



УКРАЇНА

(19) UA (11) 75862 (13) C2

(51) МПК (2006)

C07K 14/54 (2006.01)

A61K 38/17

A61K 38/20

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) ВИДІЛЕНИЙ ПОЛІПЕПТИД, ЩО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З IL-18 (IL-18BP) (ВАРІАНТИ), ВИДІЛЕНА МОЛЕКУЛА НУКЛЕІНОВОЇ КИСЛОТИ, ЩО ЙОГО КОДУЄ (ВАРІАНТИ), АНТИТІЛО, ЩО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ДАНИМ ПОЛІПЕПТИДОМ, СПОСІБ ОЧИЩЕННЯ IL-18BP ТА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО ЙОГО МІСТИТЬ**

1

2

(21) 2000031437

(22) 13.08.1998

(24) 15.06.2006

(86) PCT/IL98/00379, 13.08.1998

(31) 121554

(32) 14.08.1997

(33) IL

(31) 121639

(32) 27.08.1997

(33) IL

(31) 121860

(32) 29.09.1997

(33) IL

(31) 122134

(32) 06.11.1997

(33) IL

(31) 125463

(32) 22.07.1998

(33) IL

(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.

(72) Новік Даніела, IL, Дінарелло Чарльз, US, Рубінштейн Менахем, IL, Кім Соо Хіун, KR

(73) ІЄДА РІСЕРЧ ЕНД ДІВЕЛОПМЕНТ КО. ЛТД, IL

(56) EMBL Database entry 0 00923, accession number 0 00923, Merozite Surface Protein 1 (fragment), 01.07.97, XP002087999.

EMBL Database entry 0 00919, accession number 0 00919, Merozite Surface Protein 1 (fragment), 01.07.97, XP002088000.

EMBL Database entry HSZZ16951, accession number AA311795, Adams M.D. et al., EST182531 Jurkat T-cells VI Homo sapiens cDNA 5' end similar to Hypothetical protein C9, 18.04.97, XP002088001.

EMBL Database entry HSA10059, accession number AA010059, Hillier L. et al., ze16a02. s1 Soares fetal heart NbHH19W Homo sapiens cDNA clone, 02.08.96, XP002088002.

EMBL Database entry HZZ03012, accession number g1950205, Adams M.D. et al., EST182531 Jurkat T-

cels V Homo sapiens cDNA 5' end 18.04.97, XP002088003.

EMBL Database entry HSNUMAMR, accession number g35118, Yang C.H. et al., NuMA: an unusually long coiled-coil related protein in the mammalian nucleus, 27.03.92, XP002088004.

EMBL Database entry HSNUMAT3G, accession number g296118, Tang T.K. et al., Nuclear protein of Bovine esophageal epithelium, 31.03.93, XP002088005.

EMBL Database entry 098222, accession number 098222, Senkevich T.G. et al., Viridae; DS-DNA enveloped viruses; poxyviridae; chordopoxvirinae, molluscipoxviruses 01.02.1997, XP002088006.

EMBL Database entry 098221, accession number 098221, Senkevich T.G. et al., Viridae; DS-DNA enveloped viruses; poxyviridae; chordopoxvirinae, Molluscipoxviruses 01.02.1997, XP002088007.

EMBL Database entry 017343, accession number 017343, Otsuka A. J. et al., UNC-44 Ankyrins, 01.11.1996, XP002088008.

**(57) 1.** Виділений поліпептид, що включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з

(а) амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з AA1-AA192 SEQ ID NO: 2, AA29-AA192 SEQ ID NO: 2, AA1-AA197 SEQ ID NO: 6 і AA29-AA197 SEQ ID NO: 6,

(б) мутеїну будь-якої послідовності, вказаної в підпункті (а), де ідентичність амінокислотної послідовності вказаного мутеїну і принаймні однієї послідовності, вказаної в підпункті (а), складає щонайменше 70%;

де поліпептид, охарактеризований у підпункті (а) або (б), зв'язується з IL-18.

2. Поліпептид за п. 1, де будь-які зміни амінокислотної послідовності мутеїну, охарактеризованого в підпункті (б), являють собою заміни консервативних амінокислот в амінокислотних послідовностях, охарактеризованих у підпункті (а).

(13) C2

(11) 75862

(19) UA

3. Поліпептид за п. 1, де амінокислотна послідовність містить AA1-AA192 SEQ ID NO: 2 або AA29-AA192 SEQ ID NO: 2.
4. Поліпептид за п. 1, де поліпептид глікозильований в одному або декількох положеннях.
5. Поліпептид за п. 1, де поліпептид неглікозильований.
6. Поліпептид за п. 1, де поліпептид додатково містить принаймні один радикал, приєднаний до однієї або декількох функціональних груп, що є одним або декількома бічними ланцюгами амінокислотних залишків N- або C-кінцевих груп.
7. Поліпептид за п. 1, де поліпептид зазнав циклічної перестановки.
8. Поліпептид за п. 1, де поліпептид являє собою невірусний білок.
9. Поліпептид за п. 1, де поліпептид являє собою людський білок.
10. Поліпептид за п. 1, де поліпептид являє собою злитий білок.
11. Поліпептид за п. 10, де поліпептид злитий з Ig.
12. Поліпептид за п. 1 або 11, де поліпептид є розчинним.
13. Поліпептид за п. 1, де поліпептид є пегільованим.
14. Поліпептид за п. 6, де вказаний принаймні один радикал являє собою поліетиленгліколевий радикал.
15. Виділений поліпептид, що містить у собі амінокислотну послідовність AA1-192 SEQ ID NO: 2 або AA29-AA192 SEQ ID NO: 2 або їхні варіанти, що містять консервативні амінокислотні заміни, і зв'язується з IL-18.
16. Виділений поліпептид, що містить у собі амінокислотну послідовність AA1-197 SEQ ID NO: 6 або AA29-AA197 SEQ ID NO: 6 або їхні варіанти, що містять консервативні амінокислотні заміни, і зв'язується з IL-8.
17. Виділений поліпептид, що включає амінокислотну послідовність AA29-40 SEQ ID NO: 10 або AA1-AA40 SEQ ID NO: 10, де поліпептид зв'язується з IL-18 і модулює або блокує біологічну активність IL-18.
18. Поліпептид за п. 17, де поліпептид містить Ig-домен.
19. Очищений IL-18-зв'язуючий білок (IL-18BP), де білок характеризується наступним:
- (a) молекулярна маса білка складає приблизно 40 кДа за даними SDS-PAGE у вихідній глікозильованій формі;
- (b) білок зв'язується з IL-18 і модулює або блокує активність IL-18; і
- (c) білок містить N-кінцеву послідовність, що включає амінокислотну послідовність AA29-40 SEQ ID NO: 10 або AA1-AA40 SEQ ID NO: 10 або їхні варіанти, що містять консервативні амінокислотні заміни.
20. Активний фрагмент білка IL-18BP за п. 1 або 19, де активний фрагмент зв'язується з IL-18 і модулює або блокує активність IL-18.
21. Виділений поліпептид IL-18BP, що має N-кінцеву послідовність, що включає амінокислотну послідовність AA29-40 SEQ ID NO: 10 або AA1-AA40 SEQ ID NO: 10 або їхні варіанти, що містять консервативні амінокислотні заміни, і Ig-домен, де

поліпептид зв'язується з IL-18 і модулює або блокує активність IL-18.

22. Суміш будь-яких поліпептидів, охарактеризованих у пп. 1, 15-17, 19 і 20.

23. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з AA1-AA192 SEQ ID NO: 2, AA29-AA192 SEQ ID NO: 2 і AA29-AA197 SEQ ID NO: 6.

24. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що складається з

(a) нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 1, що кодує AA1-AA192 SEQ ID NO: 2 або AA29-AA192 SEQ ID NO: 2;

(b) нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 5, що кодує AA1-AA197 SEQ ID NO: 6 або AA29-AA197 SEQ ID NO: 6;

(c) нуклеотидної послідовності, комплемент якої зв'язується в умовах високої жорсткості з будь-якою з нуклеотидних послідовностей, охарактеризованих у підпунктах (a) або (b), і яка кодує амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з AA1-AA192 SEQ ID NO: 2, AA29-AA192 SEQ ID NO: 2, AA1-AA197 SEQ ID NO: 6 і AA29-AA197 SEQ ID NO: 6.

25. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 9 або нуклеотидну послідовність, комплемент якої зв'язується з нею в умовах високої жорсткості.

26. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 1 і 3, або область SEQ ID NO: 1 або 3, що кодує зрілий білок.

27. Спосіб визначення, виділення або ампліфікації нуклеотидної послідовності, що кодує IL-18BP, що включає застосування нуклеїнових кислот, охарактеризованих у будь-якому з пп. 23-26, як праймера або зонда.

28. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, охарактеризованої у будь-якому з пп. 23-26.

29. Вектор за п. 28, що додатково містить промотор, оперативно зв'язаний із вказаною молекулою нуклеїнової кислоти.

30. Клітина, генетично модифікована для продукування поліпептиду, охарактеризованого в будь-якому із пп. 1-21.

31. Клітина за п. 30, де клітина генетично модифікована вектором, охарактеризованим у п. 28.

32. Клітина за п. 30, де клітина є еукаріотичною.

33. Клітина за п. 30, де клітина є прокаріотичною.

34. Клітина за п. 32, де клітина є клітиною ссавця.

35. Спосіб одержання поліпептиду, охарактеризованого в будь-якому із пп. 1-21, що включає культивування клітини, охарактеризованої в будь-якому із пп. 30-34, в умовах, що забезпечують експресію вказаного поліпептиду.

36. Антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом, охарактеризованим у будь-якому із пп. 1-21.

37. Антитіло за п. 36, де антитіло являє собою моноклональне антитіло.

38. Антитіло за п. 37, де антитіло являє собою гуманізоване антитіло.

39. Спосіб визначення IL-18BP у зразку, що передбачає взаємодію вказаного зразка з антитілом, охарактеризованим у п. 36, і подальше визначення наявності зв'язаного антитіла.

40. Спосіб очищення поліпептиду IL-18BP, що передбачає взаємодію зразка IL-18BP з антитілом проти IL-18BP, охарактеризованим у п. 36, видалення білка, що не зв'язався, зі зразка з наступною елюцією IL-18BP, що зв'язався.

41. Спосіб виділення або очищення IL-18BP, охарактеризованого в будь-якому із пп. 1-21, що включає

(a) пропускання зразка через хроматографічну колонку, з якою зв'язується IL-18;

(b) промивання колонки для видалення білка, що не зв'язався, зі зразка, і

(c) елюцію IL-18BP, який зв'язався.

42. Спосіб виділення або очищення IL-18BP, охарактеризованого в будь-якому із пп. 1-21, що включає взаємодію зразка із субстратом, з яким зв'язаний IL-18, видалення білка, що не зв'язався, зі зразка з наступною елюцією IL-18BP, який зв'язався.

43. Спосіб одержання похідного IL-18BP, що включає одержання ДНК-конструкта, що кодує поліпептид, охарактеризований у будь-якому із пп. 1, 15-17 і 19-21, лігovanого з нуклеїновою кислотою, що кодує другий поліпептид, де при експресії вказаний ДНК-конструкт кодує злитий білок, що містить поліпептид, охарактеризований у будь-якому із пп. 1, 15-17 і 19-21, злитий із другим поліпептидом.

44. Спосіб за п. 43, де вказаним другим поліпептидом є Ig.

45. Спосіб одержання похідного IL-18BP, що включає хімічну модифікацію поліпептиду, охарактеризованого в будь-якому із пп. 1 і 15-17, із включенням принаймні одного модифікуючого радикала.

46. Спосіб за п. 45, де модифікуючий радикал являє собою поліетиленгліколевий радикал.

47. Композиція, що містить поліпептид, охарактеризований в будь-якому із пп. 1-21, або суміш поліпептидів за п. 22 і фармацевтично прийнятний носій.

48. Композиція, що містить нуклеїнову кислоту, охарактеризовану в будь-якому із пп. 23-26, і фармацевтично прийнятний носій.

49. Композиція, що містить антитіло, охарактеризоване в будь-якому із пп. 36-38, і фармацевтично прийнятний носій.

50. Набір, що містить в одній або декількох пляшечках фармацевтичну композицію, охарактеризовану в п. 47.

51. Набір, що містить в одній або декількох пляшечках фармацевтичну композицію, охарактеризовану в п. 48.

52. Набір, що містить в одній або декількох пляшечках фармацевтичну композицію, охарактеризовану в п. 49.

53. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з

(a) амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з AA1-AA192 SEQ ID NO: 2, AA29-AA192 SEQ ID NO: 2, AA1-AA197 SEQ ID NO: 6, AA29-AA197 SEQ ID NO: 6;

(b) мутеїну будь-якої послідовності, вказаної в підпункті (a), де амінокислотна послідовність вказаного мутеїну має принаймні 70%-у ідентичністю принаймні з одною послідовністю, вказаною в підпункті (a);

де вказана молекула нуклеїнової кислоти кодує поліпептид, що зв'язується з IL-18.

54. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що включає нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що складається з

(a) нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 1, що кодує AA1-AA192 SEQ ID NO: 2 або AA29-AA192 SEQ ID NO: 2;

(b) нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 5, що кодує AA1-AA197 SEQ ID NO: 6 або AA29-AA197 SEQ ID NO: 6;

(c) нуклеотидної послідовності, комплемент якої зв'язується в умовах високої жорсткості з кожною з нуклеотидних послідовностей, охарактеризованих у підпунктах (a)-(b);

де вказана нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що зв'язується з IL-18.

55. Рекомбінантна молекула ДНК, що включає молекулу нуклеїнової кислоти, охарактеризовану в п. 53 або 54, лігovanу з другою нуклеїновою кислотою, що кодує другий поліпептид, де при експресії вказана рекомбінантна молекула ДНК кодує злитий білок, що містить поліпептид, охарактеризований у будь-якому з пп. 1, 15-17 і 19-21, злитий з другим поліпептидом.

Даний винахід стосується інтерлейкін-18-зв'язувального білка (IL-18), надалі IL-18BP, що здатний зв'язувати IL-18. Зокрема, цей винахід стосується розчинного IL-18BP, одержуваного з біологічних рідин, розчинних IL-BP, які одержують в результаті експресії відповідних ДНК-векторів в клітинах-хазяїнах, кодованих вірусом гомологів IL-18BP, що їх одержують шляхом експресії відповідних ДНК-векторів в клітинах-хазяїнах, векторів, які експресують різні IL-BP, векторів, що є застосовними для експресії IL-18BP у людей та інших ссавців, антитіл проти IL-18BP, терапевтичного засто-

сування зазначених IL-18BP шляхом модулювання і/або блокування активності IL-18, терапевтичного застосування зазначених експресуючих векторів для модулювання і/або блокування активності IL-18 та застосування антитіл.

В 1989 році було описано індуковану ендотоксином сироваткову активну речовину, що стимулює вироблення інтерферону-гамма (IFN- $\gamma$ ), виділену з клітин селезінки миші (27). Ця сироваткова активна речовина діє не як безпосередній індуктор IFN- $\gamma$ , а скоріше як ко-стимулятор разом з IL-2 або мітогенами. Спроба виділити активну речовину з

сироватки мишей, попередньо оброблених ендотоксином, дозволила виявити, по-видимому, гомогенний білок масою 50-55кДа (26). Оскільки інші цитокіни здатні діяти як ко-стимулятори продукції IFN- $\gamma$ , неможливість нейтралізації сироваткової активної речовини нейтралізуючими антитілами проти IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 або TNF дозволяє припустити, що вона є відмінним фактором. У 1995р. ті ж самі дослідники показали, що індукований ендотоксином ко-стимулятор продукції IFN- $\gamma$  наявний в екстрактах печінки мишей, попередньо оброблених Р. аспес (31). В цій моделі, популяція макрофагів печінки (клітини Купфера) збільшується, і для цих мишей стає летальною низька доза бактеріального ліпополісахариду (LPS), яка не є летальною для необроблених мишей. Фактор, названий IFN- $\gamma$ -індукуючим фактором (IGIF), пізніше позначений як інтерлейкін-18 (IL-18), виділили в гомогенному стані з 1200 грам печінки мишей, оброблених Р. аспес. Вироджені олігонуклеотиди, одержані з амінокислотних послідовностей очищеного IL-18, застосовували для клонування кДНК IL-18 миші (31). IL-18 являє собою білок масою 18-19кДа з 157 амінокислот, що не має жодної явної гомології з будь-яким пептидом з баз даних. Месенджерні РНК IL-18 та інтерлейкіну-12 (IL-12) легко виявити в клітинах Купфера і активованих макрофагах. Рекombінантний IL-18 стимулює вироблення IFN- $\gamma$  більш потужно, ніж IL-12, по-видимому, за допомогою окремого механізму (31). Подібно індукованій ендотоксином сироватковій активній речовині сироватки, IL-18 сам по собі не індукує IFN- $\gamma$ , а діє, головним чином, як ко-стимулятор з мітогенами або IL-2. IL-18 посилює проліферацію Т-клітин, по-видимому, за допомогою IL-2-залежного механізму, і збільшує *in vitro* продукцію цитокінів-Th-1 та у випадку сумісної дії з IL-12 виявляє синергізм, збільшуючи продукцію IFN- $\gamma$  (24).

Було показано, що нейтралізуючі антитіла проти IL-18 миші відвертають летальну дію низьких доз LPS на мишей, попередньо оброблених Р. аспес. Інші дослідники повідомляли про значення IFN- $\gamma$  як медіатора летальної дії LPS у попередньо оброблених мишей. Наприклад, нейтралізуючі анти-IFN- $\gamma$  - антитіла запобігали розвитку у мишей генералізованої реакції Шварцмана (16), а оброблені галактозаміном миші з дефіцитом IFN- $\gamma$ -рецептора, виявляються резистентними до загибелі, викликаній LPS (7). Отже, не є несподіваним, що нейтралізуючі антитіла проти IL-18 миші захищають мишей, попередньо оброблених Р. аспес, від летальної дії LPS (31). До того ж обробка антитіла проти мишачого IL-18 відвертає тяжку печінкову цитотоксичність у мишей, які вижили.

Після того, як клонували мишачу форму, в 1996 році описали послідовність кДНК IL-18 людини (38). Рекombінантний IL-18 людини виявляє активність нативного IL-18 (38). Рекombінантний IL-18 людини не виявляє безпосередньої індукуючої IFN- $\gamma$  активності в Т-клітинах людини, а діє як ко-стимулятор продукції IFN- $\gamma$  і інших цитокінів Т-хелперів-1 (Th-1) (38). Нині, IL-18 розглядають головним чином як ко-стимулятор продукції цитокінів Th-1 (IFN- $\gamma$ , IL-2 і колонієстимулюючого фактора гранулоцитів-макрофагів) (20), а також як ко-

стимулятор для FAS-ліганд-опосередкованої цитотоксичності клонів натуральних-кілерів миші (37).

В результаті клонування IL-18 з пошкоджених тканин і вивчення експресії гена IL-18, виявлено тісний зв'язок цього цитокіну з аутоімунним захворюванням. У неогрядних діабетичних (NOD) мишей спонтанно розвивається аутоімунний інсуліт і цукровий діабет, які посилюють і синхронізують однократною ін'єкцією циклофосфаміду. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції (PCR) із зворотною транскриптазою виявляють мРНК IL-18 в підшлунковій залозі мишей-NOD на ранніх стадіях інсуліту. Після обробки циклофосфамідом швидко збільшується вміст мРНК IL-18 і це передуює зростанню мРНК IFN- $\gamma$  і далі розвитку цукрового діабету. Цікаво, що ці кінетичні параметри подібні до кінетики мРНК IL-12-p40, що веде в результаті до тісної кореляції з вмістом окремих мРНК. Клонування кДНК IL-18 з РНК підшлункової залози з подальшим секвенуванням дозволило виявити ідентичність з послідовністю IL-18, клонованою з купферових клітин і *in vivo* з попередньо активованих макрофагів. Макрофаги мишей-NOD відповідають на циклофосфамід експресією гена IL-18, тоді як макрофаги паралельно оброблених мишей Balb/c не реагують. Тому, експресія IL-18 регулюється аномально у аутоімунних мишей-NOD та тісно асоційована з розвитком цукрового діабету (32).

IL-18 відіграє істотну роль в імунорегуляції або запаленні шляхом збільшення функціональної активності Fas-ліганду на Th-1 клітинах (10). IL-18 також експресується в корі надниркової залози і тому є секретованим нейроімунномодулятором, що відіграє важливу роль в настройці імунної системи після впливу стресу (9).

*In vivo*, IL-18 утворюється в результаті розщеплення рго-IL-18 і, як виявилось, його ендогенна активність пояснює продукцію IFN- $\gamma$  в випадках летальності, опосередкованої Р. аспес та LPS. Внаслідок його активності, блокування біологічної активності IL-18 при захворюванні людини є терапевтичною стратегією при численних хворобах. Цього досягають використанням розчинних рецепторів або блокуючих антитіл до зв'язаного з клітиною рецептора IL-18.

Білки, що зв'язують цитокіни, (розчинні рецептори цитокінів) відповідають позаклітинним ліганд-зв'язувальним доменам відповідних їм рецепторів клітинної поверхні цитокінів. Їх одержують або шляхом альтернативного сплайсинга перед-мРНК, притаманної рецептору клітинної поверхні, або шляхом протеолітичного розщеплення рецептора клітинної поверхні. Такі розчинні рецептори були описані раніше, включаючи зокрема розчинні рецептори IL-6 і IFN- $\gamma$  (30), TNF (11, 12), IL-1 та IL-4 (21), IFN- $\alpha/\beta$  (28,29) та інші. Один цитокінзв'язувальний білок, названий остеопротегерин (OPG, також відомий як фактор, що інгібує остеокласти - OCIF)/член TNFR/Fas сімейства, є першим прикладом розчинного рецептора, який існує лише як секретований білок (1, 34, 39).

Даний винахід стосується IL-18-зв'язувальних білків, (IL-18BP) та кодованих вірусами гомологів IL-18BP (надалі, вірусні IL-18BP), та рекombінантних білків, мутантів, функціональних похідних, ак-

тивних фрагментів і їх перетворених через циклізування похідних, здатних зв'язувати IL-18. Винахід також стосується способу виділення IL-18BP з рідин організму людини, і способу одержання їх за допомогою рекомбінантних методик. Винахід також стосується векторів, що експресують IL-18BP, підхожих для експресії IL-18BP у людей та інших ссавців. Окремі IL-18BP, кодовані вірусами гомологи IL-18BP, гібридні білки, мутеїни, функціональні похідні, активні фрагменти та їх перетворені через циклізування похідні відповідно до цього винаходу можуть застосовуватись для модулювання і/або блокування активності IL-18.

Також забезпечені репліковані експресуючі вектори, що містять послідовності ДНК, підхожі для експресії різних IL-18BP в клітинах-хазяїнах, трансформованих ними, і білки та поліпептиди, що продукуються шляхом експресії такими хазяїнами.

Крім того, винахід стосується фармацевтичних композицій, які складаються з прийнятних носіїв і IL-18BP, або вірусних IL-18BP чи векторів, що експресують їх у людей та інших ссавців, для лікування захворювань або станів, при яких необхідне модулювання або блокування активності IL-18.

Далі винахід стосується антитіл проти IL-18BP і вірусних IL-18BP, підхожих для їх афінної очистки та імуноаналізу.

Фігура 1 зображує SDS-PAGE (електрофорез в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію) IL-18-зв'язувального білка, очищеного за афінною методикою. Неочищені білки сечі (500л сечі здорових людей, сконцентрованої ультрафільтруванням) наносять на колонку з IL-18-агарозою. Колонку промивали, а зв'язані білки елюювали при pH 2,2. Елюйовані фракції нейтралізовували і аліквоти аналізували за допомогою SDS-PAGE (10% акриламід) в невідновлювальних умовах і при забарвленні сріблом. Доріжки являють собою: 1: неочищені білки сечі (1,5мкг наносять на гель); 2-9: елюати 1-8, відповідно, з колонки з IL-18-агарозою; 10: маркери молекулярних мас в кДа, подані праворуч. Стрілка вказує зону, яка відповідає IL-18BP.

Фігура 2 зображує авторадіограму SDS-PAGE (7,5% акриламід) комплексів, які складаються з <sup>125</sup>I-IL-18 (уявна молекулярна маса 19кДа), поперечно-зв'язаного з такими препаратами розчинного IL-18-зв'язувального білка: Доріжка 1: Промивання з IL-18-афінної колонки. Доріжка 2: Елюція 2 з IL-18-афінної колонки. Доріжка 3: Елюція 3 з IL-18-афінної колонки. Праворуч вказані маркери молекулярних мас (в кДа). Стрілка вказує поперечно-зшитий продукт (58кДа).

Фігура 3 зображує інгібування індукованої IL-18 продукції IFN-γ за допомогою BL-18BP

(А) Сплєноцити миші стимулюють (24 години, 37°C) зазначеними поєднаннями LPS (1мкг/мл) і IL-18 людини (5нг/мл), доданими або безпосередньо, або після попереднього змішування (1 година, 37°C) з IL-18BP сечі. Рівень mIFN-γ (миші) в культурі визначають через 24 години.

(В) Сплєноцити миші інкубують (24 години) з LPS (1мкг/мл) разом з IL-18 миші (10нг/мл), попередньо змішаний (1 година, 37°C) із зростаючими концентраціями IL-18BP людини.

(С) Сплєноцити миші інкубують (24 години) з

LPS (10мкг/мл) разом з зростаючими концентраціями IL-18BP людини.

(D) Сплєноцити миші інкубують (24 години) з Con A (конканаваліном А) (мкг/мл) разом з зростаючими концентраціями IL-18BP людини.

(Е) KG-1 клітини людини стимулюють TNF-α (20нг/мл) і hIL-18 (людини) (25нг/мл), доданих або самих, або після попереднього змішування (1 година, 37°C) з IL-18BP сечі.

На Фігурі 4 подано послідовність кДНК IL-18BPa людини і білка. Сигнальний пептид підкреслено.

На Фігурі 5 подано послідовність кДНК IL-18BPb людини і білка. Сигнальний пептид підкреслено.

На Фігурі 6 подано послідовність кДНК IL-18BPc людини і білка. Сигнальний пептид підкреслено.

На Фігурі 7 подано послідовність кДНК IL-18BPd людини і білка. Сигнальний пептид підкреслено.

На Фігурі 8 зображено послідовність гена IL-18BP людини. Визначають послідовність геномного клону (7,1т.п.н.) людини і порівнюють з послідовностями різних клонів кДНК, виділених з 3 кДНК бібліотек. Спільний стартовий кодон трансляції являє собою нуклеотиди 683-685. NuMA1 ген локалізується на негативному ланцюзі від нуклеотиду 3578 до кінця.

Фігура 9 показує вплив рекомбінантного IL-18BP на активність IL-18 людини і миші.

His<sub>6</sub>-мічений IL-18BPa короткочасно експресують в клітинах COS7 і очищають.

(А) IL-18 людини (5нг/мл) попередньо змішують з або His<sub>6</sub>-міченим-IL-18BPa, або RPMI та додають до клітин селезінки миші разом з LPS (1мкг/мл). Продукцію IFN-γ вимірюють через 24 години.

(В) IL-18 миші (10нг/мл) попередньо змішують або з His<sub>6</sub>-міченим-IL-18BPa, або з RPMI і додають до клітин селезінки миші разом з LPS (1мкг/мл). Продукцію IFN-γ вимірюють через 24 години.

(С) IL-18 людини (25нг/мл) попередньо змішують або з COS7-IL-18BPa, або з RPMI і додають до РВМС (моноклеарні клітини периферійної крові) людини в присутності IL-12 (10нг/мл).

(D) IL-18 людини (25нг/мл) попередньо змішують або з COS7-IL-18BPa, або з RPMI і додають до KG-1 клітин людини в присутності TNF-α (20нг/мл).

Даний винахід стосується різних IL-18BP та вірусних IL-18BPs, які зв'язують IL-18. Такі IL-18BP модулюють і/або блокують біологічні активності IL-18. Термін "IL-18BP і вірусні IL-18B" включає в себе зрілий білок (без сигнальної послідовності), білок, що містить сигнальну послідовність, мутеїни IL-18BP і вірусних IL-18BP, похідні IL-18BP і вірусних IL-18BP та усичені форми IL-18BP і вірусних IL-18BP та їх солі.

Далі винахід стосується ДНК, що кодують різні IL-18BP, вірусні IL-18BP, мутенни, рекомбінантні білки, функціональні похідні, активні фракції та їх суміші. Зазначена ДНК являє собою геномну ДНК, кДНК, синтетичну ДНК, продукт PCR або їх поєднання. Ці ДНК вставляють в репліковані носії експресії для експресії різних IL-18BP та вірусних IL-18BP в клітинах-хазяїнах згідно з цим винахо-

дом. ДНК здатні гібридизуватись з зазначеними ДНК за жорстких умов, а кодування білків або поліпептидів, що зв'язують IL-18, також включають до цього винаходу.

Одна така ДНК кодує IL-18BP, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і містить термінуючий кодон на її 3'-кінці.

Експресуючі вектори, підходять для експресії різних IL-18BP або вірусних IL-18BP у людей або інших ссавців, тобто для генної терапії, являють собою вірусні вектори або інші типи векторів, в які включають ген IL-18BP або кДНК IL-18BP чи ДНК, що кодує IL-18BP у спосіб, який дозволяє здійснити ефективну експресію IL-18BP або вірусного IL-18BP у людей та інших ссавців. Даний винахід також включає молекули ДНК, які гібридизуються з зазначеними ДНК за жорстких умов і кодують білки і поліпептиди, що зв'язують IL-18.

Виділення IL-18BP проводять згідно з даним винаходом, наприклад, шляхом пропускання рідин організму людини таких як сеча або сироватка через хроматографічну колонку, до якої приєднаний IL-18, і подальшої елюції IL-18BP.

Різні IL-18BP і вірусні IL-18BP одержують за допомогою рекомбінантних методик, тобто шляхом експресування IL-18BP в відповідному хазяїні, слідом за оперативним приєднанням промоторів, енхансерів експресії, регуляторних послідовностей тощо, прийнятих для даного використовуваного хазяїна, що, наприклад, передбачає експресію в правильній орієнтації.

Різні IL-18BP і вірусні IL-18BP, та вектори для експресування IL-18BP у людей та інших ссавців застосовують для лікування і полегшення станів, в які втягнутий IL-18 або які викликані надлишком екзогенно введеного або ендогенно утвореного IL-18. Такими станами є, наприклад аутоімунні захворювання, цукровий діабет I типу, ревматоїдний артрит, відторгнення трансплантата, запальне захворювання кишечника, сепсис, розсіяний склероз, ішемічна хвороба серця (включаючи серцевий напад), ішемічне ураження мозку, хронічний гепатит, псоріаз, хронічний панкреатит, гострий панкреатит і таке інше.

Відповідно до цього винаходу, IL-18BP виділяють з сечі здорової людини за допомогою однієї хроматографічної стадії. Препарат неочищеної сечі людини, сконцентрованої з 500л сечі здорових людей, наносять на колонку, що містить IL-18 людини, зв'язаний з агарозою. Колонку промивають, а зв'язаний білок елюють при низькому значенні рН. Елюйовані фракції нейтралізують, а аліквоти аналізують за допомогою SDS-PAGE (електрофорез в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію) (10% акриламід) за невідновлювальних умов і при забарвленні сріблом. Зокрема, в елюйованих фракціях виявлена білкова зона 40кДа (Фіг.1).

Білок ~40кДа, одержаний на першій стадії, ідентифікують як IL-18-зв'язувальний білок, за його здатністю, зокрема, поперечно зв'язувати <sup>125</sup>I-IL-18 (Фіг.2). До того ж, білок ~40кДа характеризують, аналізуючи N-кінцеву послідовність білка. Аліквоти з елюйованого білка піддають SDS-PAGE, електроблотингу на PVDF-мембрані та проводять аналіз первинної структури короткого фрагменту пос-

лідовності білка. Аналогічно, аліквоти елюйованого білка піддають прямому аналізу первинної структури короткого фрагменту послідовності білка. В обох випадках, одержані дві поліпептидні послідовності. Головна послідовність і мінорна послідовність, остання відповідає фрагменту дефенсину людини (номер доступу p11398), починаючи з амінокислоти 65. Віднімання відомої послідовності дефенсину дає таку послідовність:

T-P-V-S-Q-Q-x-x-x-A-A-A

1 . . . 5 . . . 10

де x являє собою ще невизначені амінокислоти.

Щоб одержати більш довгу і більш точну послідовність і щоб ідентифікувати можливі залишки цистеїну, аліквоти елюйованої фракції відновлюють ДТТ (дитіотрейтолом) за денатуруючих умов, проводять реакцію з 4-вінілпіридинон, знесолюють за допомогою мікро-ультрафільтраційного пристрою (Ultrafree, cutoff 10000Lf, Millipore) і проводять аналіз первинної структури короткого фрагменту послідовності білка. Після циклу №1 секвенування, проводять реакцію залишкового білка з о-фталевим альдегідом, щоб блокувати всі N-концеві поліпептиди окрім Pro, а потім продовжують секвенування. У цей спосіб одержано таку одноланцюжкову білкову послідовність:

TPVSQXXAA XASVRSTKDP CPSQPPVFPA AKQCPALEVT

- 10 20 30 40

(T=Thr; P=Pro; V=Val; S=Ser; Q=Gln; X=невідомо; A=Ala;

R=Arg; K=Lys; D=Asp; C=Cys; F=Phe; L=Leu; E=Glu)

Одержана послідовність значно відрізняється від послідовності будь-якого іншого відомого білка, що встановлено дослідженням баз даних за структурою білка. Однак дослідження бази даних The Institute of Genomic Research (TOGR) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) за допомогою tblastn програми дослідження дало файл кДНК, позначений THC12801, відкрита рамка зчитування (128 кодонів) якої, коли транскрибується, містить послідовність високо гомологічну N-кінцевій послідовності IL-18BP. Таким чином представляють гомологію:

1 .....TPVSQXXAAAXASVRSTKDP CPSQPPVFPAAKQCPALEVT... 40  
51 VTLLVRATXVXQTTTAAATASVRSTKDP CPSQPPVFPAAKQCPALEVTWPE 100

(Верхня послідовність (1-40) є послідовністю IL-18BP, виділеною згідно з винаходом; нижню послідовність (51-100) одержано трансляцією кДНК файлу THC123801 TIGR).

Послідовність кДНК, ідентифікована як THC 12801, є, однак, тільки EST (експресована tag послідовність), тобто випадково вибраним клоном кДНК. Ніколи не досліджували, чи містить EST відкриту рамку зчитування, або чи експресується білок з гена, який відповідає EST, або з самого EST, не ідентифікували будь-коли будь-яку функцію білка, що кодується THC12801. Взагалі немає інформації про те, що THC123801 містить відкриту рамку зчитування, що кодує IL-18BP.

Афінно-очищений IL-18BP сечі зберігає здат-

ність зв'язувати його мічений ліганд ( $^{125}\text{I}$ -IL-18), і після ковалентного поперечного зв'язування утворює комплекс з молекулярною масою 58 кДа. Молекулярна маса комплексу відповідає співвідношенню 1:1 IL-18BP ~40 кДа та IL-18 19 кДа (Fig.2).

Афінно-очищений IL-18BP блокує біологічну активність IL-18 людини, так само як і миші. Таким чином, коли IL-18BP додають до IL-18 або людини, або миші, він блокує здатність IL-18 викликати продукцію інтерферона-гамма, якщо додають разом з ліпополісахаридом (LPS) до культур клітин селезінки миші (Fig.3).

З метою даного опису вираз "біологічна активність IL-18" стосується принаймні однієї з поданих нижче біологічних властивостей:

(i) індукція IFN- $\gamma$ , головним чином, в якості ко-стимулятора з мітогенами, IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$ , LPS в різних типах клітин таких як мононуклеарні клітини периферійної крові людини, лінія KG-1 клітин людини і Т-клітини,

(ii) збільшення проліферації Т-клітин,

(iii) збільшення утворення цитокіну TNF-1 *in vitro*, головним чином в якості ко-стимулятора,

(iv) синергізм з IL-12 щодо збільшення продукції IFN- $\gamma$  та інших цитокінів Т-хелперів-1,

(v) ко-стимулююча дія відносно FAS-ліганд-опосередкованої цитотоксичності клонів натуральних кілерів миші,

(vi) індукція активації NF- $\kappa$ B в KG-1 клітинах людини, ймовірно шляхом індукування утворення гомодимеру 50 NF- $\kappa$ B і гетеродимеру p65/p50 NF- $\kappa$ B,

(vii) індукція IL-8.

Вживаний в описі вираз "зв'язування з IL-18" означає здатність IL-18BP зв'язувати IL-18, що доводять, наприклад шляхом зв'язування IL-18BP з міченим IL-18 при афінній очистці, як описують в Прикладі 2 опису.

Вживаний в описі вираз "модулювання активності IL-18" означає здатність IL-18BP змінювати будь-яку активність IL-18, а не блокування, наприклад часткове інгібування, підсилення і таке інше.

Вживаний в описі вираз "блокування активності IL-18" стосується активності IL-18BP, що блокує принаймні одну з наведених вище біологічних активностей IL-18. Активність IL-18BP, що блокує IL-18, є прикладом здатності IL-18BP блокувати асоційовану з IL-18 експресію IFN- $\gamma$  в спленоцитах миші. Як буде показано більш докладно нижче, модулювання або блокування активності IL-18BP частково зумовлене тим, що IL-18BP інгібує викликану IL-18 активацію NF- $\kappa$ B. До того ж, IL-18BP блокує принаймні одну з таких активностей IL-18, а саме індукцію IFN- $\gamma$  в клітинах людини і миші, індукцію IL-8 і активацію NF- $\kappa$ B.

ДНК-зонд для скринінга кДНК бібліотек одержують шляхом PCR з зворотною транскриптазою зі специфічними смисловим і антисмисловим праймерами і РНК з Т-клітин людини Jurkat з праймерами з TIGR послідовності. Одержаний продукт PCR підтверджують аналізом послідовності ДНК. Продукт PCR мітять  $^{32}\text{P}$  і використовують в якості зонда для скринінга чотирьох кДНК бібліотек людини, одержаних з моноцитів периферійної крові, з лінії Т-клітин Jurkat, з PBMC (мононуклеар-

них клітин, периферійної крові) та з селезінки людини. Різні незалежні клони кДНК відповідають чотирьом варіантам сплайсинга IL-18BP (SEQ ID NO: 1, 3, 5 і 7). Всі варіанти сплайсинга кодують передбачувані розчинні секретовані білки. Найбільш багатий варіант (IL-18BP $\alpha$ ) має відкриту рамку зчитування з 192 кодонів, яка кодує сигнальний пептид, що раніше згадується як "лідер-послідовність" з 28 амінокислотних залишків, за яким йде зрілий передбачуваний IL-18BP $\alpha$ , перші 40 залишків якого ідеально відповідають N-кінцевій білковій послідовності IL-18BP сечі (SEQ ID NO: 2). Положення залишків цистеїну дозволяє припустити, що цей поліпептид належить до суперсімейства імуноглобулінів (Ig). Цікаво, що кожен з чотирьох залишків Gln в зрілому IL-18BP $\alpha$  є ділянкою можливого N-глікозилування. Три інші варіанти IL-18BP наявні в меншій кількості, ніж IL-18BP $\alpha$ . Вони включають в себе більш коротку 1т.п.н. кДНК IL-18BP $\beta$ , що кодує сигнальний пептид з 28 амінокислотних залишків з подальшим зрілим білком з 85 амінокислотних залишків (SEQ ID NO: 4). Третій варіант, IL-18BP $\gamma$ , являє собою кДНК 2,3т.п.н., що кодує сигнальний пептид з 28 амінокислотних залишків з подальшим зрілим IL-18BP з 169 амінокислотних залишків (SEQ ID NO: 6). Четвертий варіант, IL-18BP $\delta$ , кодує сигнальний пептид з 28 амінокислотних залишків з подальшим зрілим IL-18BP з 1 амінокислотних залишків (SEQ ID NO: 8).

Для подальшого дослідження можливого існування додаткових варіантів сплайсинга IL-18BP, проводять скринінг геномної бібліотеки людини зондом, який відповідає повній довжині кДНК IL-18BP. П'ять геномних клонів, що відрізняються за довжиною, ідентифіковані в цій бібліотеці. Проводять аналіз послідовності ДНК цих клонів з використанням зовнішнього і внутрішнього праймерів. Всього з цих клонів зібрана послідовність 7,8т.п.н. (SEQ ID NO: 9). Не ідентифікують ніякого екзона, що кодує трансмембранний (TM) рецептор з послідовністю 7,8т.п.н. Всі варіанти, розподілені в звичайному ініціюючому сайті трансляції, кодують той самий сигнальний пептид з 28 амінокислотних залишків і розчинні зрілі білки, які відрізняються за величиною та С-кінцевими послідовностями. IL-18BP-локус містить додатковий ген, що кодує білок 1 ядерного мітотичного апарату (NUMA1), який знаходиться на мінус ланцюга. Ці дані локалізують ген IL-18BP в хромосомі 11q 13 (36).

Дослідження гомології проводять на повній білковій послідовності IL-18BP $\alpha$  і GenPept базі даних ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), використовуючи Smith Watermann-алгоритм. Виявлено, що гомологи IL-18BP експресуються в деяких покс-вірусах у вигляді секретованих білків з раніше невідомою функцією. Раніше повідомляли, що віруси кодують різні рецептори цитокінів і що такі кодовані вірусами молекули служать в якості пасток-рецепторів, що інгібує імунні відповіді шляхом нейтралізації їх відповідного цитокіну (розглядають Spriggs, MK, 1994, Сшт, Opin. Immunol., 6, 526-529). Тому винахід далі стосується кодованих вірусами гомологів IL-18BP, які також є блокаторами або модуляторами біологічної активності IL-18. Приклади кодованих вірусами гомологів IL-18BP подані в Таблиці 1.

Згідно з даним винаходом, кодований вірусом гомолог експресують в прокаріотичному або еукаріотичному хазяїні. Вживаний в описі вираз "кодований вірусом гомолог IL-18BP" означає схожість принаймні 50% в послідовності з принаймні 70 амінокислотних залишків. Більш прийнятно, схожість становить принаймні 50%, принаймні 60%, принаймні 70%, принаймні 80% або ще більш прийнятно принаймні 90% схожості в послідовності з 100 амінокислотних залишків.

Таблиця 1

Кодовані вірусами білки, які виявляють високу гомологію з IL-18BP людини

Послідовність Gen Pept	Тип вірусу
MCU60315_54	U60315 Вірус Molluscum contagiosum
MCU60315_53	U60315 Вірус Molluscum contagiosum
SWPHLSB_12	L22013 Вірус віспи свині
CV41KBPL_14	Вірус (віспо)вакцини
VVCGAA 5	Вірус натуральної віспи
U01161_3 174	Вірус ектомелії (вірус віспи мишей)
VVU18340_6	Вірус натуральної віспи
VVU18338_7	Вірус натуральної віспи
VVU18337_7	Вірус натуральної віспи
VARCG_7 173	Основний вірус натуральної віспи
MCU60315_51	Вірус Molluscum contagiosum
HNABV_1	Новий вірус, асоційований з гепатитом не-A, не-B

IL-18BPа експресують в клітини COS7 мавпи. З цією метою кДНК IL-18BPа включають в експресуючий вектор рEF-BOS ссавців. Касету, що кодує (His)<sub>6</sub>-послідовність, приєднують до 3'-кінця ORF IL-18BP в рамці, щоб полегшити очистку рекомбінантного білка. Клітини COS7 короткочасно трансфікують експресуючим вектором, а безсироваткове середовище цих клітин (150мл) концентрують і очищають шляхом метал-хелатуючої хроматографії. IL-18BPа рухається у вигляді однієї смуги при SDS-PAGE з забарвленням сріблом при відновлювальних та невідновлювальних умовах і має таку ж уявну молекулярну масу, як маса IL-18BP сечі. Аналіз білкової послідовності цього препарату виявляє таку ж N-кінцеву послідовність як послідовність IL-18BP сечі. Аналіз IL-18BPа за допомогою імуноблотинга з антитілами, одержаними проти IL-18BP сечі, виявляє зону з такою ж молекулярною масою як маса білка сечі. Крім того, використовуючи імунопреципітацію з подальшими SDS-PAGE і авторадіографією, встановлюють, що IL-18BPа витісняє <sup>125</sup>I-IL-18BP сечі з сполуки з антитілом. Тому IL-18BPа структурно відповідає IL-18BP, виділеному з сечі.

Були проведені дослідження здатності сирого і очищеного IL-18BPа інгібувати біологічну активність IL-18. IL-18BPа інгібує активність IL-18 людини і миші в спленоцитах миші, PBMC і лінії KG-1 клітин людини (Фіг.9). Ці результати підтверджують справжність кДНК IL-18BPа, як кДНК, що кодує

біологічно активний IL-18BP.

Далі даний винахід стосується мутеїнів і фрагментів IL-18BP та вірусних IL-18BP, і рекомбінантних білків, які складаються з IL-18BP дикого типу та вірусних IL-18BP або їх мутеїнів або фрагментів, злитих з іншим поліпептидом або білком і які характеризуються здатністю зв'язувати IL-18 або його гомологи.

Вживаний в описі термін "мутеїни" стосується аналогів IL-18BP або аналогів вірусного IL-18BP, в яких один чи більше амінокислотних залишків нативного IL-18BP або вірусного IL-18BP заміщають різними амінокислотними залишками або вилучають, або один чи більше амінокислотних залишків приєднують до послідовності нативного IL-18BP або вірусного IL-18BP без значної зміни здатності одержаних продуктів зв'язувати IL-18 порівняно з IL-18BP дикого типу або вірусним IL-18BP. Ці мутеїни одержують шляхом відомого синтезу і/або методами сайт-спрямованого мутагенезу, або будь-якого іншого відомого методу, прийнятного для цього.

Більш прийнятно будь-який такий мутеїн має послідовність амінокислот, яка суттєво повторює послідовність IL-18BP, яка суттєво повторює послідовність вірусного IL-18BP, таку, щоб мати по суті однакову активність з IL-18BP. Однією активністю є його здатність зв'язувати IL-18. Оскільки мутеїн характеризується значною IL-18-зв'язувальною активністю, його використовують для очистки IL-18, як наприклад шляхом афінної хроматографії, і таким чином вважають, що він має активність, подібну до активності IL-18BP. Так, чи має будь-який даний мутеїн по суті таку ж активність як IL-18BP можна визначити за допомогою рутинних експериментів, в яких такий мутеїн піддають, наприклад простому конкурентному сендвіч-аналізу, щоб виявити чи зв'язує він або ні відповідно мічений IL-18, і таким як радіоімуноаналіз та EUSA (твердофазний імуоферментний аналіз).

В більш прийнятному втіленні будь-який такий мутеїн має принаймні 40% ідентичності або гомології з послідовністю або IL-18BP, або кодованого вірусом гомолога IL-18BP. Ще більш прийнятно, він має принаймні 50%, принаймні 60%, принаймні 70%, принаймні 80% або найбільш прийнятно, принаймні 90% ідентичності або гомології з нею.

Мутеїни поліпептидів IL-18BP або мутеїни вірусних IL-18BP, застосовні згідно з даним винаходом, або нуклеїнова кислота, що їх кодує, включають в себе певний набір істотно відповідних послідовностей, як пептиди заміщення або поліпептиди, які рутинно одержують за допомогою одного з звичайних способів на даному рівні техніки без зайвих експериментів на основі інструкцій і порадики, наведених в описі. Докладний опис хімії і структури білка див. [Schulz G. E. et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York, 1978; i Creighton, T. E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983], які цитують в описі. Для ознайомлення з замінами в нуклеотидній послідовності, наприклад такими як кодонні переваги, див. [Ausubel et al., supra, at A.1.1-A.1.24, i Sambrook et al., supra, в Додатках C і D].

Більш прийнятними замінами щодо мутеїнів



відповідно до цього винаходу є заміни, відомі як консервативні. Консервативні заміни поліпептидів або білків IL-18BP або вірусних IL-18BP включають в себе синонімічні амінокислоти, групи яких характеризуються достатньо схожими фізико-хімічними властивостями, що при заміщеннях між членами групи зберігається біологічна функція молекули, [Grantham, Science, Vol. 185, pp.862-864 (1974)]. Ясно, що вставки і делеції амінокислот в зазначених послідовностях можна здійснювати без зміни їх функції, особливо якщо вставки та делеції втягують лише кілька амінокислот, наприклад менше тридцяти, і більш прийнятно менше десяти, і не вилучають або заміщають амінокислоти, які є істотними для функціональної конформації, наприклад залишки цистеїну, [Anfinsen, "Principles That Govern The Folding of Protein Chains"; Science, Vol. 181, pp.22-20 (1973)]. Білки і мутеїни, утворені за допомогою таких делецій і/або вставок, входять до компетенції даного винаходу.

Однак залишки цистеїну, які не є істотними для біологічної функції, заміщають на інші залишки, наприклад, щоб уникнути утворення небажаних внутрішньомолекулярних і міжмолекулярних дисульфідних містків, які викликають зниження активності IL-18BP.

Більш прийнятні синонімічні амінокислотні групи подані в Таблиці I. Ще більш прийнятно, синонімічні амінокислотні групи являють собою групи, наведені в Таблиці II; і найбільш прийнятно синонімічні амінокислотні групи являють собою групи, названі в Таблиці III.

Таблиця I

Більш прийнятні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Таблиця II

Ще більш прийнятні  
групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

Таблиця III

Найбільш прийнятні  
групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Приклади здійснення амінокислотних замінів в білках, що використовують для одержання мутеїнів поліпептидів або білків IL-18BP, або мутеїнів вірусних IL-18BP, для застосування в даному винаході, включають будь-які відомі стадії способів таких як наведені в патентах США RE 33653, 4959314, 4588585 і 4737462 Mark et al.; 5116943 Koths et al., 4965195 Namen et al.; 4879111 Chong

et al.; i 5017691 Lee et al; i білки з заміщенням лізіном представляють в патентах США №4904584 (Shaw et al.).

В іншому більш прийнятному напрямку даного винаходу мутеїн IL-18BP або вірусного IL-18BP має амінокислотну послідовність, яка по суті відповідає послідовності IL-18BP або вірусного IL-18BP. Термін "по суті відповідає" призначено для розглядуваних білків з мінорними змінами в послідовності природного білка, які не порушують основні характеристики природних білків, особливо, що стосується їх здатності зв'язувати IL-18. Вважають, що тип змін, які звичайно відносять до "по суті відповідають", є такими змінами, що відбуваються в результаті узвичаєних методів мутагенезу ДНК, які кодують ці білки, що приводять в результаті до нечисленних мінорних модифікацій, і скринінгу необхідної активності у описаний вище спосіб. Окрім зв'язування IL-18 мутеїни також модулюють і/або блокують активність IL-18.

Відповідно до цього винаходу, мутеїни включають в себе білки, що кодуються нуклеїновою кислотою такою як ДНК або РНК, які гібридизуються з ДНК або РНК, які кодують IL-18BP або кодують вірусний IL-18BP відповідно до цього винаходу за жорстких умов. Винахід також включає в себе таку нуклеїнову кислоту, що також може застосовуватись в якості зонда при ідентифікації і очистці необхідної нуклеїнової кислоти. Крім того, така нуклеїнова кислота є основним кандидатом для визначення, чи кодує вона поліпептид, що зберігає функціональну активність IL-18BP даного винаходу. Термін "жорсткі умови" стосується гібридизації і умов подальшого промивання, що є звичайними на даному рівні техніки і узвичаєно називаються "жорсткими". Див. [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, N. Y., 6.3 i 6.4 (1987, 1992), та Sambrook et al., supra]. Без обмеження приклади жорстких умов включають в себе умови промивання 12-20° нижче від розрахованої температури гібриду при дослідженні в, наприклад 2 x SSC i 0,5% додецилсульфаті натрію протягом 5 хвилин, 2 x SSC i 0,1,% SDS протягом 15 хвилин; 0,1 x SSC 0,5% SDS при 37°C протягом 30-60 хвилин, а потім 0,1 x SSC i 0,5% SDS при 68°C протягом 30-60 хвилин. Фахівці у цій галузі розуміють, що жорсткі умови також залежать від довжини послідовності ДНК, олігонуклеотидних зондів (як, наприклад, 10-40 основ) або змішаних олігонуклеотидних зондів. Якщо застосовують змішані зонди, більш прийнятно використовують хлорид тетраметиламонію (TMAC) замість SSC. Див. Ausubel, вище.

Далі винахід стосується нуклеїнових кислот, які кодують IL-18BP відповідно до цього винаходу, але які відрізняються за послідовністю кодону внаслідок виродженості генетичного коду. Винахід також стосується таких ДНК, які, можливо, не гібридизуються за жорстких умов з послідовностями ДНК, наведеними на Фігурах 4 до 7, але, проте, кодують IL-18BP відповідно до цього винаходу.

Термін "гібридний білок" стосується поліпептиду, що містить IL-18BP або вірусний IL-18BP, або їх мутеїни, злиті з іншим білком, який, наприклад має тривалий час циркуляції в рідинах організму. Таким чином, IL-18BP або вірусний IL-18BP

можуть бути злиті з іншим білком або поліпептидом тощо, наприклад імуноглобуліном або його фрагментом. Він також може бути злитий з поліетиленгліколем (PEG) для пролонгування часу циркуляції.

Термін "солі", що використовується в описі, стосується як солей карбоксильних груп, так і солей приєднання кислот аміногруп IL-18BP, вірусного IL-18BP, мутеїнів або їх рекомбінантних білків. Солі карбоксильної групи, утворені у способі, відомі у цій галузі, включають неорганічні солі; наприклад солі натрію, кальцію, амонію, заліза або цинку тощо, та солі, утворені з органічними основами, наприклад амінами, такими як триетиламін, аргінін або лізин, піперидин, новокаїн і подібні. Солі приєднання кислот включають, наприклад солі мінеральних кислот такі як, наприклад хлористоводнева кислота або фосфорна кислота, і солі органічних кислот такі як, наприклад оцтова кислота або щавлева кислота. Звичайно, будь-які такі солі повинні мати активність, подібну до IL-18BP.

Термін "функціональні похідні", що вживається в описі, означає похідні IL-18BP або вірусного IL-18BP та їх мутеїнів і рекомбінантних білків, які одержують, наприклад з функціональних груп, існуючих у вигляді бокових ланцюгів на залишках або N- або C-кінцевих групах, згідно з методиками, відомими в даній галузі, та їх включають у винахід, оскільки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто вони не руйнують активність білка, яка по суті подібна до активності IL-18BP або вірусного IL-18BP, і не надають токсичних властивостей композиціям, що їх містять. Ці похідні включають в себе, наприклад бокові ланцюги поліетиленгліколю, які маскують антигенні ділянки та подовжують перебування IL-18BP або вірусного IL-18BP в біологічних рідинах. Інші похідні включають аліфатичні ефіри карбоксильних груп, амідні карбоксильних груп шляхом реакції з аміаком або з первинними чи вторинними амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп залишків амінокислот, утворених з ацильними компонентами (наприклад, алканойльними або карбоциклічними ароїльними групами), або O-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, груп залишків серину і треоніну), сформованих з ацильними компонентами.

В якості "активних фракцій" IL-18BP або вірусного IL-18BP, мутеїнів або рекомбінантних білків в даному винаході розглядають будь-який фрагмент або попередники поліпептидного ланцюга білкової молекули одних або разом з асоційованими молекулами або зв'язаними з ними залишками, наприклад залишками цукру або фосфату, або агрегатами білкової молекули, або самими залишками цукру за умови, що названа фракція по суті зберігає здатність зв'язувати IL-18.

Термін "перетворені через циклізування похідні", що використовується в описі, стосується лінійної молекули, кінці якої з'єднують разом або без посередньо, або через лінкер, щоб утворити кільцеву молекулу, а потім кільцеву молекулу розкривають в іншій ділянці, щоб утворити нову лінійну молекулу з кінцями, що відрізняються від кінців вихідної молекули. Перетворення через циклізування включає ті молекули, структура яких еквівалентна молекулі, яку циклізують, а потім відкрива-

ють. Так, перетворена циклізуванням молекула синтезується *de novo* як лінійна молекула, і ніколи не проходить через стадію утворення кільця і стадію розкриття. Одержання перетворених через циклізування похідних описують в міжнародній заявці WO 95/27732.

Різні рекомбінантні клітини такі як прокаріотичні клітини, наприклад, *E. coli*, або еукаріотичні клітини, такі як дріжджі або клітини комах, продукують IL-18BP або вірусні IL-18BP. Способи конструювання підхожих векторів, що несуть ДНК, які кодують IL-18BP, та прийнятні для трансформування (наприклад, *E. coli*, клітини ссавців та клітини дріжджів) або інфікування клітин комах для того, щоб продукувати рекомбінантні IL-18BP або вірусний IL-18BP, добре відомі у цій галузі. Див. наприклад, [Ausubel et al., eds. "Current Protocols, 1993; та Sambrook et al., eds. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, 1989].

Для експресії IL-18BP білків або вірусних IL-18BP, ДНК, що кодують IL-18BP або вірусний IL-18BP, їх фрагменти, мутеїни або рекомбінантні білки, і оперативно приєднані регуляторні фактори транскрипції і трансляції, включають у вектори, що здатні інтегрувати необхідні генні послідовності в хромосоми клітини-хазяїна. Щоб вибрати клітини, які стабільно інтегрують введену в їх хромосоми ДНК, використовують один чи більше маркерів, що передбачаються відбір клітин-хазяїв, що містять експресуючий вектор. Маркер забезпечує прототрофію ауксотрофному хазяїну, біоцидну резистентність до важких металів, таких як мідь і подібні. Селектований ген-маркер або безпосередньо зв'язують з ДНК послідовності гена, щоб експресувати, або вводять в ту саму клітину шляхом ко-трансфекції. Додаткові елементи також необхідні для оптимального синтезу мРНК одноланцюжкового зв'язувального білка. Ці елементи включають фактори сплайсинга, а також промотори транскрипції, енхансери і сигнали термінації.

Названу молекулу ДНК, щоб ввести в клітини вибору, більш прийнятно включають в плазмідний або вірусний вектор, здатний до автономної реплікації в реципієнті-хазяїні. Більш прийнятні прокаріотичні плазміди є похідними pBR322. Більш прийнятні еукаріотичні вектори включають в себе BPV (вірус папіломи великої рогатої худоби). Вірус вісповакцини, SV40, 2-мікронний кільцевий вірус, тощо та їх похідні. Такі плазміди і вектори добре відомі у цій галузі (2-5, 22). Якщо вектор або послідовність ДНК, що містить конструкцію, одержують для експресії, експресуючий вектор вводять у відповідну клітину-хазяїна за допомогою будь-якого з численних прийнятних способів, таких як трансформація, трансфекція, ліпофекція, кон'югування, протопластне злиття, електропорація, осадження фосфатом кальцію, пряма мікроін'єкція тощо.

Використовувані в цьому винаході клітини-хазяїни є або прокаріотичними, або еукаріотичними. Більш прийнятні прокаріотичні хазяїни включають в себе бактерії такі як *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* тощо. Найбільш прийнятні прокаріотичні хазяїни являють собою *E. coli*. Особливо цікаві бактеріаль-

ні хазяїни включають штам 294 *E. coli* K12 (ATCC 31446), *E. coli* X1776 (ATCC 3157), *E. coli* W3110 (F<sup>-</sup>, лямбда, фототрофні (ATCC 27325)). За таких умов білок не глікозилюється. Прокаріотичний хазяїн повинен бути сумісним з репліконом і контрольними послідовностями в експресуючій плазміді.

Однак оскільки природні IL-18BP є глікозилюваними білками, еукаріотичні хазяїни є більш прийнятними порівняно з прокаріотичними. Більш прийнятні еукаріотичні хазяїни являють собою клітини ссавців, наприклад людини, мавпи, миші і клітини яєчників китайського хом'яка (CHO), оскільки вони забезпечують пост-трансляційні модифікації білковим молекулам, які включають правильну укладку, правильне утворення дисульфідних зв'язків, а також глікозилювання в правильних сайтах. Клітини дріжджів і клітини комах також виконують пост-трансляційні модифікації пептидів, включаючи високоманозне глікозилювання.

Існує ряд технологій рекомбінантних ДНК, які утилізують послідовності сильних промоторів та високе число копій плазмід, котрі використовують для продукції потрібних білків у клітинах дріжджів і клітинах комах. Клітини дріжджів і комах розпізнають лідерні послідовності на клонованих генних продуктах ссавців і вибирають зрілий IL-18BP. Після введення вектора, клітини-хазяїни вирощують на селективному середовищі, яке вибирають для вирощування клітин, що містять вектор. Експресія клонованої генної послідовності(ей) приводить до продукції IL-18BP, вірусного IL-18BP, рекомбінантних білків або їх мутеїнів чи фрагментів. Зазначені способи клонування, виділення клону, ідентифікації, характеристики і секвенування описують більш докладно далі в Прикладах.

Експресовані білки потім виділяють і очищають за допомогою будь-яких узвичаєних методик, включаючи екстракцію, осадження, хроматографію, електрофорез чи подібне, або за допомогою афінної хроматографії, використовуючи, наприклад анти-IL-18BP моноклональні антитіла, імобілізовані на гелевому матриксі, приміщеному в колонку. Неочищені препарати, що містять названий рекомбінантний IL-18BP, пропускають через колонку, де IL-18BP зв'язується на колонці специфічними антитілами, тоді як домішки проходять. Після промивання, білок елюють з гелю за умов, які звичайно застосовуються з цією метою, тобто при високому або низькому рН, наприклад рН 11 або рН 2.

Крім того, винахід стосується векторів, які корисні для експресії IL-18BP або вірусного IL-18BP, або їх похідних у ссавців, а точніше у людей. Вектори для короткочасної і довгочасної експресії генів у ссавців добре відомі по літературі. Дослідження показують, що доставка гена до, наприклад, скелетного м'язу, гладкого м'язу судин і печінки приводить в результаті до системних рівнів терапевтичних білків. Скелетний м'яз є зручною мішенню через її велику масу, кровопостачання і доступність. Однак успішно використовують і інші мішені і, зокрема кістковомозкові попередники імунних клітин. Зараз доступні вектори для експресії білків, наприклад в м'язі, включають плазмідну ДНК, ліпосоми, кон'югати білок-ДНК і вектори, на основі аденовірусу, аденоасоційованого вірусу і

вірусу герпесу. З них вектори на основі аденоасоційованого вірусу (AAV) виявляються найбільш ефективними щодо тривалості і рівнів експресії гена і у відношенні безпеки [Kessel, P. D. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14082-14087].

Способи конструювання вектора на основі AAV докладно описують [Snyder et al., 1996, Current Protocols in Human Genetics, Chapters 12.1.1-12.1.17, John Wiley & Sons] і цитують в цьому патенті. Коротко, плазмиду psub201, що містить геном AAV дикого типу розрізають ферментом рестрикції Xba I та зшивають з конструцією, яка складається з ефективного еукаріотичного промотору, наприклад цитомегаловірусного промотору, Kozak погодженої послідовності, послідовності ДНК, що кодує IL-18BP або вірусний IL-18BP, або їх мутеїни, або рекомбінантні білки, чи їх фрагменти, відповідної 3' нетрансльованої області і сигналу поліаденілювання, наприклад сигналу поліаденілювання вірусу мавпи 40. Одержану рекомбінантну плазмиду ко-трансфікують з хелпер AAV-плазмидою, наприклад rAAV/Ad, в клітини ссавців, наприклад T2 93 клітини. Потім культури інфікують аденовірусом в якості хелпер-вірусу, а культуральні супернатанти збирають через 48-60 годин. Супернатанти фракціонують осадженням сульфатом амонію, очищають в градієнті щільності CsCl, діалізують, а потім нагрівають при 56°C, щоб знищити будь-який аденовірус, в той час як одержаний рекомбінантний AAV, здатний експресувати IL-18BP або вірусний IL-18BP, або їх мутеїни або рекомбінантні білки, залишається стабільним на цій стадії.

Досі не встановлено фізіологічну роль розчинних рецепторів цитокінів. Розчинні рецептори зв'язують свої специфічні ліганди і в більшості випадків інгібують їх біологічну активність, як показано на системі TNF (фактор некрозу пухлини) (11, 12). В дуже нечисленних випадках, наприклад IL-6, розчинний рецептор збільшує біологічну активність. Показано, що рекомбінантний розчинний рецептор TNF, також відомий як TBP (TNF-зв'язувальний білок), запобігає септичному шоку на моделях тварин, тоді як виявлено, що розчинні форми рецептора IL-1 справляють повне інгібування розвитку *in vivo* алогенної реактивності у мишей-реципієнтів алотрансплантату.

Аналогічно виявлено, що IL-18BP і вірусний IL-18BP даного винаходу використовують в якості модуляторів активності IL-18, наприклад при діабеті типу I, сепсисі, аутоімунних захворюваннях, при відторгненні трансплантату, ревматоїдному артриті, запальному захворюванні кишечника, сепсисі, хронічному гепатиті, псоріазі, хронічному гепатиті та гострому гепатиті. Таким чином, їх можна застосовувати, наприклад при будь-якому захворюванні, при якому ендогенна продукція або екзогенне введення IL-18 викликають захворювання або погіршення стану пацієнта.

Крім того, даний винахід стосується фармацевтичних композицій, які містять фармакологічно прийнятний носій та IL-18BP або вірусний IL-18BP винаходу, або їх активні мутеїни, рекомбінантні білки і їх солі, функціональні похідні або їх активні фракції.

Далі даний винахід стосується фармацевтич-

них композицій, які містять фармацевтично прийнятний носій і, наприклад вірусний вектор, такий як будь-який один з названих вірусних векторів на основі AAV або інший вектор, які експресують IL-18BP або вірусний IL-18BP чи їх мутеїни, фрагменти або їх рекомбінантні білки і є прийнятними для введення людям та іншим ссавцям з метою досягнення експресії *in vivo* IL-18BP або вірусного IL-18BP або їх мутеїнів чи фрагментів або рекомбінантних білків винаходу, тобто для застосування в генній терапії.

Фармацевтичні композиції винаходу готують для введення змішуванням IL-18BP або вірусного IL-18BP або їх похідних, або векторів, їх експресуючих, з фізіологічними прийнятними носіями і/або стабілізаторами і/або наповнювачами, та готують в дозованій формі, наприклад ліофілізацією в дозованих ампулах. Спосіб введення являє собою будь-який з прийнятих способів введення для подібних агентів і залежить від стану, який лікують, наприклад внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно, шляхом локальної ін'єкції або місцевої аплікації, або безперервно шляхом вливань і так далі. Кількість активної сполуки, яку вводять, залежить від способу введення, захворювання, що лікують, і стану пацієнта. Для локальної ін'єкції, наприклад вимагається більш низька кількість білка на вагу тіла, ніж при внутрішньовенному вливанні.

Відповідно, IL-18BP або вірусні IL-18BP, або вектори, які експресують їх *in vivo*, показані для лікування аутоімунних захворювань, діабету I типу, ревматоїдного артрити, відторгнення трансплантата, запального захворювання кишечника, сепсису, розсіяного склерозу, ішемічної хвороби серця, включаючи гострий серцевий напад, ішемічного ураження мозку, хронічного гепатиту, псоріазу, хронічного і гострого панкреатиту та подібних захворювань, при яких є аберантна експресія IL-18, що веде до надлишку IL-18, або у випадках ускладнень, зумовлених екзогенним введенням IL-18.

Винахід також включає антитіла проти IL-18BP або вірусного IL-18BP, а також проти їх мутеїнів, рекомбінантних білків, солей, функціональних похідних і активних фракцій. Термін "антитіло" означає включення поліклональних антитіл, моноклональних антитіл (MAT), химерних антитіл, ангідіотипових (анти-Id) антитіл до антитіл, які містять в розчинній або зв'язаній формі, і гуманізовані антитіла, а також їх фрагменти, забезпечені за допомогою будь-яких відомих методів, таких як, але не обмежених ними, ферментативне розщеплення, пептидний синтез або рекомбінантні технології.

Поліклональні антитіла являють собою гетерогенні популяції молекул антитіл, одержаних з сироватки тварин, імунізованих антигеном. Моноклональні антитіла містять по суті гомогенну популяцію антитіл, специфічних до антигенів, до яких популяція містить в основному однакові епітоп-зв'язувальні ділянки. MAT одержують у способі, відомі фахівцям у цій галузі. Див. наприклад, [Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Патент США №4376110; Ausubel et al., eds., supra, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); i Colligan et

al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N. Y., (1992, 1993)], вміст яких наводять в повному обсязі шляхом цитування. Такі антитіла можуть належати до будь-якого класу імуноглобулінів, включаючи IgG, IgM, IgE, IgA, GILD і будь-яких їх підкласів. Гібридом, що продукує МАТ даного винаходу, культивують *in vitro*, *in situ* або *in vivo*. Продукція високих титрів МАТ *in vivo* або *in situ* робить це зараз більш прийнятним способом одержання.

Химерні антитіла являють собою молекули, різні частини яких одержують від різних видів тварин, такі як молекули, що мають варіабельну область, одержану від МАТ миші, і констатну область імуноглобуліну людини. Химерні антитіла використовують головним чином для відновлення імуногенності при застосуванні і для збільшення виходу при продукції, наприклад, коли МАТ миші мають більш високий вихід з гібридом, але більш висока імуногенність у людей, так що застосовують химерні МАТ людина-миша. Химерні антитіла і способи їх одержання відомі у цій галузі. [Cabilly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984); Boulianne et al., Nature 312: 643-646 (1984); Cabilly et al., Заявка на Європейський Патент 125023 (опублікована 14 листопада, 1984); Neuberger et al., Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al., Заявка на Європейський Патент 171496 (опублікована 19 лютого, 1985); Morrison et al., Заявка на Європейський Патент 173494 (опублікована 5 березня, 1986); Neuberger et al., РСТ міжнародна Заявка WO 8601533, (опублікована 13 березня, 1986); Kudo et al., Заявка на Європейський Патент 184187 (опублікована 11 червня, 1986); Morrison et al., Заявка на Європейський Патент 173494 (опублікована 5 березня, 1986); Sahagan et al., J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al., Міжнародна Заявка WO 9702671 (опублікована 7 травня 1987); Lie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218 (1987); Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988); і Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, supra]. Ці посилання вводять в опис в повному обсязі шляхом цитування.

Антиідіотипове (анти-Id) антитіло є антитілом, що розпізнає унікальні детермінанти, звичайно асоційовані з антиген-зв'язувальним сайтом антитіла. Id-антитіло одержують імунізацією тварини того ж виду і генетичного типу (наприклад, лінія мишей) в якості джерела МАТ з МАТ, до якого анти-Id одержаний. Імунізована тварина розпізнає і відповідає на ідіотипові детермінанти імунізуючого антитіла шляхом продукування антитіл до цих ідіотипових детермінантів (анти-Id-антитіло). Див., наприклад, Патент США №4699880, який наводять в описі шляхом цитування.

Анти-Id-антитіло також використовують в якості "імуногену", щоб викликати імунну відповідь у ще іншої тварини, що продукує так зване анти-анти-Id-антитіло. Анти-анти-Id є ідентичним за епітопом до вихідного МАТ, що індукую анти-Id. Таким чином, шляхом використання антитіл до ідіотипових детермінантів МАТ можливо ідентифікувати інші клони, які експресують антитіла ідентичної специфіч-

ності.

Відповідно, МАТ одержані проти IL-18BP і споріднених білків даного винаходу, використовують, щоб індукувати анти-М-антитіла у відповідних тварин таких як BALB/c миші. Клітини селезінки від таких імунізованих мишей застосовують для одержання анти-Id гібридом, що секретують анти-Id МАТ. До того ж, анти-Id МАТ зв'язують з носієм таким гемоціанін лімфи слимака (KLH) і застосовують для імунізації додаткових BALB/c мишей. Сироватка від цих мишей містить анти-анти-Id антитіла, які мають зв'язувальні властивості вихідного МАТ специфічного відносно епітопу IL-18BP або епітопів вірусного IL-18BP.

Анти-Id МАТ, таким чином, мають власні ідіотипові епітопи або "ідіотопи" структурно подібні до оцінюваного епітопу, такому як IL-18BP або вірусний IL-18BP.

Термін "гуманізоване антитіло" означає включення, наприклад антитіл, які одержують маніпулюванням з антитілами миші за допомогою способів генетичної інженерії для того, щоб вони виявилися більш сумісними з організмом людини. Такі гуманізовані антитіла характеризуються зниженою імуногенністю і покращеною фармакокінетикою у людей. Їх одержують за допомогою технологій, відомих у цій галузі, таких як описують, наприклад для гуманізованих анти-TNF антитіл в [Molecular Immunology, Vol. 30, N 16, 1443-1453, 1993].

Термін "антитіло" також означає включення обох інтактних молекул, а також їх фрагментів таких як, наприклад Fab і F(ab')<sub>2</sub>, що зв'язують антиген. Фрагменти Fab і F(ab')<sub>2</sub>, без фрагмента Fc інтактного антитіла, швидше вилучаються з циркуляції і характеризуються меншим неспецифічним тканинним зв'язуванням, ніж інтактне антитіло [Wahl et al., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)]. Слід оцінити, що Fab і F(ab')<sub>2</sub> та інші фрагменти антитіл, корисні в даному винаході, використовують для визначення і кількісної оцінки IL-18BP або вірусного IL-18BP, згідно з способами, наведеними в описі для інтактних молекул антитіл. Такі фрагменти звичайно одержують шляхом протеолітичного розщеплення, використовуючи ферменти такі як папаїн (для одержання фрагментів Fab) або пепсин (для одержання фрагментів F(ab')<sub>2</sub>).

Як зазначено, антитіло є "здатним зв'язувати" молекулу, якщо воно здатне специфічно взаємодіяти з молекулою, щоб внаслідок цього зв'язати молекулу з антитілом. Термін "епітоп" означає, що частина будь-якої молекули здатна бути зв'язаною антитілом, яка також розпізнається таким антитілом. Епітопи або "антигенні детермінанти" звичайно складаються з хімічно активних поверхневих груп молекул таких як амінокислоти або бокові ланцюги цукрів, і мають особливі характеристики тривимірної структури, а також певні характеристики заряду.

"Антиген" являє собою молекулу або частину молекули, здатну бути зв'язаною антитілом, яке додатково індукую тварину до продукції антитіла, здатного зв'язувати епітоп такого антигену. Антиген може мати один чи більше епітопів. Зазначена специфічна реакція призначена, щоб вказати, що антиген взаємодіє у високо вибірний спосіб з йому

відповідним антитілом і не взаємодіє з множиною інших антитіл, які викликаються іншими антигенами.

Антитіла, включаючи фрагменти антитіл, корисні в даному винаході, використовують для кількісного і якісного визначення IL-18BP або вірусного IL-18BP або споріднених білків у зразку або для визначення присутності в клітинах, що експресують такі білки даного винаходу. Це здійснюють імунофлуоресцентними методами, що застосовують флуоресцентно мічені антитіла (див. нижче), в поєднанні з світловою мікроскопією, проточною цитометрією і флуориметричним визначенням.

Антитіла (або їх фрагменти), корисні в даному винаході, застосовують гістологічно для імунофлуоресцентної та імуноелектронної мікроскопії, для визначення *in situ* IL-18BP або вірусного IL-18BP або споріднених білків даного винаходу. Визначення *in situ* включає взяття гістологічного зразка у пацієнта і забезпечення такого зразка міченим антитілом даного винаходу. Більш прийнятно антитілом забезпечують нанесенням або приєднанням міченого антитіла (або фрагменту) до біологічного зразка. Застосування такого способу зробило можливим визначення не тільки присутності IL-18BP або вірусного IL-18BP або споріднених білків, але також визначення його розподілу в досліджуваній тканині. Застосовуючи спосіб даного винаходу кожен з фахівців у цій галузі швидко помітить, що будь-який з великої різноманітності гістологічних методів (таких як процедури забарвлення) можна модифікувати для проведення подібного визначення *in situ*.

Такий аналіз для IL-18BP або вірусного IL-18BP або споріднених білків даного винаходу звичайно включає в себе інкубацію біологічного зразка такого як біологічна рідина, екстракт тканини, свіжоодржані клітини такі як лімфоцити або лейкоцити або клітини, які інкубують в культурі тканини, в присутності ефективно міченого антитіла, здатного ідентифікувати IL-18BP або споріднені білки, і визначення антитіла за допомогою будь-якої з ряду технологій, добре відомих у цій галузі.

Біологічний зразок обробляють твердофазною підкладкою або носієм таким як нітроцелюлоза або твердою підкладкою або носієм, які іммобілізують клітини, клітинні частинки або розчинні білки. Підкладку або носій потім промивають відповідним буфером з подальшою обробкою ефективно міченим антитілом відповідно до цього винаходу. Твердофазну підкладку або носій потім промивають буфером другий раз, щоб вилучити незв'язані антитіла. Кількість зв'язаної мітки на твердій підкладці або носії визначають узвичаєними методами.

Терміни "твердофазна підкладка", "твердофазний носій", "тверда підкладка", "твердий носій", "підкладка" або "носій" означають будь-яку підкладку або носій, здатні зв'язувати антиген або антитіла. Добре відомі підкладки або носії включають скло, полістирол, поліпропілен, поліетилен, декстран, найлон амілази, природні і модифіковані целюлози, поліакриламід, габро і магнетид. Для цілей даного винаходу, носій може бути розчинним деякою мірою або нерозчинним. Матеріал підкладки має будь-яку можливу структурну конфігурацію такої довжини, що сполучена молекула здатна

зв'язувати антиген або антитіло. Так, конфігурація підкладки або носія є сферичною як шарик, або циліндричною як внутрішня поверхня дослідної пробірки, або як зовнішня поверхня стрижня. Альтернативно, поверхня є плоскою як аркуш, тест-смужка тощо. Більш прийнятні підкладки і носії включають гранули полістиролу. Фахівцям в цій галузі відомі численні інші носії для зв'язування антитіла або антигену, або вони зможуть встановити те ж саме шляхом звичайного експериментування.

Зв'язувальну активність даної партії антитіл відповідно до цього винаходу визначають згідно з добре відомими способами. Фахівці у цій галузі встановлюють ефективні і оптимальні умови дослідження для кожного визначення шляхом звичайного експериментування.

Інші стадії, такі як промивання, перемішування, струшування, фільтрування і таке інше додають до дослідження, коли необхідно в певній ситуації.

Одним з способів, у який відповідно до цього винаходу антитіло ефективно мітять, є зв'язування антитіла з ферментом і застосування в імуноферментному аналізі (EIA). Цей фермент, в свою чергу, при експозиції з відповідним субстратом, взаємодіє з субстратом з утворенням хімічного компонента, який визначають, наприклад за допомогою спектрофотометричного, флуориметричного або візуального способів. Ферменти, які використовують для ефективного мічення антитіл, включають, але не обмежуються, малатдегідрогеназу, стафілококову нуклеазу, дельта-5-стероїд-ізомераза, алкогольдегідрогеназу, альфа-глицерофосфатдегідрогеназу, триозофосфатізомераза, пероксидазу хрому, лужну фосфатазу, аспарагіназу, піранозоксидазу, бета-галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназу, глюкоамілазу і ацетилхолінеестеразу. Визначення здійснюють колориметричними методами, в яких застосовують хромогенний субстрат для ферменту. Визначення також проводять шляхом візуального порівняння міри ензиматичної реакції субстрату порівняно з аналогічно приготованими стандартами.

Визначення виконують, використовуючи будь-який з цілого ряду інших імунологічних аналізів. Наприклад, радіоактивним міченням антитіл або фрагментів антитіл, визначають IL-18BP або вірусний IL-18BP шляхом застосування радіоімунного аналізу (RIA). Гарний опис RIA є в [Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, by Work, T. S. et al., North Holland Publishing Company, NY (1978) з особливим посиланням на главу, що має назву "An Introduction to Radioimmuno Assay and Related Techniques" by Chard, T.], введени до опису цитуванням. Радіоактивний ізотоп визначають за допомогою таких засобів як застосування гамма-лічильника або сцинтиляційного лічильника або шляхом авторадіографії.

Відповідно до цього винаходу антитіло мітять флуоресцентною сполукою. Коли флуоресцентно мічене антитіло піддають дії світла, належної довжини хвилі, його присутність визначають за флуоресценцією. Звичайно найбільш використовувани-

ми сполуками для флуоресцентного мічення є флуоресцеїн ізотіоціанат, родамін, фікоеритрин, фікоціанін, алофікоціанін, о-фталевий альдегід та флуорескамін.

Антитіла також ефективно мітять, використовуючи метали, що емітують флуоресценцію, такі як  $^{152}\text{Eu}$  або інші з серії лантанидів. Ці метали приєднують до антитіла, використовуючи такі метал-хелатуючі групи як діетилентриамінпентаоцтова кислота (ЕТРА).

Антитіло ефективно мітять зв'язуванням його з біотином. Біотинізоване антитіло потім визначають за допомогою авідину або стрептавідину, приєднаних до флуоресцентної сполуки або ферменту, такого як пероксидаза, або до радіоактивного ізотопу і подібних.

Також антитіло ефективно мітять, приєднуючи його до хемілюмінесцентної сполуки. Присутність хемілюмінесцентного антитіла потім визначають, детектуючи люмінесценцію, що виникає в ході хімічної реакції. Прикладами особливо корисних люмінесцентно мічених сполук є лумінол, ізолумінол, тероматичний ефір акридину, імідазол, сіль акридину і ефір щавлевої кислоти.

Подібним чином, біоломінесцентну сполуку використовують для мічення антитіла даного винаходу. Біоломінесценція являє собою вид хемілюмінесценції, виявленої в біологічних системах, в яких каталітичний білок збільшує ефективність хемілюмінесцентної реакції. Присутність біоломінесцентного білка визначають за наявністю люмінесценції. Для мічення важливими біоломінесцентними сполуками є люциферин, люцифераза і екворин.

Молекулу антитіла даного винаходу адаптують для застосування в кількісному імуноаналізі, також відомому як "два-сайти" або "сендвіч-аналіз". В типовому кількісному імуноаналізі велика кількість немічених антитіл (або фрагменту антитіла) зв'язують з твердою підкладкою або носієм і додають ефективно мічені розчинні антитіла, щоб зробити можливим виявлення і/або кількісний аналіз потрійного комплексу, утвореного між твердофазним антитілом, антигеном і міченим антитілом.

Типовий і більш прийнятний кількісний імуноаналіз включає "прямий" аналіз, в якому антитіло, зв'язане з твердою фазою, спочатку контактує з тестованим зразком, щоб витягти антиген з зразка шляхом утворення подвійного комплексу твердофазне антитіло-антиген. Після відповідного періоду інкубації тверду підкладку або носій промивають для вилучення залишків рідкого зразка, включаючи антиген, що не прореагував, якщо це взагалі вимагається, а потім здійснюють контакт з розчином, що містить невідому кількість мічених антитіл (що функціонує як "репортерна група"). Після другого періоду інкубації, протягом якого мічене антитіло утворює комплекс з антигеном, зв'язаним з твердою підкладкою або носієм за допомогою неміченого антитіла, тверду підкладку або носій промивають другий раз для вилучення мічених антитіл, що не прореагували.

В іншому типі імуноаналізу - "сендвіч-аналізі", який успішно проводять з антигеном даного винаходу, використовують так звані "одночасний" і "зворотний" аналіз. "Одночасний" аналіз включає в

себе одну стадію інкубації, коли антитіло, зв'язане з твердою підкладкою або носієм, і мічене антитіло - обидва додають до тестованого зразка водночас. По завершенні інкубації, тверду підкладку і носій промивають для вилучення залишку рідкого зразка і міченого антитіла, не включеного до комплексу. Присутність міченого антитіла, асоційованого з твердою підкладкою або носієм, визначають за допомогою узвичаєного "прямого" сендвіч-аналізу.

У "зворотному" аналізі використовують ступінчасте додання спочатку розчину міченого антитіла до рідкого зразка, за яким йде додання неміченого антитіла, зв'язаного з твердою підкладкою або носієм, після відповідного періоду інкубації. Після другої інкубації тверду фазу промивають узвичаєним способом для вилучення залишку досліджуваного зразка розчину міченого антитіла, що не прореагувало. Визначення міченого антитіла, зв'язаного з твердою підкладкою або носієм, здійснюють як у випадку "одночасного" і "прямого" аналізів.

Даний винахід також передбачає молекули ДНК, які кодують будь-які з білків даного винаходу, що описані вище, репліковувані носії експресії, що містять будь-які такі молекули ДНК, клітини-хазяїни, трансформовані будь-яким таким експресуючим носієм, включаючи прокариотичні і еукаріотичні клітини-хазяїни, більш прийнятно клітини СНО. Винахід також включає в себе спосіб для продукції експресуючих векторів, що кодують будь-який з білків даного винаходу, з метою їх експресії у людей та інших ссавців.

У винахід також включають спосіб одержання будь-якого з білків даного винаходу шляхом культивування трансформованої клітини відповідно до цього винаходу і повернення білка, кодованого молекулою ДНК, і експресуючого носія в таку трансформовану клітину-хазяїна.

Окрім використання IL-18BP або вірусного IL-18BP для модулювання активності IL-18, їх також застосовують для очистки самого IL-18. З цією метою IL-18BP або вірусний IL-18BP зв'язують з афінною колонкою і пропускають неочищений IL-18. Потім IL-18 витягають з колонки шляхом, наприклад елюції при низькому рН.

Далі винахід ілюструють наведеними нижче необмежувальними прикладами:

#### Приклад 1

Виділення білка, що зв'язує IL-18

IL-18 *E. coli* (2,5мг, Peprotech, NJ) приєднують до Affigel-10 (0,5мл, BioRad), згідно з інструкціями виробника, і упаковують в колонку. Неочищений білок сечі (сконцентрованої в 1000 разів, 500мл) наносять на колонку при низькій швидкості 0,25мл/хвилину. Колонку промивають 250мл 0,5M NaCl в фосфатному буферному розчині (PBS). Зв'язані білки потім елюють 25мМ лимонної кислоти рН 2,2 і бензамідином (1мМ), негайно нейтралізують 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Збирають фракції по 1мл. Фракції аналізують за допомогою SDS-PAGE і забарвлення сріблом. Білок, що зв'язує IL-18, елюється в фракціях 2-8 у вигляді білка 40000 Дальтон (Фіг.1). В зоні 40кДа, що відповідає IL-18BP, при забарвленні сріблом виявляється чіткий жовтий колір. Аналізують різні фракції шляхом поперечного зв'язування з  $^{125}\text{I}$ -IL-18, SDS-PAGE і авторадіо-

блокувати всі N-кінцеві поліпептиди інші, ніж Pro. У цей спосіб одержують лише основну послідовність, як таке:

TPVSEQXXKAA XASVRSTKDP CPSQPPVFPA AKQCOALEVT  
10 20 30 40  
(T=Thr; P=Pro; V=Val; S=Ser; Q=Gln; X=не восстановлено,  
a; R=Arg; K=Lys; D=Asp; C=Cys; F=Phe; L=Leu; E=Glu)

В циклах 6, 7, 8 і 11 одержують низький рівень сигналу Thr. Через цей низький рівень його розглядають більш обережно, щоб не позначити даний амінокислотний залишок в названих циклах.

Одержана послідовність значно відрізняється від послідовності будь-якого іншого відомого білка, що встановлено дослідженням баз даних за структурою білка. Однак дослідження бази даних TIGR за допомогою tblastn програми дослідження забезпечило файл кДНК, позначений TNC12801, відкрита рамка читування (218 кодон) якого, коли транслюється, містить послідовність високо гомологічну N-кінцевій послідовності IL-18BP. Цим подана гомологія:

1 .....TPVSQXXXAAXASVRSTKDCPSQPVPFAAKQCPALEVT... 40  
| | | | |  
51 VTLIVRATXVXTTAAATASVRSTKDCPSQPPVFPAAKQCPELVTFWE 100

(Верхня послідовність (1-40) являє собою послідовність IL-18BP, виділеного згідно з винаходом; нижня послідовність (51-100) одержана трансляцією кДНК з файлу TNC123801 TIGR).

Гадана білкова послідовність, одержана транслюванням файлу THC12801, викликає сумніви щодо залишків 2 і 4 IL-18BP. Вона підтверджує ідентичність амінокислотних залишків 6, 7 і 8 IL-18BP як Thr і, по-видимому, підходить також для залишку 11.

### Приклад 4

IL-18BP є глікопротеїном

Аліквоту (0,3мл) елюйованих фракцій Прикладу 1 очищають далі гель-хроматографією на колонці Superose 12 (1×30см, Pharmacia, Sweden). Колонку попередньо врівноважують і елюють фосфатним буферним розчином і азидом натрію (0,02%) при швидкості потоку 0,5мл/хвилину і збирають фракції по 1мл. Білок, що зв'язує IL-18, елюється в фракціях 20-25 як білок ~40000 Дальтон, що встановлюють методом SDS-PAGE і забарвленням сріблом. Зразок, що містить білок ~40000 Дальтон (фракція 23, 50мкл, 50нг білка) взаємодіє з N-глікозидазою F (PNG-ase F, BioRad) згідно з інструкцією. Коротко, аліквоту денатурують кип'ятінням в присутності 5% SDS протягом 10 хвилин, 10×07 буферу (2,5мкл), 10% NP-40 (2,5мкл) і PNGase F (1мкл), 1 година при 37°C. Зразок аналізують методом SDS-PAGE (10% акриламід) за невідновлювальних умов і порівнюють з негідролізованим IL-18BP з такої ж фракції з Superose 12. Показано, що зона 40кДа IL-18BP зникає з фракції, обробленої PNGase. Виявляють нові зони, які відповідають 30кДа (навіть вище зони PNGase) і 20кДа. Зникнення зони 40кДа вказує, що ця зона є N-глікозилізованим білком.

### Приклад 5

### Блокування біологічної активності IL-18 за допомогою IL-18BP

Через цю подвійну послідовність неможливо одержати дані відносно більш довгої послідовності. Мінорну послідовність ідентифікують як фрагмент дефенсину людини (№ доступу p11398), починаючи з 65 амінокислоти дефенсину. Основну послідовність не зв'язують з жодним відомим білком, ґрунтуючись на дослідженнях всіх доступних баз даних в NCBI і TIGR за допомогою blastp і tblastn програм дослідження.

Для того, щоб одержати більш довгу і більш точну послідовність і для того, щоб ідентифікувати передбачувані залишки цистеїну, іншу аліквоту фракції, елюйованої з колонки IL-18-агарози, відновлюють DTT в 6М гуанідині HCl, проводять реакцію з 4-вінілпіридином, знесолюють за допомогою мікроультрафільтраційного пристрою (Ultrafree, cutoff 10000 Daltons, Millipore) і проводять визначення первинної структури короткого фрагменту молекули білка. Після циклу №1 секвенування, фільтер взаємодіє з о-фталевим альдегідом, щоб



Здатність IL-18BP, виділеного з сечі, блокувати активність IL-18 визначають шляхом вимірювання індукованої IL-18 продукції IFN- $\gamma$  в моноклеарних клітинах. IL-18 індукує IFN- $\gamma$ , якщо додають разом або з низькими концентраціями LPS, IL-12, IL-2, або з іншими стимуляторами. Активність IL-18 тестують в спленоцитах миші, в моноклеарних клітинах периферійної крові (PBMC) людини і в лінії KG-1 клітин людини. Клітини селезінки одержують від здорових мишей, промивають, суспендують в середовищі RPMI 1640, доповненому 10% фетальною бичачою сироваткою при  $5 \times 10^6$  клітин/мл. 1,0 мл культури стимулюють LPS (або 0,5 або 1 мкг/мл) разом з рекомбінантним IL-18 людини або миші (або 0,5 або 5 нг/мл). IL-18-зв'язувальний білок людини (0/5 або 50 нг/мл) додають до рекомбінантного IL-18 перед доданням до клітин селезінки. Після культивування протягом 24 годин, клітини селезінки піддають трьом циклам заморожування ( $-70^\circ\text{C}$ ) і танення (кімнатна температура), клітинний дебрис вилучають центрифугуванням, а супернатант аналізують щодо IFN- $\gamma$ , використовуючи ELISA-набори для IFN- $\gamma$  миші (Endogen). Як показують на Фіг.3А, IL-18BP блокує активність huIL-18 (людини) в спленоцитах миші у доза-залежний спосіб. На відміну від цього, використовуваний в якості контролю розчинний рецептор інтерферона- $\alpha/\beta$  не справляє ніякої дії. Аналогічно, IL-18BP людини інгібує активність рекомбінантного IL-18 миші, дозволяючи припустити, що IL-18BP людини розпізнає IL-18 миші (Фіг.3В). В спленоцитах миші високі концентрації LPS індукують ендогенний IL-18, приводячи до продукції IFN- $\gamma$ . Дійсно, індукція IFN- $\gamma$  за допомогою LPS також інгібується IL-18BP сечі (Фіг.3С). Конканавалін А (Con A) активує Т-клітини, щоб продукувати IFN- $\gamma$  за відсутності IL-18 (13). Дійсно, індукція IFN- $\gamma$  конканаваліном Ф не інгібується IL-18BP навіть при високих концентраціях (Фіг.3Д). Ці дані демонструють, що IL-18BP є специфічно інгібітором біоактивності IL-18 скоріше, ніж неспецифічним інгібітором продукції IFN- $\gamma$ . IL-18BP також інгібує активність IL-18 людини в KG-1 клітинах людини, індуковану поєднанням IL-18 і TNF- $\alpha$  (Фіг.3Е).

Наведені вище дані демонструють, що IL-18BP сечі інгібує активність IL-18 людини, а також миші, що оцінюють шляхом коіндукції IFN- $\gamma$  в моноклеарних клітинах людини і миші. Концентрація IL-18BP, що знижує активність IL-18 на  $>90\%$ , є порівнянною з концентрацією самого IL-18, дозволяючи припустити високу спорідненість взаємодії між цими двома білками.

#### Приклад 6

Виділення клонів кДНК, що кодують IL-18BP

Тотальна РНК з юркатних Т-клітин (CRL 8163, American Type Culture Collection) зворотно-транскрибована з Superscript Rnase H зворотною транскриптазою (Gibco-BRL) і довільними праймерами (Promega, Madison WI). Потім одержані фрагменти кДНК ампліфікують шляхом PCR, використовуючи Таг-ДНК полімерази (Sigma) і праймери, що відповідають нуклеотидам 24-44 (смысловий) і 500-481 (зворотний) клону THC12801 TIGR. Ампліфікацію проводять в 30 циклах відпалу ( $55^\circ\text{C}$ , 2

хвилини) і елонгації ( $70^\circ\text{C}$ , 1 хвилина). Одержані продукти PCR поділяють методом електрофорезу в агарозному гелі (1%), елюють і клонують з рGEM-Teasy TA вектором клонування (Promega). ДНК з індивідуальних клонів секвенують з T7 і SP6 праймерами.

Одержаний фрагмент 477 пар основ мітять  $^{32}\text{P}$  шляхом рендом-праймування. Цей зонд використовують для скринінга різних кДНК людини і геномних бібліотек. Подвійні нітроцелюлозні фільтри піддають гібридизації з зондом при  $60^\circ\text{C}$  в буфері, що містить 6 x SSC, 10x розчин Денхардта, 0,1% SDS і 100 мкг/мл ДНК сперми лосося. Фільтри промивають і витримують протягом ночі при  $-80^\circ\text{C}$  на плівці Kodak XAR. Подвійні позитивні клони очищують з колоній. Плазмиди вирізаються з лямбда-рCEU9 клонів і плазмиди самолігуються. кДНК з інших бібліотек виділяють згідно з інструкціями авторів. Автоматизований аналіз послідовності ДНК з виділених клонів проводять на секвенаторах моделей 373A і 377 (Applied Biosystems), використовуючи смысловий і антисмысловий праймери. Використовують стандартні протоколи для цих процедур копіювання (33).

Проведено скринінг таких бібліотек: бібліотека кДНК моноцитів людини, сконструйована в лямбда-рCEU9 векторі клонування (15), люб'язно надана Т. Мікі бібліотека кДНК юркатних лейкозних Т-клітин людини, бібліотека кДНК лейкоцитів периферійної крові людини, всі від Clontech (Palo Alto<CA). Геномна бібліотека плаценти людини в лямбда- FIX II векторі одержана від Stratagene (La Jolla, CA).

Одержані і охарактеризовані всі клони кДНК, які відповідають чотирьом різним варіантам сплайсинга IL-18BP. Всі варіанти сплайсинга кодують завбачені розчинні секретовані білки. Найбільш переважний варіант (IL-18BP $\alpha$ ) має відкриту рамку зчитування з 192 кодонів, що кодує сигнальний пептид з 28 амінокислотних залишків з подальшим зрілим гаданим IL-18BP $\alpha$ , перші 40 залишків якого (SEQ ID NO: 10) повністю сумісні з N-кінцевою білковою послідовністю IL-18BP сечі (SEQ ID NO: 2). Положення залишків цистеїну дозволяє припустити, що цей поліпептид належить до суперсімейства імуноглобулінів (Ig). Кожен з чотирьох залишків Gln в зрілому IL-18BP $\alpha$  є можливою ділянкою N-глікозилювання. Інші три варіанти сплайсинга IL-18BP наявні в значно меншій кількості.

Інша кДНК IL-18BP $\beta$  1т.п.н. кодує зрілий білок з 85 амінокислотних залишків (SEQ ID NO: 4). Третій варіант, IL-18BP $\gamma$ , представляється 2,3т.п.н. кДНК, що кодує зрілий IL-18BP з 169 амінокислотних залишків (SEQ ID NO: 6). Четвертий варіант, IL-18BP $\delta$ , кодує зрілий IL-18BP з 133 амінокислотних залишків (SEQ ID NO: 8). Внутрішньоекзонний сплайсинг відбувається у двох сайтах вздовж промРНК. Ці явища і додатковий 5' екзон в IL-18BP $\alpha$  приводять до 3 різних 5' UTRs в різних клонах кДНК. Тому цілком можливо, що різні варіанти IL-18BP утворюються у відповідь на певні сигнали регулювання транскрипції.

Досі не виявлено жодної кДНК, що кодує рецептор з трансмембранним доменом.

#### Приклад 7

Конструкція експресуючого вектора ссавців, продукція реком-бінантного IL-18BP і оцінка біологічних активностей рекомбінантного IL-18BP

Кодуючу область кДНК IL-18BPа ампліфікують шляхом PCR з смисловим праймером

5' TATATCTAGAGCCACCATGAGACACAACCTGGACACCA

та зворотним праймером:

5' ATATCTAGATTAATGATGATGATGATGATGATGACCCCTGCTGCTGGACTGC

Продукти PCR вирізають за допомогою Xba I та клонують в сайт Xba I рEF-BOS експресуючого вектора (25), щоб одержати рEF-BOS-IL-18BPа. Конструкції підтверджують секвенуванням ДНК.

Серії  $6 \times 10^7$  COS7 клітин в 1,4мл TD-буферу, що містить плазмідну ДНК рEF-BOS-IL-18BPа (10мкг) і ДЕАЕ-декстран (120мкг), інкубують протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, як описують (35). Клітини потім промивають DMEM-10% фетальна бичача сироватка, культивують протягом 4 годин в DMEM-10, промивають та інкубують протягом 3-5 днів в безсироватковому середовищі DMEM. Культуральне середовище збирають, концентрують в 6 разів ультрафільтруванням (10 kD cutoff) і виділяють IL-18BP-HiS<sub>6</sub> на колонці Talon (Clontech) з імідазолом в якості елюенту згідно з інструкцією авторів.

Імунологічну перехресну реактивність сечового і COS7-експресованого IL-18BP оцінюють так: IL-18BP сечі (5мкг) мітять <sup>125</sup>I у спосіб з хлораміном Т. Супернатанти COS7 клітин (250мкл) змішують (1 година, кімнатна температура) з антитілами до IL-18BP сечі, розбавляють 1:1000 в забуференому фосфатом розчині (PBS), 0,05% твіні 20 і 0,5% бичачому сироватковому альбуміні (Wash Buffer). Потім додають IL-18BP сечі ( $10^6$  імпульсів на хвилину) і через 1 годину додають білок-G-sepharose (20мкл). Суміш суспендують (1,5 години, 4°C), потім гранули ізолюють і промивають 3х Wash Buffer і раз в PBS. Гранули елюють методом для зразка, поділяють методом SDS-PAGE (10% акриламід) у відновлювальних умовах з подальшою авторадіографією.

IL-18BPа рухається у вигляді однієї зони на SDS-PAGE з забарвленням сріблом за відновлювальних і невідновлювальних умов та має таку ж уявну молекулярну масу, як маса IL-18BP сечі (дані не наведено). При аналізі послідовності білка цього препарату виявляють таку ж N-кінцеву послідовність як послідовність IL-18BP сечі, вказуючи, що останній не деградується на N-кінці.

Імуноблотинговий аналіз IL-18BP з антитілами, одержаними проти IL-18BP сечі, виявляє зону з такою ж молекулярною масою як маса білка сечі. Крім того, використовуючи імунопреципітацію з подальшими SDS-PAGE і авторадіографією, показують, що IL-18BPа здатний витіснити <sup>125</sup>I-IL-18BP сечі з комплексу з антитілами. Тому, IL-18BPа структурно відповідає IL-18BP сечі.

Досліджують здатність неочищеного і очищеного IL-18BPа інгібувати біологічну активність IL-18. IL-18BPа інгібує у доза-залежний спосіб індуквальну IFN- $\gamma$  активність IL-18 людини і миші в спленоцитах миші, PBMC та в лінії KG-1 клітин людини (Fig.9).

Результати різних біодосліджень, а також аналіз зміни рухливості (Приклад 8) показують, що інгібування активності IL-18 є властивістю, притаманною клонованому IL-18BP, а не властивістю супутніх домішок в IL-18BP сечі, таких як фрагмент дефенсину, що ко-елюється.

#### Приклад 8

Аналіз зміни електрофоретичної рухливості

Вивчають вплив сечового і рекомбінантного IL-18BP на індуквану IL-18 активацію NF-kB в KG-1 клітинах людини. KG-1 клітини людини ( $4 \times 10^6$  в 1мл RMPI) стимулюють або huIL-18 (людини) (10нг/мл), або huIL-18, попередньо змішаним з IL-18BP (20 хвилин, кімнатна температура). Після 20 хвилин при 37°C, клітини три рази промивають охолодженим льодом PBS і негайно заморожують в рідкому азоті. Клітинні осадки повторно суспендують в трикратному пакувальному колонковому об'ємі буферу А (20мМ трис pH 7,6, 0,4М NaCl, 0,2мМ EDTA, гліцерин (20% за об'ємом), 1,5мМ MgCl<sub>2</sub>, 2мМ дититрейтол (DDT), 0,4мМ PMSF, 1мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2мкг/мл кожного з лейпептину, пепстагіну і апротиніну). Клітинний дебріс вилучають центрифугуванням (15000 x g, 15 хвилин), аліквоти супернатанту заморожують в рідкому азоті і зберігають при -80 °C. Концентрацію білка визначають за методом Бредфорда (Bio-Rad), використовуючи бичачий сироватковий альбумін в якості стандарту. Дволанцюжковий олігонуклеотид, який відповідає елементу, що зв'язує NF-kB (10пмол, Promega), мітять [<sup>32</sup>P]dCTP (300Ки/ммол) і T4 полінуклеотидкіназою (New England Biolabs). Вільні нуклеотиди вилучають центрифугуванням з нанесенням препарату на спін-колонку. Екстракти (10мкг білка) клітин, оброблені IL-18 або IL-18+IL-18BP, інкубують (15 хвилин, кімнатна температура) з міченим зондом ( $3 \times 10^4$  імпульсів на хвилину) разом з полі dI.dC (500нг, Pharmacia) і денатурованою ДНК сперми лосося (100нг, Sigma) в 20мкл буферу, що містить HEPES (pH 7,5, 10мМ), 60мМ KCl, 1мМ MgCl<sub>2</sub>, 2мМ EDTA, 1мМ DTT і гліцерин (5% за об'ємом). Потім суміші наносять на 5% неденатуючі поліакриламідні гелі. Електрофорез проводять при 185Вт в 0,5 x TBE (40мМ трис HCl, 45мМ борної кислоти і 2,5мМ EDTA). Гелі висушують під вакуумом і проводять авторадіографію всю ніч при -80°C. Виявлено, що IL-18 індукує утворення гомодимеру p50 NF-kB і гетеродимеру p65/p50 NF-kB. Сечовий, а також рекомбінантний IL-18BP інгібує активацію NF-kB, викликану IL-18, що встановлюють за аналізом зміни електрофоретичної рухливості з екстрактами KG-1 клітин, що зв'язують радіоактивний олігонуклеотид, який відповідає погодженій послідовності NF-kB.

#### Приклад 9

Експресія IL-18BP в E. coli, клітинах дріжджів і комах

IL-18BP також продукується іншими рекомбінантними клітинами, такими як прокаріотичні клітини, наприклад E. coli, або іншими еукаріотичними клітинами, такими як клітини дріжджів і комах. Є добре відомі способи для конструювання відповідних векторів, що несуть ДНК, які кодують будь-який IL-18BP, і придатні для трансформування E. coli і клітин дріжджів, або інфікування клітин комах для того, щоб продукувати рекомбінантний IL-

18BP. Для експресії в клітинах дріжджів, ДНК, що кодує IL-18BP (Приклад 6) вирізають і вставляють в експресуючі вектори, підхожі для трансфекції клітин дріжджів. Для експресії в клітинах комах, ДНК, що кодує IL-18BP, вставляють в бакуловірус, а клітини комах інфікують названим вище рекомбінантним бакуловірусом. Для експресії в *E. coli*, ДНК, що кодує IL-18BP, піддають сайтспрямованому мутагенезу з відповідними олігонуклеотидами для того, щоб ATG кодон ініціації вставити саме до першого кодона зрілого IL-18BP. Альтернативно, таку ДНК одержують шляхом PCR з відповідними смисловим і антисмисловим праймерами. Одержані ДНК-конструкції потім вводять в прокаріотичні експресуючі вектори, відповідно сконструйовані з використанням технологій, добре відомих на даному рівні техніки (23).

#### Приклад 10

Конструкція експресуючого вектора, асоційованого з аденовірусом, для експресії IL-18BP *in vivo*

Функціональний ген, що кодує IL-18BP, конструюють на основі плазмідної pcDNA3 (Invitrogen, San Diego CA). кДНК IL-18BP з Kozak-погодженою послідовністю на 5' кінці зшивають в сайті Xba pcDNA3 у спосіб, що руйнує сайт рестрикції. Нові Xba 1 сайти вставляють шляхом сайтспрямованого мутагенезу до неоміцинової касети (основа 2151 вихідної послідовності pcDNA3) і після сигналу поаденілування SV40 (основа 3372 вихідної послідовності pcDNA3). Цю конструкцію вирізають шляхом XbaI і одержаний 4,7т.п.н. мініген вставляють в XbaI-сайт плазмідної psub201, як описують [Snyder et al., 1996, Current Protocols in Human Genetics, Chapters 12.1.1-12.1.17, John Wiley & Sons]. Одержану рекомбінантну плазмиду ко-трансфікують з хелпер AAV плазмидою pAAV/Ad в T293 клітини людини. Культури потім інфікують аденовірусом в якості хелпер-вірусу і клітини збирають після 48-60 годин інкубації. Клітини піддають 3 циклам заморожування-танення, клітинний дебрис вилучають центрифугуванням, а супернатант насичують сульфатом амонію 33% насичення. Потім суміш центрифугують, а pAAV осаджують з супернатанту сульфатом амонію при 50% насичення. Далі вірус очищають за допомогою CsCl, діалізують і нарешті нагрівають протягом 15 хвилин при 56°C, щоб знищити будь-який вірус.

#### Приклад 11

Конструкція рекомбінантних білків злиття IL-18BP

Одержання білків, що містять IL-18BP, злитих з константною областю важкого ланцюга IgG2, проводять так: ДНК IL-18BP піддають сайтспрямованому мутагенезу з відповідними олігонуклеотидами для того, щоб ввести унікальний сайт рестрикції безпосередньо перед і після кодуєчих послідовностей. Плазмиду, що несе константну область важкого ланцюга IgG2, наприклад pRKC042Fcl (6), піддають подібному сайтспрямованому мутагенезу, щоб ввести той самий унікальний сайт рестрикції у спосіб, що допускає трансляцію в фазі злитого білка. Фрагмент dsDNA, що складається з 5'нетранслованих послідовностей і кодує IL-18BP, одержують шляхом розщеплення в унікальних сайтах рестрикції або, альтернативно,

шляхом PCR з відповідно сконструйованими праймерами. Аналогічно розщепляють мутантний pRKC042Fcl, щоб утворити великий фрагмент, що містить плазмиду і послідовності IgG1. Потім два фрагменти лігують з утворенням нової плазмиди, яка кодує поліпептидний попередник, що складається з IL-18BP і приблизно 227 С-кінцевих амінокислот IgG1 (область петлі і CH2 та CH3 домени). ДНК, що кодує рекомбінантні білки, виділяють з плазмиди шляхом рестрикції відповідними ферментами рестрикції, а потім вводять в ефективні прокаріотичні і еукаріотичні експресуючі вектори.

#### Приклад 12

Одержання хімічно модифікованих IL-18BP

Для збільшення періоду напів-життя IL-18BP в плазмі, одержують IL-18BP, які хімічно модифікують поліетиленгліколем (PEG). Модифікацію здійснюють поперечним зшиванням PEG з залишком цистеїну молекули IL-18BP. Конструюють мутантні IL-18BP, що містять додатковий залишок цистеїну на амінокінцях, в ділянках глікозилювання та на карбоксильних кінцях кожного IL-18BP. Мутагенез здійснюють методом PCR, використовуючи олігонуклеотиди, що містять потрібну мутацію. Ці мутантні білки експресують у звичайний спосіб, добре відомий в цій галузі. Проводять regulation цих білків і визначають активність.

#### Приклад 13

Одержання поліклональних антитіл до IL-18BP

Кроликам спочатку вводять підшкірно 5мкг чистого препарату IL-18BP сечі, емульгованого в повний ад'ювант Фрейнда. Через три тижні їм знову вводять підшкірно 5мкг препарату IL-18BP в неповному ад'юванті Фрейнда. Дві додаткові ін'єкції IL-18BP, розчиненого в PBS, проводять з 10-денними інтервалами. У кроликів забирають кров через 10 днів після останньої імунізації. Зростання рівня антитіл визначають за допомогою радіоімунаналізу. <sup>125</sup>I-мічений IL-18BP (166000 імпульсів на хвилину) змішують з різними розведеннями (1:50, 1:500, 1:5000 і 1:50000) сироватки кролика. Суспензію гранул білок-G-агарози (20мкл, Pharmacia) додають в загальному об'ємі 200мкл. Суміш залишають протягом 1 години при кімнатній температурі, потім гранули промивають 3 рази і рахують зв'язану радіоактивність. Антисироватку кролика до лептину людини використовують в якості негативного контролю. Титр IL-18BP- антисироватки виявляється між 1:500 і 1:5000, у той час як негативний контроль менший від 1:50.

#### Приклад 14

Одержання моноклональних антитіл до IL-18BP

Самицям Balb/C мишей (у віці 3 місяців) вводять спочатку 2мкг очищеного IL-18BP в емульсії повного ад'юванту Фрейнда, а через три тижні підшкірно в неповному ад'юванті Фрейнда. Три додаткові ін'єкції роблять з 10-денними інтервалами підшкірно в PBS. Кінцеві бустер-ін'єкції здійснюють внутрішньочеревно за 4 і 3 дні до злиття мишам, які показують найвищий титр зв'язування, що визначають шляхом IRIA (див. нижче). Злиття проводять, використовуючи NSO/1 лінію клітин меланоми і лімфоцити, одержані як з селезінки, так і з лімфатичних вузлів тварин, в якості клітин, що зливаються. Злиті клітини розподіляють в багато-

лункові планшети для мікрокультури і гібридоми селекують в ДМЕМ, доповненим НАТ і 15% сироваткою коня. Гібридами, котрі, як виявлено, продукують антитіла до IL-18BP, субклонують за методом лімітуючих розведень і вводять Balb/C мишам, яким введений пристан для утворення асцитів. Ізотипи антитіл визначають, використовуючи комерційно доступний EUSA-набір (Amersham, UK).

Скринінг гібридом, що продукують анти-IL-18BP моноклональні антитіла, проводять так: Гібридомні супернатанти тестують щодо присутності анти-IL-18BP антитіл за допомогою інвертного твердофазного радіоімунаналізу (IRIA). ELISA-планшети (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA) покривають Talon-очищенням IL-18BP<sub>α</sub>-His<sub>6</sub> (10мкг/мл, 100мкл/лунку). Після інкубації протягом ночі при 4°C, планшети промивають двічі PBS, що містять BSA (бичачий сироватковий альбумін) (0,5%) і твін-20 (0,05%) та блокують промивальним розчином протягом принаймні 2 годин при 37°C. Додають гібридомні культуральні супернатанти (100мкл/лунку) і планшети інкубують протягом 4 годин при 37°C. Планшети промивають 3 рази, та додають кон'югат пероксидази хрину з антитілами кози до антитіл миші (HRP, Jackson Labs, 1:10000, 100мкл/лунку) протягом 2 годин при кімнатній температурі. Планшети промивають 4 рази, а забарвлення проявляють шляхом ABTS (2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазолін-6-сульфокислота, Sigma) з H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в якості субстрату. Планшети зчитують за допомогою автоматичного ELISA-планшет-рідера. Зразки, що дають OD, яке принаймні в 5 раз вище, ніж величина негативного контролю, вважають позитивними.

#### Приклад 15

Афінна хроматографія IL-18BP з моноклональними антитілами

Антитіла проти IL-18BP використовують для очистки IL-18BP за допомогою афінної хроматографії. Секретовану гібридомою асцитну рідину, що містить моноклональні антитіла, очищають осадженням суфатом амонію при 50% насичення з подальшим екстенсивним діалізом проти PBS. Приблизно 10мг імуноглобулінів зв'язують з 1мл Affigel 10 (Bio Rad USA), як рекомендує виробник.

250мл білків сечі людини (еквівалентних 250л неочищеної сечі) наносять на 0,5мл колонку з анти-IL-18BP-антитілами при 4°C при швидкості потоку 0,25мл/хвилину. Колонку промивають PBS, аж доки не перестане визначатися білок в промивній рідині. IL-18BP елюють 25мМ буфером лимонної кислоти, рН 2,2, (8×1 колонка, об'єм фракцій) і негайно нейтралізують 1М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Подальшу очистку цього препарату здійснюють за допомогою гел'фільтрації.

#### Приклад 16

ELISA-тест (метод твердофазного імуноферментного аналізу)

Титраційні мікропланшети (Dynatech or Maxisorb, by Nunc) покривають анти-IL-18BP моноклональними антитілами (безсироватковий гібридомний супернатант або імуноглобуліни асцитної рідини) протягом ночі при 4°C. Планшети промивають PBS, що містить BSA (0,5% та твін 20 (0,05%) та блокують тим самим розчином протягом принаймні 2 годин при 37°C. Тестовані зразки

розбавляють блокуючим розчином і додають в лунки (100мкл/лунку) протягом 4 годин при 37°C. Потім планшети 3 рази промивають PBS, що містить твін 20 (0,05%) з подальшим доданням анти-IL-18BP сироватки кролика (1:1000, 100мкл/лунку) для подальшої інкубації протягом ночі при 4°C. Планшети промивають 3 рази і додають кон'югат пероксидази хрину з антитілами кози до антитіл кролика (HRP, Jackson Labs, 1:10000, 100мкл/лунку) протягом 2 годин при кімнатній температурі. Планшети промивають 4 рази, а забарвлення проявляють з використанням ABTS (2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазолін-6-сульфокислоти, Sigma) з H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в якості субстрату. Планшети зчитують за допомогою автоматичного апарату для зчитування планшетів.

#### Приклад 17

Неглікозилований IL-18BP людини біологічно активний

Досліджують здатність очищеного рекомбінантного IL-18BP<sub>α</sub> інгібувати біологічну активність IL-18. IL-18BP<sub>α</sub> інгібує у доза-залежний спосіб індукуючу IFN-γ активність IL-18 людини і миші в спленоцитах миші, PBMC та лінії KG-1 клітин людини (Фіг.9).

Очищений IL-18BP<sub>α</sub>, що має His<sub>6</sub> tag на C-кінці (1,5мкг, 50мкл) приводять до рН 7,5 та змішують з N-глікозидазою F (3мкл, 500000 U/мл PNGase F, New England Biolabs). Суміш інкубують протягом 24 годин при 37° за невідновлювальних умов. Аліквоти з зразка і з негідролізованого IL-18BP-His<sub>6</sub> аналізують шляхом SDS-PAGE за невідновлювальних умов з подальшим імуноблотингом з антитілами до IL-18BP. Виявляють, що зона 40кДа IL-18BP-His<sub>6</sub> зникає в PNGase- обробленій фракції, і виявляють нову зону 20кДа. Молекулярна маса продукту і специфічність PNGase F вказують, що IL-18BP-His<sub>6</sub> є повністю деглікозилованим.

PNGase-оброблені фракції, негідролізований IL-18BP-His<sub>6</sub> і контрольний зразок, що містить PNGase в буфері, нарізно адсорбують на Talon-гранулах, промивають фосфатним буфером та елюють імідазолом (100мМ). Елюювані фракції піддають біоаналізу, використовуючи IL-18 людини (20нг/мл), LPS (2мкг/мл) та спеноцити миші. Результати наведені у таблиці нижче:

Зразок	IFN-γ (нг/мл)
Контроль	7,5
Негідролізований IL-18BP-His <sub>6</sub>	0
Оброблений PNGase IL-18BP-His <sub>6</sub>	0

Зроблено висновок, що деглікозилований IL-18BP біологічно активний як модулятор активності IL-18.

Наведений вище опис окремих напрямків виявляє основну суть винаходу так, що інші, застосовуючи сучасні знання, легко модифікують і/або пристосовують для різних застосувань такі конкретні напрямки без відступу від основних уявлень і тому такі пристосування і модифікації повинні бути та призначені для включення до значень та галузі еквівалентів описаних напрямків. Зрозуміло, що фразеологія і термінологія служать для опису, а не обмеження.

## References

1. Anderson, D.M., et al., A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997. 390(6656): p.175-179.
2. Bollon, D. P., et al. (1980) *J. Clin. Hematol. Oncol.* 10:39-48.
3. Botstein, D., et al. (1982) *Miami Wint. Symp.* 19:265-274.
4. Broach, J. R., in "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp.445-470 (1981).
5. Broach, J. R., (1982) *Cell* 28:203-204.
6. Byrn R. A. et al., 1990, *Nature (London)* 344:667-670.
7. Car, B. D., V. M. Eng, B. Schnyder, L. Ozmen, S. Huang, P. Gallay, D. Heumann, M. Aguet, and B. Ryffel. 1994. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J. Exp. Med.* 179:1437-44 issn: 0022-1007.
8. Chater, K. F. et al., in "Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology", Akademiai Kiado, Budapest, Hungary (1986), pp.45-54.
9. Conti, B., J. W. Jahng, C. Tinti, J. H. Son, and T. H. Joh. 1997. Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 272:2035-2037.
10. Dao, T., K. Ohashi, T. Kayano, M. Kurimoto, and H. Okamura. 1996. Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell-Immunol.* 173:230-5 issn: 0008-8749.
11. Engelmann, H., D. Aderka, M. Rubinstein, D. Rotman, and D. Walhsch. 1989. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J. Biol. Chem.* 264:11974-11980.
12. Engelmann, H., D. Novick, and D. Wallach. 1990. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.* 265: 1531-1536.
13. Fantuzzi, G., et al., IL-18 regulation of IFN- $\gamma$  production and cell proliferation as revealed in interleukin-1 $\beta$  converting enzyme-deficient mice. *Blood*, 1998. 91: p.2118-2125.
14. Gryczan, T., "The Molecular Biology of the Bacilli", Academic Press, NY (1982), pp.307-329.
15. Gutkind, J.S. et al., A novel c-fgr exon utilized in Epstein-Barr virus-infected B lymphocytes but not in normal monocytes. *Molec. Cell. Biol.*, 1991. 11: p.1500-1507.
16. Heremans, H., J. Van Damme, C. Dillen, R. Dijkmans, and A. Billiau. 1990. Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Schwartzman-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.* 171:1853-69 issn: 0022-1007.
17. Izaki, K. (1978) *Jpn. J. Bacterial.* 33:729-742.
18. John, J. F., et al. (1986) *Rev. Infect. Dis.* 8:693-704.
19. Kendall, K.J. et al. (1987) *J. Bacterial.* 169:4177-4183.
20. Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, and M. Kurimoto. 1997. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.* 158:1541-1550.
21. Maliszewski, C. R., T. A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Slack, M. P. Beckmann, and K. H. Grabstein. 1990. Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro. *J. Immunol.* 144:3028-3033.
22. Maniatis, T., in "Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol.3: Gene Expression", Academic Press, NY, pp.563-608 (1980).
23. Maniatis et. al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
24. Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1996. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur-J-immunol* 26:1647-51 issn: 0014-2980.
25. Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acid Res.* 18:5322-5328.
26. Nakamura, K., H. Okamura, K. Nagata, T. Komatsu, and T. Tamura. 1993. Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production. *Infect-Immun* 61:64-70 issn: 0019-9567.
27. Nakamura, K., H. Okamura, M. Wada, K. Nagata, and T. Tamura. 1989. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect-Immun* 57:590-5 issn: 0019-9567.
28. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1994. The Human Interferon alpha/beta Receptor - Characterization and Molecular Cloning. *Cell* 77:391-400.
29. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1992. Soluble Interferon-alpha Receptor Molecules Are Present in Body Fluids. *FEBS Lett* 314:445-448.
30. Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach, and M. Rubinstein. 1989. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.* 170:1409-1414.
31. Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378:8 8-91.
32. Rothe, H., N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and H. Kolb. 1997. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J-Clin-Inves.* 99:469-74 issn: 0021-9738.
33. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and M. T., *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. ed. 1989, Cold Spring Ear-box, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
34. Simonet, W.S., et al., Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997. 89(2): p.309-319.
35. Sompayrac, L.H. and K.L. Danna, Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40.

- Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1981. 78: p. 7575-7578.
36. Sparks, C.A., et al., Assignment of the nuclear mitotic apparatus protein NuMA gene to human chromosome 11q13. *Genomics*, 1993.17: p.222-224.
37. Tsutsui, H., K. Nakanishi, K. Matsui, K. Higashino, H. Okamura, Y. Miyazawa, and K. Kaneda. 1996. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J. Immunol.* 157:3967-73 issn: 0022-1767.
38. Ushio, S., M. Namba, T. Okura, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura, and M. Kurimoto. 1996. Cloning

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Novick, Daniela  
Dinareello, Charles  
Rubinstein, Menachem  
Kim, Soo Hyun  
Yeda Research and Development Co. Ltd.

<120> Білки, що зв'язують інтерлейкін-18,  
їх одержання та застосування

<130> IL-18 Rubinstein

<140>

<141>

<150> 125463

<151> 1998-07-22

<150> 122134

<151> 1997-11-06

<150> 121869

<151> 1997-09-29

<150> 121639

<151> 1997-08-27

<150> 121554

<151> 1997-08-14

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1348

<212> ДНК

<213> людина

<400> 1

gagaagagga cgttgtcaca gataaagagc caggctcacc agctcctgac gcatgcatca 60  
tgaccatgag acacaactgg acaccagacc tcagcccttt gtgggtcctg ctctctgtgtg 120  
ccacgtcgt cactctcctg gtcagagucca cactgtcttc gcagaccacc acagctgcca 180  
ctgctcagtg tagaagcaca aaggaccctt gccctcccca gcccccagtg ttcccagcag 240  
ctaagcagtg tccagcattg gaagtgcatt ggccagaggt ggaagtgcga ctgaatggaa 300  
cgctgagctt atcctgtgtg gctgcagcc gcttcccpaa ctccagcatc ctctactggc 360  
tgggcaatgg ttcttcatt gagcauctcc caggccgact gtggaggggg agcaccagcc 420

- of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein. *J. Immunol.* 156:4274-4279.34. Okayama, H. and Berg, P. (1983) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 3:280-289.
39. Yasuda, H., et al., Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 1998. 139: p.1329-1337.

gggaacgtgg gagcacaggt acgcagctgt gcaaggcctt ggtgctggag cagctgaccc 480  
ctgccttgca cagcaccacc ttctcctgtg tgctcgtgga cctgaacag gttgtccagc 540  
gtcacgtcgt cctggcccag ctctgggctg ggctgagggc aaccttgccc cccaccacaag 600  
aagccctgcc ctccagccac agcagccac agcagcaggg ttaagactca gcacagggcc 660  
agcagcagca caaccctgac cagagcttgg gtctacctg tctacctgga gtgaacagtc 720  
cctgactgcc ttagggctgc gtggatgcgc aacacacccc ctctctctct gctttgggtc 780  
cttctctcca ccaaatccaa actccattcc cactaccta gaaaatcaca gccctctat 840  
aatgcctcct ctctcctgca ttctctctcc acctatccat tagccttctt aacgtccatc 900  
tctccacact gctctactgc tcagaaacca ccaagactgt tgatgctta gccctgacct 960  
ccagggccct acctgcattt cccacatgac ttctggaag cctcccaact attcttgctt 1020  
ttccccagca gctcccaact ccatgtctct gctcatitag tccgtcttc ctccagcccc 1080  
cagcagggga acgtccaagc ctgggtgaaa tgctgctct tcaagtgaag catcctcttt 1140  
cagctctggc cgcattctgc agacttctta tcttgctgt gtatgtttt tttttccccc 1200  
ttcactctaa tggactgttc cagggaaggg atgggggac cagctgcttc ggatccacac 1260  
tgtatctgtg tcatccccc atgggtcccc ataaaggatt attcaatgga aaaaaaaaaa 1320  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 1348

<210> 2

<211> 192

<212> PRT Білок

<213> людина

<220>

<221> SIGNAL сигнальний пептид

<222> (1)..(28)

<400> 2

Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser  
20 25 30

Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro  
35 40 45

Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala  
50 55 60

Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu  
65 70 75 80

Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile Leu  
85 90 95

Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu  
100 105 110

Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu  
115 120 125

Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Ser Thr  
130 135 140

Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His  
145 150 155 160

Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Thr Leu Pro Pro  
165 170 175

Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro Gln Gln Gln Gly  
180 185 190

<210> 3  
<211> 1038  
<212> ДНК  
<213> людина

<400> 3  
gagaagaggga cgttgttcaca gataaagagc caggctcacc agctcctgac gcatgcatca 60  
tgaccatgag acacaactgg acaccagacc tcagcccttt gtgggtcctg ctccctgtgtg 120  
ccacgcgct cactctcctg gtcagagcca cactctctc gcagaccacc acagctgcaca 180  
ctgcctcagt tagaagcaca aagagccctt gcccttccca gcccccagtg ttcocagcag 240  
ctaagcagtg tccagcattg gaagtgaact ggccagaggt ggaagtgcga ctgagctggg 300  
ctgaggggcaa ccttgccccc caccacaaga gccctgccct ccagccacaag cagtccacag 360  
cagcaggggt aagactcagc acagggccag cagcagcaca accctgacca gagcttgggt 420  
cctacctctg tacctggagt gaacagctcc tgactgcctg tagctctggt ggtgcgcaca 480  
cacacccctt ccttctctg tttgggtccc ttctctcaac aaattcaaac tccattccca 540  
cctacctaga aaatcacagc ctctctataa tgctctctcc tctgctcatt ctctctccca 600  
ctatccatta gccctctcaa cgtctctatc ctccacactg tctactgctc agaaaccacc 660  
aagactgttg atgctctagc ctgcactcc agggccctac ctgcatttcc cacatgactt 720  
cttgggaagcc tcccaactat tcttgetttt cccagacagc tcccactccc atgtctctgc 780  
tcattttagc ccgtctctct caccgcccca gcaggggaaac gctcaagcct ggttgaagt 840  
ctgctctctc agtgaagtca tctctcttca gctctggccg cattctgcag acttccctac 900  
tctgtctgct atgttttttt ttcccccctt cactctaaag gactgttcca gggaaaggat 960  
gggggcacca gctgcttcgg atccacactg tatctgtgtc atcccacat gggtctctcat 1020  
aaaggattat tcaatgga 1038

<210> 4  
<211> 113  
<212> РРГ блок  
<213> людина  
<220>  
<221> сигнальный пептид  
<222> (1)...(28)

<400> 4  
Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser  
20 25 30

Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro  
35 40 45

Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala  
50 55 60

Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Ser Trp Ala Glu  
65 70 75 80

Gly Asn Leu Ala Pro His Pro Arg Ser Pro Ala Leu Gln Pro Gln Gln  
85 90 95

Ser Thr Ala Ala Gly Leu Arg Leu Ser Thr Gly Pro Ala Ala Ala Gln  
100 105 110

<210> 5  
<211> 7063  
<212> ДНК  
<213> людина

<400> 5  
gaattcctgc cgcgctgcag gccagagggg ctaggatgag agacagaggg tgtgtatggtg 60  
ggtgcgggga aatgtaccgc acccttggggc tgggtggctgg gggagtgggt agcctgggaa 120  
aggccaggat gtagcggcag tggatggcca ctgagcctga agtggccaa cttggggctc 180  
ccacgagcct aggaagtgtg tcccttgtaa gtgcagtgtg aaggtgaagg aggaagcaga 240  
tgctgtgtca tatggaaaca aagacctggc tgtgaagagg ggagcgggac accaaagtcc 300  
tgacacttgg gcgggacaga attgatctgt gagagactca tctagtctat accctaggtg 360  
accctggggg tggcattggg gtatattaga gatccagctc tgytatcttc tggagagtay 420  
gagtcccgag agctgaaggt ttctggccca tgaacttttg ctaaaacaga ggtgtccacag 480  
ctgctcaaga tccctgggtt aaaaagtcaa agtgaatatg agggctcggg caggtctctc 540  
cagaagagat tgcctggcct cctgcccctc ccagaagcag ctctggtgct gaagagaca 600  
ctgcccctct gctgcagctg gtagtgcctat actccctctt tgggtctcaca ttgtgccttc 660

cctaataag gggtaagatt ggaactagga agcactttac aaccatttgt ggtcatgaga 720  
ctgctgggtgg ggaaggattg tcaactgacc ccccaagctc tggttctaa gcttgaaga 780  
ctgctcagact atgtctacgg aggaagagac agctactgag gaaagccag ctactgaga 840  
aaaagcgggag tggtttacc ttctccccc ccacctttca ccagagaaga ggacgttgc 900  
acacataaag agccaggctc accagctctc gacgcattga tcatgacct gagacacaa 960  
tggaacacag accctcagcc ttgtggggc ctgctcctgt gtcgccagct cgtcactctc 1020  
ctggtcagag ccacacccgt ctgcagacc accacagctg ccactgcctc agttagaagc 1080  
acaaagagacc cctgcccctc ccagccccc gtgttcccag cagctaaaga gtgtccagca 1140  
ttggaagtga cctggccaga ggtggaagtg ccaactgaat gaacgtgag ctatctgt 1200  
gtggcctgca gccctctccc caactcagc atcctctact ggtctggcaa tggttctctc 1260  
attgagcacc tcccaggccg actgtgggag gggagcacca gccgggaacg tgggagcaca 1320  
ggtacgcagc tgtgcaaggc ctgggtgctg gagcagctga cccctgcctc gcacagcacc 1380  
aaactctcct gtgtgctcgt ggaacctgaa caggttgtcc agcgtcaagt cgtcctggcc 1440  
cagctcggg tgaggaagcc aaggagaggc ctccaggaa acaggagagct ctgcttccat 1500  
atgtggggag gaaagggtgg gctctgcagc agcagcctgt gaactaatgc ccagcattcc 1560  
tcaaggctcag ccagacaaaa aggaacttag gtcttgggca gaggaggtgt agcctggggc 1620  
aaagtatgga gatgtccctc ctgtctcttg ctgtctcttg ctgtctctc acttccctag 1680  
gctgggtctga gggcaacctt gcccccacc caagaagccc tgccctccag ccacagcagt 1740  
ccacagcagc aggggttaaga ctacgcacag gggcagcagc agcacaacct tgaacctagt 1800  
ttgggtccca cctgtctacc tggagtgaa agtccctgac tgctctgtag ctgctgtgat 1860  
ggcgaacaca cccctcctct ctgtctcttg ggtccctctc ctacacaaat tcaaacctca 1920  
ttccacacta cctagaaaaa cagacctctc ttataatgac tctctctctt gccattctct 1980  
ctccacttat ccatagacct tctaaagctc ctactctcca cactgtctta ctgtctcaaa 2040  
accacaaaga ctgttgatgc cttagccttg cactccaggg cctacacctg atttccacca 2100  
tgacttcttg gaagcctccc aactctctct gcttttccca gacagctccc actcccatgt 2160  
ctctgctcat ttatgctcgt ctctctcacc gccccagcag ggaacgcctc aagcctggtt 2220  
gaaatgctgc ctctctcagt aagctctctt ctctcagctc tggccgcatc ctgcacagt 2280  
cctactcttg tctgttatgt tttttttt cccctctact ctatgtact gttccagga 2340  
agggatgggg gcagcagctg ctctggatcc acactgtatc tgtgtatcc ccacatgggt 2400  
cctcacaaag gattattcaa tggaggctac ctgacatctg tctacttagc cttaagctcc 2460  
cctccacaga actttgctgt tccacagagg gagtattgga gatattgact gccacagctc 2520  
agctgaagca aacactgctc tcaagggaac acaggcgctt gaaaagaaga agagagaaca 2580  
gccataaag ctccccggga gcagagggca ctggaaggca cttaatggag gttccagaag 2640  
tgtggctcca ggaagagggg tgaagaaaag gattgtgtat ggaagactca gccagagctc 2700  
tgtaggcttc aaagagctca tatctctct ttctccacac cgtacaaagt caaggaataa 2760  
cctggggaga aaatagact ttatttcaa gtaataaact ttgaataaga tccatccccg 2820  
gcctctaaaa acccttccat caactccaat cccacccagc tgaagtctg gggaaaggag 2880  
ggtgtgagct gctgtgaaag gctgtccccc aaccccactc ctgagacaca gggcccatcc 2940  
ctctggggaa agagcatcct ctggcagggt tccccaagc ctgagaccca gctctggact 3000  
tcaagagtga gggccctcgc tggggccagc caccagggca gcagaaacca ccccgactcc 3060  
ctcttatggt cctctctaga tccagaggtt aagaggaaga ctggccaggc ccaaggaccc 3120  
agccatcaaa accagctcca aatctgggtg tgaaggagaa gtagatttgc tttaagaaaa 3180  
aaggaggaaa ggtagggaga gcgccacac tgcctcatgt tgcagccccc tgggcagact 3240  
ccagagaagg gcagtgaaag gaccagggag caggccaggg tgcgggcagg catcactgtc 3300  
ctcagggggt tggctactgt tggcctggga gctgagaga ggcaactaga gggcagactc 3360  
cggaagagcc aggtgacggc agcatcgggg acacaggtgg gggccactac tggtaactgc 3420  
cctttatgct tttgctgaa agagacaaag tccatggccc agatgagaac ttgcgactac 3480  
agcctgcacc cactggctgc gaagactctt cctgtctccc agcccccctg ctgtactccc 3540  
tcccttgtga gccccagggt tatcagttgc tggctgtgcc tgaagcagct tgggtgctct 3600  
ccatgagaa ttggggccatc gtctctctcc ctggagagg agctaccagg acaggagac 3660  
ctcttaccac acacccctca gcagcctggc gttggcccat ctgttatgct acttggggg 3720  
gcggctcggg ggggtgccat gctctcatcg ggttcccccc ccccatcctg ccagtgctcc 3780  
taccttgccc ttggctcag ggtgggacc aatggcgga cgaagtggcg cgtggctgt 3840  
ggtgtggga atgcgcggag aacggcggtt tcaactgca gttgtgggg aagccttga 3900  
caggggcttc tttagggct cccgcgcag aaggctgttc cctagctctt tgggtgtgt 3960  
gaggtatgct aaggccatcg actggcgcc gtcagcctgc aagggaaggc tgcagagcc 4020  
ggagagccaa tgcctgcttc ccaggccagc gtgctgtgcc acgtgtacc agcaaggtcc 4080  
cgccaggggc tgccttcat ccccttccag ccagcctca cctgtttagt aagaactga 4140  
gctgctttct tctgggctc agtagtgctc tgtttgccc ctctcatgct gtcctggga 4200  
gtctatgggc ggggaaaca gctgggtgcc ttcttagact atggagaaga ggaactgat 4260  
gcagacagta gcaagaggag tcaactctga agccaggtgt ctgtcctctc cagagctgac 4320  
tggaacttgt aagtcaactg gcaactgct ccccttccca cctctgggac agactctcc 4380  
cttcccaaca gttcccatc atgggtcagg ccttggaaga gagggaaga gagggggaag 4440  
tgagggaagg agagagaagg ctccctttag tccctgggtg gctgggctg accctgacac 4500  
agtgctcagg taacacccag gggcacccgc gcaactccca ggaatttccag ggcctgggtg 4560  
gggctcttag gagaccctt tgctgtgct cgggtgtgtg agtcagctgc cctcgctat 4620  
ctgatttggc tgcattgctg ctggcgccag ggtctcttgg ggtctccag tttctatc 4680  
ctcaactgtg atggtgccca ggtccaggga aggttgcatg ggtggaagag gtgctcagct 4740  
gaccatagct gtatggagat ggaagaggac ctggggctgt tccagaactc tacaactgac 4800  
cgacacttat ggtcgggacc ctctctgct acagagtaga aagacacaag cctcctttcc 4860  
tgttctgctt tctacctaa ccttgggcaa atgggcacaag cagtgcaagt ctgacacagt 4920  
tctctctga gctcctgctt acccccaggg acttcaacct tgaagtgcct ccaagtgtct 4980  
gttccactgt cagcatgaga aggtcaacct ttcccctatt cggccagta gtatccagg 5040  
gcctcagtgc tagcctgaga tcaagcaggt ggatttccag gaaggcgagg gatgggaagc 5100  
cttgccacag gacccagggc ctacacctgg actccaggga tagcaggtct tcaagtgtg 5160  
ggggacactc cgaattgcgt gctgcaagct tccaatgagg tccagctat ccagctgctc 5220  
aggtctatcc tggcaagtgc ccaagtgaag gctgttctct cctgtggaag gcaagggaag 5280  
gggaacaaat gagcctggag tggcagagtc accctctggc cctggcatct tgcacacct 5340  
tgtctccacc taccctata acttgaagcc cggcacacca gtctgattca gtcgcgag 5400  
tgacagagta cggcacacag actatttcta tctaggggc ttgctacca cctctctct 5460  
ggaaggggca gaagaggtca cagcagaga ctgctactac atctattca cctgcagaag 5520  
ctggtgtgct aacaccaga ggaacaaat aaggacggg aattaattcc caggggctcc 5580  
ctgggtccca aaggacaaga gcttccaaga agagtctgga cagcctggcc tctccagcag 5640  
cccatcaacc cctgagaagg ccaatggagg cctccacag ctaagctga caattgtgct 5700  
gggaactccc ggccttaac tctggttaag agtgcccca acacagccag cccctagagt 5760  
ggcaggttaag gaagccctg aggtctcagg aaggaggggc aggtggagct ggaatgtagc 5820  
aaagagacca gccctggatc tttaaaagc ttctctttt tccctgtgcc acgatccacc 5880  
ttcagctcta attttgggt atagtaagtc cctgtagctc cctgacctg aggggcccca 5940  
ctggacaccc cggcctggga acgacagga gaactcgag tgggtggggc gtagccaggc 6000  
aagctgagca ggcctgagtt gccataatg ggagaacca ggcagagctg agactgagt 6060  
gagaggtggt ctgcagagct agcctgggaa gcaggagcag acccgctgct gtagaacgat 6120  
gagttggcgt tgtctggctc ttccatctat agcttctgga agacagagt aatctgtct 6180  
agttacagt cctggcact gtacagaagc ttccatctc ctccagag ctccagatcc 6240  
caggccatct ccatgtatcc ccaactgctc tgaagaggt cttaaatgtc gtgctgtcaa 6300  
gaatggggc ctgcagacag aagcctcacc aaggtgggtc tbatgtctc taactgtctc 6360  
taccgatttt tctatggag tctattcata atgcttcag gtagggagc cagagtgttt 6420



atcgcccat tttggagatg aagtgcaag aaataaagtg actagcccca aatcacactg 6480  
 ctaggaaagta tcaagagctg ggtcaggccc catgtctcct gactagtcag gctcatccca 6540  
 cagccctcgc tgcctccag tccaaacttc cagggccctt accatgttcc agaacttccc 6600  
 ccaactttctt ggtcaggagg ggcaccctaa acacacaggt cccctctgct gtaccagggg 6660  
 cccctctccc cctctcccca aactccctct tcaagatgtg gaaacaaagg caaggcgctg 6720  
 cagcctgtca ggcagctccc tgggcagcaa caatgcctct cagctgcagt gggcagctg 6780  
 ggaggcacag gatgggctgc agcttcgcca cgttctctcc ctccacctg cacaggctca 6840  
 gtgctacgca tggagagaat gctagcctta gtcaggaggc agggatctaa tccatgcccc 6900  
 gctttttct tcaagaagtc ccttaaccaa gtcactgccc ttttaagac ctccagctt 6960  
 tccactgtga acatggactg gctgctcacc cctccctgct cctgactgag tgcacagtcg 7020  
 aaagatgccc ttgagaggaa gtgggaattg ctgacctgac gac 7063

<210> 6  
 <211> 197  
 <212> PRT Бiлoк  
 <213> лyдиha

<220>  
 <221> cигнальный пептид  
 <222> (1)..(28)

<400> 6  
 Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser  
 20 25 30

Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro  
 35 40 45

Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala  
 50 55 60

Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu  
 65 70 75 80

Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile Leu  
 85 90 95

Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu  
 100 105 110

Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu  
 115 120 125

Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Ser Thr  
 130 135 140  
 Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His  
 145 150 155 160

Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Val Arg Ser Pro Arg Arg Gly Leu Gln  
 165 170 175

Glu Gln Glu Glu Leu Cys Phe His Met Trp Gly Gly Lys Gly Leu  
 180 185 190

Cys Gln Ser Ser Leu  
 195

<210> 7  
 <211> 1360  
 <212> ДНК  
 <213> лyдиha

<400> 7  
 gcgccgcgt cgaccacgca gctaaacaca gctaaactga gtcttgagc tccataaagg 60  
 aagctctctg aaaggaaggc tottcaggac ctcttaggag ccaagaaga ggcgttgtc 120  
 acagataaag agccaggctc accagctcct gacgcatgca tcatgacct gagacacaa 180  
 tggacaccaa acccagcccc tttgtgggtc gtgctcctgt gtgcccact cgtcactcc 240  
 ctggctcagag ccacacctgt ctgcagagcc accacagctg cactgcctc agttagaagc 300  
 acaaaaggacc cctgccccct ccagccccca gtgttccag cagctaaagca gttccacga 360  
 ttggaagtga cctggccaga gttggaagt ccaactgaat gaacgtgag ctatcctgt 420  
 gtggctgtca ggccttccc caacttcagc atctctact ggtgggga tgggtctctc 480  
 attgagcacc tcccaggccg actgtgggag gggagcacca gccgggaacg tgggagcaca 540  
 gctggggctg agggcaacct tgcctccac ccaagaagcc ctgccctcca gccacagcag 600  
 tccacagcag cagggttaag actcagcaca gggccagcag cagcacaacc ttgaccagag 660  
 ctgggttccc acctgtctac ctggagtgaa cagtcactga ctgctgtag cctgcgtgga 720  
 tgcgcaacac accctcctct tetctgtctt ggttccctc tccacacaaa tccaaactcc 780  
 attccacact acctagaaaa tccagacccc ctataatgc ctctctccc tgcattctc 840  
 tctccaccta tccattagcc ttcctaacgt cctactctcc acactgtct actgtctaga 900  
 aaccacaaag actgttgtat ctctagcctt gcactccagg gccctacct catctccac 960  
 atgactttcc ggaagctccc caactattct tgccttccc agacagctcc cactcccatg 1020  
 tctctgtcca tttagtcccc tctctctcac cgccccagca ggggaacgct caagcctggt 1080  
 tgaagctgct cctcttcagt gaagtcaccc tcttccagct ctggccgcat tctgcagact 1140  
 tctcatcttc gtgctgtatg tttctttttt cccctctcac tctaatgac tgrtccagg 1200  
 aagggatggg ggcagcagct gcttcggatc cacactgtat ctgtgtcact cccacatggg 1260  
 tctcataaa ggattattca atggaggcat cctgacatct gtccatttag gcttcagctc 1320  
 cactccacag aactttgctt gtccccagag ggaagtatgg 1360

<210> 8  
 <211> 161  
 <212> Бiлoк  
 <213> лyдиha

<220>  
 <221> cигнальный пептид  
 <222> (1)..(28)

<400> 8  
 Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser  
 20 25 30

Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro  
 35 40 45

Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala  
 50 55 60

Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu  
 65 70 75 80

Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile Leu  
 85 90 95

Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu  
 100 105 110

Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Trp Ala Glu  
 115 120 125

Gly Asn Leu Ala Pro His Pro Arg Ser Pro Ala Leu Gln Pro Gln Gln  
 130 135 140

Ser Thr Ala Ala Gly Leu Arg Leu Ser Thr Gly Pro Ala Ala Ala Gln  
 145 150 155 160

Pro

<210> 9  
 <211> 7912  
 <212> ДНК  
 <213> лyдиha

<400> 9  
 gtcgacgcta ccccccggaa agatttaata cgaccaccta tagggcggga cagaattgat 60  
 ctgcgagaga ctcatcragt tcaaccccta gtcgacctg ggggtggcat ggggtagat 120  
 tagagatccc agtctggtat cctctggaga gtaggagtc caggagctga aggtttcttg 180  
 ccaactgaact ttggctaaag cagaggtgtc acagctgtcc aagattccct ggttaaaaag 240  
 tgaagtgaa atagagggtc gggcgagtcg ttccccagaa ggatgtctcg gcatcctgcc 300  
 ctccccagaa gcagctcttg tctgaaag agcactgct cctgtgtga ctgggtgagt 360  
 ccatattctc tctttgggtc tcaatttgc ctccctaat gaagggttaa gattgacta 420  
 ggtgaagcct tcaacacat ttgtgtcat gagagctgg ggggggaagg attgtcact 480  
 gaccccccca gctctgttc taagtctga aagagctcca gctatgcta cggagagga 540  
 agcagctac taggaaaaag ccagctactg agaaaaagcg ggagtgttt accattctcc 600  
 tccccacct tccaccagag aagaggactg tctcacat aaagagccag gctcaccagn 660  
 tccgacgca tgcacatga ccatgagaca caactggaca ccaggtaggc ctggggctga 720  
 ccatatggca ggcgggtag ggtgaggtct atgaacagaa tggagcaat ggctaaccg 780  
 gagccttacc tccaaaggca accaccacag gcacctggg ctgtgtttt aagaacctg 840  
 gcagatattg tagctctggc tcaagtctaa agcttctctg tactctgttc aataaaggcg 900  
 taagggtggg gtgctgagg gtccctctc ccgctctgat tccctggcta gaaccacag 960  
 atctctggcg tggagtaca tcttaccg ggcagccacc tctgtctcca gagccgtcc 1020  
 cctgtaactg tcttctctc agacctcag ccttctggg gcttctctc gtgtgcccac 1080  
 gcgtgctc tctgtgtag agccacact gctctgcaga cccacacagc tgcactgccc 1140  
 tcatgtagaa gcacaaagga cccctgccc cccagcccc cagtgtccc agcagctaa 1200  
 cagtgtccag cattggaagt gacctggcca gagggtgaag tgcactgag taagaagca 1260  
 agtggctggg ggtgggctat gggcacagag gtcctccagg tgggtgtgac tctgagcgc 1320  
 cagctccctt gtccccatgt accacacagt gaggcagct gggtgagcag gcaacctct 1380  
 cctccccaac cccagtgtca tgggtgcagg ctggcgagc ctcccagat gctccctac 1440  
 aaataggaca gagaactcaa gacataagta atgtcacag gacctccag agccttggt 1500  
 gcagtggacc ccaaggccag cccctccacc cagagctgc tggcctctg ccatctcaga 1560  
 ggagcagcag ccatccagca ctgctctgt cactgggct cccaagtcc caggctggg 1620  
 cactagaaaa ggtcatcctg aggagcaggg ttccagaag gattcatcac gtgaaccaag 1680  
 gaccattcct cacattcccc gtgttaggg ctagggctc tcggagacaa ctgcaactct 1740  
 gtaacggagc tccccaccta ggtgggtgct agagcagttc tctaggttcc agatctgtg 1800  
 ggactggggg gactggccag agagggcaca gcagagcagg gtaggggaag ggcctgctc 1860  
 tctgaagacc taactgtcgc ctgtgtctcc agatggaacg ctgagcttat cctgtgtggc 1920  
 ctgcagccgc tcccccaact tcaagctct ctactggct ggcaatggt cctctcattg 1980  
 gcacctccca ggcgaactgt gggaggggag caccaggtga ggtcgcagc agccaggtg 2040  
 ttgggaagga agctctctg ggcctctca tgaccttcc ttcctctccg ctccagccg 2100  
 gaactgggga gcacaggtac gcagctgtgc aaggccttg tctggagca gctgacctc 2160  
 gccctgcaca gcaccaact ctctgtgtg ctctgggacc ctgaacaggt tgcctagct 2220  
 cagtgtctc tggccagct ctgggtgagg agcccaagga gaggctcca ggaacagag 2280  
 gagctctgct tccatagt gggaggaagg ggtgggctc gccagagcag cctgtgaact 2340  
 aatgccacg attcctcaag gtcagccaga caaaaaggaa cttaggtctt gggcagagga 2400  
 ggtgtagctt ggggcaaat gatgagatg cctctcttc ctggcctca tctgtctg 2460  
 ccttaactc ctaggtctg gctgagggca accctgccc ccaacccaga agcctgccc 2520  
 tccagccaca gcagctccaca gcagcagggt taagactcag cacaggcca gcacagcag 2580  
 aacctgacc agagcttggg tctactgt ctacctggag tgaacagct ctagctgct 2640  
 gtggctgcg tggatggca acacacccc tcttctctg ctttgggtcc ctctctcac 2700  
 caaatccaa tccattccc acctacctg aaatcacag cctcctata atgctcctc 2760  
 ctctgctcat tctcttcca cctatccatt agcttctcta agtctcat cctcactg 2820  
 ctctactgct cagaaccacc caaga tgtt gatgcttag cctgcaact cagggccca 2880  
 ctgca ttc ccatgact tctggaggc ctcccagta tctgtctt tcccagacag 2940  
 ctccactcc catgtctgt ctatttagt cccgtcttc tccagcccc agcaggaggaa 3000



49

75862

50

cgcctcaagcc tgggtgaatt gctgctctct cagtgaaatc atcctctctc agcctctggc 3060  
 gcatctctga gactctctat cctgctgctg tatgtttttt ttttccctcc tcaactataat 3120  
 ggactgtctcc agggaaagga tgggggcagc agctgctctg gatccacact gtatctgtgt 3180  
 catccccaac tgggtctctca taaaggatta tcaaaaggag gcatcctgac atctgttcat 3240  
 ttaggctcca gttccactcc caggaaacttt gctgttccca cgaggagtag tgggagagat 3300  
 ggactgcccac acagaagctg aagacaacac ctgcttccag ggaacacagc cgtttgaaaa 3360  
 agaaaaagaa gaacagccca taatgctccc cgggagcaga ggccactaat ggagagtggg 3420  
 aagagcctgg aaagatgtgg cctcaggaaa agggatgaga gaaaggaggt ggtatggaag 3480  
 actcagcagg aacaaggtag gcttcaaaaga gcttatattc ctctttttcc caacccgact 3540  
 aagtcacact agtactccag ggagaaaaat agactttatt tacaagtaat aacatttaga 3600  
 aaagatccat ccccgccctt taaaaacett cccatcaact caaatccac cccagtgcac 3660  
 gtctggggaa ggtagggtgt gagctgctgc tgaaggctgt ccccaaccc cactccctag 3720  
 accagggccc catccgtctt gggaaagagc atcctctggc aggtgtctcc accaggtcag 3780  
 acccagctct ggacttcaag agtgagggcc cctgctgggc ccagccacca ggacagcagg 3840  
 aaccaggccc taactctctt atgttccctt ctatagccag aggtctaaag gaaagctggc 3900  
 caggcccaag gaccocagca tcaaaaaccag cctcaaatct ggttgtgatg gagaagtgc 3960  
 ttctgtttaa gaaaaaagga ggcaaggttag ggagagcgcc cacactgtcc atgctccagg 4020  
 cccctggggc cagctcccgag aaggcgccagc tgaaggacca gggaccaggg cagggtcgcc 4080  
 gcaggcatca ctgtctctag ggttttggct actgttggcc tgggagctga gagaaggcac 4140  
 tgagagggtac agtagcgga ggaacaggtg acggcagcat cggggacaca ggtggggcca 4200  
 ctcaactggta ctggcccttt agtgcctttgc ctgaaaagaga cacagtcaca tggccagatg 4260  
 agaaacttgcg ataactagct gcaaccaact gctgggaaga tctcttctgc ctccacgccc 4320  
 cctgtctgga tccctctctt tctgagcccc agggttatca gttgctgctc gtcctcgagc 4380  
 agctctgggt gctctccatg agaattgggg catctgtctt ctctccctgg agaggagcta 4440  
 ccaggacagg gacacctctt accccacacc ctccacagc ctggcgtggc cccatcttgg 4500  
 atgctacttg tggggcggtt ctgggggggt ccatgctctc catcggtttt cctccccaac 4560  
 tctctccagt gctctcactt tggccttggc tggaggggtg gcaaccaatg cggcagcagt 4620  
 ggccgctcgt gctgtggtg ggtcactgct cggagaacgg cgggttccac tgcagatggt 4680  
 gggggaaagg ttggacaggg cctctcttga ggtctccccc cgcagaaggg tgttccctag 4740  
 ctctctgggt tctgttagga tcttgaaggg catcgactgc cgcctgctag cctgcaagg 4800  
 agggctgtca gaccgggaga cccaatgctg ccttcccagg ccagcgtgct gtcgcaagct 4860  
 gtaccagcaa ggtcccgcca gggcgtgctt tcatccctcc tcaagccacc cctcacctgt 4920  
 ttagttagaa ctggagctgc ttctctctg gctcagtag tgcctgtttt gcgcccctca 4980  
 tctcgtctct ggggagctat ggggctgtgg aaacagctgg tggcctctct agactataga 5040  
 gaaagaggaa gtaggcaga catagacaa aggaagtcaca tctgaagcca ggtgtctgtt 5100  
 cctctcagag ctgagtgga cttgtgaagc aacgtgcaac ctgctccctt tcccaactct 5160  
 gggccagatc cttcccttcc caacagttcc catccatggg tcaggccctt ggagagaggg 5220  
 aagagagagg ggaagttagg gaagagagaa gaaggtctcc tttagctctt ggtgagctgg 5280  
 gcctgacctg agcagagtg tggagtacaa cccaggagcc acccgcccta cctcaggagt 5340  
 tccaggggccc tgggtgggct ctaggagagc ccgttttgcg tgcctgcccgg tggtagtgc 5400  
 agtgccctcg gctatctgga ttgctgcat gctgctcgg cgcagggtct cttgggggtc 5460  
 tccagtttct atctctcat ctgtgatggt gccaggctc agggaaagct gcatgggtgg 5520  
 aagaggtggt cagtgagcca tagctgtat gagatggagg aggaacctgg gctgttccag 5580  
 aactctacac tgcgcccaga ctatagtgct ggaaccttcc tgctctacag gtgaaagac 5640  
 acaagctccc ttctctgtc tgctttctac ctaagccttg ggcataatgg acaagcagtg 5700  
 cagctctgac cagattctct tctgagctcc tgcctacccc cagggtactc accctcaggt 5760  
 gccctccagc tgcctgttcc accctgaaaca tgagaaggtc acccttccct ctcttcggcc 5820  
 agtcagtgat ccaggggccc agtgcctcag ctatagcagc aggtgggact ccaaggaagg 5880

gcaggagatg gaggccctgc acagtgaacc caggcctcac cctggactcc agggatagca 5940  
 ggtcttccga tgtggggggg acactcgatt gcgctgctgc agctctgcaa tgcggttcca 6000  
 gtcatccagg tctcaggctt catctcgcca agtgcccatg tagaagctgt tcttctctgt 6060  
 ggaaggcagg gaagtgggaa caaatgagcc tggagtctgc aggtcacctc ctggccctgg 6120  
 catcttgcca gcttttctg ccactatccc cataaacttg aagcccgcca caccagtctg 6180  
 attcagctgc gcagggtcag gactacggca cacagactat tctatccta ggggtctgct 6240  
 caccaccttc tccctggaga gggcagaaga ggtcacacgc agagactgct actacatctt 6300  
 attcaccctg caaggcttgg tggccaacac ccagaggaac aaattaagga ccgggaatta 6360  
 attcccaagg gctccctggt gccaaaagga caagagcttc caagaagagt ctggccagcc 6420  
 tggcctttcc agcagcccat caccgctgca gaaggcatg gaggactccc cacagctaa 6480  
 tgtcacaaat gtgctgggaa tcccgggccc ttaactctg ctaagagtgc cccaacaca 6540  
 gccagcccc agatgggcag gtaaggaaag cctcgaggtt gcaggaagga ggggcaggtg 6600  
 gagctggatg gtacgaagga ggcagccctt ggttttttaa aagcttctcc tcttttccct 6660  
 gtgccaagat ccaccttcca gtctaattt ggggtatagt aagtccctgt agtccctca 6720  
 cctggagggg cccactgga caccgggccc tgggaacgac gacgagaact gcgagtggtg 6780  
 gggcggtagc caggcaagct gacgagggct gactgtccat aatccggga acccagggca 6840  
 gctagagact gactagagga ggtggctgc aggtctagct ggaagcagg agcagacgcg 6900  
 gtgctgtaga acgataggtt ggcctgtctt ggtcttccca catctagctt ctggaagaca 6960  
 gactgaactc gtgtcaggtt acagtccctg gcatgtgaca gaagctctcc attcccttcc 7020  
 gaagccctca gatccacagg cactccatgt tattcccaac tgccttccaa aggtccctaa 7080  
 agtgtgtgtc tgcaagaaat gggccttctc gacagaagcc ctcaacaggt ggtgtgtatg 7140  
 ctgtcaagac tctctacgc attttttcca tggagtctat tcaatagctt ttgagtagg 7200  
 gaatgcagag tgtttatcg cccatttttg agatgaagt caaagaaata aagtactag 7260  
 ccccaaatca cactgctagg aagratcaga gctggggcta ggcctatgt cctctgacta 7320  
 gtcaggctca tcccacagcc tctgctgtcc ctacgtccaa acttccaggg cccctaccat 7380  
 gttccagaac ttcccccac ttcttggtag caggggggcac cctaaacaca caggtccccc 7440  
 ctgctgtacc agggggcccc tctccctccc tcccaaacct ccccttcaag atgtgaaac 7500  
 aaaggcaagg gctcgagctc tctcaggcag tccactgggc agcaacaatg cctctcagct 7560  
 gcatggggca tgcctggagg cacagagatg gctgcagctt ccgcacgctc tctcccttca 7620  
 ccttcacagc gctcagtgct acgcatggag agaatgctag ccttagtcag gaggcaggga 7680  
 tcaaatctca gccctgctct ttcttccaga agtgccctta accaagtca cgcctttttt 7740  
 aagactcttc agctttccca ctgtaacatg gactgtgtgc tcatccctcc ctgctcctga 7800  
 ctgagtgccc ag 7812

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; БЛОЖ

&lt;213&gt; ЛЮДИНА

&lt;400&gt; 10

Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser  
 1 5 10 15

Thr Lys Asp Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys  
 20 25 30

Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr  
 35 40

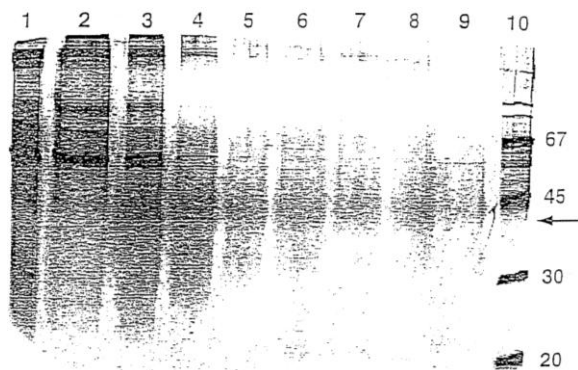


Fig. 1

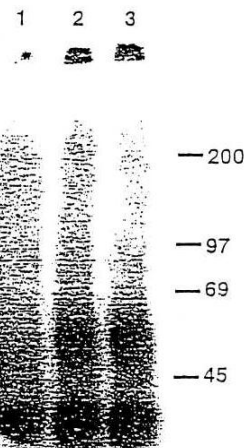


Fig. 2

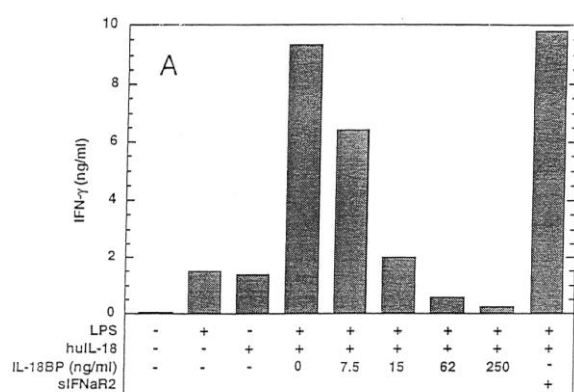


Fig. 3A

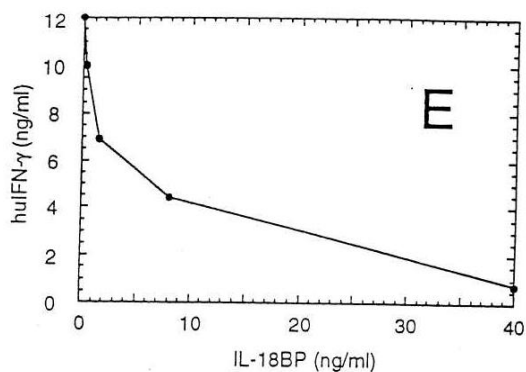


Fig. 3E

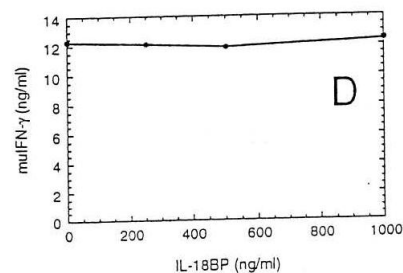
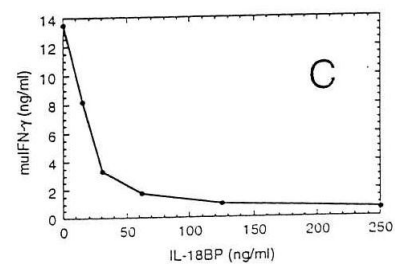
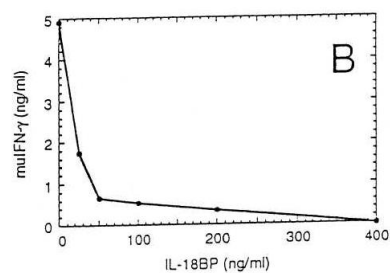


Fig. 3 B-D

1 GAGAAGAGGA CGTTGTCACA GATAAAGAGC CAGGCTCACC AGCTCCTGAC  
 51 GCATGCATCA TGACCATGAG ACACAACTGG ACACCAGACC TCAGCCCTTT  
 101 GTGGGTCTGT CTCCTGTGTG CCCACGTCTG CACTCTCTGT GTCAGAGCCA  
 151 CACCTGTCTC GCAGACCACC ACAGCTGCCA CTGCCTCAGT TAGAAGCACA  
 201 AAGGACCCCT GCCCTCCCA GCCCCAGTG TTCCAGCAG CTAAGCAGTG  
 251 TCCAGCATTG GAAATGACCT GGCCAGAGGT GGAAGTGCCA CTGAATGGAA  
 301 CGCTGAGCTT ATCCTGTGTG GCCTGCAGCC GCTTCCCAA CTTGAGCATC  
 351 CTCTACTGGC TGGGCAATGG TTCTTCTATT GAGCACCTCC CAGGCCGACT  
 401 GTGGGAGGGG AGCACCAGCC GGAACGTGG GAGCACAGGT ACGCAGCTGT  
 451 GCAAGGCCTT GGTGCTGGAG CAGCTGACCC CTGCCCTGCA CAGCACCAC  
 501 TTCTCCTGTG TGCTCGTGA CCCTGAACAG GTTGTCAGC GTCACGTCTG  
 551 CCTGGCCAG CTCTGGGCTG GGCTGAGGC AACCTTGCC CCCACCCAAG  
 601 AAGCCCTGCC CTCCAGCCAC AGCAGTCCAC AGCAGCAGGG TTAAGACTCA  
 651 GCACAGGGCC AGCAGCAGCA CAACCTTGAC CAGAGCTGG GTCTACCTG  
 701 TCTACCTGGA GTGAACAGTC CCTGACTGCC TGTAGGCTGC GTGGATGCGC  
 751 AACACACCCC CTCCTTCTCT GCTTTGGGTC CTTCTCTCA CCAAATTCAA  
 801 ACTCCATTCC CACCTACCTA GAAAATCACA GCCTCCTTAT AATGCCTCCT  
 851 CCTCTGCCA TTCTCTCTCC ACCTATCCAT TAGCCTTCTT AACGCTCTAC  
 901 TCCTCACACT GCTCTACTGC TCAGAAACCA CCAAGACTGT TGATGCTTA  
 951 GCCTTGCACT CCAGGGCCCT ACCTGCATT CCCACATGAC TTCTGGAAG  
 1001 CCTCCCAACT ATTCTTGCTT TTCCAGACA GCTCCCACTC CCATGTCTCT  
 1051 GCTCATTAG TCCCGTCTTC CTCACCGCCC CAGCAGGGGA ACGCTCAAGC  
 1101 CTGGTIGAAA TGCTGCTCTC TCAGTGAAGT CATCTCTTT CAGCTCTGGC  
 1151 CGCATTCTGC AGACTTCTTA TCTTCGTGCT GTATGTTTT TTTTCCCCC  
 1201 TTCACTCTAA TGGACTGTC CAGGGAAGGG ATGGGGGCAC CAGCTGCTTC

Fig. 4.

1251 GGATCCACAC TGTATCTGTG TCATCCCCAC ATGGGTCTCTC ATAAAGGATT  
1301 ATTCAATGGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLVRATP VSQTTTAATA SVRSTKDP  
51 SQPPVFPAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFISILYWL  
101 NGSFIEHLP RLWEGSTSRE RGSTGTQLCK ALVLEQLTPA LHSTNFSCVL  
151 VDPEQVVQRH VVLAQLWAGL RATLPPTQEA LPSSHSSPQQ QG

Fig. 4A

1 MRHNWTPD LSPLWVLLC AHVVTLLVRA TPVSQTTTAA TASVRSTKDP  
49 CPSQPPVFPA AKQCPALEVT WPEVEVPLSW AEGNLAPIPR SPALQPQQST  
99 AAGLRLSTGP AAAQP\*

Fig. 5A

1 GAGAAGAGGA CGTTGTCACA GATAAAGAGC CAGGCTCACC AGCTCCTGAC  
51 GCATGCATCA TGACCATGAG ACACAACTGG ACACTACAGC TCAGCCCTTT  
101 GTGGGTCTCTG CTCCTGTGTG CCCACGTCGT CACTCTCCTG GTCAGAGCCA  
151 CACCTGTCTC GCAGACCACC ACAGCTGCCA CTGCCTCAGT TAGAAGCACA  
201 AAGGACCCCT GCCCCTCCCA GCCCCCAGTG TTCCAGCAG CTAAGCAGTG  
251 TCCAGCATTG GAAGTGACCT GGCCAGAGGT GGAAGTGCCA CTGAGCTGGG  
301 CTGAGGGCAA CCTTGCCCCC CACCAAGAA GCCCTGCCCT CCAGCCACAG  
351 CAGTCCACAG CAGCAGGTTT AAGACTCAGC ACAGGGCCAG CAGCAGCACA  
401 ACCTTGACCA GAGCTTGGGT CCTACCTGTC TACCTGGAGT GAACAGTCCC  
451 TGACTGCCTG TAGGCTGCGT GGATGCGCAA CACACCCCTT CTTCTCTGTC  
501 TTTGGGTCCC TTCTCTACC AAATTCAAAC TCCATTCCTA CCTACCTAGA  
551 AAATCACAGC CTCCTTATAA TGCTCTCTCC TCCTGCCATT CTCTCTCCAC  
601 CTATCCATTA GCCTTCTAA CGTCCTACTC CTCACACTGC TCTACTGCTC  
651 AGAAACCACC AAGACTGTTG ATGCTTAGC CTTGCACTCC AGGGCCCTAC  
701 CTGCATTTC CACATGACTT TCTGGAAGCC TCCCAACTAT TCTTGCTTTT  
751 CCCAGACAGC TCCCACTCCC ATGTCTCTGC TCATTTAGTC CCGCTCTCCT  
801 CACCGCCCCA GCAGGGGAAC GCTCAAGCCT GGTGAAATG CTGCCTCTTC  
851 AGTGAAGTCA TCCTCTTCA GCTCTGCGC CATTCTGCAG ACTTCCTATC  
901 TTCGTGCTGT ATGTTTTTTT TTTCCCTT CACTCTAATG GACTGTTCCTA  
951 GGGAGGGAT GGGGGCACCA GCTGCTTCGG ATCCACACTG TATCTGTGTC  
1001 ATCCCCACAT GGGTCTCAT AAAGGATTAT TCAATGGA

Fig. 5

1 GAATTCGCGG CCGGTCGAC GCCAGAGGG CTAGGATGAG AGACAGAGGG  
51 TGTGATGGTG GGTGCTGGGA AATGTACCG ACCTTGGGGC TGGTGGCTGG  
101 GGGAGTGGGT AGCCTGGGA AGGCCAGGAT GTGGACGGAC TGGTATGGCA  
151 TTGAGCTGA AGTGGTCCAA CTTGGGGTTC CCCAGTGCCT AGGAAAGTTG  
201 TCCCTTGAA TGTCAGTGTG AAGGTGAAG AGGAAGCAGA TGCCTGTTCA  
251 TATGGAACA AAGACCTGGC TGTGAAGAG GGAGCGGAC ACCAAAGTCC  
301 TGACACTTGG GCGGGACAGA ATTGATCTGT GAGAGACTCA TCTAGTTTAT  
351 ACCCTAGGTG ACCCTGGGGG TGGCATGGGG GTAGATTAGA GATCCAGTC  
401 TGGTATCTC TGGAGAGTAG GAGTCCCAGG AGCTGAAGGT TTCTGCCCAC  
451 TGAACCTTGG CTAAGCACA GGTGTCACAG CTGCTCAAGA TTCCCTGGTT  
501 AAAAAGTGAA AGTGAAATAG AGGGTCGGGG CAGTGCTTTC CCAGAAGGAT  
551 TGCTCGGCAT CCTGCCCTTC CCAGAAGCAG CTCTGGTGCT GAAGAGAGCA  
601 CTGCCTCCCT GTGTGACTGG GTGAGTCCAT ATTCTCTTT TGGGTCTCAA  
651 TTTTGCTTC CTAATGAAG GGGTAAGATT GGAAGGTA AGCATCTTAC  
701 AACCATTGT GGTATGAGA GCTGGGGTGG GGAAGGATTG TCACCTGACC  
751 CCCCCAGTC TGTTCCTAAG TGCTGAAAGA GCTCCAGGCT ATGCTACGGG  
801 AGGAGAAGCC AGCTACTGAG GAAAAGCCAG CTAAGAGAA AAAGCGGGAG  
851 TGGTTACCA TTCTCTCCC CCACCTTCA CCAGAGAAGA GGACGTTGTC  
901 ACACATAAAG AGCCAGGCTC ACCAGCTCCT GACGCATGCA TCATGACCAT  
951 GAGACACAAC TGGACACCAG ACCTCAGCCC TTTGTGGTTC CTGCTCTGT  
1001 GTGCCCCAGT CGTCACTCTC CTGGTCAGAG CCACACCTGT CTCGCAGACC  
1051 ACCACAGCTG CCACTGCCTC AGTTAGAAGC ACAAGGACC CCTGCCCTC  
1101 CCAGCCCCCA GTGTCCAG CAGCTAAGCA GTGTCCAGCA TTGGAAGTGA  
1151 CTTGCCAGA GGTGGAAGTG CCACTGAATG GAACGCTGAG CTTATCTGT  
1201 GTGGCCTGCA GCGCTTCCC CAACTTCAGC ATCTCTACT GGCTGGGCAA

Fig. 6

1351 TGGTTCCTTC ATTGAGCACC TCCCAGGCCG ACTGTGGGAG GGGAGCACCA  
 1301 GCCGGGAACG TGGGAGCACA GGTACGCAGC TGTGCAAGGC CTGGTGCTG  
 1351 GAGCAGCTGA CCCCTGCCCT GCACAGCACC AACTTCTCCT GTGTGCTCGT  
 1401 GGACCTGAA CAGGTTGTCC AGCGTCACGT CGTCTGGCC CAGCTCTGGG  
 1451 TGAGGAGCCC AAGGAGAGGC CTCAGGAAC AGGAGGAGCT CTGCTTCCAT  
 1501 ATGTGGGGAG GAAAGGGTGG GCTCTGCCAG AGCAGCCTGT GAACTAATGC  
 1551 CCAGCATTCG TCAAGGTCAG CCAGACAAAA AGGAACTTAG GTCTTGGGCA  
 1601 GAGGAGGTGT AGCGTGGGC AAAGTGATGA GATGTCCCTC TTTCCTTGG  
 1651 CCTGATCCTT GTCTGCCTTC ACTTCCCTAG GCTGGGCTGA GGGCAACCTT  
 1701 GCGCCCAACC CAAGAAGCCC TGCCCTCCAG CCACAGCAGT CCACAGCAGC  
 1751 AGGGTTAAGA CTCAGCAGAG GGCAGCAGC AGCACAACCT TGACCAGAGC  
 1801 TTGGGTCTCA CTTGTCTACC TGAAGTGAAC AGTCCCTGAC TGCTGTAGG  
 1851 CTGGGTGGAT GCGCAACACA CCCCCTCTTT CTCTGCTTTG GGTCCTTCT  
 1901 CTCACCAAAAT TCAAACTCCA TTCCCACTA CTAAGAAAAAT CACAGCTCC  
 1951 TTATAATGCC TCCTCTCTCT GCCATTCTCT CTCACCTAT CCATTAGCCT  
 2001 TCCTAACGTC CTACTCTCTA CACTGTCTA CTGCTCAGAA ACCACCAAGA  
 2051 CTGTTGATGC CTTAGCCTTG CACTCCAGGG CCCTACCTGC ATTTCCACCA  
 2101 TGACTTTCTG GAAGCCTCCC AACTATTCTT GCTTTCCCA GACAGCTCCC  
 2151 ACTCCCATGT CTCTGTCTAT TTAGTCCCGT CTTCTCTACC GCCCAGCAG  
 2201 GGAACGCTC AAGCCTGGTT GAAATGTGTC CTCTTCAGTG AAGTATCCT  
 2251 CTTTCAGCTC TGGCCGCAAT CTGCACTT CTAATCTTCG TGCTGTATGT  
 2301 TTTTITTTTC CCCCTTCACT CTAATGGACT GTTCCAGGGA AGGGATGGGG  
 2351 GCAGCAGCTG CTTGGATCC ACATGTATC TGTGTATCC CCACATGGGT  
 2401 CCTCATAAAG GATTATTCAA TGGAGGCATC CTGACATCTG TTCATTTAGG  
 2451 CTTCAAGTCC ACTCCAGGA ACTTGGCTG TCCACGAGG GAGTATGGGA  
 2501 GAGATGGACT GCCACACAGA AGCTGAAGAC AACACCTGCT TCAGGGGAAC

Fig. 6A

3851 ATGCGCGGAG AACGGCGGT TCCACTGCGA GTGTTGGGGG AAGCCTTGGG  
 3901 CAGGGCCTTC TTTGAGGCTC CCCGCCGAG AAGGCTGTTT CCTAGCTTCT  
 3951 TGGGTGTTT GAGGATGCTG AAGGCCATCG ACTGGCGCCG GTCAGCCTGC  
 4001 AAGGAAGGGC TGTCAGACCG GGAGACCCAA TGCTGCCCTC CCAGGCCAGC  
 4051 GTGCTGTGCC ACGCTGTACC AGCAAGGTCC CGCCAGGGCG TCGCTTCATC  
 4101 CCCCTTCAAG CCCAGCCTCA CCTGTTTAGT AGAAGCTGGA GCTGCTTCT  
 4151 TCTGGGCTC AGTAGTGCTC TGTTTGGCCG CTTATGTGCG GTCTCGGGGA  
 4201 GTCATGGGGC GTGGGAACCA GCTGGTGGCC TTCTTAGACT ATGAGAAGA  
 4251 GGACAGTTAG GCAGACAGTA GCAAGAGGAG TCACATCTGA AGCCAGGTGT  
 4301 CTTGTCTCTC CAGAGCTGAG TGAACCTTGT AAGTCAACGT GCAACCTGCT  
 4351 CCCCTTCCA ACTCTGGGC AGATCTTCC TTCCCAACA GTTCCCATCC  
 4401 ATGGGTCAAG CCCTTGGAGA GAGGAAAGA GAGGGGAAG TGAGGGAAGG  
 4451 AGAGAGAAGG CTCCTTTAG TCCTTGGTGA GCTGGGCTG ACCTGAGCAC  
 4501 AGTGTGGAG TAACACCCAG GAGCCACCGC GCCTACCTCA GGAGTTCAG  
 4551 GGCCCTGGTG GGGCTCTAGG GAGACCCGTT TGCCTGCTG CCGGTTGGTG  
 4601 ATGCCAGTGC CECTGGCTAT CTGGATTGGC TGCATGTGG CTCGGCGCAG  
 4651 GGTCTCTTGG GGGTCTCCAG TTTTATCTC CTCATCTGTG ATGGTGCCCA  
 4701 GGCTCAGGGA AGGCTGCATG GGTGGAAGAG GTGGTCAGTG GACCATAGCT  
 4751 GTATGGAGAT GGAGGAGGAC CTGGGGCTGT TCCAGAACTC TACACTCGCC  
 4801 CGACACTTAT GGTGGGACC CTTCTGCTC ACGAGGTAGA AAGACACAAG  
 4851 CCTCCTTCC TGTTCTGCTT TCTACCTAAG CCCTGGGCAA ATGGCACAAG  
 4901 CAGTGCAGTC CTGACCAGAT TCCTCTCTGA GCTCTGCTC ACCCCAGGG  
 4951 ACTTACCCCT TGAGTGCCCT CCAGCTGTCT GTTCCACCTG GAACATGAGA  
 5001 AGGTACCCCT TTCCCTCTT CGGCCAGTCA GTGATCCAGG GCCTAGTGC  
 5051 TCAGGCTAGA TCAGAGGTG GGAATCCAAG GAAGGGCAGG GATGGGAGGC  
 5101 CCTGCACAGT GACCCAGGC CTCACCTGG ACTCCAGGGA TAGCAGTCT

Fig. 6C

2551 ACAGGCGCTT GAAAAAGAAA AGAGAGAACA GCCCATAATG CTCGCCGGGA  
 2601 GCAGAGGCCA CTAATGGAGA GTGGGAAGAG CCTGGAAGA TGTGGCTCA  
 2651 GAAAAAGGA TGAGAGAAAG GAGGTGGTAT GGAAGACTCA GCAGGAACAA  
 2701 GGTAGGCTTC AAAGAGCCTA TATCTCTT TTTCCACAC CGATCAAGTC  
 2751 AACTCAGTAC TCACGGGAGA AAAATAGACT TTATTACAA GTAATAACAT  
 2801 TTAGAAAAGA TCCA TCCCCG GCCCTTAAAA ACCTTCCCAT CACTCCAAAT  
 2851 CCCACCCAG TGCAAGTCTG GGAAGGTAG GGTGTGAGCT GCTGCTGAAG  
 2901 GCTGTCCCC AACCCCTC CTGAGACACA GGGCCATCC GTCTGGGAA  
 2951 AGAGCATCCT CTGGCAGGTG CTCACCAGG GTCAGACCCA GTCTGGACT  
 3001 TCAAGAGTGA GGGCCCTGC TGGGCCAGC CACCAGGACA GCAGGAACCA  
 3051 GGGCTACTC CTCTTATGCT CCCTTCTAGA TCCAGAGGT AAGAGGAAGA  
 3101 CTGGCCAGGC CCAAGGACC AGCATCAAA ACCAGCTCA AATCTGGTTG  
 3151 TGATGGAGAA GTGACTTTGC TTTAAGAAAA AAGGAGGCAA GGTAGGAGA  
 3201 GCGCCACAC TGTCATGCT CCAGGCCCC TGGGCCAGT CCGAGAAGGC  
 3251 GCCAGTGAAG GACCAGGAG CAGGCCAGG TCGGGCAGG CATCACTGTC  
 3301 TCTAGGGGTT TGGCTACTGT TGGCTGGGA GCTGAGAGAA GGCAGTGA  
 3351 GGGACAGTAG GCGGAGGACC AGGTGACGGC AGCATCGGG ACACAGGTGG  
 3401 GGCCACTCAC TGGTACTGGC CCTTTAGTGC TTGCTGAA AGAGACACAG  
 3451 TCACATGGCC AGATGAGAAC TTGCATACT AGCTGCACC CACTGGTGG  
 3501 GAAGATCTCT TCCTGCTCCC ACGCCCTGT CTGGATCCCC TCCTTGTGA  
 3551 GCGCCAGGT TATCAGTTGC TGGCTGTGCG TGAGCAGCTC TGGGTGCTCT  
 3601 CCATGAGAAAT GGGGCCATCT GTCTTCTCTC CTTGGAGAGG AGCTACCAGG  
 3651 ACAGGGACAC CTCTTACCCC ACACCTCCA GCAGCTGGC GTGGCCCAT  
 3701 CTTGGATGCT ACTTGGTGG GCGGTCTGG GGTGCCCAT GCTCTCATCG  
 3751 GGTTCCTCT CCCCATCTG CCAGTGCTC TACCTTGCC TTGGCTGAG  
 3801 GGGTGGCACC AATGGCGCA GCAGTGGCG CGCTGGCTGT GGTGGTGGCA

Fig. 6B

5151 TCAGATGTGG GGGGCACACT CGATTGCTG GCTGCAGCTC TGCAATGCGG  
 5201 TTCCAGTCAT CCAGCTGCTC AGGCTCATCC TGGCAAGTGC CCATGTAGAA  
 5251 GCTGTTCTT CCTGTGGAAG GCAGGGAAGT GGAACAAAT GAGCCTGGAG  
 5301 TCGGCAGGTC ACCTCCTGGC CTTGGCATCT TGCCAGCCTT TGCTGCCACC  
 5351 TACCCATAA ACTTGAAGCC CGGCACACCA GTCTGATTCA GTGCCGAGG  
 5401 TGCAAGGAGTA CGGCACACAG ACTATTCTA TCCTAGGGGC TTGCTCACCA  
 5451 CTTCTCCCT GGAGAGGGCA GAAGAGGTCA CACGCAGAGA CTGCTACTAC  
 5501 ATCTTATTCA CTTGCCAAGG CTTGGTGGCC AACACCCAGA GGAACAAATT  
 5551 AAGGACCGGG AATTAATTC CAGGGGCTCC CTGGTGCCCA AAGGACAAGA  
 5601 GCTTCCAAGA AGAGTCTGGC CAGCTGGCC TTTCCAGCAG CCCATCACCG  
 5651 CTTGAGAAGG GCATGGAGGA CTCCCCACAG CTAAGTGTCA CAATTGTGCT  
 5701 GGGAAATCCG GGGCTTAACT CTGGCTAAG AGTGCCCCCA ACACAGCCAG  
 5751 CCCCTAGATG GGCAGGTAAG GAAGGCCCTG AGGCTGCAGG AAGGAGGGGC  
 5801 AGGTGGAGCT GGATGGTAGC AAGGAGGCCA GCCTTGGATT TTTAAAAAGC  
 5851 TTTCTCTTT TCCTGTGCC ACGATCCACC TTCCAGTCTA ATTTTGGGGT  
 5901 ATAGTAAGTC CCTGTAGTCC CCTCACCTGG AGGGGCCCCA CTGGACACCC  
 5951 CGGCTGGGA ACGACGAGCA GAACTGCGAG TGGTGGGGCG GTAGCCAGGC  
 6001 AAGCTGAGCA GGGCTGACTT GCCATAATCG GGAGAACCCA GGCAGCTAG  
 6051 AGACTGAGTA GAGGAGGTGG CTCGAGGCT AGCCTGGGAA GCAGGAGCAG  
 6101 ACCCGTGCT GTAGAACGAT GAGTGGCGC TGTCTGGCTC TTCCATCTCT  
 6151 AGCTTCTGGA AGACAGAGTG AATCTGTTC AGTGACAGT CCCTGGCACT  
 6201 GTACAGAAGC TTCCATTCC CTTCCGAAGC CCTCAGATCC CACGGACAT  
 6251 CCATGTATTC CCAACTGCTT TGCAAAGGTC CTTAAAGTGT GTGCTGCAA  
 6301 GAAATGGGCC TTGTCGACAG AAGCCCTCAC AAGGTGGTGC TGATGTTGTC  
 6351 AAGACTCTTC TACGCATTTT TTCAAGGAG TCTATTCTA ATGCTTGGAG  
 6401 GTAGGGAATG CAGAGTGTTT ATCGGCCCAT TTTGGAGATG AAGTGCAAG

Fig. 6D

6451 AAATAAAGTG ACTAGCCCCA AATCACACTG CTAGGAAGTA TCAGAGCTGG  
 6501 GGCTAGGCCC CATGTCTCT GACTAGTCAG GCTCATCCCA CAGCCTCTGC  
 6551 TGTCCCTCAG TCCAACTTC CAGGCCCCCTT ACCATGTTCC AGAACTTCCC  
 6601 CCAACTTCTT GGTAGCAGGG GGCACCTAA ACACACAGGT CCCCCCTGCT  
 6651 GTACCAGGGG CCCCCTCTCC CTTCTCTCCA AACCTCCCCT TCAAGATGTG  
 6701 GAAACAAAGG CAAGGGCCTG CAGCCTGTCA GGCAGTCCAC TGGGCAGCAA  
 6751 CAATGCCTCT CAGCTGCATG GGGCATGCTG GGAGGCACAG GATGGGCTGC  
 6801 AGCTTCGCCA CGTTCTCTCC CTTACCCCTG CACAGGTCA GTGCTACGCA  
 6851 TGGAGAGAAT GCTAGCCTTA GTCAGGAGGC AGGGATCTAA TCCTAGCCCT  
 6901 GCCTTTTTCT TCAGAAATGC CCTTAACCAA GTCAGTGCCC TTTTAAAGAC  
 6951 CTCTCAGTT TCCCACTGTA ACATGGACTG GCTGCTCATC CCTCCCTGCT  
 7001 CCTGACTGAG TGCCAGTGC AAAGATGCCC TTGAGAGGAA GTGGGAATTG  
 7051 CTGACCTGTC GAC

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLVLRATP VSQTTTAATA SVRSTKDPCP  
 51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSILYWL  
 101 NGSFIEHLP RLWEGSTSRE RGSTGTQLCK ALVLEQLTPA LHSTNFQVCL  
 151 VDPEQVVQRH VVLAQLWVRS PRRGLQECEE LCFHMWGGKG GLCQSSL

Fig. 6E

1201 AAGGGATGGG GGCAGCAGCT GCTTCGGATC CACACTGTAT CTGTGTCATC  
 1251 CCCACATGGG TCCTCATAAA GGATTATTCA ATGGAGGCAT CCTGACATCT  
 1301 GTCCATTAG GCTTCAGTTC CACTCCAGG AACTTTGCCT GTCCACGAG  
 1351 GGAGTATGGG

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLVLRATP VSQTTTAATA SVRSTKDPCP  
 51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSILYWL  
 101 NGSFIEHLP RLWEGSTSRE RGSTGWAEGN LAPHPRSPAL PQQSTAAGL  
 151 RLSTGPAAAP

Fig. 7A

1 GCGGCCGCGT CGACCACGCA GCTAAACACA GCTAACTTGA GTCTTGAGC  
 51 TCCTAAAGGG AAGCTTCTGG AAAGGAAGGC TCTTCAGGAC CTCTTAGGAG  
 101 CCAAAGAAGA GGACGTTGTC ACAGATAAAG AGCCAGGCTC ACCAGCTCCT  
 151 GACGCATGCA TCATGACCAT GAGACACAAC TGGACACCAG ACCTCAGCCC  
 201 TTTGTGGGTC CTGCTCCTGT GTGCCCCAGT CGTCACTCTC CTGGTCAGAG  
 251 CCACACCTGT CTCGCAGACC ACCACAGCTG CCACTGCCTC AGTTAGAAGC  
 301 ACAAAGGACC CCTGCCCTC CCAGCCCCCA GTGTTCCCA GAGCTAAGCA  
 351 GTGTCCAGCA TTGGAAGTGA CCTGGCCAGA GGTGGAAGTG CCACTGAATG  
 401 GAACGCTGAG CTTATCCTGT GTGGCCTGCA GCCGCTTCCC CAACTTCAGC  
 451 ATCCTCTACT GGCTGGGCAA TGGTTCCTTC ATTGAGCACC TCCCAGGCCG  
 501 ACTGTGGGAG GGGAGCACCA GCCGGGAACG TGGGAGCACA GGCTGGGCTG  
 551 AGGGCAACCT TGCCCCCACC CCAAGAAGCC CTGCCCTCCA GCCACAGCAG  
 601 TCCACAGCAG CAGGGTTAAG ACTCAGCACA GGCCACGAG CAGCACAAAC  
 651 TTGACCAGAG CTTGGGCTCT ACCTGTCTAC CTGGAGTGAA CAGTCCCTGA  
 701 CTGCCTGTAG GCTGCGTGGA TGGCAACAC ACCCCCTCTC TCTGTCTTT  
 751 GGGTCCCTTC TCTACCCAAA TTCAAaCTCC ATTCACCT ACCTAGAAAA  
 801 TCACAGCTC CTTATaATGC CTCCTCTCC TGCCATTCTC TCTCCACCTA  
 851 TCCATTAGCC TTCTAAAGCT CTTACTCTTC ACACCTCTC ACTGCTCAGA  
 901 AACCACCAAG ACTGTTGATG CTTAGCCTT GCATCCAGG GCCCTACCTG  
 951 CATTTCACAC ATGACTTTCT GGAAGCCTCC CAACTATTCT TGCTTTTCCC  
 1001 AGACAGCTCC CACTCCCATG TCTTGCTCA TTAGTCCCG TCTTCTCAC  
 1051 CGCCCCAGCA GGGGAACGCT CAAGCCTGGT TGAATGCTG CCTCTTCAGT  
 1101 GAAGTCATCC TCTTTCAGCT CTGGCCGATC TCTGCAGACT TCCTATCTTC  
 1151 GTGCTGTATG TTTTTTTTTT CCCCCCTCAC TCTAAIGGAC TGTTCCAGGG

Fig. 7

1 GTCGACGGTA CCCCCGGAA AGATTTAATA CGACTACTA TAGGGCGGGA  
 51 CAGAATTGAT CTGTGAGAGA CTCATCTAGT TCATACCTA GGTGACCTG  
 101 GGGGTGGCAT GGGGGTAGAT TAGAGATCCC AGTCTGGTAT CCTCTGGAGA  
 151 GTAGGAGTCC CAGGAGCTGA AGGTTTCTGG CCACTGAACT TTGGCTAAG  
 201 CAGAGGTGTC ACAGCTGCTC AAGATTCCCT GGTTAAAAAG TGAAAGTGAA  
 251 ATAGAGGGTC GGGGCAGTGC TTTCCAGAA GGATTGCTG GCATCCTGCC  
 301 CTTCCAGAA GCAGCTCTGG TGCTGAAGAG AGCACTGCCT CCTGTGTGA  
 351 CTGGGTGAGT CCATATTCTC TCTTTGGGTC TCAATTTTC CTTCCCTAAT  
 401 GAAGGGGTAA GATTGGACTA GGTAAGCATC TTACAACCAT TTGTGTGCTAT  
 451 GAGAGCTGGG GTGGGAAGG ATTGTCATT GACCCCCCA GCTCTGTTTC  
 501 TAAGTGCTGA AAGAGCTCCA GGCTATGCTA CGGGAGGAGA AGCCAGCTAC  
 551 TGAGGAAAAG CCAGCTACTG AGAAAAAGCG GGAGTGGTTT ACCATTCTCC  
 601 TCCCCACCT TTCACCAGAG AAGAGGACGT TGTCACACAT AAAGAGCCAG  
 651 GCTCACCAGC TCCTGACGCA TGCATCATGA CCATGAGACA CAACTGGACA  
 701 CCAGGTAGGC CTTGGGGCTA CGCATGGGCA GGCGGGGTAG GGTGAGGTCT  
 751 ATGAACAGAA TGGAGCAATG GGCTAACCCG GAGCTTTCAC TCCAAGGCAA  
 801 ACCACCCAGC GCACCTGGTG CTGTTGCTTT AAGAACCTGG GCAGATATTG  
 851 TAGCTCTGGC TCCAGTCTAA AGCTTCTCTG TACTCTGTT CATAAAGGGC  
 901 TAAGGGGTGG GTGCTGAGGG GTCCCTCTTC CCGCTCTAT TCCTTGCTA  
 951 GAACCCAGAC ATCTCTGGG TGGAGTTACA TCCTTACCC GGCAGCCCCAC  
 1001 TCTGTCTCA GAGCCGCTGA CCTGTAAGT TCCTTCTCTC AGACCTCAGC  
 1051 CCTTTGTTGG TCCTGCTCT GTGTGCCAC GTCTCACTC TCCTGGTCAG  
 1101 AGCCACACCT GTCTCGCAGA CCACCACAGC TGCCACTGCC TCAGTTAGAA  
 1151 GCACAAAGGA CCCCTGCCCC TCCCAGCCCC CAGTGTTCCTC AGCAGCTAAG

Fig. 8

1201 CAGTGTCCAG CATTGGAAGT GACCTGGCCA GAGGTGGAAG TGCCACTGAG  
 1251 TAAGAAGCAC AGTGGTGGAG GGTGGGCTAT GGGCACAGAG GTTCCCAGGG  
 1301 TCGGGTTGAC TCCTGAGCGC CAGTCCCCTT CTGCCCATGT ACCACCAGCT  
 1351 GAGCCAGCTG GGCTGAGCAC GCACCATCTT CCCTCCCCAA CCCAGTGTCA  
 1401 TGGGTGCAGG CTTGGCGCAG CTCCCAAGAT GCTCCCTATC AAATAGGACA  
 1451 GAGAACTCAA GACATAAGTA ATGGTCACAG GACCTCCAG AGCCTTGGTT  
 1501 GCAGTGGACC CCAAGGCCAG CCCCTCCACC CAGAGCCTGC TGGCCTCTGG  
 1551 CCATCTCAGA GGAGCAGCAG CCATCCAGCA CTGCCTCTGT CACCTGGGCT  
 1601 CCCAAGTCAC CGAGGCTGGG CACTAGAAAA GGTATCCTCT AGGAGACAGG  
 1651 TTCAGAAAG GATTATCATC GTGAACCAAG GACCATTCTT CACATTCCCC  
 1701 GTGTTTAGGG CTAGGGCCTC TCGGAGACAA CTGCATTCT GTAACGGACG  
 1751 TTCCACCTA GGTGGTGTGC AGAGCAGTTC TTAGGTTCC AGATGCATGG  
 1801 GGACTGGGGG GAGCTGGCAG AGAGGGCACA GCAGAGCAGG GTAGGGGAAG  
 1851 GGCCTGTCT TCTGAAGAGC TAACTGTCTG CTGTGTCCCT AGATGGAACG  
 1901 CTGAGCTTAT CCTGTGTGGC CTGCAGCCGC TTCCCAACT TCAGCATCTT  
 1951 CTACTGGCTG GGCAATGGTT CTTCTATTGA GCACCTCCCA GGCCGACTGT  
 2001 GGGAGGGGAG CACCAGGTGA GGGTCGCAGC AGCCAGGTGG GTGGGAAGGA  
 2051 AGCCTTCTGC GGCCTTCTCA TGACCTTTCC TTCCCTTCCG CTCCAGCCGG  
 2101 GAACGTGGGA GCACAGGTAC GCAGCTGTGC AAGGCCTTGG TGCTGGAGCA  
 2151 GCTGACCCCT GGCCTGCACA GCACCAACTT CTCTGTGTG CTCGTGGACC  
 2201 CTGAACAGGT TGTCAGCGT CACGTCTGTC TGGCCCACT CTGGGTGAGG  
 2251 AGCCCAAGGA GAGGCCTCCA GGAACAGGAG GAGCTCTGCT TCCATATGTG  
 2301 GGGAGGAAAG GGTGGGCTCT GCCAGAGCAG CCGTGTGAAT AATGCCCAAG  
 2351 ATTCTCAAG GTCAGCCAGA CAAAAGGAA CTTAGGTCTT GGGCAGAGGA  
 2401 GGTGTAGCCT GGGGCAAGT GATGAGATGT CCTCCTTTC CTTGGCCTGA  
 2451 TCCTTGCTG CTTTCACTTC CTTAGGCTGG GCTGAGGGCA ACCTTGCCCC

Fig. 8A

3801 AGTGAGGGCC CCGTCTGGGC CCAGCCACCA GGACAGCAGG AACAGGGCC  
 3851 TACTCTCTT ATGTCCTCTT CTAGATCCAG AGGCTAAGAG GAAGACTGGC  
 3901 CAGGCCCAAG GACCCAGCCA TCAAAACCAG CCTCAAATCT GGTGTGTATG  
 3951 GAGAAGTGAC TTTGCTTTAA GAAAAAGGA GGCAAGGTAG GGAGAGCGCC  
 4001 CACACTGTCC ATGTCTCAGG CCCCTGGGC CAGCTCCGAG AAGGCGCCAG  
 4051 TGAAGGACCA GGGACCGAGC CAGGGTGGG GCAGGCATCA CTGTCTCTAG  
 4101 GGGTTTGGCT ACTGTTGGCC TGGGAGCTGA GAGAAGGCAC TGAGAGGGAC  
 4151 AGTAGGCGGA GGACCAAGTG ACGGCAGCAT CGGGACACA GGTGGGGCCA  
 4201 CTCACTGGTA CTGGCCCTTT AGTGCTTTGC CTGAAAGAGA CACAGTCACA  
 4251 TGGCCAGATG AGAACTTGCG ATACTAGCCT GCACCCACTG GCTGGGAAGA  
 4301 TCTCTTCTG CTCCACAGCC CCGTCTGGA TCCCTCCCT TGTGAGCCCC  
 4351 AGGGTTATCA GTTGCTGGCT GTGCCTGAGC AGCTCTGGGT GCTCTCCATG  
 4401 AGAATGGGGC CATCTGTCTT CTCTCTTGG AGAGGAGCTA CCAGGACAGG  
 4451 GACACCTCTT ACCCCACACC CTCCAGCAGC CTGGCGTGGC CCCATCTTGG  
 4501 ATGCTACTTG GTGGGGCGGT CTGGGGGGTG CCCATGTCTT CATCGGGTTT  
 4551 CCCTCCCCCA TCCTGCCAGT GCCTCTACCT TGCCCTTGGC TCGAGGGGTG  
 4601 GCACCAATGG CGGCAGCAGT GCGGGCGCTG GCTGTGGTGG TGGCAATGCG  
 4651 CGGAGAACGG CGGGTTCCAC TGCGAGTGTG GGGGGAAGCC TTGGACAGGG  
 4701 CCTTCTTTGA GGCTCCCCGC CGCAGAAGGC TGTTCCCTAG CTTCTTGGGT  
 4751 GTGTTGAGGA TGCTGAAGGC CATCGACTGG CGCGGCTCAG CCTGCAAGGA  
 4801 AGGGCTGTCA GACCGGGAGA CCAATGCTG CTTCCAGG CCAGCGTGCT  
 4851 GTGCCACGCT GTACAGCAAA GGTCCCGCCA GGGCGTCTG TCATCCCCCT  
 4901 TCAGCCCCAG CCTCACTGT TTAGTAGAAG CTGGAGCTGC TTTCTTCTGG  
 4951 GCCTCAGTAG TGCTCTGTTT GCGCCCTTCA TGTCGTCTC GGGGATCAT  
 5001 GGGCGTGGG AAACAGCTGG TGGCTTCTT AGACTATGGA GAAGAGGACA  
 5051 GTTAGGCAGA CAGTAGCAAG AGGAGTCACA TCTGAAGCCA GGTGTCTTGT

Fig. 8C

2501 CCACCCAAGA AGCCCTGCCC TCCAGCCACA GCACTCCACA GCAGCAGGGT  
 2551 TAAGACTCAG CACAGGGCCA GCAGCAGCAC AACCTTGACC AGAGCTTGGG  
 2601 TCCTACCTGT CTACCTGGAG TGAACAGTCC CTGACTGCCT GTAGGCTGCG  
 2651 TGGATGCGCA ACACACCCCC TCCTTCTCTG CTTTGGGTCC CTCTCTCAC  
 2701 CAAATTCAAA CTCCATTCCC ACCTACCTAG AAAATCACAG CCTCCTTATA  
 2751 ATGCCTCCTC CTCTGCCAT TCTCTTCCA CCTATCCATT AGCCTTCTTA  
 2801 ACGTCTACT CCTCACACTG CTCTACTGCT CAGAAACCAC CAAGACTGTT  
 2851 GATGCCTTAG CCTTGCACTC CAGGGCCCTA CCTGCATTTC CCACATGACT  
 2901 TTCTGGAAGC CTCCCAACTA TTCTTGCTTT TCCCAGACAG CTCCCACTCC  
 2951 CATGTCTCTG CTCATTAGT CCCGTCTTCC TCACCGCCCC AGCAGGGGAA  
 3001 CGCTCAAGCC TGGTTGAAAT GCTGCCTCTT CAGTGAAGTC ATCTCTTTTC  
 3051 AGCTCTGGCC GCATTCTGCA GACTTCTAT CTTCGTGCTG TATGTTTTTT  
 3101 TTTTCCCCCT TCACTCTAAT GGACTGTTC AGGGAAGGGA TGGGGGACGC  
 3151 AGCTGCTTCG GATCCACACT GTATCTGTGT CATCCCCACA TGGGTCTCTA  
 3201 TAAAGGATTA TTCAATGGAG GCATCTGAC ATCTGTTCAT TTAGGCTTCA  
 3251 GTTCACTCC CAGGAACCTT GCCTGTCCCA CGAGGGAGTA TGGGAGAGAT  
 3301 GGACTGCCAC ACAGAAGCTG AAGACAACAC CTGCTTCAGG GGAACACAGG  
 3351 CGCTTGAAAA AGAAAAGAGA GAACAGCCCA TAATGCTCCC CGGGAGCAGA  
 3401 GGCCACTAAT GGAGAGTGGG AAGAGCCTGG AAAGATGTGG CCTCAGGAAA  
 3451 AGGGATGAGA GAAAGGAGGT GGTATGGAAG ACTCAGCAGG AACAAGGTAG  
 3501 GCTTCAAAGA GCCTATATTC CTCTTTTTCC CACACCGATC AAGTCAACTC  
 3551 AGTACTCAGC GGAGAAAAAT AGACTTTATT TACAAGTAAT AACATTAGA  
 3601 AAAGATCCAT CCCCAGCCCT TAAAAACCTT CCCATCACTC CAAATCCCAC  
 3651 CCCAGTGCAA GTCTGGGAA GGTAGGGTGT GAGCTGCTGC TGAAGGCTGT  
 3701 CCCCCAACCC CACTCTGAG ACACAGGGCC CATCCGTCTT GGGAAAGAGC  
 3751 ATCTCTGGC AGGTGCTCCC ACCAGGTCAG ACCCAGTCTT GGACTTCAAG

Fig. 8B

5101 CCTCTCAGAG CTGAGTGGAC CTTGTAAGTC AACGTGCAAC CTGCTCCCTT  
 5151 TCCCAACTCT GGGCCAGATC CTCCCTTCC CAACAGTCC CATCCATGGG  
 5201 TCAGGCCCTT GGAGAGAGGG AAAGAGAGGG GGAAGTGAGG GAAGGAGAGA  
 5251 GAAGGCTCCC TTAGTCTT TGTGAGCTGG GCCTGACCTG AGCACAGTGC  
 5301 TGGAGTAACA CCCAGGAGCC ACCGCGCTA CCTCAGGAGT TCCAGGGCCC  
 5351 TGGTGGGGCT CTAGGGAGAC CCGTTTGGC TGCTGCCGGG TGGTATGCC  
 5401 AGTGCCCTCG GCTATCTGGA TTGGCTGCAT GCTGCTCGG CGCAGGGTCT  
 5451 CTTGGGGGTC TCCAGTTTTC ATCTCTCAT CTGTGATGTT GCCCAGGCTC  
 5501 AGGGAAGGCT GCATGGGTGG AAGAGGTGGT CAGTGGACCA TAGCTGTATG  
 5551 GAGATGGAGG AGGACCTGGG GCTGTTCCAG AACTCTACAC TCGCCCGACA  
 5601 CTTATGGTCG GGACCCTTCC TGCTACGAG GTAGAAAGAC ACAAGCCTCC  
 5651 TTTCTGTTT TGCTTTTCTAC CTAAGCCCTG GGCAATGGC ACAAGCAGTG  
 5701 CAGTCTGAC CAGATTCCTC TCTGAGCTCC TGCTACCCC CAGGCACTTC  
 5751 ACCCCTGAGT GCCCTCAGC TGCTGTTC ACCTGGAACA TGAGAAGGTC  
 5801 ACCCCTTCCC CTCTTCGGCC AGTCAGTGAT CCAGGGCCCT AGTGCTCAGG  
 5851 CTAGATCAGC AGGTGGGATT CCAAGGAAGG GCAGGGATGG GAGGCCCTGC  
 5901 ACAGTGACCC CAGGCCTCAC CTTGACTCC AGGGATAGCA GGTCTTCAGA  
 5951 TGTGGGGGGC ACATCGATT GCGCTGTGC AGCTCTGCAA TCGGTTTCCA  
 6001 GTCATCCAGC TGCTCAGGCT CATCTGGGA AGTGCCTATG TAGAAGCTGT  
 6051 TCCTTCTGT GGAAGGCAGG GAAGTGGGAA CAAATGAGCC TGGAGTCGGC  
 6101 AGGTCACCTC CTGGCCCTGG CATCTTGCCA GCCTTTGCTG CCACCTACCC  
 6151 CATAAACTTG AAGCCCGGCA CACCAGTCTG ATCAGTGCC GCAGGTGACG  
 6201 GAGTACGGCA CACAGACTAT TTCTATCTTA GGGGCTGTCT CACCACCTTC  
 6251 TCCTTGAGGA GGGCAGAAGA GGTACACGC AGAGACTGCT ACTACATCTT  
 6301 ATTCACCTGC CAAGGCTTGG TGGCAACAC CCAGAGGAAC AAATTAAGGA  
 6351 CCGGGAATTA ATTCCAGGGG GCTCCCTGTT GCCCAAAGGA CAAGAGCTTC

Fig. 8D



6401 CAAGAAGAGT CTGGCCAGCC TGGCCTTTCC AGCAGCCCAT CACCGCCTGA  
 6451 GAAGGGCATG GAGGACTCCC CACAGCTAAG TGTACAATT GTGCTGGGAA  
 6501 TCCCGGGCCC TTAACCTGCG CTAAGAGTGC CCCCAACACA GCCAGCCCTT  
 6551 AGATGGGCAG GTAAGGAAGG CCCTGAGGCT GCAGGAAGGA GGGGCAGGTG  
 6601 GAGCTGGATG GTAGCAAGGA GGCCAGCCTT GGATTTTAA AAAGCTTTCC  
 6651 TCTTTTCCCT GTGCCAGAT CCACCTTCCA GTCTAATTTT GGGGTATAGT  
 6701 AAGTCCCTGT AGTCCCTCA CCTGGAGGGG CCCCACTGGA CACCCGGCC  
 6751 TGGGAACGAC GAGCAGAACT GCGAGTGGTG GGGCGGTAGC CAGGCAAGCT  
 6801 GAGCAGGGCT GAGTTGCCAT AATCGGGAGA ACCCAGGCGA GCTAGAGACT  
 6851 GAGTAGAGGA GGTGGCTCGC AGGCTAGCCT GGAAGCAGG AGCAGACCGC  
 6901 GTGCTGTAGA ACGTAGATT GGCCTGTCT GGCTCTTCCA CATCTAGCTT  
 6951 CTGGAAGACA GAGTGAATCT GTTGCACTGT ACAGTCCCTG GCACTGTACA  
 7001 GAAGCTTCCC ATTCCTTCC GAAGCCCTCA GATCCACGG CACATCCATG  
 7051 TATTCCCAAC TGCTTTGCAA AGGTCCTTAA AGTGTGTGC TGCAAGAAAT  
 7101 GGGCCTTGTC GACAGAAGCC CTCACAAGGT GGTGCTGATG TTGTCAAGAC  
 7151 TCTTCTACGC ATTTTTCCTA TGGAGTCTAT TCATAATGCT TTGAGGTAGG  
 7201 GAATGCAGAG TGTTTATCGG CCCATTTTGG AGATGAAGTG CAAAGAAATA  
 7251 AAGTACTAG CCCCCAATCA CACTGCTAGG AAGTATCAGA GCTGGGGCTA  
 7301 GGCCCCATGT CTCCTGACTA GTCAGGCTCA TCCACAGCC TCTGCTGTCC  
 7351 CTCAGTCAA ACTTCCAGGG CCCTTACCAT GTTCCAGAAC TTCCCCAAC  
 7401 TTCTTGGTAG CAGGGGGCAC CCTAAACACA CAGGTCCCC CTGCTGTACC  
 7451 AGGGGGCCCC TCTCCCTCC TCCCAAACCT CCCCTTCAAG ATGTGGAAC  
 7501 AAAGGCAAGG GCCTGCAGCC TGTCAGGCAG TCCACTGGGC AGCAACAATG  
 7551 CCTCTAGCT GCATGGGGCA TGCTGGGAGG CACAGGATGG GCTGCAGCTT  
 7601 CGCCACGTTT TCTCCCTTCA CCCTGCACAG GCTCAGTGCT ACGCATGGAG  
 7651 AGAATGCTAG CCTTAGTCAG GAGGCAGGGA TCTAATCCTA GCCCTGCCTT

Fig. 8E

7701 TTTCTTCAGA AGTGCCTTA ACCAAGTCAC TGCCCTTTT AAGACCTCTC  
 7751 AGCTTTCCCA CTGTAACATG GACTGGCTGC TCATCCCTCC CTGCTCCTGA  
 7801 CTGAGTGCCC AG

Fig. 8F

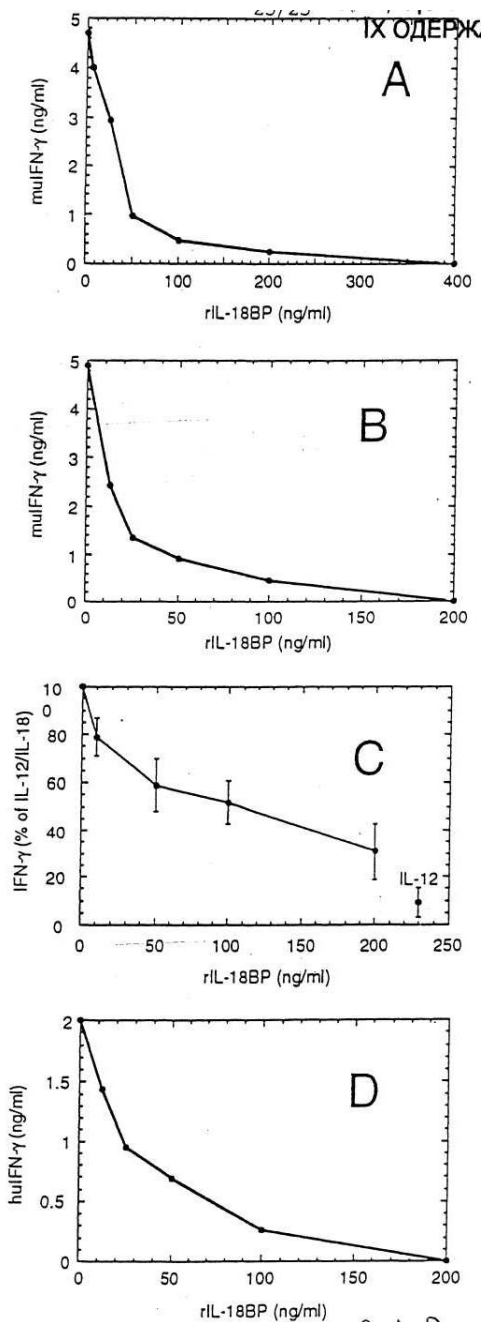


Fig. 9 A-D