag ggggtgtgtaa agaaacaaac 180
 atcacctgcc atccaaccca gttgcaaggc cagtaccaag gctcattcga gggcggcagc 240
 atgcacgtat gcttcgtcag caccgactac agcaacctca ttctttacgt gcgctttgag 300
 gatgatgaga tcaccaacct gtgggtgctg ctggcgagaa gaatgctgga ggaccccaaa 360
 tggctgggaa gatacttgga gtacgtggag aaattccacc tgcagaaagc cccggtcttc 420
 aacatagatg gcccatgtcc cccaccctga 450

<210> 68
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68
 Phe Asn Ala Gln Lys Val Glu Gly Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Asn His Ala Asp Leu Val Ser Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala
 20 25 30
 Leu His Ser Ile Arg Thr Arg Asp Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu
 35 40 45
 Phe Trp Lys Gly Glu Gly Val Cys Lys Glu Thr Asn Ile Thr Val His
 50 55 60
 Pro Thr Gln Leu Gln Gly Gln Tyr Gln Gly Ser Phe Glu Gly Gly Ser
 65 70 75 80
 Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu Tyr
 85 90 95
 Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu Ala
 100 105 110
 Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr
 115 120 125
 Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp Gly
 130 135 140
 Pro Cys Pro Pro Pro His His His His His
 145 150 155

<210> 69
 <211> 468
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 ttcaatgcgc agaaggtgga ggggcgctgg ctcaccctgc agctggcagc caaccacgca 60
 gacctggtct ccccggccga cccctgagg ctgctctctcc actccatccg gaccagggac 120
 ggcggggacg tggacttcgt gctgttctgg aagggagaag ggggtgtgtaa agaaacaaac 180
 atcacctgcc atccaaccca gttgcaaggc cagtaccaag gctcattcga gggcggcagc 240
 atgcacgtat gcttcgtcag caccgactac agcaacctca ttctttacgt gcgctttgag 300

155

94221

156

gatgatgaga tcaccaacct gtgggtgctg ctggcgagaa gaatgctgga ggaccccaaa 360
 tggctgggaa gatacttgga gtacgtggag aaattccacc tgcagaaaagc cccggtcttc 420
 aacatagatg gcccattgtcc cccacctga caccatcacc atcaccat 468

<210> 70
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

<210> 71
 <211> 548
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 gaagaggtac cggtagacgcc gggcttcaat ggcagagaagg tggaggggag ctggctcacc 60
 ctgcagctgg cagccaacca cgcagacctg gtctccccgg cgcacccctc gaggtctcgt 120
 ctccactcca tccggaccag ggacggcggg gacgtggact tcgtgctgtt ctggaaggga 180
 gaaggggtgt gtaaagaaac aaacatcacc gtccatccaa cccagttgca aggccagtac 240
 caaggctcat ggcattggggg ggtccagggc ctgggggacg gaggagagag gcattcgtgca 300
 tcagctggcc cgggggtctcc aacagtcgag ggcggcagca tgcacgtatg cttcgtcagc 360
 accgactaca gcaacctcat tctttacgtg cgctttgagg atgatgagat caccaacctg 420
 tgggtgctgc tggcgagaag aatgctggag gaccccaaat ggctgggaag atacttggag 480
 tacgtggaga aattccacct gcagaaagcc ccggtcttca acatagatgg cccatgtccc 540
 ccacccga 548

<210> 72

157

94221

158

<211> 188
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 Glu Glu Val Pro Val Gln Pro Gly Phe Asn Ala Gln Lys Val Glu Gly
 1 5 10 15
 Arg Trp Leu Thr Leu Gln Leu Ala Ala Asn His Ala Asp Leu Val Ser
 20 25 30
 Pro Ala Asp Pro Leu Arg Leu Ala Leu His Ser Ile Arg Thr Arg Asp
 35 40 45
 Gly Gly Asp Val Asp Phe Val Leu Phe Trp Lys Gly Glu Gly Val Cys
 50 55 60
 Lys Glu Thr Asn Ile Thr Val His Pro Thr Gln Leu Gln Gly Gln Tyr
 65 70 75 80
 Gln Gly Ser Trp His Gly Gly Val Gln Gly Leu Gly Asp Gly Gly Glu
 85 90 95
 Arg His Arg Ala Ser Ala Gly Pro Gly Ser Pro Thr Val Glu Gly Gly
 100 105 110
 Ser Met His Val Cys Phe Val Ser Thr Asp Tyr Ser Asn Leu Ile Leu
 115 120 125
 Tyr Val Arg Phe Glu Asp Asp Glu Ile Thr Asn Leu Trp Val Leu Leu
 130 135 140
 Ala Arg Arg Met Leu Glu Asp Pro Lys Trp Leu Gly Arg Tyr Leu Glu
 145 150 155 160
 Tyr Val Glu Lys Phe His Leu Gln Lys Ala Pro Val Phe Asn Ile Asp
 165 170 175
 Gly Pro Cys Pro Pro Pro His His His His His
 180 185

<210> 73
 <211> 564
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 gaagaggtac cggtagagcc gggcttcaat gcgcagaagg tggagggggcg ctgggtcacc 60
 ctgcagctgg cagccaacca cgcagacctg gtctccccgg ccgaccccct gaggtctgct 120
 ctccactcca tccggaccag ggacggcggg gacgtggact tcgtgctgtt ctggaaggga 180
 gaaggggtgt gtaaagaaac aaacatcacc gtccatccaa cccagttgca aggccagtac 240
 caaggctcat ggcatggggg ggtccagggc ctggggggacg gaggagagag gcatcgtgca 300
 tcagctggcc cggggtctcc aacagtcgag ggcggcagca tgcacgtatg cttcgtcagc 360
 accgactaca gcaacctcat tctttacgtg cgctttgagg atgatgagat caccaacctg 420
 tgggtgctgc tggcgagaag aatgctggag gaccccaaat ggctgggaag atacttgag 480
 tacgtggaga aattccacct gcagaaagcc ccggtcttca acatagatgg cccatgtccc 540
 ccacccacc atcaccatca ccat 564

Запит по INSP181

(181 знак)

База даних: всі ненадмірні послідовності з GenBank CDS,
трансляції+PDB+SwissProt+PIR+PRF

1607648 послідовностей; всього 528681616 знаків

Пошук ----- зроблений	Оцінка відповідності (біти)	Показник Е
Послідовності, що дають значущі результати співставлення		
sp Q8WX39 MUPL_HUMAN Putative MUP-like lipocalin precursor >gi 1...	62	4e-09
ref XP_352808.1 similar to Putative MUP-like lipocalin precursor...	60	1e-08
sp O18874 ALL2_CANFA Minor allergen Can f 2 precursor (Allergen ...	56	3e-07
sp P02755 LACB_BUBBU Beta-lactoglobulin precursor (Beta-LG) >gi ...	55	6e-07
emb CAA67099.1 P19 lipocalin (Equus caballus)	55	8e-07
ref NP_084235.1 lipocalin; MUP-like lipocalin precursor (Mus mu...	53	2e-06
dbj BAC23126.1 Lipocalin-type Prostaglandin D synthase [Hyla ja...	53	3e-06
sp Q95182 ALL1_HORSE Major allergen Equ c 1 precursor >gi 157577...	52	5e-06
sp Q01584 LIPQ_BUFMA Lipocalin precursor >gi 104284 pir S25465 ...	52	5e-06
sp P07380 LACA_HORSE BETA-LACTOGLOBULIN II PRECURSOR, MINOR MONO...	52	5e-06

Фіг. 1

>sp|Q8WX39|MUPL_передбачуваний MUP-подібний попередник
ліпокаліну людини emb|CAD13244.1|bA100C15.4 (новий
ліпокалін/цитозольний білок, який зв'язує жирну кислоту)
[Homo sapiens]
Довжина = 172

Оцінка відповідності = 62,4 біти (150); Очікувана оцінка = 4e-09

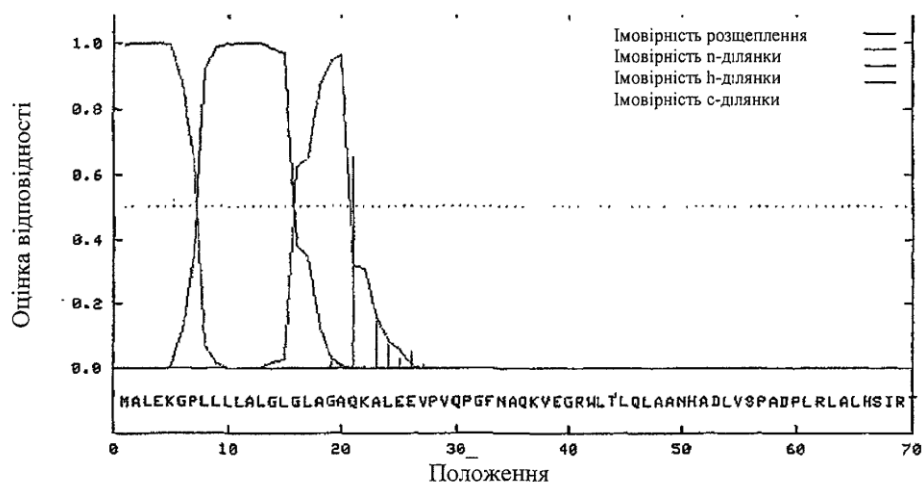
Ідентичність = 45/169 (26%), Позитивні оцінки = 78/169 (45%); Пропуски = 4/169 (2%)

Запит 8 L L L L L A L G L G L A G A Q K A L E E V P V Q P G F N A Q R V E G R W L T L Q L A A N H A D L V S P A D F L R L A L H S 67
L L L L + L G L L A Q + + Q + N + V G W + + A + + + + L R + + +
Суб'єкт 3 L L L L S L G L S L I A A Q E F D P H T V M Q R N Y N V A R V S G V W Y S I F M A S D D L N R I K E N G D L R V F V R N 62
Запит 68 I R T R D G G D V D F V L F W K G E G V C K E T N I T V H P T Q L Q G Q Y Q G S F E G G S M H V C F V S T D Y S N L I L 127
I G + F + + G C + T + G + Y + + E G + V T D Y I
Суб'єкт 63 I E H L K N G S L I P D F E Y M V Q G E C V A V V V C E K T E K N G E Y S I N Y E G Q N T - V A V S E T D Y R L F I T 121
Запит 128 Y -- V R F E D D E I T N L W V L L A R R M L E D P K W L G R Y L E Y V E K F H L Q K A P V F N I 174
+ F + T + L L E P + L R + E E K + L + + +
Запит 122 F H L Q N F R N G T E T H T L A L Y G T S A L E - P S F L S R F E E T C E K Y G L G S Q N I D L 169

Фіг. 2

SignalP-HMM, результат:

SignalP-HMM, передбачення (моделі euk): INSP181



#Дані

>INSP181

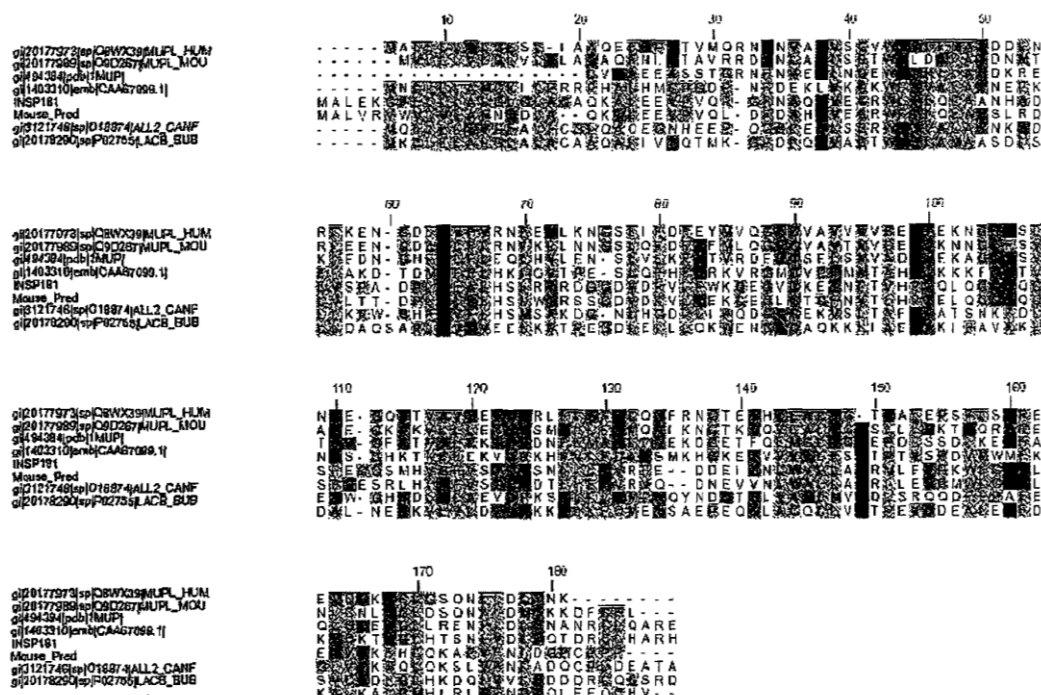
INSP181: Передбачення: сигнальний пептид

Сигнальний пептид, імовірність: 0,998

Імовірність закорювання сигналу: 0,001

Максимальна імовірність сайту розщеплення: 0,655, між положеннями 20 і 21

Фіг. 3 (продовження)



Фіг. 4



```


1  gcaatgcagt taaactgccc cgacagccac tccacaccca gtccaaacaa cagcttcgca
61  tcactttaga catggggcgg tgcccagagg cgggtgtcatt cctggggtag gattgcggaa
121 ctttttagtg gcaggtgggt ccgggcagcg cagaggaggg agctggctag ggacgctccc
181 ccttccccgg agccatggcc ctggagaaaag gccgctcct gctgctggcc cttggcctgg
      m a l e k g p l l l l a l g l
      INSP181-CP1
241 gcctggcggg tgcccagaag gctctggaag aggtacgggt acagccgggc ttoaatgogc
      g l a g a q k a l e e v p v q p g f n a
301 agaagtgtag ggggcgctgg ctacccctgc agctggcagc caaccacgca gacctggctt
      q k v e g r w l t l q l a a n h a d l v
361 ccccgccgga cccctgagg ctgctctctc actccatccg gaccaggagc ggcggggagc
      s p a d p l r l a l h s i r t r d g g d
421 tggacttcgt gctgttctgg aaggagagaag ggggtgtgtaa agaaacaaac atcacgctcc
      v d f v l f w k g e g v c k e t n i t v
481 atccaaccca gttgcaaggc cagtaccaag gctcattcga gggcggcagc atgcacgtat
      h p t q l q g q y q g s f e g g s m h v
541 gcttcgtcag caccgactac agcaacctca ttctttacgt gcgctttgag gatgatgaga
      c f v s t d y s n l i l y v r f e d d e
601 tcaccaacct gtgggtgctg ctggcgagaa gaatgctgga ggaccccaa tggtgggaa
      i t n l w v l l a r r m l e d p k w l g
661 gatacttgga gtacgtggag aaattccacc tgcagaaagc ccgggtcttc aacatagatg
      r y l e y v e k f h l q k a p v f n i d
      INSP181-CP4
721 gcccatgtcc cccaccctga gcctaggtct ggcggttctg gactcttctt gcctggggccc
      g p c p p p
      INSP181-CP2
781 ctcacccctc tgetgccctc agcctccctt ccacctcctt caccttgggt tgtggcctgg
841 actgtcccca ggtccctctg gaagcccttt tgcattctag ggactcaagg aagctcccca
901 gctgagccca accctgctc tctcctggtc cctccctctg ctg

```

Положення і смислова характеристика ПЛР-праймера →

Fig. 5

INSP181_передбачення INSP181_клонований INSP181-SV1	ATGGCCCTGGAGAAAGGCCCGCTCCTGCTGCTGGCCCTTGGCCTGGGCCTGGCGGGTGCC -----GCTGCTGGCCCTTGGCCTGGGCCTGGCGGGTGCC -----GCTGCTGGCCCTTGGCCTGGGCCTGGCGGGTGCC ***** <div style="text-align: center;">  INSP181-CP3 </div>
INSP181_передбачення INSP181_клонований INSP181-SV1	CAGAAGGCTCTGGAAGAGGTACCGGTACAGCCGGGCTTCAATGCGCAGAAGGTGGAGGGG CAGAAGGCTCTGGAAGAGGTACCGGTACAGCCGGGCTTCAATGCGCAGAAGGTGGAGGGG CAGAAGGCTCTGGAAGAGGTACCGGTACAGCCGGGCTTCAATGCGCAGAAGGTGGAGGGG *****
INSP181_передбачення INSP181_клонований INSP181-SV1	CGCTGGCTCACCCTGCAGCTGGCAGCCAACACGCAGACCTGGTCTCCCCGGCCGACCCC CGCTGGCTCACCCTGCAGCTGGCAGCCAACACGCAGACCTGGTCTCCCCGGCTGACCCC CGCTGGCTCACCCTGCAGCTGGCAGCCAACACGCAGACCTGGTCTCCCCGGCCGACCCC *****
INSP181_передбачення INSP181_клонований INSP181-SV1	CTGAGGCTCGCTCTCCACTCCATCCGGACCAGGGACGGCGGGGACGTGGACTTCGTGCTG CTGAGGCTCGCTCTCCACTCCATCCGGACCAGGGACGGCGGGGACGTGGACTTCGTGCTG CTGAGGCTCGCTCTCCACTCCATCCGGACCAGGGACGGCGGGGACGTGGACTTCGTGCTG *****
INSP181_передбачення INSP181_клонований INSP181-SV1	TTCTGGAAGGGAGAAGGGGTGTGTAAGAAACAACAATCACCGTCCATCCAACCCAGTTG TTCTGGAAGGGAGAAGGGGTGTGTAAGAAACAACAATCACCGTCCATCCAACCCAGTTG TTCTGGAAGGGAGAAGGGGTGTGTAAGAAACAACAATCACCGTCCATCCAACCCAGTTG *****
INSP181_передбачення INSP181_клонований INSP181-SV1	CAAGGCCAGTACCAAGGCTCAT----- CAAGGCCAGTACCAAGGCTCAT----- CAAGGCCAGTACCAAGGCTCATGGCATGGGGGGGTCCAGAGCCTGGGGGACGGAGGAGAG *****
INSP181_передбачення INSP181_клонований INSP181-SV1	-----TCGAGGGCGGCAGCATGCACGTA -----TCGAGGGCGGCAGCATGCACGTA AGGCATCGTGCATCAGCTGGCCCGGGGTCTCCAACAGTCGAGGGCGGCAGCATGCACGTA *****
INSP181_передбачення INSP181_клонований INSP181-SV1	TGCTTCGTCAGCACCGACTACAGCAACCTCATTCCTTTACGTGCGCTTTGAGGATGATGAG TGCTTCGTCAGCACCGACTACAGCAACCTCATTCCTTTACGTGCGCTTTGAGGATGATGAG TGCTTCGTCAGCACCGACTACAGCAACCTCATTCCTTTACGTGCGCTTTGAGGATGATGAG *****
INSP181_передбачення INSP181_клонований INSP181-SV1	ATCACCACCTGTGGGTGCTGCTGGCGAGAAGAATGCTGGAGGACCCCAAATGGCTGGGA ATCACCACCTGTGGGTGCTGCTGGCGAGAAGAATGCTGGAGGACCCCAAATGGCTGGGA ATCACCACCTGTGGGTGCTGCTGGCGAGAAGAATGCTGGAGGACCCCAAATGGCTGGGA *****
INSP181_передбачення INSP181_клонований INSP181-SV1	AGATACTTGGAGTACGTGGAGAAATTCACCTGCAGAAAGCCCCGGTCTTCAACATAGAT AGATACTTGGAGTACGTGGAGAAATTCACCTGCAGAAAGCCCCGGTCTTCAACATA--- AGATACTTGGAGTACGTGGAGAAATTCACCTGCAGAAAGCCCCGGTCTTCAACATA--- *****
INSP181_передбачення INSP181_клонований INSP181-SV1	<div style="text-align: center;">  INSP181-CP4 </div> GGCCCATGTCCCCACCC ----- -----

Положення і смислова характеристика ПЛР-праймера 

Фіг. 6


```

1   gctgctggcc cttggcctgg gcttggcggg tgcccagaag gctctggaag aggtaccggt
    l l a l g l g l a g a q k a l e e v p
    ───────────┐
                INSP181-CP3
61  acagccgggc ttcaatgcgc agaagggtgga ggggcgctgg ctacacctgc agctggcagc
    v q p g f n a q k v e g r w l t l q i a
121 caaccacgca gacctggtct ccccggccga cccctgagg ctgctctctc actccatccg
    a n h a d l v s p a d p l r i a l h s i
181 gaccaggcac ggccgggacg tggacttcgt gctgttcttg aagggaag ggggtgttaa
    r t r d g g d v d f v l f w k g e g v c
241 agaaacaacc atcacgcgtc atccaaccca gttgcaaggc cagtaccaag gctcatggca
    k e t t i t v h p t q l q g q y q g s w
301 tggggggggtc cagagcctgg gggacggagg agagaggcat cgtgcatcag ctggccccgg
    h g g v q s l g d g g e r h r a s a g p
361 gtctccaaca gtcgaggggc gcagcatgca cgtatgcttc gtcagcaccg actacagcaa
    g s p t v e g g s m h v c f v s t d y s
421 cctcattctt tacgtgcgct ttgaggatga tgagatcacc aacctgtggg tgctgctggc
    n l i l y v r f e d d e i t n l w v l l
481 gagaagaatg ctggaggacc ccaaatggct gggaagatac ttggagtacg tggagaiaatt
    a r r m l e d p k w l g r y l e y v e k
541 ccacctgcag aaagccccgg tcttcaacat a
    f h l q k a p v f n i
    ───────────┘
                INSP181-CP4

```

Положення і смислова характеристика ПЛР-праймера

Fig. 9

Найменування: INSP181:клонований Довжина:181

```

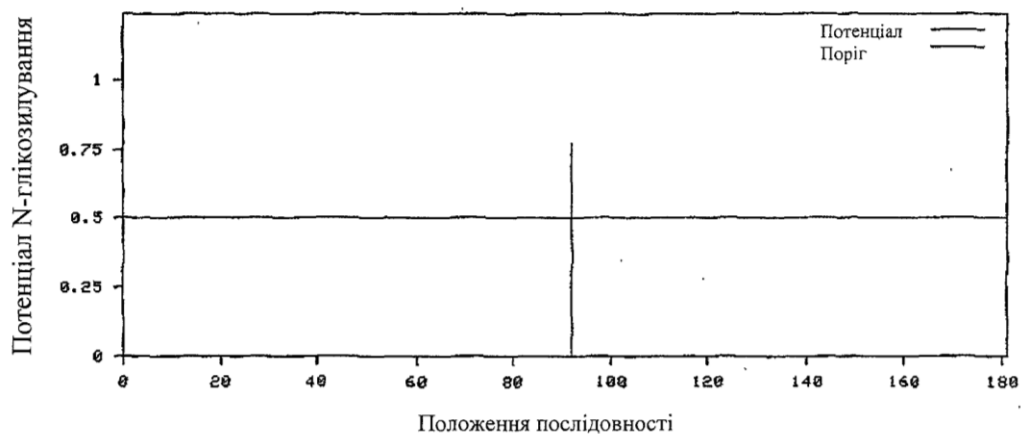
MALEKGPILLLLALGLGLAGAKALEEVPVQPGFNAQKVEGRWLTQLAANHADLVSPADPLRLALHSITRDGGDVDFVL      80
FWKGEVCKEETNITVHTQLQGQYQGSFEGGSMHVCFVSTDYSMLILYVRFEDDETNLWVLLARRMLEDPKWLGRYLEY      160
VEKFEHQKAPVFNIDGECPPP
.....N.....
.....

```

(Ppir = 0,5)

Назва послідовності	Положення	Потенціал	Оцінка	NGlyc, результат відповідності
INSP181-	92 NITV	0.7728	(9/9)	+++

Передбачені сайти N-глікозилювання в клонованому INSP181 з використанням програми NetNGlyc 1.0



Фіг. 10

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1  GCAATGCAGTTAAACTGCCCGACAGCCACTCCACACCCAGTCCAAACAA 50
-----|-----|-----|-----|-----|
51 CAGCTTCGCATCACTTTAGACATGGGGCGGTGCCAGAGCGGTGTTCATT 100
-----|-----|-----|-----|-----|
101 CCTGGGGTGGGATTGCGGAACTTTATAGGTGGCAGGTGGGTCCGGGCAGCG 150
-----|-----|-----|-----|-----|
151 CAGAGGAGGGAGCTGGCTAGGGACGCTCCCCCTCCCCGGAGCCATGGCC 200
F3                                     M A 10
-----|-----|-----|-----|-----|
201 CTGGAGAAAGGCCCGCTCCCTGCTGCTGGCCCTTGGCCTGGGCCTGGCGGG 250
F3 11 L E K G P L L L L A L G L G L A G 27
      Сигнальний пептид
-----|-----|-----|-----|-----|
251 TGCCCAAGAAGGCTCTGGAAGAGGTACCGGTACAGCCGGGCTTCAATGCGC 300
F3 28 A Q K A L E E V P V Q P G F N P A L 44
-----|-----|-----|-----|-----|
301 AGAAGGTGGAGGGGCGCTGGCTCACCCCTGCAGCTGGCAGCCAAACCACGCA 350
F3 45 [REDACTED] 60
      Домен ліпокаліну
-----|-----|-----|-----|-----|
351 GACCTGGTCTCCCCGGCCGACCCCTGAGGCTCGCTCTCCACTCCATCCG 400
F3 61 [REDACTED] 77
-----|-----|-----|-----|-----|
401 GACCAGGGACGGCGGGACGTGGACTTCGTGCTGTTCTGGAAGGGAGAAG 450
F3 78 [REDACTED] 94
-----|-----|-----|-----|-----|
451 GGGTGTCTAAAGAAACAACATCACCGTCCATCCAACCCAGTTGCAAGGC 500
F3 95 [REDACTED] 110
-----|-----|-----|-----|-----|
501 CAGTACCAAGGCTCATTCGAGGGCGGCAGCATGCACGTATGCTTCGTTCAG 550
F3 111 [REDACTED] 127
-----|-----|-----|-----|-----|
551 CACCGACTACAGCAACCTCATTCCTTACGTGCGCTTTGAGGATCATGAGA 600
F3 128 [REDACTED] 144
-----|-----|-----|-----|-----|
601 TCACCAACCTGTGGGTGCTGCTGGCGAGAAGAATGCTGGAGGACCCCAAA 650
F3 145 [REDACTED] 160
-----|-----|-----|-----|-----|
651 TGGCTGGGAAGATACCTGGAGTACGTGGAGAAATCCACCTGCAGAAAGC 700
F3 161 [REDACTED] 177
-----|-----|-----|-----|-----|
701 CCCGGTCTTCAACATAGATGGCCCATGTCACCCACCTGAGCCTAGGTCT 750
F3 178 [REDACTED] *
-----|-----|-----|-----|-----|

```

Фіг. 11

```

751 GCGGTTCTGGAGTCTTCCTGCCTGGGCCCTCACCCCTCTGCTGCCCTC 800
-----|-----|-----|-----|-----|
801 AGCCTCCCTTCCACCTCCTTACCTTGGCTTGTGGCCTGGACTGTCCCA 850
-----|-----|-----|-----|-----|
851 GGTCCCCCTGGAAGCCCTTTTGCATCTCAGGGACTCAAGGAAGCTCCCA 900
-----|-----|-----|-----|-----|
901 GCTGAGCCCAACCCTGCCTCTCTCTGGTCCCTCCCTGCTG 943

```

○ = Цистеїни, що залучаються в утворення дисульфідних зв'язків

Фіг. 11 (продовження)

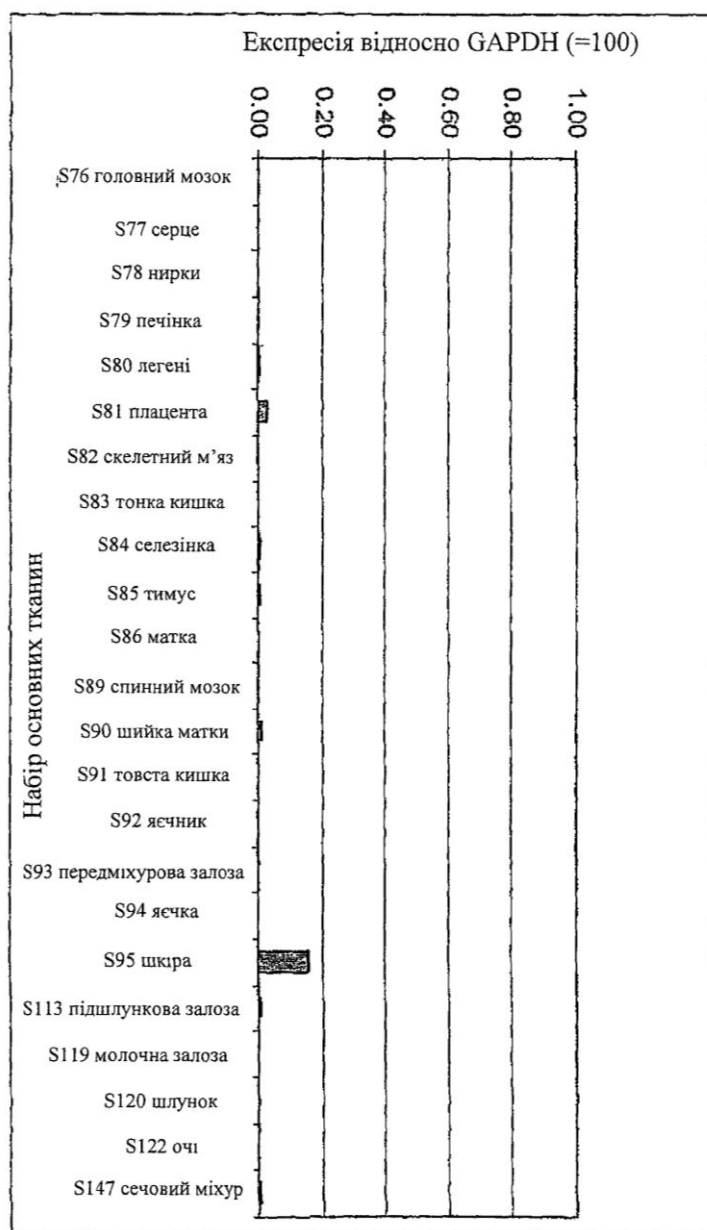
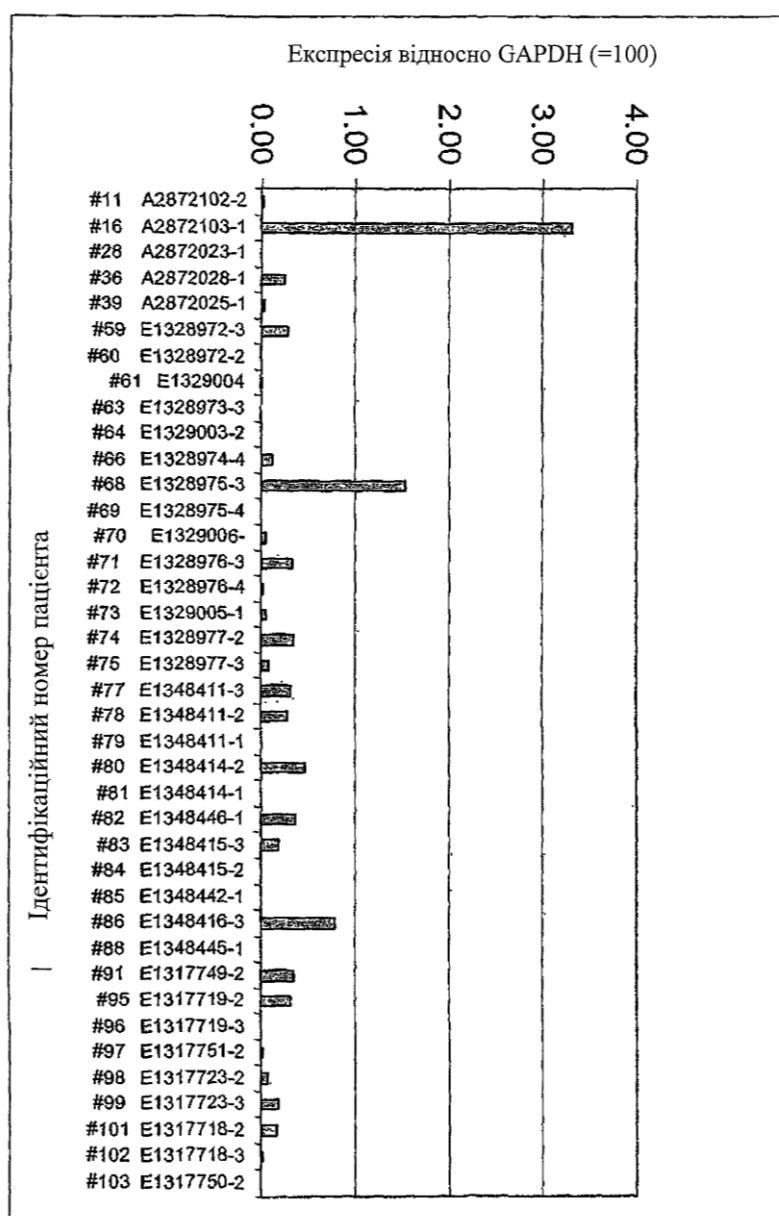


Fig. 12



Фіг. 13

Запит на пошук подібних ліпокаліну варіантів

Відбір: Найкращі до Кожний Вид Повна послідовність E=0.01 Resubmit FASTA

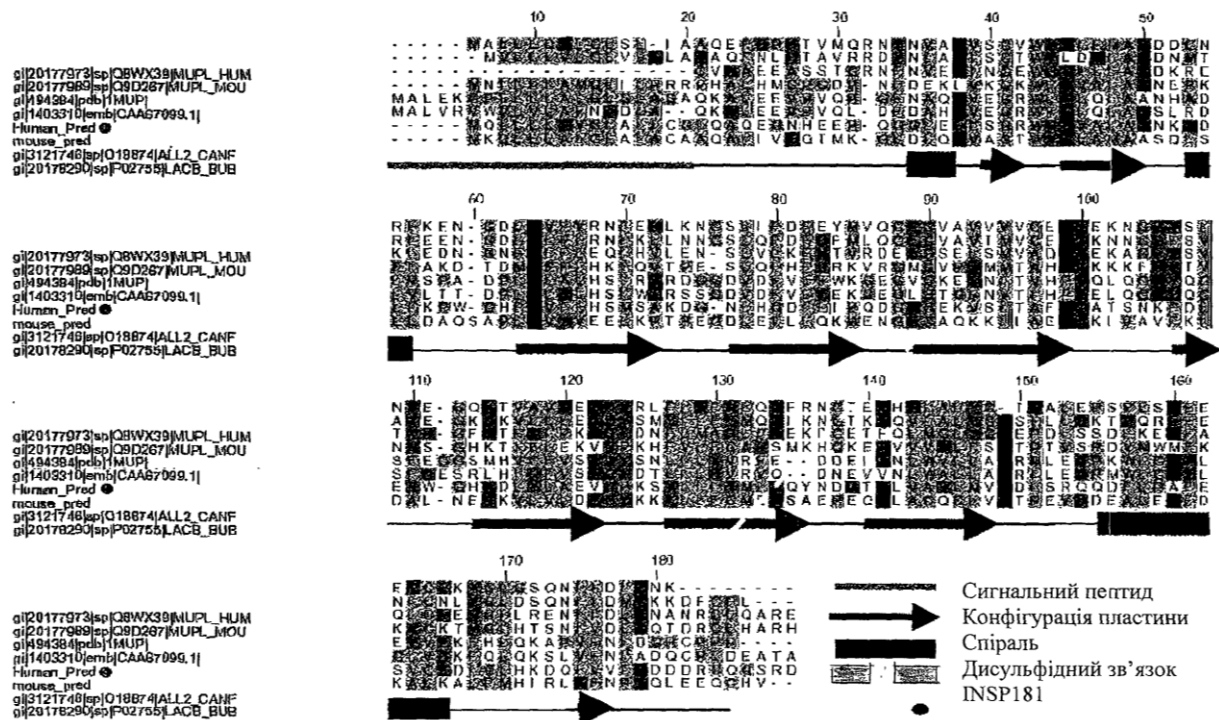
20 40 60 80 100 120 140 160 180

1: IPL d1v4a
2: CATH Serratia Metallo Proteinase ...
3: SCOP Neutrophil gelatinase-associated ...
4: CDD lipocalin

Показники E та ділянки, показані на даній сторінці, використані з репсидомом і є приблизними – показник „Aln” використовується для оцінки і укавання зіставлення

Мішень (домен)	Охоплені доменом ділянка	Опис	Джерело 2DB	Область запиту	Область мішені	1-а ітерація/ оцінка	Остання ітерація/оцінка	Пошук
1: IPL d1v4a	96%	/Lipocalins /Retinol binding protein-like SCOP v1.61 d1v4a; b.60.1.1 (A:) Major urinary protein/alpha-2u-globulin (Mouse (Mus musculus))	IPL010023	25-174	2-151	5/2.7e-12	-/-	N/A
2: Металопроєїназа CAT Serratia	91%	2.40.128.20 Mainly Beta; Barrel; Serratia Metallo Proteinase Inhibitor, subunit I;	logA0	26-180	16-178	-/-	3/2.9e-11	≥
3: SCOP желатиназа нейтрофіліна, асоційована з...	91%	b.60.1.1 (A:) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) (Human (Homo sapiens))	dlogA	26-180	16-178	-/-	3/2.9e-11	≥
4: CDD ліпокалін	90%	Lipocalin / cytosolic fatty-acid binding protein family. Lipocalins are transporters for small hydrophobic molecules, such as lipids, steroid hormones, bilirubin, and retinoids. Alignment subsumes both the lipocalin and fatty acid binding protein signatures from PROSITE. This is supported on structural and functional grounds. Structure is an eight-stranded beta barrel.	pfam00061	37-166	1-131	1/6.1e-03	-/-	≥

Фіг. 14



Фіг. 15

