



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97946** (13) **C2**  
(51) МПК (2012.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**C12N 5/20** (2006.01)**C12P 21/08** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61P 37/00****G01N 33/577** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2008 09418**

(22) Дата подання заявки: **20.12.2006**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.04.2012**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **2005-366465**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **20.12.2005**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **JP**

(41) Публікація відомостей про заявку: **10.10.2008, Бюл.№ 19**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.04.2012, Бюл.№ 7**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/JP2006/325391, 20.12.2006**

(72) Винахідник(и):  
**Камоґава Юміко (JP),  
Чо Мінквон (JP),  
Арай Наоко (JP),  
Ішида Кої (JP)**

(73) Власник(и):  
**ЕС-БІ-АЙ БІОТЕХ КО., ЛТД.,  
Shirokanedai ST Building 8F, 4-7-4,  
Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-0071,  
Japan (JP)**

(74) Представник:  
**Войтенко Олександр Петрович, реєстр.  
№23**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
X-S. JU ET AL.: "Immunoglobulin-like transcripts ILT2, ILT3 and ILT7 are expressed by human dendritic cells and down-regulated following activation." GENE, vol. 331, 28 April 2004 (2004-04-28), pages 159-164, XP004503527.  
A. DZIOONEK ET AL.: "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 194, no. 12, 17 December 2001 (2001-12-17), pages 1823-1834, XP002277387.  
A. BLASIUS ET AL.: "A cell-surface molecule selectively expressed on murine natural interferon-producing cells that blocks secretion of interferon-alpha." BLOOD, vol. 103, no. 11, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 4201-4206, XP002991726.  
C. ASSELIN-PATUREL ET AL.: "Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 171, 2003, pages 6466-6477, XP002984375.  
VALES-GOMEZ M. et al.: "Genetic variability of the major histocompatibility complex class I homologue encoded by human cytomegalovirus leads to differential binding to the inhibitory receptor ILT2", Journal of virology, Feb. 2005, Vol. 79 (4), p. 2251-2260.  
NAKAJIMA H. et al.: "Cutting edge: human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain.", J. Immunol., 1999, Vol. 162 (1), p. 5-8.  
CAO W. et al.: "Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production", J. Exp. Med., Jun. 2006, Vol. 203 (6), p. 1399-1405.

UA 97946 C2

**(54) МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО, ЯКЕ СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ПОЗАКЛІТИННИМ ДОМЕНОМ ILT7 ЛЮДИНИ**

(57) Реферат:

Винахід належить до моноклонального антитіла, яке специфічно зв'язується з позаклітинним доменом ILT7 людини, полінуклеотиду, що його кодує, вектора, способу виробництва моноклонального антитіла, гібридами, депонованої під номером FERM BP-10704 або під номером FERM BP-10705, інгібітору активності клітини, яка виробляє інтерферон тощо.

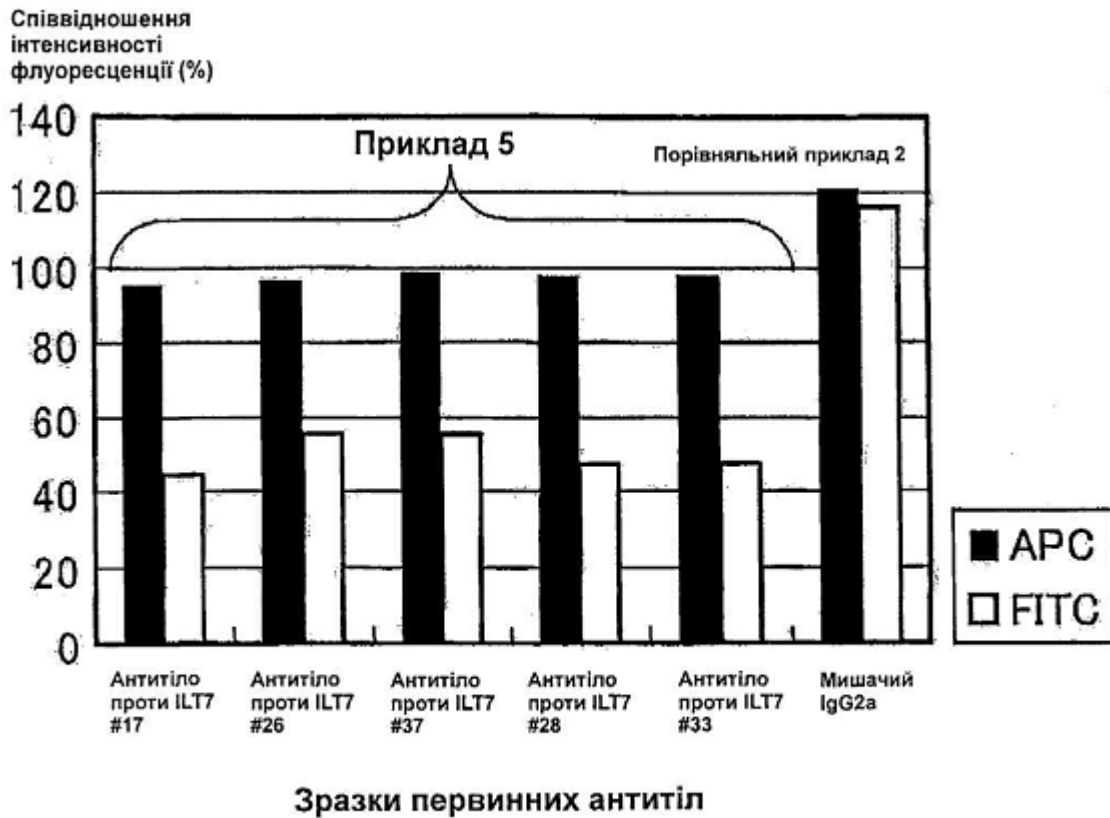


Fig. 13

Галузь техніки

Цей винахід стосується антитіла, що зв'язується з ILT7 людини.

Попередній рівень техніки

Відомо, що інтерферон  $\alpha$  (IFN $\alpha$  далі у цьому описі "інтерферон" скорочується як IFN) та інтерферон  $\beta$  (IFN $\beta$ ) є інтерферонами типу 1, яким притаманна протівірусна активність або протипухлинна активність. З іншого боку, було також виявлено, що IFN $\alpha$  пов'язаний з автоімунними хворобами. Наприклад, повідомлялося про аномальне виробництво IFN $\alpha$  у пацієнтів з переліченими далі автоімунними хворобами. Також припустили, що симптоми автоімунних хвороб можна зменшити шляхом нейтралізації IFN $\alpha$ .

Системний червоний вовчак (Shiozawa et al., Arthr. & Rheum. 35, 412, 1992).

Хронічний ревматизм (Hopkins et al., Clin. Exp. Immunol. 73, 88, 1988).

Повідомлялося про випадки, при яких симптоми автоімунних хвороб були явними або загострювалися внаслідок введення рекомбінантного IFN $\alpha$ 2 або IFN (Wada et al., Am. J. Gastroenterol. 90, 136, 1995; Perez et al., Am. J. Hematol. 49, 365, 1995; Wilson LE et al., Semin Arthritis. Rheum. 32, 163-173, 2002).

Крім того, було також виявлено, що IFN $\alpha$  індукуює диференціювання дендритних клітин. Дендритна клітина - це також клітина з присутнім антигеном. Отже, вважають, що індукція диференціювання дендритних клітин складає важливий механізм в автоімунних хворобах. Припустили, що існує глибокий зв'язок між індукцією диференціювання дендритних клітин IFN $\alpha$  та початком системного червоного вовчака (Blanco et al., Science, 16:294, 1540-1543, 2001). Отже, було вказано на те, що IFN $\alpha$  є тісно пов'язаним з протипухлинною активністю, так само, як і з автоімунними хворобами. Крім того, IFN $\alpha$  глибоко залучається у початок псоріазу (Nestle FO et al., J. Exp. Med. 202, 135-143, 2005).

Клітини, що виробляють інтерферон (IPC), ідентифікували як клітини, що виробляють IFN типу 1 у великих кількостях у зв'язку з вірусною інфекцією. Невелика кількість IPC є присутньою у крові. Вважають, що лімфоцити периферійної крові становлять 1% або менше IPC. Проте, IPC мають дуже велику здатність виробляти IFN. Здатність IPC виробляти IFN сягає, наприклад, 3000 пг/мл/10<sup>4</sup> клітин. Тобто, можна говорити про те, що більша частина IFN $\alpha$  або IFN $\beta$  у крові, що виробляються під час вірусної інфекції, є результатом IPC, незважаючи на невелику кількість таких клітин.

З іншого боку, IPC - це недиференційовані лімфоїдні дендритні клітини, яких вважають клітинами-попередниками дендритних клітин. IPC можна назвати плазмоцитоїдними дендритними клітинами. IPC диференціюються у дендритні клітини внаслідок стимуляції вірусом та індукують виробництво IFN $\gamma$  або IL-10 Т-клітинами. IPC також диференціюються у дендритні клітини внаслідок стимуляції IL-3. Диференційовані внаслідок стимуляції IL-3 дендритні клітини індукують виробництво цитокіну Th2 (IL-4, IL-5 та IL-10) Т-клітинами. Отже, IPC мають властивості, що дозволяють їм диференціюватися у певні дендритні клітини шляхом різних стимуляцій.

Отже, IPC мають два профілі: клітини, що виробляють IFN, та клітини-попередники дендритних клітин. Обидва типи клітин відіграють важливу роль в імунній системі. Іншими словами, IPC - це одна з важливих клітин, яка підтримує імунну систему у різних аспектах.

Непатентний документ 1: Shiozawa et al., Arthr. & Rheum. 35, 412, 1992.

Непатентний документ 2: Hopkins et al., Clin. Exp. Immunol. 73, 88, 1988.

Непатентний документ 3: Wada et al., Am. J. Gastroenterol. 90, 136, 1995.

Непатентний документ 4: Perez et al., Am. J. Hematol. 49, 365, 1995.

Непатентний документ 5: Bianco et al., Science, 16:294, 1540-1543, 2001.

Непатентний документ 6: Ju et al., Gene. 2004 Apr 28; 331: 159-64.

Непатентний документ 7: Colonna M et al., Seminars in Immunology 12: 121-127, 2000.

Непатентний документ 8: Nakajima H. et al., J. Immunology 162: 5-8, 1999.

Непатентний документ 9: Wilson LE et al., Semin Arthritis. Rheum. 32, 163-173, 2002.

Непатентний документ 10: Nestle FO et al., J. Exp. Med. 202, 135-143, 2005.

Патентний документ 1: WO03/12061 (опублікована заявка на патент США №. 2003-148316).

Суть винаходу

Задачі, що вирішуються винаходом

Завданням цього винаходу є забезпечення антитілом, що зв'язується з імуноглобулін-подібним транскриптом-7 (ILT-7), та виявлення, ідентифікування або виділення IPC. Іншим завданням цього винаходу є регулювання активності IPC.

Засоби для вирішення задач

Для регулювання активності гуморального фактору, такого як IFN, ефективним є введення антитіл, що розпізнають цей фактор. Наприклад, було здійснено спробу лікувати автоімунні

хвороби антитілами проти інтерлейкіну IL-1 або IL-4 (Guler et al., *Arthritis Rheum.*, 44. S307, 2001). Крім того, припускають, що нейтралізуючі антитіла можуть служити як терапевтичні агенти аутоімунних хвороб, як у випадку з інтерфероном (Stewart, TA. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14; 139-154, 2003). Можна передбачити, що такий саме підхід, як описано вище, є ефективним у випадку з інтерфероном, що виробляється IPC. Проте, такий підхід засновується на інгібуванні ефекту гуморального фактору після виробництва цього фактору. Якщо можна безпосередньо контролювати виробництво бажаного гуморального фактору, тоді можна досягти більш суттєвих терапевтичних ефектів.

Повідомлялося про антитіла, що розпізнають IPC людини. Наприклад, анти-BDCA-2 моноклональне антитіло - це IPC-специфічне моноклональне антитіло людини (Dzionek A. et al. *J. Immunol.* 165: 6037-6046, 2000). Визначають, що анти-BSDCA-2 моноклональне антитіло є ефективним при інгібуванні виробництва інтерферону IPC людини (*J. Exp. Med.* 194: 1823-1834, 2001). Крім того, також повідомлялося, що моноклональні антитіла, які розпізнають мишачі клітини, що виробляють інтерферон, інгібують виробництво інтерферону (*Blood* 2004 Jun 1; 103/11: 4201-4206. Epub 2003 Dec). Повідомлялося, що зменшення кількості дендритних клітин було наслідком дії моноклональних антитіл проти плазмацитоїдних дендритних клітин у мишей (*J. Immunol.* 2003, 171: 6466-6477).

Подібно до цього, якщо є антитіла, які розпізнають IPC людини та можуть регулювати їх активність, це може бути корисним. Наприклад, автори цього винаходу вже продемонстрували, що антитіло, яке розпізнає Ly49Q, специфічно зв'язується з IPC мишей. Проте, антитіло проти Ly49Q не впливає на активність IPC мишей (*Blood*, 1 April 2005, Vol. 105, No. 7, та pp. 2787-2792.; WO2004/13325). З іншого боку, відомо, що ILT7 є молекулою, специфічна експресія якої спостерігається у плазмацитоїдних дендритних клітинах (Ju XS et al. and *Gene*. 2004 Apr 28; 331: 159-64.; WO03/12061). Проте, не було отримано жодних антитіл проти ILT7. Отже, вплив антитіл на IPC є також невідомими.

ILT7 - це мембранний білок, що містить імуноглобулін-подібний мотив. Про нього повідомляли, як про одну з молекул, що експресуються у клітинах мієлоїдної системи або лімфатичної системи (Colonna M et al., *Seminars in Immunology* 12:121-127, 2000). Численні молекули, структура яких є аналогічною до ILT7, називаються родиною ILT. Родина ILT є також структурно подібною до інгібіторних рецепторів клітин-кілерів (KIR). ILT7 має чотири імуноглобулін-подібні домени С-типу, як і інші молекули родини ILT. Вважають, що ILT7 посилає сигнали активації у клітини, як і у випадку з ILT1, ILT1-подібним білком, ILT8 та LIR6a. Було підтверджено, що молекула, яка належить до родини ILT, експресується у клітинах кровотворної системи (Young et al., *Immunogenetics* 53: 270-278, 2001; "The KIR Gene Cluster", Carrington, Mary and Norman, Paul. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI; 2003).

Далі, високу експресію ILT7 визначили у плазмацитоїдних дендритних клітинах (PDC), а низьку експресію ILT7 визначили у моноцит-похідних дендритних клітинах (MDDC) за допомогою віднімальної гібридизації. ILT2 та ILT3 експресувалися не тільки у PDC, а також у DC (дендритних клітинах), отриманих з MDDC- або CD34- позитивних клітин. Проте, оскільки мРНК у ILT7 специфічно експресувалася у PDC, визначили, що мРНК може служити як маркер PDC. Крім того, визначили, що у той самий час експресія ILT7 зменшувалася внаслідок зменшення стимуляції CpG (Ju XS et al. *Gene*. 2004 Apr 28; 331: 159-64.; WO03/12061).

Цей винахід доводить, що специфічній експресії ILT7 у IPC сприяло дослідження на IPC людини. Отже, автори цього винаходу зробили спробу отримати антитіла до ILT7 та пояснити ці ефекти. Наприклад, молекули, що складають родину ILT, такі як ILT2 та ILT3, мають високу консервативність, особливо в амінокислотних послідовностях позаклітинних доменів (Fig. 9). Ці родини ILT демонструють характерні профілі експресії у різних клітинах крові, відповідно. Отже, дуже важливо отримати антитіло, яке може імунологічно розрізняти між іншими молекулами родини ILT та ILT7. Проте, фактично, було важко отримати антитіло, що зв'язується специфічно з IPC людини, застосовуючи при цьому ILT7 як імуноген, що є наслідком перешкод, описаних нижче.

Взагалі, білок, що виробляється шляхом технології генної рекомбінації, застосовується як імуноген для того, щоб отримати антитіло, що розпізнає невелику кількість білків, що походять з живих організмів. У цьому винаході зроблена спроба експресувати ILT7 людини на основі інформації послідовності основ кДНК ILT7 людини, яку вже знайшли, та амінокислотної послідовності, що кодується послідовністю основ (GenBank Accession No. NM\_012276). Проте, авторам цього винаходу не вдалося отримати ILT7 людини як рекомбінант за нормальних умов.

Часткову амінокислотну послідовність природного білка часто намагаються застосовувати як імуноген з метою отримання антитіла білка. Проте, існує мало амінокислотних послідовностей, що є специфічними до ILT7 людини у білках, оскільки гомологія амінокислотних



послідовностей є надзвичайно високою у родині ILT. Крім того, необхідно вибирати ділянку, що складається з частини, яка розпізнається як епітоп антитілами на поверхні клітин для того, щоб дозволити антитілам розпізнавати молекули на поверхні клітин. Отже, вважали, що утворення антитіла, що є специфічним до ILT7, застосовуючи фрагмент амінокислотної послідовності як імуноген, є неможливим.

Автори цього винаходи показали, що антитіло, яке зв'язується з IPC, можна отримати, застосовуючи спеціальний імуноген за таких умов. Крім того, автори цього винаходу визначили, що отримане таким способом антитіло специфічно розпізнає IPC людини та, крім того, має ефект регулювання активності, таким чином їм вдалося виконати цей винахід. Отже, цей винахід стосується наступного антитіла проти ILT7, способу його виробництва та його застосування.

#### Ефекти винаходу

Цим винаходом пропонується імуноген, що є корисним при виробництві антитіла, яке розпізнає ILT7 людини, та спосіб виробництва антитіла проти ILT7 людини, при якому застосовується цей імуноген. ILT7 - це мембранний білок, що належить до родини ILT. Зокрема, амінокислотна послідовність позаклітинної ділянки є надзвичайно консервативною серед родини ILT. Отже, надзвичайно важко отримати антитіло, що розрізняє представників родини ILT, застосовуючи загальні способи імунізації. Автори цього винаходу показали, що антитіло, яке розпізнає ILT7 людини, можна легко отримати, застосовуючи тваринні клітини, у яких ILT7 експресується разом з білком клітинної мембрани. Антитіло проти ILT7, яке можна отримати, застосовуючи цей винахід, має високу специфічність, яка дозволяє відрізнити клітини, що експресують інші родини ILT, від тих, що експресують IPC людини.

У переважному варіанті здійснення винаходу антитіло проти ILT7 людини, запропоноване цим винаходом, зв'язується з IPC людини. Крім того, антитіло цього винаходу специфічно розпізнає IPC людини. Отже, воно є корисним при виявленні та виділенні IPC. IPC - це клітина, що виробляє більшу частину інтерферону типу 1. Отже, таке виявлення та виділення є важливими для постановки діагнозу та вивчення хвороб, які залучають IPC, таких як автоімунні хвороби. Зокрема, згідно з даними авторів цього винаходу експресія ILT7 у IPC не знижується у присутності  $IFN\alpha$ . Експресія  $IFN\alpha$  часто легко відбувається у пацієнтів з автоімунними хворобами. Це означає, що антитіло проти ILT7 цього винаходу можна застосовувати для виявлення та виділення IPC у пацієнтів з автоімунними хворобами, у яких відбувається експресія  $IFN\alpha$ .

Антитіло проти ILT7, запропоноване цим винаходом, має ефект, який регулює активність IPC людини у переважному варіанті здійснення цього винаходу. Отже, антитіло проти ILT7 цього винаходу можна застосовувати для інгібування активності IPC. Як описано раніше, експресія ILT7 у IPC не зменшується у присутності  $IFN\alpha$ . Отже, якщо застосовується інгібування активності IPC антитілом цього винаходу, можна очікувати терапевтичний ефект у пацієнтів з автоімунними хворобами, у яких спостерігається експресія  $IFN\alpha$ .

Невелика кількість IPC виробляє велику кількість інтерферону. Для нейтралізації інтерферону необхідно стільки антитіл, скільки є молекул інтерферону. На відміну від цього, згідно з цим винаходом безпосередньо інгібується активація клітин, які виробляють інтерферон. Внаслідок цього можна очікувати сильний інгібіторний ефект щодо інтерферону, навіть якщо застосовується менша кількість антитіл порівняно з нейтралізацією антитілом проти  $IFN$ . Крім того, у випадку, коли інтерферон виробляється безперервно, вважають, що нейтралізація антитілами проти інтерферону є тимчасовим інгібуванням. У цьому винаході, оскільки інгібується активність IPC, ефект інгібування виробництва інтерферону можна очікувати протягом тривалого періоду часу.

#### Стислий опис ілюстративних матеріалів

Фіг. 1a - це фотографія, на якій експресія мРНК гена ILT7 досліджується способом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскриптазою (RT-PCR). Це результат аналізу експресії мРНК гена ILT7 в імуніцитах людини.

Фіг. 1b - це діаграма, на якій експресія мРНК гена ILT7 у різних тканинах та клітинах людини порівнюється та досліджується із застосуванням способу кількісної полімеразної ланцюгової реакції (PCR). Горизонтальна вісь представляє клітини та тканини, що досліджуються, а вертикальна вісь демонструє рівень експресії ILT7, який стандартизується згідно з рівнем експресії гена GAPDH.

Фіг. 2 - це діаграма, що демонструє структури білка ILT7, де

Фіг. 2(a) демонструє амінокислотну послідовність білка ILT7 і також демонструє визначену сигнальну послідовність секреції та трансмембранний домен на зображенні, та

Фіг. 2(b) демонструє схематичну діаграму білків ILT7, які кодуються побудованими векторами експресії.

Фіг. 3 - це діаграма, що демонструє результати дослідження за допомогою FCM того, що вектор експресії ILT7 та вектор експресії FcR $\gamma$  ввели у клітини, та поверхнево-клітинної експресії молекул ILT7. Горизонтальна вісь представляє інтенсивність флюоресценції, визначену в антитілі проти FLAG, а саме, інтенсивність поверхнево-клітинної експресії молекул ILT7, до яких мітка FLAG була приєднана, а вертикальна вісь представляє кількість клітин.

Фіг. 4 демонструє фотографію, де вектор експресії ILT7 та вектор експресії FcR $\gamma$  ввели у клітини та пов'язані молекули проаналізували шляхом імунопреципітації та вестерн-блотингу. Діаграми з лівого боку демонструють результати того, що молекула ILT7 зазнала блотингу антитілом проти FLAG після імунопреципітації молекули FcR $\gamma$  антитілом проти тус (зображення зверху), а молекула FcR $\gamma$  зазнала блотингу антитілом проти тус (зображення знизу). Аналогічно, діаграми з правого боку демонструють результати того, що молекула ILT7 зазнала блотингу антитілом проти FLAG після імунопреципітації молекули FcR $\gamma$  антитілом проти FLAG (зображення зверху), а молекула FcR $\gamma$  зазнала блотингу антитілом проти тус (зображення знизу).

Фіг. 5 - це фотографія, де глікозилування молекули ILT7 досліджували шляхом введення вектора експресії ILT7 та вектора експресії FcR $\gamma$  у клітину та обробки N-глікозидазою. Лівий бік діаграми демонструє розмір ILT7 у випадку, коли ILT7 не обробляли N-глікозидазою, а правий бік фотографії демонструє розмір ILT7 у випадку, коли виконували обробку N-глікозидазою.

Фіг. 6a - це діаграма, яка демонструє дослідження реактивності отриманого моноклонального антитіла проти ILT7 шляхом аналізу FCM. (a) демонструє результат того, що зв'язування антитіла проти ILT7 з фракцією BDCA-2-позитивних IPC проаналізували, застосовуючи лімфоцити периферійної крові людини та подвійне забарвлення антитілом проти ILT7 та антитілом проти BDCA-2. Вертикальна вісь демонструє реактивність до антитіла проти BDCA-2, а горизонтальна вісь демонструє реактивність до кожного з отриманих антитіл проти ILT7.

Фіг. 6b - це діаграма, яка демонструє результати дослідження реактивності отриманих моноклональних антитіл проти ILT7 за допомогою FCM-аналізу. (b) демонструє результат дослідження зв'язування антитіла проти ILT7 з молекулою ILT7 із застосуванням клітин 293T, у які ввели вектори експресії ILT7 та FcR $\gamma$ . Вертикальна вісь демонструє реактивність антитіла проти FLAG, а саме інтенсивність експресії молекул ILT7, до яких приєднали мітку FLAG, а горизонтальна вісь демонструє реактивність відповідних антитіл проти ILT7.

Фіг. 7 - це діаграма, що демонструє результати дослідження отриманих моноклональних антитіл проти ILT7, реактивності двох клонів до лімфоцитів периферійної крові людини за допомогою FCM-аналізу. Три графіки зліва демонструють результати #11, та три графіки справа демонструють результати #17. На діаграмах з лівого боку кожна вісь з відміткою ILT7 демонструє реактивність ILT7 #11. Подібно до цього, на діаграмах з правого боку кожна вісь з відміткою ILT7 демонструє реактивність ILT7 #17.

Фіг. 8 - це результат порівняння та дослідження зв'язувальної активності отриманих моноклональних антитіл ILT#11 та ILT# 17 проти ILT7 з лімфоцитами людини зі зв'язувальною активністю антитіла проти BDCA-2. Вертикальна вісь демонструє реактивність антитіла проти CD123, а горизонтальна вісь демонструє реактивність кожного антитіла. Тобто, кожне антитіло зв'язується з частиною CD123 позитивної клітини. Це діаграма, що демонструє результати аналізу реактивності, де клітини-лімфоцити стимулювали двома типами CpG та IFN $\alpha$ .

Фіг. 9a - це діаграма, що демонструє амінокислотні послідовності молекул родини з високою гомологією молекул ILT7. Кожну амінокислотну послідовність зовнішньо-клітинної ділянки здебільшого зображено як результат порівняльного аналізу, Фіг. 9b - це продовження Фіг. 9a, а Фіг. 9c - це продовження Фіг. 9b.

Фіг. 10 - це результат дослідження реактивності отриманих моноклональних антитіл ILT#11 та ILT#17 проти ILT7 до молекул ILT1, ILT2 та ILT3, при якому застосовувалися клітини, у які ввели їх вектори експресії. Верхня діаграма демонструє результати, де знов підтвердилася реактивність до клітин, у яких молекули ILT7 з міткою FLAG експресувалися разом з FcR $\gamma$ . Нижня діаграма демонструє результати дослідження реактивності до клітин, у які ввели ILT1, ILT2, ILT3 та FcR $\gamma$  (ліва діаграма: ILT7#11, права діаграма: ILT7#17). Горизонтальна вісь демонструє реактивність кожного антитіла проти ILT7.

Фіг. 11 - це діаграма, що демонструє вплив отриманих моноклональних антитіл ILT7#11 та ILT7#17 проти ILT7 на інтерферогенну спроможність лімфоцитів людини. На діаграмі горизонтальна вісь демонструє концентрацію інтерферону- $\alpha$  у культуральній надосадовій рідині, коли лімфоцити людини стимулювали вірусом грипу, а вертикальна вісь показує

оброблені антитіла. Термін "без інфекції" вказує на результати з клітинами, які не стимулювали вірусом грипу.

Фіг. 12 - це діаграма, що демонструє активність CDC отриманих моноклональних антитіл ILT7#37, ILT7#28 та ILT7#33 проти ILT7. Навіть коли застосовували моноклональні антитіла проти ILT7, отримані з гібридами, 80% або більше активності CDC спостерігали при концентрації антитіл 0,1 мкг/мл або більше. У випадку з антитілами, відмінними від моноклонального антитіла проти ILT7, активність CDC до клітин-мішеней не спостерігали.

Фіг. 13 - це діаграма, що демонструє інтерналізацію до клітин-мішеней отриманих моноклональних антитіл ILT7#17, ILT7#26, ILT7#37, ILT#28 та ILT7#33 проти ILT7.

Інтенсивність флюоресценції антигенпрезентувальної клітини (APC) - це індикатор кількості імунного комплексу ILT7 - антитіло проти ILT7, який був присутнім на поверхні клітин перед інкубацією, та вона визначається незважаючи на те, чи є присутнім на поверхні клітини-мішені імунний комплекс ILT7 - антитіло проти ILT7, чи його було включено у клітину після інкубації. З іншого боку, інтенсивність флюоресценції FITC - це індикатор кількості імунного комплексу ILT7 - антитіло проти ILT7, яка залишилася на поверхні клітин після інкубації. Тобто, інтенсивність флюоресценції FITC зменшується шляхом інтерналізації.

Переважні варіанти здійснення винаходу

Повідомлялося про те, що ILT7 людини (імуноглобулін-подібний транскрипт-7) - це молекула, яка специфічно експресується у плазмацитоїдних дендритних клітинах (Gene. 2004 Apr 28; 331:1 59-64.; WO03/12061). Альтернативно, також відомо, що ILT7 людини можна застосовувати як індикатор-попередник для прогнозування лімфоми (WO2005/24043). Проте, способу отримання антитіла, здатного розпізнавати ILT7 людини, ще було не розроблено.

ILT7 людини складається з 499 амінокислотних залишків, як зображено на SEQ ID NO: 2, та він є трансмембранним білком, що включає чотири імуноглобулін-подібні домени у структурі та одну трансмембранну ділянку (445-466; від 429 до 450 у SEQ ID NO: 2). Серед 444 амінокислотних залишків, що включають N-закінчення, 16 амінокислотних залишків (від -15 до -1, у SEQ ID NO: 2) є сигнальними послідовностями, а від 17 до 444 амінокислотного залишку (від 1 до 428 у SEQ ID NO: 2) складають позаклітинний домен. З іншого боку, ділянка C-закінчення - це внутрішньоклітинний домен. Більшість частин ILT7 людини - це позаклітинні домени, а 33 амінокислотні залишки складають внутрішньоклітинний домен (від 467 до 499, від 451 до 483 у SEQ ID NO: 2). Не передбачається, що мотив, який залучається у сигналізацію, є присутнім у внутрішньоклітинному домені. Амінокислотну послідовність повної довжини ILT7 людини зображено на SEQ ID NO: 2, а послідовність основ кДНК, що кодує амінокислотну послідовність, зображено на SEQ ID NO: 1. Тут: кодувальні ділянки зрілого пептиду (72)..(1520), зображені на SEQ ID NO: 1, не включають кодони термінації та ініціації. Тобто, послідовності, що кодують білок та включають кодони термінації та ініціації у SEQ ID NO: 1 - це від 24 до 1523.

Вважають, що сигнал ліганду передається клітинам у зв'язку з ILT7 людини молекулою трансдукції сигналу. Наприклад, більшість  $\gamma$ -ланцюгів Fc рецептора є присутніми у клітинах. Крім того, внутрішньоклітинний домен містить мотив активації на основі тирозину імунорецептора (ITAM), який залучається у сигналізацію. ITAM - це частина амінокислотної послідовності, яку звичайно можна спостерігати у молекулах-адапторах, які пов'язуються з імунорецепторами, такими як рецептори Fc. Мотив, такий як YxxL (SEQ ID NO: 76), який є мішенню фосфорилювання тирозину, включається у ITAM, і сигнал передається шляхом фосфорилювання. Відомі приклади молекули трансдукції сигналу, яка включає ITAM у внутрішньоклітинному домені, окрім  $\gamma$ -ланцюга рецептора Fc, включають CD3 $\xi$  та DAP 12. Серед цих молекул трансдукції сигналу передбачається, що молекула, пов'язана з ILT7 людини, буде  $\gamma$ -ланцюгом рецептора Fc. На цей час не знайдено ліганду, який зв'язується з ILT7 людини.

Автори цього винаходу підтвердили шляхом аналізу генної експресії, що ILT7 специфічно експресується у IPC людини. Автори цього винаходу вважали, що може бути корисним досліджувати IPC, якщо можна отримати антитіло, здатне імунологічно відрізнити ILT7 людини від інших молекул. Проте, у родині ILT, що включає ILT7, існує багато молекул з подібними структурами. Молекули, такі як ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6 або LIR-8 містять високо гомологічні амінокислотні послідовності, особливо у своїх позаклітинних доменах. Отже, автори цього винаходу вважали, що дуже важко отримати антитіло, здатне розрізняти ці молекули, застосовуючи пептид домену, який включає часткову амінокислотну послідовність, що утворює позаклітинний домен, як імуноген. Отже, автори цього винаходу намагалися отримати антитіло проти ILT7 людини, застосовуючи клітини, що експресують ILT7 людини як імуногени.

Проте, застосування загальних векторів експресії не викликало експресію кДНК ILT7 людини у тваринних клітинах. Повідомлялося, що молекула ILT1, що має структуру, дуже подібну до ILT7, пов'язується з  $\gamma$ -ланцюгом рецептора Fc. Тобто, коли клітини, у яких експресувався  $\gamma$ -

ланцюг рецептора Fc, такі як клітини RBL (базофільного лейкозу щурів) та клітини P815 (мастоцити мишей), застосовувалися як клітини-хазяїни, спостерігали експресію ILT1 на поверхні цих клітин. Проте, якщо ILT1 примушували експресуватися у клітинах 293, у яких γ-ланцюг рецептора Fc первинно не експресується, експресію на поверхні клітин не спостерігали.

3 іншого боку, було продемонстровано, що експресію ILT1 на поверхні клітин можна підтвердити, коли ILT1 експресується разом з γ-ланцюгом рецептора Fc (Nakajima H. et al., J. Immunology 162:5-8.1999). Проте, не існує інформації про імуноген для виробництва антитіл до ILT7.

Наприклад, у цьому повідомленні клітини RBL, у які вводять ген ILT1, застосовуються як імуноген для отримання антитіл до ILT1. Автори цього винаходу намагалися отримати антитіла до ILT7, застосовуючи комбінацію клітин RBL з геном ILT7 таким самим способом, як описано. Проте, навіть якщо ILT7 примушували експресуватися у клітинах RBL (P815), експресію ILT7 на поверхні клітин не спостерігали, та внаслідок цього його не можна застосовувати як імуноген.

Автори цього винаходу здійснили цільове дослідження з метою отримати антитіло, здатне розпізнавати ILT7 людини. Внаслідок цього автори цього винаходу визначили, що бажане антитіло можна отримати, застосовуючи специфічну трансформовану клітину як імуноген, та тим самим виконали цей винахід. Тобто, цей винахід стосується моноклонального антитіла, яке зв'язується з позаклітинним доменом ILT7 людини, та стосується фрагменту, що включає його антиген-зв'язувальну ділянку.

У цьому винаході ILT7 людини можна визначити як природну молекулу, що експресується у IPC людини, або як молекулу, яка є імунологічно еквівалентною до ILT7, що експресується у IPC людини. У цьому винаході зв'язування антитіл з ILT7 людини можна підтвердити, наприклад, наступним способом.

Підтвердження на основі реактивності до клітин людини

Згідно з даними авторів цього винаходу специфічну експресію ILT7 людини спостерігали у IPC людини. Спочатку ILT людини виділили як ген, експресію якого спостерігають у плазмацитоїдних дендритних клітинах (Blood. 2002 100; 3295-3303, Gene. 2004 Apr 28; 331:159-64). Крім того, також відомо, що його можна застосовувати як маркер плазмацитоїдних дендритних клітин (WO03/12061). Припускають, що плазмацитоїдні дендритні клітини та IPC є здебільшого ідентичними популяціями клітин, або їх великі частини є однаковими. Отже, не існує жодних протиріч між цими повідомленнями та даними авторів цього винаходу.

З точки зору такого профілю експресії ILT7 людини, по-перше, зв'язувальна активність IPC або плазмацитоїдних дендритних клітин з принаймні певною субпопуляцією - це одна з важливих характеристик антитіла, що зв'язується з ILT людини у цьому винаході. Маркери поверхні клітин, специфічні до відповідних клітинних популяцій, можна застосовувати для визначення, чи є певна клітина IPC або плазмацитоїдною дендритною клітиною. Наприклад, зв'язування з бажаними клітинами можна підтвердити шляхом подвійного забарвлення антитілом, що зв'язується з маркерами поверхні клітин, та антитілом, зв'язувальну активність якого слід перевірити. Тобто IPC у цьому винаході включають, наприклад, клітини, які експресують BDCA-2.

Підтвердження на основі реактивності до трансформованих клітин, що експресують ген ILT7 людини

Автори цього винаходу визначили, що імунологічна характеристика ILT7, що експресувався у IPC людини, була перебудована, коли експресію гена ILT7 людини здійснювали за специфічною умовою. Отже, реактивність до ILT7 людини можна підтвердити на основі реактивності антитіл до клітин, до яких ген, що кодує ILT7, штучно вводиться. А саме, цей винахід стосується моноклонального антитіла, яке включає амінокислотну послідовність, яка утворює позаклітинний домен як певний позаклітинний домен та зв'язується з молекулою, що експресується разом з молекулою трансдукції сигналу, або стосується фрагмента, який включає його антиген-зв'язувальну ділянку. У цьому описі позаклітинний домен складається з амінокислотної послідовності, яка відповідає від 17-ої до 444-ої позиції N-кінцевої амінокислотної послідовності, зображеної на SEQ ID NO: 2 (від 1 до 428 у SEQ ID NO: 2).

Наприклад, імунологічну характеристику ILT7, що експресується у IPC людини, підтримували у клітинах, які трансфектували вектором експресії, який включає ДНК, що кодує ILT7 людини, разом з вектором експресії, який включає ДНК, що кодує молекулу трансдукції сигналу. Отже, трансформована клітина, яка експресує разом ILT7 людини та молекулу трансдукції сигналу, є переважною для підтвердження афінності зв'язування антитіл із позаклітинним доменом ILT7 людини у цьому винаході. У цьому винаході бажано застосовувати клітину, яка не трансформується, як контрольні клітини, коли реактивність антитіл підтверджується застосуванням при цьому трансформованої клітини. Крім того, також важливо

підтвердити те, що зв'язування антитіл не визначається при застосуванні такої ж самої клітини-хазяїна, яка експресує тільки молекулу трансдукції сигналу, як контрольної.

У цьому винаході молекулу, яка індукує експресію ILT7 людини на клітинній поверхні, можна застосовувати як молекулу трансдукції сигналу для спільної експресії. Молекулу трансдукції сигналу у цьому винаході можна також визначити як молекулу, яка може надавати імунологічної характеристики природного ILT7 людини принаймні позаклітинному домену молекули ILT7 у клітині, яка експресує ILT7. Як застосовується у цьому описі, термін "імунологічна характеристика" природного ILT7 людини означає розпізнавання антитілом, яке зв'язується з IPC людини.

Специфічно, переважно застосовувати  $\gamma$ -ланцюг рецептора Fc або DAP 12 як молекулу трансдукції сигналу. У цьому винаході  $\gamma$ -ланцюг рецептора Fc є особливо переважним як молекула трансдукції сигналу.  $\gamma$ -Ланцюг рецептора Fc - це молекула, що складається з амінокислотних послідовностей, зображених на SEQ ID NO: 16. Молекула трансдукції сигналу може бути фрагментом, доки ILT7 людини, який мусить спільно експресуватися, розташовується на клітинній поверхні. Доки ILT7 людини, який мусить спільно експресуватися, розташовується на клітинній поверхні, доти мутація або додавання амінокислотної послідовності дозволяється в амінокислотних послідовностях, зображених на SEQ ID NO: 16. Тобто, цим винаходом пропонуються способи отримання клітин, що виробляють моноклональне антитіло, яке зв'язується з позаклітинним доменом ILT7 людини, при цьому спосіб включає наступні етапи:

(1) введення імунним тваринам клітини, яка екзогенно експресує білок, що включає позаклітинний домен ILT7 людини, та молекулу, що включає амінокислотні послідовності, вказані у SEQ ID NO: 16; та

(2) вибір виробляючої антитіла клітини, яка виробляє антитіло, яке зв'язується з ILT7 людини, з виробляючих антитіла клітин імунних тварин.

Внаслідок цього, стосовно антитіла, що зв'язується з ILT7 людини у цьому винаході, є переважним застосовувати антитіло, в якому схрещування з клітинними популяціями, про які відомо, що вони експресують родини ILT, відмінні від ILT7, не спостерігається. Специфічно, стосовно антитіла, що зв'язується з ILT7 людини у цьому винаході, є переважним застосовувати антитіло, у якому зв'язування з клітинними популяціями, про які відомо, що вони експресують родини ILT, відмінні від ILT7, не може спостерігатися за такою ж самою умовою, як і умова, за якої підтвердилося зв'язування з IPC. Як вже було описано, наприклад, ILT2 та ILT3 експресуються не тільки у PDC, а також у DC, отриманих з MDDC- або CD34-позитивних клітин (Gene. 2004 Apr 28; 331: 159-64). З іншого боку, експресію ILT7 не можна визначити у дендритних клітинах через диференціювання IPC. Отже, антитіло, яке не може виявляти зв'язування з DC, отриманих від MDDC- або CD34-позитивних клітин за умовою, при якій зв'язування з IPC можна підтвердити, є антитілом, яке зв'язується з ILT7 людини у цьому винаході.

Повідомлялося про наступні конфігурації експресії стосовно інших молекул родини ILT ("The KIR Gene Cluster", Carrington, Mary and Norman, Paul. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI; 2003, Gene. 2004 Apr 28; 331: 159-64). Отже, антитіло, яке зв'язується з IPC або PDC людини, та зв'язування якого з наступними клітинами не можна підтвердити, включається в антитіло, що має специфічність до ILT7:

ILT1; послідовність генерації мієлоїдних клітин (моноцити, DC, що походять від моноцитів, макрофаги);

ILT2; PDC, В-клітини, CD34-позитивні клітини, DC, що походять від CD34-позитивних клітин, та DC, що походять від моноцитів;

ILT3; PDC та DC;

ILT5; моноцити, DC, що походять від CD34-позитивних клітин, та DC, що походять від моноцитів; та

ILT8; послідовність генерації клітин-моноцитів.

Тобто, моноклональне антитіло, яке зв'язується із позаклітинним доменом ILT7 людини, у цьому винаході переважно включає моноклональне антитіло, що має наступні імунологічні характеристики:

а) моноклональне антитіло зв'язується з IPC людини та

б) зв'язування моноклонального антитіла з однією або більше клітинами, що вибрані з групи, яка складається з моноцитів, макрофагів, В-клітин, CD34-позитивних клітин та дендритних клітин, що походять з цих клітин, не можна підтвердити в умовах для зв'язування з IPC людини.

Стосовно моноклонального антитіла цього винаходу переважно застосовувати антитіло, у якому зв'язування з моноцитами, макрофагами, В-клітинами, CD34-позитивними клітинами та

дендритними клітинами, що походять з цих клітин, не можна підтвердити в умовах для зв'язування, особливо, з IPC людини.

Альтернативно, моноклональне антитіло, яке зв'язується із позаклітинним доменом ILT7 людини у цьому винаході, переважно є моноклональним антитілом, яке має наступні імунологічні характеристики:

с) моноклональне антитіло зв'язується з трансформованою клітиною, яка трансфектується вектором експресії, який є виразним носієм ДНК, що кодує ILT7 людини, разом з вектором експресії, який є виразним носієм ДНК, що кодує молекулу трансдукції сигналу;

д) зв'язування з клітиною-хазяїном до трансформації не можна підтвердити в умовах для зв'язування з клітинами, що зазнали спільної трансфекції, як описано у (с); або

моноклональне антитіло цього винаходу є моноклональним антитілом, яке має наступні імунологічні характеристики:

е) зв'язування з клітиною-хазяїном, яка експресує тільки молекулу трансдукції сигналу, не можна підтвердити в умовах для зв'язування з клітинами, що зазнали спільної трансфекції, як описано у (с).

У цьому винаході той факт, що моноклональне антитіло проти ILT7 не перехрещується з родиною ILT інших молекул, можна підтвердити, застосовуючи клітини, у яких кожному родину ILT примушували експресуватися. Тобто для примусової експресії, кДНК, що кодує кожному родину ILT амінокислотних послідовностей, вводиться у відповідну клітину-хазяїна. Моноклональне антитіло проти ILT7, схрещування якого слід підтвердити, виробляють так, щоб воно контактувало з отриманою трансформованою клітиною. Потім можна підтвердити, що, коли зв'язування антитіла з клітиною, яка експресує молекули родини ILT, відмінні від ILT7, не спостерігається, антитіло є здатним імунологічно відрізнити ILT7 від інших молекул родини ILT. Наприклад, у прикладах, описаних далі, спостерігається той факт, що моноклональне антитіло проти ILT7, отримане за наступним винаходом, не перехрещується з ILT1, ILT2 та ILT3. Отже, переважним прикладом моноклонального антитіла у цьому винаході є моноклональне антитіло, що зв'язується з ILT7, у якому зв'язування з ILT1, ILT2 та ILT3 неможливо виявити в тих же самих умовах.

Зокрема, ILT2 та ILT3 - це гени, експресію яких у IPC підтвердили (Ju et al. Gene 331,159-164, 2004). Проте, ці молекули можуть демонструвати профілі експресії, які є унікальними для кожного клітинного типу, залежно від відповідних рівнів диференціювання у IPC або умов, таких як стимуляція вірусами або іншими цитокінами. Застосування антитіла, яке є здатним імунологічно відрізнити ці молекули родини ILT від ILT7, дозволяє специфічно виявляти зміни в експресії ILT7.

Зв'язування моноклонального антитіла, зв'язувальну активність якого слід підтвердити з різними типами клітин, можна підтвердити на основі, наприклад, принципу проточної цитометрії. Для того, щоб підтвердити реактивність антитіл на основі принципу проточної цитометрії, переважно заздалегідь помітити антитіла молекулою або атомною групою, яка виробляє помітний сигнал. Взагалі застосовуються флуоресцентні або люмінесцентні мітки. Клітинний сортер зі збудженням флуоресценції (FACS) можна застосовувати для того, щоб проаналізувати зв'язування мічених флуоресценцією антитіл з клітинами на основі принципу проточної цитометрії. Застосування клітинного сортера зі збудженням флуоресценції дозволяє ефективно підтвердити зв'язування численних антитіл з численними клітинами.

Специфічно, наприклад, антитіло А, стосовно якого попередньо визначили, що воно здатне ідентифікувати IPC, та антитіло В, характеристики зв'язування з IPC якого слід проаналізувати, реагували з клітинними популяціями, які у той самий час включали IPC. Антитіло А та антитіло В мітяться флуоресцентним сигналом, який заздалегідь взаємно розрізняється цими антитілами. У випадку, коли обидва сигнали виявляються з однакових клітинних популяцій, зв'язування цих антитіл з такими ж самими клітинними популяціями можна підтвердити. Іншими словами, визначили, що як антитіло А, так і антитіло В мають однакові характеристики зв'язування. У випадку, коли вони зв'язуються з різними клітинними популяціями, є очевидним, що обидва антитіла мають відмінні характеристики зв'язування.

Переважний приклад моноклонального антитіла у цьому винаході може бути моноклональним антитілом, що виробляється гібридомою ILT7#11 або ILT7#17. Гібридома ILT7#11 та гібридома ILT7#17 зберігаються у Національному інституті провідної промислової науки та техніки, Міжнародному сховищі патентних організмів за номерами FERM BP-10704 та FERM BP-10705 з 21 жовтня 2005 року.

Специфікація сховища включає наступне.

(а) Назва та адреса закладу зберігання

Назва: Національний інститут провідної промислової науки та техніки, Міжнародне сховище патентних організацій

Адреса: AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan (zip code 305-8566).

5 (b) Дата початку зберігання: 21 жовтня 2005 року.

(c) Номер доступу: FERM BP-10704 (гібридома ILT7#11).

(d) Номер доступу: FERM BP-10705 (гібридома ILT7#17).

Моноклональне антитіло цього винаходу може бути фрагментом, що включає його антиген-зв'язувальну ділянку. Наприклад, фрагмент антитіла, що включає антиген-зв'язувальну ділянку, яку отримують шляхом ферментативного перетравлення IgG, можна застосовувати як антитіло у цьому винаході. Специфічно, фрагменти антитіла, такі як Fab та F(ab')<sub>2</sub>, можна отримати шляхом перетравлення папаїном або пепсином. Добре відомо, що ці фрагменти антитіла можна застосовувати як молекули антитіла, що мають афінитет до антигену. Альтернативно, антитіла, побудовані шляхом генної рекомбінації, можна також застосовувати доти, доки зберігається задовільна антиген-зв'язувальна активність. Приклади побудованих шляхом генної рекомбінації, включають химерні антитіла, CDR-трансплантовані антитіла, Fvs з єдиним ланцюгом, діатіла, лінійні антитіла та поліспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіла. Загально відомо, що ці антитіла можна отримати із застосуванням моноклональних антитіл або клітин, що виробляють антитіла.

20 Моноклональне антитіло цього винаходу можна отримати, застосовуючи специфічну трансформовану клітину як імуноген. Тобто, цей винахід стосується способу отримання клітин, що виробляють моноклональне антитіло, яке зв'язується із позаклітинним доменом ILT7 людини, при цьому цей спосіб включає наступні етапи:

25 (1) введення імуногенним тваринам клітини, що експресує екзогенний білок, який включає позаклітинний домен ILT7 людини, та екзогенну молекулу, яка зв'язана з ILT7 людини; та

(2) вибір виробляючої антитіла клітини, яка виробляє антитіло, яке зв'язується з ILT7 людини, з виробляючих антитіла клітин імуногенних тварин.

Отримані таким способом клітини, що виробляють антитіло, або іморталізовані клітини, що виробляють антитіло, культивують, та з культур можна одержувати бажані моноклональні антитіла. Відомо багато способів стосовно іморталізації клітин, що виробляють антитіло.

У способі отримання моноклонального антитіла цього винаходу корисні приклади молекули, яка зв'язана з ILT7 людини, для виробництва трансформованої клітини, яку слід застосовувати як імуноген, включають білки клітинної мембрани. Серед них молекулу трансдукції сигналу, яка розташовується у клітинних мембранах, переважно застосовувати як білок клітинної мембрани у цьому винаході. Термін "молекула трансдукції сигналу" означає молекулу, яка пов'язується з білками та клітинами, які мають рецепторні структури у позаклітинному домені, та яка передає стимуляцію зв'язування лігандів до рецепторів у клітинах. Приклади молекули трансдукції сигналу включають  $\gamma$ -ланцюг рецептора Fc, DAP 12 або подібні. Наприклад,  $\gamma$ -ланцюг рецептора Fc є переважним для застосування як білка клітинної мембрани у цьому винаході. Амінокислотні послідовності DAP 12 людини та  $\gamma$ -ланцюг рецептора Fc, а також послідовність основ кДНК, що кодує ці послідовності, є широко відомими. Послідовність основ  $\gamma$ -ланцюга рецептора Fc та амінокислотна послідовність, що кодується цією послідовністю основ, наведені в SEQ ID NOs: 15 та 16, відповідно.

У цьому винаході трансформовану клітину, яку слід застосовувати як імуноген, можна отримати шляхом приготування, наприклад, клітини, яка є виразним носієм наступних (a) та (b):

(a) екзогенного полінуклеотиду, що кодує амінокислотну послідовність, яка включає позаклітинний домен ILT7 людини; та

(b) екзогенного полінуклеотиду, що кодує  $\gamma$ -ланцюг рецептора Fc.

У цьому винаході екзогенний полінуклеотид означає полінуклеотид, який штучно вводиться у клітину-хазяїна. Коли клітини людини застосовуються як такі клітини, гени людини вводяться у клітини людини. У такій комбінації штучно введений полінуклеотид означає екзогенний полінуклеотид. Отже, ектопічна експресія ILT7 людини або  $\gamma$ -ланцюга рецептора Fc людини включається в експресію екзогенного полінуклеотиду.

55 Як застосовується у цьому описі, термін "позаклітинний домен ILT7 людини" означає амінокислотну послідовність від 17-ої до 444-ої позиції амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO: 2, яка відповідає позаклітинному домену амінокислотної послідовності (від 1 до 428 у SEQ ID NO: 2). Стосовно амінокислотної послідовності, що включає позаклітинний домен ILT7 людини, у цьому винаході переважно застосовувати амінокислотну послідовність, яка включає кожну ділянку, наприклад, починаючи з N-закінчення, у наступному порядку:

сигнальна послідовність + позаклітинний домен + трансмембранний домен + внутріклітинна ділянка.

Альтернативною є амінокислотна послідовність, у якій частково не вистачає внутріклітинної ділянки, як описано далі, включається в амінокислотну послідовність, яка включає

5 позаклітинний домен ILT7 людини, у цьому винаході:  
сигнальна послідовність + позаклітинний домен + трансмембранний домен + частина внутріклітинної ділянки.

Крім того, структура, у якій не вистачає внутріклітинної ділянки, як згадується далі, включається в амінокислотну послідовність, яка включає позаклітинний домен ILT7 людини, у

10 цьому винаході, тобто:  
сигнальна послідовність + позаклітинний домен + трансмембранний домен.

У структурі, ділянки, відмінні від позаклітинного домену, можуть бути амінокислотними послідовностями, що вибираються з амінокислотних послідовностей, наведених у SEQ ID NO: 2, або можуть об'єднуватися з іншими амінокислотними послідовностями, що мають гомологію з

15 цими ділянками. Наприклад, амінокислотна послідовність, що складає сигнальну послідовність, трансмембранний домен та внутріклітинну ділянку, може бути амінокислотою послідовністю молекул родини ILT, відмінних від ILT7. Або її можна об'єднати з амінокислотою послідовністю родини ILT у зразках, відмінних від зразків людини. Крім того, амінокислотна послідовність, яка складає ділянки, відмінні від позаклітинного домену, може включати мутацію у діапазоні,

20 придатному для зберігання функції кожної ділянки. Альтернативно, інші ділянки можуть втручатися між кожною ділянкою. Наприклад, мітку епітопу, таку як FLAG, можна також вставити між сигнальною послідовністю та позаклітинним доменом. Зокрема, сигнальна послідовність видаляється шляхом процесингу під час її перенесення до поверхні клітинної мембрани після того, як її транслювали у білок. Отже, довільну амінокислотну послідовність, яка індукує перехід

25 трансльованого білка до клітинної мембрани, можна застосовувати як сигнальну послідовність. Більш специфічно, переважно застосовувати амінокислотну послідовність (SEQ ID NO: 2) ILT7 людини як амінокислотну послідовність, що включає позаклітинний домен ILT7 людини.

Отже, у цьому винаході довільну послідовність основ, що кодує амінокислотну послідовність, яка складає вищезгадану структуру [сигнальна послідовність + позаклітинний

30 домен + трансмембранний домен + внутріклітинна ділянка], можна застосовувати як полінуклеотид, який складає екзогенний полінуклеотид, описаний у (а). Наприклад, амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 2 кодується послідовністю основ, визначеній у SEQ ID NO: 1.

У цьому винаході вектор експресії, який є виразним носієм вищезгаданих полінуклеотидів (а) та (б), можна ввести у відповідну клітину-хазяїна для отримання трансформованої клітини, яку слід застосовувати як імуноген. Один вектор або різні вектори можуть бути носіями полінуклеотидів (а) та (б). Коли різні вектори є носіями кожного полінуклеотиду, клітини-хазяїни трансфектуються спільно двома типами векторів.

Переважні приклади клітини-хазяїна у цьому винаході включають клітини ссавців. Специфічні приклади клітини-хазяїна включають клітини, що походять від людей, мавп, мишей або щурів. Зокрема, клітини, що походять від людей, є переважними клітинами-хазяїнами. Наприклад, у цьому винаході переважно застосовувати як клітину-хазяїна клітини 293T, що походять від людей. Клітини 293T можна отримати як ATCC CRL-11268. Крім того, клітини, що походять від імунних тварин, можна також застосовувати як клітини-хазяїни. Коли клітини, що

45 походять від імунних тварин, застосовуються як імуноген, отримують незначну імунологічну реакцію на клітини-хазяїнів. Внаслідок цього можна отримати ефективне антитіло проти позаклітинного домену ILT7, який експресується екзогенно. Отже, наприклад, коли мишей застосовують як імунних тварин, клітини, що походять від мишей, можна також застосовувати як клітини-хазяїнів.

50 Вищезгадані полінуклеотиди можна трансфектувати у клітини, якщо їх носієм буде вектор, здатний індукувати експресію у клітинах-хазяїнах. Можна застосовувати комерційно доступні вектори, які можуть індукувати експресію у клітинах ссавців. Для цього винаходу можна застосовувати вектори експресії, такі як pCMV-Script(R) Vector, PSG5 Vector (виробляється Stratagene), pcDNA3.1 (виробляється Invitrogen).

55 Трансформовані таким способом клітини вводяться імунним тваринам за необхідністю разом з додатковими компонентами, такими як ад'юванти. Корисні приклади ад'юванту включають повний ад'ювант Фрейнда та йому подібні. У випадку застосування мишей як імунних тварин трансформовані клітини можна вводити у діапазоні від  $10^4$  до  $10^9$  клітин, більш специфічно від  $10^4$  до  $10^6$  клітин. Взагалі, багаторазові дози імуногена вводяться з регулярними інтервалами доти, поки титр антитіла не підвищиться. Наприклад, у випадку нетривалої



імунізації трансформовані клітини вводять з інтервалами від 2 до 4 днів, більш специфічно з інтервалами у 3 дні. Після введення двічі або тричі можна одержати клітини, що виробляють антитіло. Альтернативно, їх вводять один раз на тиждень, а клітини, що виробляють антитіло, можна також одержати після введення п'ять або шість разів.

5 У цьому винаході одержані клітини, що виробляють антитіла, клонуються, внаслідок чого отримують моноклональні антитіла. Переважно, щоб клітини, що виробляють антитіла, були іморталізовані для клонування. Наприклад, спосіб злиття клітин, типовим зразком якого є спосіб гібридом або спосіб трансформації вірусом Епштейна-Бара (EBV), можна застосовувати як спосіб іморталізації клітин, що виробляють антитіла.

10 Стосовно клітин, що виробляють антитіла, одна клітина виробляє один тип антитіла. Отже, створення клітинних популяцій, що походять від однієї клітини (тобто клонування), дозволяє отримати моноклональні антитіла. Спосіб гібридом включає процес, при якому клітини, що виробляють антитіла, зливаються з відповідною клітинною лінією, яка є іморталізованою, а потім піддають клонуванню.

15 Іморталізовані клітини, що виробляють антитіла, можна клонувати за допомогою способу, такого як спосіб серійних розведень. Відомо, що існує багато клітинних ліній, корисних для способу гібридом. Ці клітинні лінії є відмінними стосовно ефективності іморталізації лімфоцитних клітин та мають різні генетичні маркери, необхідні для вибору успішно злитих клітин. Крім того, коли намагаються отримати клітини, що виробляють антитіла, можна також

20 застосовувати клітинну лінію, у якій нема здатності виробляти антитіла. Наприклад, мієлому мишей P3x63Ag8.653 (ATCC CRL-1580) та P3x63Ag8U.1 (ATCC CRL-1597) широко застосовують як корисні клітинні лінії для способу злиття клітин для мишей або щурів. Взагалі, гібридома виробляється шляхом злиття гомогенних клітин, проте моноклональне антитіло можна також отримати з гетерогенної гібридами з різних зразків серед близько

25 споріднених зразків. Специфічні протоколи злиття клітин є широко відомими. А саме, виробляючи антитіла клітини імунних тварин змішуються з відповідними партнерами по злиттю, щоб виконати злиття клітин. Прийнятні приклади клітини, що виробляє антитіло, включають клітини селезінки, лімфоцитні клітини, взяті з лімфатичного вузла, та В-клітини периферійної крові. Як партерів по злиттю можна застосовувати різні клітинні лінії, які описано раніше. Для злиття клітин можна застосовувати спосіб поліетилєнґліколю та спосіб електричного злиття.

Далі успішно злиті клітини вибирають на основі маркерів селекції злитих клітин. Наприклад, коли НАТ-чутливу клітинну лінію застосовують для злиття клітин, успішно злиті клітини вибираються шляхом селекції клітин, що зростають у середовищі НАТ. Далі підтверджують, що

35 антитіла, вироблені вибраними клітинами, мають бажану реактивність. Кожну гібридому піддають скринінгу на основі реактивності антитіл. А саме, гібридома, що виробляє антитіла, які зв'язуються з ILT7 людини, вибирається за способом, описаним раніше. Переважно, коли вибрану гібридому субклонують, а потім зрештою підтверджується виробництво бажаного антитіла, і підтверджене антитіло стає підставою для вибору гібридами, що виробляє моноклональне антитіло цього винаходу.

40 Специфічно, бажану гібридому можна вибирати на основі реактивності до клітин людини або реактивності до трансформованої клітини, яка експресує ген ILT7 людини. Антитіла, що зв'язуються з клітинами, можна виявити на основі принципу імунологічного аналізу. Наприклад, аналіз ЕЛАЙЗА, в якому клітини застосовуються як антигени, можна використовувати для виявлення бажаного антитіла. Специфічно, виготовляється культуральна надосадова рідина гібридами, яка мусить контактувати з основою, на якій ІРС людини або трансформована клітина застосовується як імуноген. У випадку, коли культуральна надосадова рідина включає бажане антитіло, це антитіло захоплюється у клітину, іммобілізовану на основі. Потім тверду фазу відокремлюють від культуральної надосадової рідини та за необхідністю промивають. Після

50 цього можна виявити антитіло, що потрапило у тверду фазу. Антитіло, що розпізнає антитіло, можна застосовувати для виявлення антитіл. Наприклад, антитіло миші можна виявити антитілом анти-мишачого імуноглобуліну. Виявлення здійснити легко, якщо антитіло, яке розпізнає антитіло, є міченим. Придатні приклади мітки включають ферменти, флуоресцентні барвники, люмінесцентні барвники та їм подібні.

55 З іншого боку, частинки та внутрішню стінку титраційного мікропланшета можна застосовувати як основу, на якій клітини іммобілізуються. Клітини можна іммобілізувати на частинках, виготовлених з пластмаси, або на поверхні контейнера шляхом фізичної адсорбції. Придатні приклади основи для іммобілізації клітин включають гранули, виготовлені з полістиролу, та реакційні судини.

У селекції гібридом можна передбачати виробництво антитіла не проти ILT7, а проти клітини-хазяїна трансформованої клітини, що застосовується як імуноген. Наприклад, як проілюстровано у Прикладах, у випадку, коли клітину людини застосовують як імуноген, а мишу застосовують як імунну тварину, клітина людини розпізнається як стороння речовина. Отже, передбачається виробництво антитіла, що зв'язується зі сторонньою речовиною. У цьому винаході наполегливо намагаються отримати антитіло, здатне розпізнавати ILT7 людини. Отже, не має необхідності отримати антитіло, що розпізнає антигени клітини людини, відмінні від ILT7 людини. Для того, щоб видалити гібридами, які виробляють таке антитіло, при скринуванні, небажані антитіла можна абсорбувати до підтвердження реактивності антитіла.

Небажані антитіла можна абсорбувати антигеном, з яким зв'язується антитіло, існування якого передбачається. Специфічно, наприклад, антитіло проти антигенів-клітин людини, відмінних від ILT7 людини, можна абсорбувати клітиною, яка не може детектувати експресію ILT7 людини. У цьому винаході переважно застосовувати клітину-хазяїна, що застосовується для імуногена, як антиген для абсорбції небажаних антитіл. Альтернативно, клітину-хазяїна, яка не експресує позаклітинний домен ILT7 людини, проте експресує молекулу, яка пов'язується з ILT7, можна застосовувати як антиген для абсорбції цих антитіл.

Стосовно моноклонального антитіла, зв'язувальна активність якого з антигеном підтверджується, його дійсний вплив на активність IPC підтверджується за необхідністю. Вплив на IPC можна підтвердити за способами, які описані далі.

Стосовно моноклонального антитіла цього винаходу, гібридома, що виробляє моноклональне антитіло, культивується, а моноклональне антитіло цього винаходу одержується з отриманої культури. Гібридому можна культивувати *in vitro* та *in vivo*. У випадку культивування *in vitro* гібридому можна культивувати, застосовуючи відоме культуральне середовище, таке як RPMI1640. Імуноглобулін, що виділяється гібридомою, накопичується у культуральній надосадовій рідині. Отже, моноклональне антитіло цього винаходу можна отримати шляхом збирання культуральної надосадової рідини та очищення її за необхідністю. Легше очистити імуноглобулін, коли сироватку не додають до культурального середовища. Проте, маючи на меті більш швидку проліферацію гібридами та сприяння виробництву антитіла, 10% фетальну бичачу сироватку можна також додати до культурального середовища.

Гібридому можна також культивувати *in vivo*. Специфічно, внутрішньочеревну культивування гібридами можна здійснювати шляхом інокуляції гібридами у черевну порожнину голих мишей. Моноклональні антитіла накопичуються в асцитах. Отже, якщо отримують асцит та за необхідністю його очищують, бажане моноклональне антитіло можна отримати. Отримані моноклональні антитіла можна відповідним способом модифікувати або обробляти згідно з призначенням їх застосування.

Моноклональне антитіло цього винаходу може експресуватися шляхом отримання кДНК, що кодує антиген-зв'язувальну ділянку антитіла, з гібридами, та вставлення її у відповідний вектор експресії. Відомим є спосіб, при якому отримують кДНК, яка кодує варіабельну ділянку антитіла, а потім вона експресується у відповідній клітині-хазяїні. Крім того, також відомим є спосіб, при якому химерне антитіло отримують шляхом вшивання варіабельної ділянки, яка включає антиген-зв'язувальну ділянку, у константну ділянку.

Переважні приклади моноклонального антитіла у цьому винаході включають моноклональні антитіла, що виробляються гібридомою #11 (Номер доступу: FERM BP-10704), гібридомою #17 (Номер доступу: FERM BP-10705) або гібридомою #37. Амінокислотні послідовності, що складають варіабельні ділянки цих моноклональних антитіл, а також послідовності основ кДНК, що їх кодує, описано далі. Отже, наприклад, химерні антитіла, які слід отримати шляхом кон'югації цих варіабельних ділянок з константними ділянками інших імуноглобулінів, є переважними у цьому винаході. В амінокислотних послідовностях, описаних у Переліку послідовностей, амінокислотна послідовність від 1 до С-закінчення складає зрілий білок. А саме, отримана внаслідок цього, амінокислотна послідовність від 1 до С-закінчення для кожної амінокислотної послідовності - це зріла послідовність кожної амінокислотної послідовності. З іншого боку, амінокислотна послідовність, представлена числовим значенням від N-закінчення до -1, - це сигнальна послідовність.

	Варіабельна ділянка важкого ланцюга	Варіабельна ділянка легкого ланцюга
#11	SEQ ID NO: 38 (послідовність основ) SEQ ID NO: 39 (амінокислотна послідовність)	SEQ ID NO: 40 (послідовність основ) SEQ ID NO: 41 (амінокислотна послідовність)
#17	SEQ ID NO: 42 (послідовність основ) SEQ ID NO: 43 (амінокислотна послідовність)	SEQ ID NO: 44 (послідовність основ) SEQ ID NO: 45 (амінокислотна послідовність)
#37	SEQ ID NO: 46 (послідовність основ) SEQ ID NO: 47 (амінокислотна послідовність)	SEQ ID NO: 48 (послідовність основ) SEQ ID NO: 49 (амінокислотна послідовність)

Наприклад, химерне антитіло миші (варіабельна ділянка) - людини (константна ділянка) можна отримати шляхом вшивання генів цих варіабельних ділянок у константну ділянку важкого ланцюга IgG1 людини та ген, що кодує константну ділянку легкого ланцюга Ig каппа людини, відповідно. Амінокислотні послідовності такого химерного антитіла та послідовності основ, що його кодують, відповідно описано далі. Химерні антитіла, що визначаються цими послідовностями, демонструють побудову переважного варіанту моноклонального антитіла проти ILT7 у цьому винаході. У наступних амінокислотних послідовностях химерних антитіл амінокислотна послідовність від N-закінчення до -1 відповідає сигнальній послідовності, а амінокислотна послідовність від 1 до C-закінчення відповідає зрілому білку. Тобто, химерне антитіло, що включає важкий та легкий ланцюги, які складаються з амінокислотної послідовності від 1 до C-закінчення для кожної амінокислотної послідовності, є переважним у цьому винаході.

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг
#11	SEQ ID NO: 50 (послідовність основ) SEQ ID NO: 51 (амінокислотна послідовність)	SEQ ID NO: 52 (послідовність основ) SEQ ID NO: 53 (амінокислотна послідовність)
#17	SEQ ID NO: 54 (послідовність основ) SEQ ID NO: 55 (амінокислотна послідовність)	SEQ ID NO: 56 (послідовність основ) SEQ ID NO: 57 (амінокислотна послідовність)

Крім того, антиген-зв'язувальну активну ділянку моноклонального антитіла можна також трансплантувати у інші імуноглобуліни. Варіабельна ділянка імуноглобуліну включає гіперваріабельну ділянку (CDR) та каркасну ділянку. Антиген-зв'язувальна властивість кожного імуноглобуліну визначається CDR, а каркасна ділянка підтримує структуру антиген-зв'язувальної ділянки. Амінокислотна послідовність CDR є надзвичайно багатою на різноманітність, тоді як амінокислотна послідовність частини каркасної ділянки є надзвичайно консервативною. Відомо, що амінокислотна послідовність, що складає CDR, включається у каркасну ділянку інших молекул імуноглобуліну, що дозволяє переносити антиген-зв'язувальну активність. Розроблено спосіб, при якому антиген-зв'язувальна властивість різних імуноглобулінів переноситься на імуноглобулін людини із застосуванням цього процесу. Як застосовується у цьому описі, термін "антиген-зв'язувальна ділянка" може включати CDR, що трансплантується у каркасну ділянку. Отже, термін "фрагмент, що включає антиген-зв'язувальну ділянку" певного моноклонального антитіла включає фрагмент імуноглобуліну людини, який включає варіабельну ділянку, до якої трансплантується CDR моноклонального антитіла. Наприклад, кожна амінокислотна послідовність вищезгаданих варіабельних ділянок включає наступні амінокислотні послідовності (SEQ ID NO) як CDR.

	CDR1	CDR2	CDR3
#11 важкий ланцюг	SDYAWN (58)	YISYSGSTSYNPSLKS	SPYYAMDY (60)
#11 легкий ланцюг	KASQDVGTAVA (61)	WASTRHT (62)	QQYSSYPLT (63)
#17 важкий ланцюг	SYWIH (64)	RIYPGTGSTYYNEKFKG (65)	YPTYDWYFDV (66)
#17 легкий ланцюг	RASQISNYLH (67)	YASQIS (68)	QQSNSWPLT (69)
#37 важкий ланцюг	SDYAWN (70)	YISYSGSTSYNPSLKS	ALPLWFAY (72)
#37 легкий ланцюг	KASQDVGTAVA (73)	WASTRHT (74)	QQYSSYPYT (75)

На основі інформації стосовно послідовності основ, яка кодує вищезгадані амінокислотні послідовності, та інформації стосовно послідовності основ, яка кодує каркасну ділянку (FR) імуноглобуліну людини, можна побудувати праймер та ампліфікувати кДНК, що має послідовність основ, отриману шляхом кон'югації обох послідовностей основ. Операцію повторюють для кожної каркасної ділянки, та можна побудувати варіабельну ділянку, у якій CDR1, CDR2 та CDR3 мишей з'єднуються каркасною ділянкою людини. Далі, коли послідовність основ, що кодує константу ділянку імуноглобуліну людини, зазнає кон'югації, за необхідністю можна отримати гуманізоване антитіло з константною ділянкою.

Стосовно химерного антитіла, що включає вищезгадані варіабельні ділянки, або гуманізованого антитіла, до якого трансплантується CDR, яка складає варіабельну ділянку, антитіло з константною ділянкою, що походить від IgG або IgM, включається у переважне антитіло у цьому винаході. Автори цього винаходу підтвердили, що моноклональне антитіло проти ILT7 демонструє CDC-дію на клітинах, що експресують ILT7. Отже, антитіло, що має константу ділянку, яка походить від IgG або IgM, демонструє цитотоксичність проти клітин, що експресують ILT7, внаслідок CDC-ефекту. Такі антитіла є корисними для інгібування ряду клітин, що експресують ILT7, таких як IPC.

Химерне антитіло, здатне розпізнавати ILT7, або гуманізоване антитіло, що пропонується цим винаходом, можна отримати шляхом генної інженерії, застосовуючи полінуклеотиди, що кодують ці антитіла. Наприклад, полінуклеотид, який є послідовністю основ, представленою наступними SEQ ID NO, та кодує амінокислотну послідовність, що складає зрілий білок для амінокислотної послідовності, можна застосовувати як полінуклеотид, що кодує варіабельну ділянку #11 або #17. Отримана внаслідок цього амінокислотна послідовність від 1 до С-закінчення для кожної амінокислотної послідовності відповідає зрілому білку. У випадку, коли кожний зрілий білок експресується як окремий білок, переважно розташовувати сигнал секреції на N-закінченні кожної амінокислотної послідовності. Наприклад, в амінокислотних послідовностях, представлених в цих SEQ ID NO, амінокислотну послідовність від N-закінчення до -1 можна застосовувати як сигнальну послідовність, коли такі білки експресуються у тваринних клітинах. Альтернативно, ці варіабельні ділянки можна виділяти як зрілі білки, застосовуючи довільну сигнальну послідовність, що робить можливою секрецію імуноглобуліну.

#11 SEQ ID NO: 50 (послідовність основ) SEQ ID NO: 52 (послідовність основ)  
#17 SEQ ID NO: 54 (послідовність основ) SEQ ID NO: 56 (послідовність основ)

Таким самим способом, як описано вище, стосовно полінуклеотиду, що кодує гуманізоване антитіло, полінуклеотид, який експресує гуманізоване антитіло, можна отримати, застосовуючи послідовність основ, яка кодує білок, що має сигнальну послідовність, яку слід додати до N-закінчення. Коли важкий та легкий ланцюги переносяться на окремих векторах, обидва вектори спільно трансфектуються в одну клітину-хазяїна. Важкий та легкий ланцюги, що експресуються з кожного вектора, застосовуються для побудови молекули імуноглобуліну з обома ланцюгами. Або полінуклеотид, що кодує важкий ланцюг, та полінуклеотид, що кодує легкий ланцюг, можна також переносити на одному векторі. Клітина-хазяїн, у яку вектор, який є носієм обох полінуклеотидів, трансфектується, експресує важкий та легкий ланцюги та виробляє імуноглобулін, що має обидва ланцюги.

Ці полінуклеотиди можна експресувати як антитіла, застосовуючи систему вектор-хазяїн, здатну експресувати ген антитіла. Крім того, у випадку, коли вони експресуються як молекула сигнального білка шляхом з'єднання варіабельної ділянки важкого ланцюга та варіабельної ділянки легкого ланцюга, сигнальну послідовність можна розташувати на N-закінченні молекули

білка. Відомий приклад такої молекули антитіла включає молекулу scFv, у якій варіабельна ділянка важкого ланцюга та варіабельна ділянка легкого ланцюга з'єднуються лінкером.

Кожне моноклональне антитіло, яке отримали за таким способом, є моноклональним антитілом цього винаходу. Іншими словами, моноклональне антитіло, що складається з імуноглобуліну, який включає антиген-зв'язувальну ділянку, що кодується поліпептидом, який походить від кДНК, яка кодує антиген-зв'язувальну ділянку вищезгаданих моноклональних антитіл, є моноклональним антитілом цього винаходу.

Як описано раніше, клітини RBL, у яких ген ILT1 примусово експресувався, можна застосовувати як імуноген для отримання антитіл ILT1. Проте, експресію ILT7 на поверхні клітин RBL (P815) не можна підтвердити, та внаслідок цього її не можна застосовувати як імуноген. Автори цього винаходу визначили, що експресію ILT7 людини на поверхні клітин можна індукувати шляхом спільної експресії ILT7 людини та інших білків клітинної мембрани, які пов'язані з ILT7 людини. Потім автори цього винаходу визначили, що антитіло, яке зв'язується з IPC людини, можна отримати, застосовуючи трансформовану клітину, експресія якої таким способом індукується, як імуноген, та виконали цей винахід.

Тобто, цим винаходом пропонується імуноген для виробництва антитіла, яке зв'язується з позаклітинним доменом ILT7 людини, та він є або тваринними клітинами, у яких (а) поліпептид, який кодує амінокислотну послідовність, що включає позаклітинний домен ILT7 людини; та (б) поліпептид, що кодує  $\gamma$ -ланцюг рецептора Fc, зберігаються так, щоб експресуватися екзогенно, або мембранними фракціями цих клітин.

Вже минуло шість або більше років з того часу, як у 1998 році відкрили структуру ILT7 людини. Проте, антитіло, здатне специфічно розпізнавати ILT7, досі не отримали. Антитіло, здатне розпізнавати ILT7 людини, вперше отримали, застосовуючи імуноген цього винаходу. Тобто, цим винаходом запропоновано антитіло, здатне розпізнавати ILT7 людини, яке можна отримати, виконуючи наступні етапи:

(1) введення імунним тваринам клітини, яка екзогенно експресує білок, який включає позаклітинний домен ILT7 людини, та молекулу, яка зв'язана з ILT7 людини;

(2) вибір виробляючої антитіла клітини, яка виробляє антитіло, яке зв'язується з ILT7 людини, з виробляючих антитіла клітин імунних тварин; та

(3) культивування вибраних на етапі (2) клітин, які виробляють антитіла, та одержання антитіла, здатного розпізнавати ILT7 людини, з цих культур.

Визначили, що ILT7 людини специфічно експресується у IPC людини. Під час аналізу генної експресії шляхом SAGE, який здійснювали автори цього винаходу, специфічну експресію ILT7 людини у IPC людини також підтвердили. Проте, в останніх повідомленнях рівні експресії ILT7 в обох випадках проаналізували на основі мРНК. Оскільки антитіло, здатне виявляти ILT7 людини, не отримали, стан експресії білка не проаналізували традиційним способом. Аналіз білка ILT7 людини виконували з урахуванням антитіла, яке зв'язується з позаклітинним доменом ILT7 людини, цього винаходу.

Автори цього винаходу дійсно підтвердили, що моноклональне антитіло, яке зв'язується з позаклітинним доменом ILT7 людини, на основі цього винаходу специфічно виявляло IPC людини. Отже, цей винахід стосується способу виявлення клітин, що виробляють інтерферон, який включає етапи: контактування моноклонального антитіла, яке зв'язується з позаклітинним доменом ILT7 людини, або фрагмента, що включає його антиген-зв'язувальну ділянку, з тестовою клітиною та виявлення моноклонального антитіла, зв'язаного з клітинами, або фрагмента, який включає його антиген-зв'язувальну ділянку.

Виявлення ILT7 людини на основі цього винаходу дозволяє визначити, чи є певна клітина IPC. Тобто, цим винаходом пропонується спосіб ідентифікації IPC, застосовуючи ILT7 людини як індикатор. Або, IPC людини можна відокремити шляхом відокремлення клітин, у яких виявили ILT7 людини, на основі цього винаходу. Тобто, цим винаходом пропонується спосіб відокремлення IPC, застосовуючи ILT7 людини як індикатор.

На основі аналізу антитілом ILT7 людини підтвердили, що рівень експресії ILT7 у IPC, диференціювання яких індукувалася CpG та йому подібним, знизився. Тобто, IPC до того, як індукується їх диференціювання, можна специфічно виявити, застосовуючи ILT7 як індикатор. Іншими словами, моноклональне антитіло цього винаходу є корисним, зокрема для виявлення IPC до початку їх диференціювання у дендритні клітини. Як застосовується у цьому описі, терміном "IPC до їх диференціювання" можна визначити клітинні популяції, що зберігають здатність виробляти інтерферон.

У цьому винаході моноклональне антитіло, яке зв'язується з позаклітинним доменом ILT7 людини, або фрагмент, що включає його антиген-зв'язувальну ділянку, можна заздалегідь помітити. Наприклад, антитіла можна легко виявити завдяки міченню люмінесцентними

барвниками або флуоресцентними барвниками. Більш специфічно, антитіло, мічене флуоресцентним барвником, отримують, щоб воно контактувало з клітинною популяцією, яка може включати IPC, а потім клітини, з якими антитіло цього винаходу зв'язано, можна виявити, застосовуючи флуоресцентний барвник як індикатор. Далі, IPC можна відокремити шляхом відокремлення клітин, у яких виявляється флуоресцентний барвник. Серію етапів можна легко здійснити на основі принципу FACS (клітинного сортера з активацією флуоресценції).

Альтернативно, антитіло цього винаходу можна заздалегідь зв'язати з твердофазною основою, такою як магнітні частинки. Антитіло, зв'язане з твердофазною основою, розпізнає ILT7 людини, а потім IPC захоплюються у твердофазну основу. Внаслідок цього IPC можна виявити або відокремити.

Як реагент для виявлення IPC можна отримати антитіло, необхідне для способу виявлення IPC на основі цього винаходу. Тобто, цим винаходом пропонується реагент для виявлення клітин, що виробляють інтерферон, який включає моноклональне антитіло, яке зв'язується з позаклітинним доменом ILT7 людини, або фрагмент, який включає його антиген-зв'язувальну ділянку. Реагент для виявлення IPC цього винаходу можна застосовувати у додаток до антитіл у комбінації з позитивними контрольними клітинами або негативними контрольними клітинами. Наприклад, трансформовані клітини, що експресують позаклітинний домен ILT7 людини та застосовуються як імуноген, а також IPC, отримані від людини, можна застосовувати як позитивні контрольні клітини. Звичайно, тільки невелику кількість IPC людини можна отримати з периферійної крові. Тому переважно застосовувати особливо трансформовану клітину як позитивну контрольну клітину у реагенті цього винаходу. З іншого боку, довільну клітину, яка не експресує ILT7 людини, можна застосовувати як негативну контрольну клітину.

Тобто, цим винаходом пропонується набір для виявлення IPC людини, який містить:

(а) моноклональне антитіло, що зв'язується з позаклітинним доменом ILT7 людини, або фрагмент, що включає його антиген-зв'язувальну ділянку; та

(b) клітину, що експресує екзогенний білок, який включає позаклітинний домен ILT7 людини, та екзогенну молекулу, що зв'язана з ILT7 людини.

Автори цього винаходу проаналізували вплив антитіла, що зв'язується з позаклітинним доменом ILT7 людини, на IPC. Внаслідок цього, підтвердилося, що антитіло, яке зв'язується із позаклітинним доменом ILT7 людини, інгібує активність IPC. Тобто, цей винахід стосується способу інгібування активності клітин, що виробляють інтерферон, який включає етап контактування будь-якого з наступних компонентів з клітинами, що виробляють інтерферон:

(а) моноклонального антитіла, що зв'язується з ILT7 людини та інгібує активність клітин, що виробляють інтерферон, або фрагмента, що включає його антиген-зв'язувальну ділянку; та

(b) імуноглобуліну, до якого гіперваріабельна ділянка моноклонального антитіла, описаного у (а), трансплантована, або фрагмента, що включає його антиген-зв'язувальну ділянку.

Або цей винахід стосується способу інгібування активності клітин, що виробляють інтерферон, у живих організмах, який включає етап введення живим організмам будь-якого з наступних компонентів:

(а) моноклонального антитіла, що зв'язується з ILT7 людини та інгібує активність клітин, що виробляють інтерферон, або фрагмента, що включає його антиген-зв'язувальну ділянку;

(b) фрагмента, що включає імуноглобулін, до якого гіперваріабельна ділянка моноклонального антитіла, описаного у (а), трансплантована, або фрагмента, що включає його антиген-зв'язувальну ділянку; та

(c) полінуклеотиду, що кодує компоненти, описані у (а) або (b).

Як застосовується у цьому описі, термін "клітини, що виробляють інтерферон, (IPC)" означає клітини, що мають здатність виробляти інтерферон та експресувати ILT7 на клітинній поверхні. Далі у цьому описі, якщо інше не вказується, термін "IPC" охоплює не тільки клітини, що є клітинами-попередниками дендритних клітин, а також клітини, що мають здатність виробляти інтерферон та експресувати ILT7 на клітинній поверхні. Способи ідентифікації таких IPC є загально відомими. IPC можна відрізнити від інших клітин крові, застосовуючи деякі маркери клітинної поверхні як індикатори. Специфічно, профіль маркерів клітинної поверхні IPC людини описано далі (Shortman, K. and Liu, YJ. Nature Reviews 2: 151-161, 2002). За останні роки в деяких повідомленнях також було запропоновано, що BDCA-2-позитивні клітини визначаються як IPC (Dzionek, A. et al. J. Immunol. 165: 6037-6046, 2000).

Профіль антигенів клітинної поверхні IPC людини

CD4-позитивні, CD123-позитивні.

Послідовність клітинних генерацій (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)-негативні та CD11c-негативні

Отже, можна також сказати, що IPC - це клітини, що мають профіль експресії цих відомих маркерів та мають здатність виробляти інтерферон. Далі, клітини у живих організмах зі здатністю виробляти інтерферон включають у IPC, навіть якщо клітини є клітинною популяцією з профілями, відмінними від структури експресії профілю експресії цих маркерів. Далі, приклади

5 характеристик, які звичайно спостерігаються у IPC людини, є наступними.

Морфологічна характеристика клітин

- Подібні до клітин плазми,
- круглі клітини з гладкою клітинною поверхнею,
- ядро є відносно великим.

10 Функціональна характеристика клітин

- Під час вірусної інфекції велика кількість інтерферонів типу 1 виробляється протягом короткого періоду часу;

- диференціюються у дендритні клітини після вірусної інфекції.

Як застосовується у цьому описі, термін "інгібування активності IPC" означає інгібування  
15 принаймні однієї з функцій IPC. Приклади функцій IPC включають виробництво інтерферону та виживання клітин. Виживання клітин можна також інтерпретувати як кількість клітин. Отже, у випадку інгібування обох або однієї з цих функцій говорять, що активність IPC інгібується. Визначили, що інтерферон типу 1, що виробляється IPC, викликає різні хвороби. Отже, інгібування ряду IPC та виробництва інтерферону є корисним для стратегії медичного лікування  
20 цих хвороб.

Наприклад, вказується на взаємозв'язок між патологічним станом автоімунних хвороб та інтерфероном- $\alpha$ . Більша частина IFN- $\alpha$  виробляється IPC. Отже, патологічні стани, що спричиняються IFN- $\alpha$ , можна полегшити шляхом інгібування виробництва інтерферону- $\alpha$ . Як застосовується у цьому описі, термін "інгібування виробництва інтерферону IPC" означає  
25 інгібування виробництва принаймні одного з інтерферонів, що виробляються IPC. Переважний інтерферон у цьому винаході - це інтерферон типу 1. Серед них важливим є IFN- $\alpha$ .

Тобто, цей винахід стосується інгібітора виробництва інтерферону, який включає антитіло, яке зв'язується з позаклітинним доменом ILT7, як активний інгредієнт. Або цим винаходом пропонується спосіб інгібування виробництва інтерферону, який включає етап введення  
30 антитіла, що зв'язується із позаклітинним доменом ILT7. Далі, цей винахід стосується застосування антитіла, яке зв'язується з позаклітинним доменом ILT7, у виробництві медичної композиції для інгібування виробництва інтерферону.

Клітини, у яких велика кількість інтерферону виробляється невеликою кількістю клітин, включаються до IPC. Наприклад, клітини-попередники дендритних клітин, стимульовані  
35 вірусами та їм подібними, виробляють більшу частину інтерферону, що виробляється живим організмом. Наслідком інгібування ряду IPC, які виробляють багато інтерферону, є супресія виробництва інтерферону. Завдяки цьому патологічні стани, спричинені IFN- $\alpha$ , можна зменшити шляхом інгібування ряду IPC. Підтвердили, що зв'язок моноклонального антитіла проти ILT7 з клітинами, що експресують ILT7, і наступний ефект цитотоксичності були наслідком  
40 комплемент-залежної цитотоксичності (CDC) у переважному варіанті здійснення цього винаходу. Ефект CDC - це один з важливих механізмів ліків з антитілом. Моноклональне антитіло проти ILT7 цього винаходу також має сильну цитотоксичність проти клітин, що експресують ILT7, таких як IPC, внаслідок його ефекту CDC. Тобто, стосовно моноклонального антитіла проти ILT7 у переважному варіанті здійснення винаходу, окрім механізму інгібування  
45 виробництва інтерферону, можна очікувати ефект інгібування виробництва інтерферону внаслідок цитотоксичності проти IPC.

Антитіло, що розпізнає позаклітинний домен ILT7 людини, що слід застосовувати для цього винаходу, можна отримати на основі способу, описаного раніше. Антитіло у цьому винаході може бути будь-якого класу. Види організмів, з яких походить антитіло, також не обмежуються.  
50 Далі, фрагмент, що включає антиген-зв'язувальну ділянку антитіла, можна застосовувати як антитіло. Наприклад, фрагмент антитіла, який включає антиген-зв'язувальну ділянку, яку отримують шляхом ферментного перетравлення IgG, можна застосовувати як антитіло цього винаходу. Специфічно, фрагменти антитіла, такі як Fab та F(ab')<sub>2</sub>, можна отримати шляхом перетравлення папаїном або пепсином. Добре відомо, що ці фрагменти антитіла можна  
55 застосовувати як молекули антитіл, які мають афінитет до антитіл. Альтернативно, антитіла, побудовані шляхом генної рекомбінації, можна також застосовувати доти, поки зберігається задовільна антиген-зв'язувальна активність. Приклади антитіл, побудованих шляхом генної рекомбінації, включають химерні антитіла, CDR-трансплантовані антитіла, Fvs з єдиним ланцюгом, діатіла, лінійні антитіла та поліспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.  
60 Загально відомо, що ці антитіла можна отримати, застосовуючи моноклональні антитіла.

У цьому винаході антитіла можна за необхідністю модифікувати. Згідно з цим винаходом антитіло, яке розпізнає позаклітинний домен ILT7 людини, має інгібувальний вплив на активність IPC. Тобто, передбачається, що само антитіло має цитотоксичність проти IPC. Підкласи антитіл, які демонструють сильну ефекторну активність, є відомими. Альтернативно, інгібувальну дію на активність IPC можна далі підсилити шляхом модифікування антитіл цитотоксичним агентом. Приклади цитотоксичних агентів описані далі.

Токсини: ендотоксин синьогнійного сепсису, токсин дифтерії, рицин.

Радіоізотопи:  $Tc^{99m}$ ,  $Sr^{89}$ ,  $I^{131}$ ,  $Y^{90}$ .

Протиракові агенти: каліхеаміцин, мітоміцин, паклітаксел.

Токсини, що складаються з білків, можна кон'югувати з антитілами або їх фрагментами за допомогою біфункціонального реагенту. Альтернативно, токсин, що кодує ген, з'єднується з антитілом, що кодує ген, і злиті білки обох генів можна також отримати. Спосіб кон'югації антитіл з радіоізотопами є також відомим. Наприклад, відомим є спосіб мічення антитіл радіоізотопами, застосовуючи хелатоутворювальний агент. Крім того, протиракові агенти можна кон'югувати з антитілами, застосовуючи цукрові ланцюги або біфункціональний реагент.

Автори цього винаходу підтвердили феномен, при якому моноклональне антитіло, що зв'язується з ILT7, що експресується на клітинній мембрані, включається у клітини після зв'язування (інтерналізації). Отже, цитотоксичні агенти можна доставити у клітини, здійснивши контакт антитіл, кон'югованих з цитотоксичними агентами цього винаходу, з клітинами, що експресують ILT7. Тобто, цим винаходом пропонується активний інгібітор клітин, що експресують ILT7, який включає моноклональне антитіло проти ILT7, з яким цитотоксичний агент кон'югується як активний інгредієнт. Або цей винахід стосується застосування моноклонального антитіла проти ILT7, з яким цитотоксичний агент кон'югується, у виробництві активного інгібітора клітин, що експресують ILT7. Далі, цим винаходом пропонується спосіб інгібування активності клітин, що експресують ILT7, який включає етап введення моноклонального антитіла проти ILT7, з яким кон'югується цитотоксичний агент.

У цьому винаході антитіло, структура якого штучно модифікується, можна також застосовувати як активний інгредієнт. Наприклад, відомо багато способів модифікації, призначених для покращення цитотоксичності та стабільності антитіл. Специфічно, відомим є імуноглобулін, у якому модифікуються цукрові ланцюги важких ланцюгів (Shinkawa, T. et al. J. Biol. Chem. 278:3466-3473. 2003). Активність імуноглобуліну щодо опосередкованої клітинами залежної від антитіла цитотоксичності (ADCC) підвищили шляхом модифікації цукрових ланцюгів. Або імуноглобулін, у якому амінокислотна послідовність ділянки Fc модифікується, також відомий. Тобто, активність ADCC була поліпшена шляхом штучного підвищення зв'язувальної активності імуноглобуліну з рецептором Fc (Shield, RL. et al. J. Biol. Chem. 276; 6591-6604, 2001).

IgG, що зв'язується з рецептором Fc, включається у клітини один раз. Потім IgG зв'язується з рецептором Fc, що експресується в ендосомі, та він виділяється у кров знов. Цей феномен було визначено. IgG з високою зв'язувальною активністю з рецептором Fc має кращий шанс бути виділеним у кров знов після включення його у клітини. Внаслідок цього час утримання IgG у крові подовжується (Hinton, PR. et al. J Biol Chem. 279: 6213-6216, 2004). Окрім цього, говорять, що модифікація амінокислотної послідовності ділянки Fc спричиняє зміну активності комплемент-залежної цитотоксичності (CDC). Ці модифіковані антитіла можна застосовувати як антитіло цього винаходу.

Коли антитіло, що зв'язується із позаклітинним доменом ILT7 людини, контактує з IPC, тоді активність IPC інгібується. Завдяки цьому антитіла можна застосовувати для інгібітора або для способу інгібування активності IPC. Тобто, цим винаходом пропонується активний інгібітор IPC, який включає принаймні один компонент, вибраний з групи, яка складається з перелічених далі від (a) до (c), як активний інгредієнт. Або цей винахід стосується способу інгібування активності IPC, який включає етап введення принаймні одного компонента, що вибирають з групи, яка складається з перелічених далі від (a) до (c). Далі, цей винахід стосується застосування принаймні одного компонента, вибраного з групи, що складається з перелічених далі від (a) до (c), у виробництві активного інгібітора IPC:

(a) моноклонального антитіла, що зв'язується з ILT7 людини, або фрагмента, що включає його антиген-зв'язувальну ділянку;

(b) імуноглобуліну, до якого гіперваріабельна ділянка моноклонального антитіла, описаного у (a), трансплантована, або фрагмента, що включає його антиген-зв'язувальну ділянку; та

(c) полінуклеотиду, що кодує компоненти, описані у (a) або (b).

У цьому винаході моноклональне антитіло, що розпізнає позаклітинний домен ILT7 людини, можна застосовувати як моноклональне антитіло, що інгібуює активність IPC. У цьому винаході



можна застосовувати одне або більше моноклональних антитіл. Наприклад, одне або більше моноклональних антитіл, що розпізнають позаклітинний домен ILT7 людини, змішують для застосування у цьому винаході.

Можна підтвердити, що антитіла мають інгібуючу дію на виробництво інтерферону IPC, таку як описано далі. IPC виробляють велику кількість інтерферону внаслідок вірусної стимуляції. Антитіла додають до IPC до, після або під час стимуляції IPC вірусами. Здатність кожної такої клітини IPC, що виробляє інтерферон, порівнюється зі здатністю виробляти інтерферон кожної контрольної клітини IPC, до якої не додавали антитіла. Здатність виробляти інтерферон можна оцінити шляхом вимірювання  $IFN\alpha$  та  $IFN\beta$ , що містяться у культуральній надосадовій рідині IPC. Внаслідок порівняння можна підтвердити, що антитіла, які тестуються, є ефективними при інгібуванні здатності виробляти інтерферон, коли кількість інтерферону у надосадовій рідині суттєво знижується внаслідок додавання антитіл. Ці способи вимірювання інтерферону є відомими. IPC виробляють більшу частину інтерферону у живому організмі. Отже, стан виробництва інтерферону у живому організмі можна регулювати шляхом інгібування здатності IPC виробляти інтерферон.

У цьому винаході активність IPC охоплює підтримання кількості IPC. Внаслідок цього, інгібування активності IPC у цьому винаході включає інгібування кількості IPC. Коли підтверджується, що кількість IPC зменшується у присутності антитіл, можна визначити, що антитіла інгібують активність IPC. Стосовно виробництва інтерферону, інертний імуноглобулін, що походить з такого ж самого тваринного зразка, що і антитіло, активність якого слід підтвердити, можна застосовувати як порівняльний контрольний імуноглобулін. Кількість IPC можна кількісно порівняти шляхом рахування клітин. Кількість клітин можна рахувати за допомогою клітинного сортера з активацією флюоресценції або за допомогою мікроскопа.

Далі, говорять, що внаслідок інфекції вірусом або йому подібним IPC диференціюються у клітини, що індують Th2, які називаються дендритними клітинами 2 (DC2). Якщо виробництво інтерферону IPC внаслідок вірусної стимуляції можна інгібувати, їх диференціювання у Th2 можна також інгібувати. Таким чином, можна очікувати, що моноклональне антитіло цього винаходу, яке інгібує виробництво інтерферону, може також мати терапевтичний вплив на різні алергічні хвороби.

Коли антитіло, що розпізнає позаклітинний домен ILT7 людини, вводиться хазяїну, відмінному від виду організму, з якого походить антитіло, бажано надати антитілу форму, яку хазяїну важко розпізнавати як сторонню речовину. Наприклад, імуноглобулін не можна легко розпізнати як сторонню речовину, перетворивши антитіло у перелічені далі молекули (спосіб процесингу молекул імуноглобуліну, який описано далі, є відомим):

- фрагмент, що включає антиген-зв'язувальну ділянку, у якій не вистачає константної ділянки (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, Academic Press Limited. 1995; Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996);

- химерне антитіло, що складається з антиген-зв'язувальної ділянки моноклонального антитіла та константної ділянки імуноглобуліну хазяїна ("Gene Expression Experiment Manual", Isao Ishida, Tamie Ando, eds., Kodansha, 1994);

- CDR-заміщене антитіло, у якому гіперваріабельна ділянка (CDR) імуноглобуліну хазяїна замінюється на CDR моноклонального антитіла ("Gene Expression Experiment Manual", Isao Ishida, Tamie Ando, eds., Kodansha, 1994).

Альтернативно, антитіло людини можна отримати шляхом використання тварин, які не є людиною, у які поміщений ген антитіла людини, як імунних тварин, незважаючи на те, що застосовуються тварини, які не є людиною. Наприклад, з метою отримання антитіл людини, трансгенних мишей з генами антитіла людини застосовували на практиці як імунних тварин (Ishida et al., Cloning and Stem Cells, 4:85-95, 2002). Застосування таких тварин дозволяє отримати антитіло людини, яке розпізнає ILT7, застосовуючи імуногени, як описано раніше. Переважно вводити антитіло людини людям.

Альтернативно, ген варіабельної ділянки імуноглобуліну людини можна також отримати за способом фагової індикації (McCafferty J. et al., Nature 348:552-554, 1990; Kretzschmar T et. al., Curr Opin Biotechnol. 2002 Dec; 13(6): 598-602). У способі фагової індикації ген, що кодує варіабельну ділянку імуноглобуліну людини, включається у ген фага. Бібліотеку фагів можна також отримати шляхом застосування різних генів імуноглобуліну як додатків. Фаг експресує варіабельну ділянку як злитий білок складеного білка фага. Варіабельна ділянка, що експресується фагом на поверхні фага, зберігає зв'язувальну активність з антигеном. Внаслідок цього вибираються фаги, що зв'язуються з антигенами або клітинами, у яких антигени експресуються, тим самим дозволяючи вибрати з бібліотеки фагів фаг, у якому експресується варіабельна ділянка, що має бажану зв'язувальну активність. Далі, ген, що кодує варіабельну

ділянку, яка має бажану зв'язувальну активність, утримується у вибраних таким чином фагових частинках. Тобто, у способі фагової індикації можна отримати ген, що кодує варіабельну ділянку з бажаною зв'язувальною активністю, використовуючи зв'язувальну активність варіабельної ділянки як індикатор.

5 В активному інгібіторі IPC або у способі інгібування активності IPC цього винаходу антитіло, що розпізнає позаклітинний домен ILT7 людини, або фрагмент антитіла, який включає принаймні антиген-зв'язувальну ділянку антитіла, можна вводити як білок або як полінуклеотид, що кодує білок. Стосовно введення полінуклеотидів бажано застосовувати вектор, у якому полінуклеотид, що кодує бажаний білок, розташовується під контролем відповідного промотору, так щоб експресувати бажаний білок. У векторі можна також розташувати енхансер та термінатор. Відомим є вектор, що є носієм гена важкого та легкого ланцюгів, що створює імуноглобулін та є здатним експресувати молекулу імуноглобуліну.

10 Вектор, здатний експресувати імуноглобулін, можна вводити шляхом введення його у клітини. При введенні до живих організмів вектор, яким можна інфікувати шляхом введення у живі організми разом з клітинами, можна вводити й безпосередньо. Якщо з живих організмів виділяються лімфоцити, тоді вектор вводиться у лімфоцити, які можна знов повернути у живі організми (ex vivo).

В активному інгібіторі IPC або у способі інгібування активності IPC на основі цього винаходу, з точки зору кількості моноклонального антитіла, яке слід вводити живим організмам, імуноглобулін вводиться звичайно у діапазоні від 0,5 мг до 100 мг, наприклад, від 1 мг до 50 мг, переважно від 2 мг до 10 мг на кг маси тіла. Інтервали введення антитіла живим організмам можна належно відрегулювати, так щоб у живих організмах підтримувалася ефективна концентрація імуноглобуліну протягом періоду лікування. Специфічно, наприклад, антитіло можна вводити з інтервалами від 1 до 2 тижнів. Спосіб введення є довільним. Фахівці у галузі можуть вибрати належний ефективний спосіб введення під час лікування. Специфічні приклади способів введення включають пероральне введення або парентеральне введення. Антитіла вводять системно або локально, наприклад, шляхом внутрішньої ін'єкції, внутрішньом'язової ін'єкції, внутрішньочеревної ін'єкції, підшкірної ін'єкції тощо. Приклади відповідних лікарських форм для парентерального введення у цьому винаході включають розчини для ін'єкцій, супозиторії та спреї. Коли антитіло вводиться до клітин, імуноглобулін додають до культурального середовища звичайно у діапазоні 1 мкг/мл, переважно 10 мкг/мл, більш переважно 50 мкг/мл, найбільш переважно 0,5 мг/мл.

В активному інгібіторі IPC або у способі інгібування активності IPC цього винаходу моноклональне антитіло можна вводити живим організмам довільними способами. Звичайно моноклональне антитіло змішується з фармацевтично прийнятною основою. За необхідністю моноклональне антитіло можна змішувати з додатковими агентами, такими як загусники, стабілізатори, консерванти та солубілізатори. Приклади такої основи або додаткового агента включають лактозу, лимонну кислоту, стеаринову кислоту, магнію стеарат, сахарозу, крохмаль, тальк, желатин, агар, рослинну олію та етиленгліколь. Термін "фармацевтично прийнятний" 40 означає ухвалені компетентним органом кожного уряду або перелічені у фармакопеї у кожній країні або інші загально визнані фармацевтичні агенти для застосування щодо тварин, ссавців та, зокрема, до людей. Активний інгібітор IPC цього винаходу може також бути у формі єдиної дози або багаторазових доз ліофілізованих порошків або таблеток. Далі, ліофілізовані порошки або таблетки можна застосовувати у комбінації зі стерильною водою для ін'єкцій, з фізіологічним сольовим розчином або буферним розчином для розчинення композицій, щоб досягти бажаної концентрації перед введенням.

Далі, коли моноклональне антитіло вводиться як вектор, який експресує імуноглобулін, тоді важкий та легкий ланцюги спільно трансфектуються до іншої плазміді, та кожен плазмід можна вводити у діапазоні від 0,1 до 10 мг, наприклад, від 1 до 5 мг на кілограм маси тіла. Для того, щоб ввести плазміді у клітини in vitro, вміст векторів для застосування становить від 1 до 5 мкг/10<sup>6</sup> клітин. Далі у цьому описі цей винахід буде специфічно описано з посиланням на Приклади.

Усі документи з попереднього рівня техніки, які процитовано у цьому описі, включено у їх повному обсязі шляхом посилання.

55 Приклади

Приклад 1

A. Аналіз експресії ILT7

A-1) Аналіз із застосуванням бібліотеки SAGE

60 Експресію генів у моноцитах, IPC та оброблених вірусом простого герпесу (HSV) IPC людини порівнювали та проаналізували, застосовуючи спосіб серійного аналізу експресії генів

(торгівельна назва; SAGE). Спосіб аналізу полягає у наступному. Моноцити виділили як BDCA-4-позитивні клітини, а IPC виділили як CD14-позитивні клітини з периферійної крові людини, застосовуючи клітинний сортер. Далі, IPC культивували протягом 12 годин у присутності вірусу простого герпесу (HSV), а потім приготували диференційовані IPC. З відповідних клітин отримали РНК, потім приготували бібліотеку SAGE, застосовуючи набір I-SAGE (торгівельна назва) (вироблено Invitrogen). Дані на отриманих послідовностях основ з приблизно 100000 міток проаналізували, застосовуючи аналітичне програмне забезпечення SAGE (розроблено Invitrogen). Внаслідок цього, виявили ген, у якому значення кількості моноцитів/IPC/IPC+HSV становить 0/16/0, а саме ILT7 (Gen Bank Acc#NM\_012276), відомий як ген, що демонструє IPC-специфічну експресію. ILT7 - це мембранний білок з імуноглобулін-подібними доменами, що кодується послідовністю основ, наведеною на SEQ ID NO: 1 (Фіг. 2(a)). Повідомлялося, що мРНК ILT7 експресується IPC (Blood 100, 3295-3303 (2002)).

A-2) Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) зі зворотною транскриптазою (RT PCR)

Експресію ILT7 у клітинах-гемоцитах досліджували більш детально. Кожну клітину заздалегідь виділили з периферійної крові людини за допомогою клітинного сортера. РНК екстрагували з кожної з виділених клітинних популяцій, з яких синтезували кДНК. Кількісну ПЛР здійснювали за звичайним способом, застосовуючи отриману кДНК як матрицю, та проаналізували рівень експресії мРНК ILT7. Умови, що застосовувалися для послідовностей основ праймерів та ПЛР, є наступними:

Передній праймер: 5' CTC CAA CCC CTA CCT GCT GTC 3' (SEQ ID NO: 3),

Зворотній праймер: 5' TTC CCA AGG CTC CAC CAC TCT 3' (SEQ ID NO: 4),

1 цикл ПЛР (при 94°C протягом 3 хвилин),

25 циклів ПЛР [94°C протягом 30 секунд, при 58°C протягом 30 секунд та при 72°C протягом 1 хвилини],

1 цикл ПЛР (при 72°C протягом 6 хвилин).

Коли досліджували IPC, стимульовані моноцитами, IPC, HSV, та CD19-позитивні клітини (тобто В-клітини), CD3-позитивні клітини (тобто Т-клітини), Т-клітини, стимульовані РМА, та CD56-позитивні клітини (тобто NK-клітини), визначили, що ILT7 експресувався специфічно у IPC (Фіг. 1(a)).

A-3) Кількісна RT PCR

Далі експресію в інших органах та тканинах досліджували шляхом кількісної ПЛР, застосовуючи ABI PRISM 7000 (виробляється Applied Biosystem). Як панель кДНК застосовували панель кДНК численної тканини MTC BD (торгівельна назва) (Human I; Cat.No.636742, Human immune; Cat.No.636748, фракції крові людини; Cat.No.636750; усі вони вироблені Becton Dickinson), та таку ж саму кДНК, що походить з клітин-гемоцитів, як описано у 2).

Використані послідовності основ праймерів є наступними:

Передній праймер для ILT7: 5' CCT CAA TCC AGC ACA AAA GAA GT 3' (SEQ ID NO: 5),

Зворотній праймер для ILT7: 5' CGG ATG AGA TTC TCC ACT GTG TAA 3' (SEQ ID NO: 6),

Передній праймер для GAPDH: 5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC 3' (SEQ ID NO: 7),

Зворотній праймер для GAPDH: 5' TGG GAT TTC CAT TGA TGA CAA G 3' (SEQ ID NO: 8).

ПЛР здійснювали, застосовуючи ABI PRISM 7000 (виробляється Applied Biosystem) та набір SYBR green PCR master mix (виробляється тією ж самою компанією). Для аналізу застосовували програмне забезпечення Sequence Detection System Software (розроблено тією ж самою компанією).

Умови реакції є наступними:

Етап 1: 1 цикл ПЛР (при 50°C протягом 2 хвилин),

Етап 2: 1 цикл ПЛР (при 95°C протягом 10 хвилин),

Етап 3: 40 циклів ПЛР (при 95°C протягом 15 секунд, при 60°C протягом 1 хвилини).

Експресію гена ILT7 порівнювали між кожною тканиною шляхом стандартизації рівня експресії гена гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH), про який відомо, що він експресується конститутивно. Внаслідок цього спостерігали, що ILT7 не експресується у будь-яких органах, відмінних від лімфатичних тканин, та експресується специфічно у IPC.

В. Виробництво векторів експресії ILT7 та FcR $\gamma$

Далі здійснювали клонування генів та виробництво векторів експресії з метою експресувати білки ILT7.

В-1) Клонування генів ILT7

Poly(A)<sup>+</sup>РНК, виділену з периферійної крові людини, екстрагували з IPC, з чого синтезували кДНК, застосовуючи праймер oligo dT та Super Script Choice System для набору синтезу кДНК. Адаптер EcoRI вшили у синтезовану кДНК, яку вшили у вектор pME18S, розщеплений EcoRI,

внаслідок чого отримали бібліотеку кДНК ІРС людини. Ген ІLT7 ампліфікували за способом ПЛР, застосовуючи отриману бібліотеку кДНК як матрицю, а також застосовуючи праймери з наступними послідовностями основ. 1 одиницю ДНК-полімерази KOD Plus (виробляється TOYOBO CO., LTD.) застосовували для ПЛР. Умови реакції були наступними: 25 циклів ПЛР [при 94°C протягом 15 секунд, при 55°C протягом 30 секунд та при 68°C протягом 2 хвилин] після 1 циклу ПЛР при 94°C протягом 2 хвилин.

Передній праймер: 5' CAG GGC CAG GAG GAG GAG ATG 3' (SEQ ID NO: 9).

Зворотній праймер: 5' TCA GCA GAC ACT TCC CCA ACT 3' (SEQ ID NO: 10).

Ампліфікований фрагмент з 2 т.п.н. кДНК ІLT7 виділили та одержали шляхом електрофорезу, застосовуючи 1% агарозний гель, а потім клонували у вектор плазмиди pCR4 Blunt-TOPO (виробляється Invitrogen), застосовуючи набір Zero Blunt TOPO PCR Cloning (виробляється Invitrogen). Послідовності основ отриманих генів проаналізували та визначили, що отримали бажаний ген ІLT7, наведений у SEQ ID NO: 1.

В-2) Виробництво векторів експресії FLAG-міченого ІLT7

Відповідно побудували плазмиду, що експресує білок, де мітки FLAG було злито з N-та С-закінченнями ІLT7. ІLT7 злили з міткою, що дозволило підтвердити експресію білка ІLT7 завдяки виявленню мітки. Бажану послідовність ампліфікували за способом ПЛР, застосовуючи ген ІLT7, отриманий так, як описано у (1), як матрицю, а також застосовуючи праймери з наступними послідовностями основ. 1 одиницю ДНК-полімерази KOD Plus (виробляється TOYOBO CO., LTD.) застосовували для ПЛР. Умови реакції були наступними: 25 циклів ПЛР [при 94°C протягом 15 секунд, при 55°C протягом 30 секунд та при 68°C протягом 2 хвилин] після 1 циклу ПЛР при 94°C протягом 2 хвилин.

Для N-FLAG ІLT7

Передній праймер (SEQ ID NO: 11): 5' CCG etc gag ATG ACC CTC ATT CTC ACA AGC CTG CTC TTC TTT GGG CTG AGC CTG GGC GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG CCC AGG ACC CGG GTG CAG GCA GAA 3'.

Зворотній праймер (SEQ ID NO: 12): 5' C TAG act agt TCA GAT CTG TTC CCA AGG CTC 3'.

Для C-FLAG ІLT7

Передній праймер (SEQ ID NO: 13): 5' CCG etc gag ATG ACC CTC ATT CTC ACA AGC 3'.

Зворотній праймер (SEQ ID NO: 14): 5' C TAG act agt TCA CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC GAT CTG TTC CCA AGG CTC 3'.

У вищезгаданих послідовностях основ кожна підкреслена частина у дужках показує послідовність основ, що кодує приєднану мітку FLAG, а кожна маленька літера показує сайт розщеплення для рестрикційного ферменту XhoI або SpeI. Фрагменти ДНК, ампліфіковані ПЛР, розщепили XhoI та SpeI, які потім відокремили шляхом гель-електрофорезу. Одержали фрагменти ДНК 2 т.п.н., а потім їх вшили у вектор pME18X, розщеплений XhoI та SpeI за таким самим способом, як описано вище. Потім побудували два типи плазмід, здатних експресувати бажаний злитий білок, тобто pME18X-N-FLAG ІLT7 та pME18 X-C-FLAG ІLT7, відповідно.

В-3) Клонування генів FcR $\gamma$

Білок FcR $\gamma$  вважали білком, здатним зв'язуватися з білком ІLT7. Ця молекула є геном з послідовностями основ та амінокислотними послідовностями SEQ ID NO: 15 та 16 (Genbank Acc#NM\_004106, J. Biol. Chem. 265, 6448-6452 (1990)). Ця молекула є молекулою ( $\gamma$  ланцюг), що утворює Fc $\epsilon$ RI, тобто рецептор ІgЕ з високим афінітетом. Незважаючи на те, що його також позначають як Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ , далі у цьому описі його позначають як FcR $\gamma$ . Стосовно цього, ця молекула також відома як компонент Fc $\gamma$ R або Fc $\alpha$ R. З метою отримання векторів експресії, цей ген клонували за способом ПЛР, як показано далі. Ген FcR $\gamma$  ампліфікували за способом ПЛР, застосовуючи бібліотеку кДНК ІРС людини, отриману так, як описано у (1), як матрицю, а також застосовуючи праймери з наступними послідовностями основ. 1 одиницю ДНК-полімерази KOD Plus (виробляється TOYOBO CO., LTD.) застосовували для ПЛР. Умови реакції були наступними: 25 циклів ПЛР [при 94°C протягом 15 секунд, при 55°C протягом 30 секунд та при 68°C протягом 1 хвилини] після 1 циклу ПЛР при 94°C протягом 2 хвилин.

Передній праймер: 5' CCC AAG ATG ATT CCA GCA GTG 3' (SEQ ID NO: 17). j

Зворотній праймер: 5' GGA AGA ACC AGA AGC CAA AGA 3' (SEQ ID NO: 18). j

Ампліфікований фрагмент FcR $\gamma$ кДНК 0,3 т.п.н. виділили та одержали електрофорезом, застосовуючи 2% агарозний гель, потім його клонували до плазмідного вектора pCR4 Blunt-TOPO (виробляється Invitrogen), застосовуючи набір Zero Blunt TOPO PCR Cloning (виробляється Invitrogen). Послідовності основ отриманих генів проаналізували та підтвердили, що бажаний ген FcR $\gamma$ , наведений на SEQ ID NO: 15, клонувався.

В-4) Виробництво векторів експресії Мус-міченого FcR $\gamma$

Плазмиду, що експресує білок, де мітку Мус приєднали до С-закінчення, побудували так, щоб можна було б підтвердити експресію білка FcR $\gamma$ . Бажану послідовність ампліфікували за способом ПЛР, застосовуючи ген FcR $\gamma$ , отриманий так, як описано у (3), як матрицю, а також застосовуючи праймери з наступними послідовностями основ. 1 одиницю ДНК-полімерази KOD Plus (виробляється TOYOBO CO., LTD.) застосовували для ПЛР. Умови реакції були наступними: 25 циклів ПЛР [при 94°C протягом 15 секунд, при 55°C протягом 30 секунд та при 68°C протягом 1 хвилини] після 1 циклу ПЛР при 94°C протягом 2 хвилин.

Передній праймер: (SEQ ID NO: 19): 5' CCG etc gag ATG ATT CCA GCA GTG GTC TTG 3'.

Зворотній праймер: (SEQ ID NO: 20): 5' CTA Gac tag tCT A[CA GAT CCT CTT CAG AGA TGA GTT TCT GCT C]CT GTG GTG GTT TCT CAT G 3'.

У вищезгаданих послідовностях праймерів підкреслена частина у дужках показує послідовність основ, що кодує приєднану мітку Мус, а кожна маленька літера показує сайт розщеплення для рестрикційного ферменту XhoI або SpeI. Фрагменти ДНК, ампліфіковані ПЛР, розщепили XhoI та SpeI, які потім відокремили шляхом гель-електрофорезу. Фрагменти ДНК приблизно 0,3 т.п.н. одержали, а потім вшили у вектор pME18X, розщеплений XhoI та SpeI за таким самим способом, як описано вище. Потім побудували плазмиду, здатну експресувати бажаний злитий білок, тобто pME18X-Мус-FcR $\gamma$ .

С. Експресія ILT7 у тваринних клітин

Експресію ILT7 у тваринних клітин досліджували, застосовуючи вектори експресії, отримані так, як описано вище.

С-1) Експресія у клітин 293Т

ДНК, що складаються з наступних п'яти комбінацій, ввели у клітини 293Т (7x10<sup>5</sup> клітин), застосовуючи набір трансфекції effectene (виробляється Qiagen). Через два дні після введення здійснили аналіз проточної цитометрії (аналіз FCM).

(1) pME18X-N-FLAG ILT7 2 мкг

(2) pME18X-C-FLAG ILT7 2 мкг

(3) pME18X-N-FLAG ILT7 1 мкг + pME18X-Мус-FcR $\gamma$  1 мкг

(4) pME18X-C-FLAG ILT7 1 мкг + pME18X-Мус-FcR $\gamma$  1 мкг

(5) pME18X-Мус-FcR $\gamma$  2 мкг

Спосіб аналізу проточної цитометрії виконували таким самим чином, як описано у А-4 з наступного Прикладу 2. Су3-кон'юговане анти-Flag антитіло (виробляється Sigma) застосовували для реакції та FACScan (виробляється Becton Dickinson) застосовували для аналізу. Внаслідок цього визначили, що тільки невелика кількість ILT7 експресувалася на клітинній поверхні, коли у реакції брало участь тільки антитіло, проте ILT7 експресувався за межами клітини та суттєво у присутності FcR $\gamma$  (Фіг. 3). Відомо, що FcR $\gamma$  миші має високу гомологію з FcR $\gamma$  людини. Проте, коли клітини p815 (мастоцитома миші), які експресують FcR $\gamma$  миші, застосовувалися як хазяїни, експресію ILT7 не могли спостерігати.

С-2) Аналіз способами імунопреципітації та вестерн-блотингу

ILT7 експресувався у супроводі FcR $\gamma$  на клітинній поверхні, що підтвердили наступним способом. Після імунопреципітації проаналізували різні антитіла для кожної клітини 293Т, яка експресувалася спільно з обома генами у відповідних комбінаціях, описаних у від (1) до (5). ДНК ввели у клітини 293Т (7x10<sup>5</sup> клітин), де клітини 293Т одержали через два дні після введення за таким самим способом, як описано у (1). Клітинні фракції розчинили у лізисному буфері (0,5% Triton, 150 mM NaCl), який залишили на льоду на 20 хвилин. Після цього декілька разів повторювали аспірацію, застосовуючи голку (27G), потім центрифугували зі швидкістю 15000 обертів за хвилину протягом 20 хвилин. Анти-мус антитіло (2 мкг, виробляється Santa Cruz biotechnology) або анти-Flag антитіло (виробляється Sigma) додали до 200 мкг лізату отриманих продуктів, який потім перемішували шляхом обертання при 4°C протягом 4 годин. Потім суміш Protein A/G Sepharose 4 Fast Flow (виробляється Amersham bioscience) додали, а потім перемішували шляхом обертання при 4°C протягом 1 години. Потім отримані преципітовані фракції тричі промили лізисним буфером з наступним складом.

Лізисний буфер:

0,5% TritonX-100,

50 mM HEPES (pH 7,6),

150 mM NaCl,

1 mM EDTA,

10% гліцерин,

1 mM DTT (дитіотреїтол),

2 mM PMSF (фенілметилсульфонілфторид),

1 мкг/мл Апротиніну,

1 мкг/мл Леупептину,  
 1 мкг/мл Пепстатину А,  
 0,1 мкг/мл Хімоостатину,  
 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>,  
 0,1 мМ β-гліцерофосфат.

Зразок буферу для електрофорезу в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) додали до промитих осадів, а потім кип'ятили протягом 5 хвилин та центрифугували, потім здійснювали електрофорез на гелі з 10% додецилсульфату натрію. Зразки перенесли з гелю після електрофорезу до мембрани PVDF (мембрана Immobilon-p-transfer: виробляється Millipore) згідно зі звичайним способом. Блотинг виконували з анти-Flag антитілом та анти-мус антитілом. Підтвердили, що ILT7, пов'язаний з FcRγ, був присутнім у клітинах 293T, тому що їх присутність спостерігали у кожному імунному преципітаті (Фіг. 4).

#### С-3) Аналіз цукрового ланцюга

Оскільки під час вестерн-аналізу спостерігали декілька смуг ILT7, то досліджували можливість того, що ILT7 глікозилювався. 200 мкг лізату клітин 293T, що експресують N-FLAGILT7 та Мус-FcRγ, піддали імунопреципітації анти-Flag антитілом за способом, описаним у (1) та (2). Після цього осаджені фракції суспендували у 60 мкл N-глікозидазному буферу з наведеним далі складом, та 30 мкл кожного отриманого розчину розподілили без залишків у дві трубки.

N-глікозидазний буфер:

10 мМ EDTA,  
 0,2% додецилсульфат натрію (SDS),  
 0,5% TritonX100,  
 1% 2-меркаптоетанол у PBS (фосфатний буфер).

Потім 3 одиниці з 3 мкл N-глікозидази (#1365177, виробляється Roche) додали до однієї пробірки, у якій відбувалася реакція при 37°C протягом 15 годин. Потім туди додали 7 мкл буферу зразка та нагрівали при 100°C протягом 5 хвилин, після чого здійснили електрофорез на гелі з 10% додецилсульфату натрію. Після електрофорезу гель перенесли до мембрани PVDF, до якої додали 1 мкг поліклонального антитіла проти ILT7, як описано у (4), та здійснювали реакцію при 4°C протягом ночі. Отриманий продукт промили буфером TBS-T та здійснили реакцію з розведеним у 100000 разів HRP-міченим анти-кролячим антитілом (виробляється Jackson) при кімнатній температурі. Потім його забарвили системою ECL Western Blotting Detection System (виробляється Amersham bioscience). Внаслідок цього очевидну молекулярну масу зменшили обробкою N-глікозидазою. Отже, очікували, що цукрові ланцюги додалися до ILT7 (Фіг. 5).

#### С-4) Виробництво поліклонального антитіла проти ILT7

Поліклональне антитіло проти ILT7, що застосовувалося, як описано у (3), отримали за наступним способом. Пептид з 23 амінокислот, що відповідають С-закінченню ILT7 (CSQEANSRKDNAPFRWERWEQI; SEQ ID NO: 21), синтезували хімічним способом та зв'язали з білком KLH, який є носієм, а отриманий продукт застосовували як імуноген. Кролів крізьшкірно імунізували імуногеном, змішаним з повним ад'ювантом Фрейнда. Після всього шести імунізацій (одна на тиждень) підтвердився підвищений титр антитіла у сироватці, та потім зібрали суцільну кров. Потім деяку кількість сироватки афінно очистили, застосовуючи пептидну колонку такої ж самої послідовності. Отриманий продукт визначили як поліклональне антитіло проти ILT7.

#### Приклад 2

##### А. Виробництво моноклонального антитіла проти ILT7

##### А-1) Виробництво імуногена

Клітини, які слід застосовувати як імуногени, приготували шляхом введення генів у клітини 293T за способом, який описано далі. 46,4 мкг трансгена (pME18 X-C-FLAG ILT7 23,2 мкг та ME18X-Мус-FcRγ 23,2 мкг) додали до дна 100 мм покритої колагеном чашки (IWAKI), покритої 3 мл opti-MEM (GIBCO), та змішали. Після цього азид з трангенного розчину, 58 мкл Lipofectamine (торгівельна назва) 2000 (Invitrogen) розвели 3 мл opti-MEM та залишили при кімнатній температурі на 5 хвилин, та приготували розчин Lipofectamine. Після цього розчин Lipofectamine повільно додавали до чашки, що містила трансгенний розчин, та перемішували. Після витримання протягом 20 хвилин при кімнатній температурі 10 мл клітин 293T, розведених до 1x10<sup>6</sup> клітин/мл із застосуванням культурального середовища DMEM (SIGMA), що містило 10% FBS (фетальної бичачої сироватки), повільно додавали до чашки. Отримане середовище піддали статичному культивуванню в інкубаторі при 37°C у присутності CO<sub>2</sub> протягом 48 годин.

З цього середовища клітини отримали за допомогою піпетки. Отримані клітини застосовували як трансфектанти для імуногенів.

#### А-2) Виробництво гібридом

За день до імунізації клітин 50 мкл емульсії, отриманої шляхом змішування 200 мкл фізіологічного розчину з фосфатним буфером (PBS) з 200 мкл повного ад'юванту Фрейнда (FREUND) (RM606-1, виробляється Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.), ввели шляхом ін'єкції у нижні частини обох ніг чотирьох самок мишей Balb/c (віком чотири тижні) для імунізації. Наступного дня імунізували 50 мкл  $2 \times 10^7$  клітин, суспендованих у 400 мкл фізіологічного розчину з фосфатним буфером. Другу та третю імунізації виконували кожні чотири дні. Через три дні після третьої імунізації здійснювали злиття клітин наступним способом. Клітини зібрали з лімфатичних вузлів мишей, імунізованих у ногу. Клітини мієломи мишей P3-X63-Ag8-U1, культивовані у культуральному середовищі RPMI1640 (SIGMA), що містить 10% FBS, змішали з клітинами, що походять з лімфатичних вузлів та мієломи, так щоб відношення клітин мієломи мишей до клітин, що походять з лімфатичних вузлів, становило від 2:1 до 10:1. З цього середовища клітини одержали шляхом центрифугування. PEG4000 (MERCK), еквівалентно розведений культуральним середовищем RPMI1640, додали до отриманих клітинних фракцій, які потім піддали клітинному злиттю. Після промивання клітин отриманий продукт суспендували у 160 мл 15% середовища FBS-HAT, що містило конглютинін, а потім його інокулювали у 16 96-лункових планшетів по 200 мкл/лунку. Культуральне середовище поміняли через три дні. Через один-два тижні після спостереження утворення колонії виконали первинний скринінг.

#### А-3) Скринінг гібридами способом ЕЛАЙЗА для клітин

Гібридому, що виробляє антитіло-мішень, скринували за наступним способом ЕЛАЙЗА для клітин. Отримані клітини, як описано у (1), застосовували по  $1 \times 10^7$  клітин на 96-лунковий планшет, їх суспендували у 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS, а потім розподілили без залишку у чашці для ЕЛАЙЗА клітин (NUNC 249570 96V NW PS) по 100 мкл/лунку. Центрифугування здійснювали зі швидкістю 2000 обертів за хвилину при 4°C, а потім надосадову рідину відкинули. Культуральну надосадову рідину зразка додали по 50 мкл/лунку, реакція здійснювалася при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Двічі здійснювали операцію промивання, яка включає додавання 0,5% BSA/2 mM та EDTA/PBS до кожної лунки, центрифугування зі швидкістю 2000 обертів за хвилину при 4°C протягом 2 хвилин та відкидання надосадової рідини. 50 мкл/лунку розведеного у 10000 разів міченого пероксидазою анти-мишачого IgG антитіла козла (IM0819; Beckman coulter) додали до кожної лунки після промивання, та реакція здійснювалася протягом 30 хвилин. Операцію промивання із застосуванням 0,5% BSA/2 mM-EDTA/PBS виконували двічі, а потім додали забарвлювальний розчин. Отриманий розчин антитіла замістили фізіологічним розчином з фосфатним буфером (-) мембраною діалізу (10000 розрізів, вироблених PIERCE), внаслідок чого отримали очищені химерні антитіла проти ILT7.

#### А-4) Дослідження реактивності антитіла аналізом проточної цитометрії (FCM)

Культуральну надосадову рідину гібридами проаналізували шляхом проточної цитометрії (FCM). Отримані клітини, які описано у (1), суспендували у 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS, що потім перенесли у пробірку для центрифугування при  $1 \times 10^5$  на один зразок, а потім додали 40 мкл кожної культури. Реакцію здійснювали при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Двічі здійснювали операцію промивання, яка включає додавання до кожної пробірки 1 мл 0,5% BSA/2 mM та EDTA/PBS, центрифугування при 1200 об./хв. при 4°C протягом 3 хвилин та відкидання надосадової рідини. 40 мкл розведеного у 100 разів міченого FITC анти-мишачого IgG антитіла козла (IM0819; Beckman coulter) додали до кожної лунки після промивання, та реакція здійснювалася протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Операцію промивання із застосуванням 0,5% BSA/2 mM-EDTA/PBS виконували двічі, а потім аналізували із застосуванням проточної цитометрії FC500 (Beckman coulter). Вибрали гібридому, що виробляла антитіло, яке не реагувало на саму тільки клітину-хазяїна, а реагувало специфічно на клітину, у яку ввели ген. Вибрану гібридому клонували способом обмежувального розведення та отримали гібридами #11 та #17, що виробляють моноклональні антитіла.

#### В. Дослідження реактивності антитіла проти ILT7

ILT7, у якому мітку FLAG приєднали до N-закінчення, експресували спільно з молекулою FcR $\gamma$  у клітинах 293T за таким способом, як описано у (C-1) Прикладу 1. Потім реактивність антитіла, отриманого у Прикладі 2, підтвердили аналізом FCM, застосовуючи FACScan (Becton Dickinson). Внаслідок цього підтвердили, що усі антитіла, що виробляються гібридами #11 та #17, які отримали так, як описано у (A), реагували на клітини, до яких ввели ген ILT7, та які експресували ILT7 (Fig. 6b). Далі, лімфоцити виділили з периферійної крові людини, застосовуючи Ficoll, та потім виконували подвійне забарвлення отриманим антитілом проти

ILT7 та PE-міченим антитілом проти BDCA-2 (Miltenyi). Потім досліджували реактивність до лімфоцитів. Внаслідок цього виявили зв'язування моноклонального антитіла, виробленого гібридомами #11 та #17, з BDCA-2-позитивною клітиною. Тобто, підтвердили, що обидва моноклональні антитіла розпізнавали молекули ILT7, що експресуються на IPC людини (Фіг. 6а).

Ці моноклональні антитіла позначили як антитіло #11 проти ILT7 та антитіло #17 проти ILT7, відповідно. Виконали більш детальний аналіз.

Аналіз за допомогою багаторазового забарвлення для лімфоцитів периферійної крові людини здійснювали із застосуванням отриманого антитіла проти ILT7, антитіла проти послідовності клітинних генерацій-1 (антитіла проти CD3, CD14, CD16, CD19, CD56; Becton Dickinson), антитіла проти CD123 (Becton Dickinson) та антитіла проти BDCA-2 (Miltenyi). Стосовно позитивних фракцій антитіла ILT7 маркер послідовності клітинних генерацій був негативним, стосовно CD123 був позитивним та стосовно BDCA-2 теж був позитивним. На підставі результатів підтвердили, що IPC були забарвлені тільки ILT7#11 та ILT7#17 (Фіг. 7).

Далі, експресію різних молекул досліджували за допомогою аналізу проточної цитометрії, коли лімфоцити периферійної крові людини стимулювали за допомогою CpG або IFN $\alpha$  протягом 24 годин. CpGODN2216 застосовували як CpGA, який індукує виробництво інтерферону з IPC, та CpGODN2006 застосовували як CpGB, який сприяє визріванню дендритних клітин (Moseman et al. J. Immunology. 173, 4433-4442, 2004). Вікно було встановлено для негативної фракції маркера послідовності клітинних генерацій. Коли аналізували реактивність антитіла проти BDCA-2 та антитіла проти ILT7 на популяцію позитивних клітин CD123, більшість позитивних фракцій ILT7 зникла навіть після 24-годинної стимуляції за допомогою CpG. З іншого боку, деякі клітини BDCA-2 демонстрували позитивні фракції після 24-годинної стимуляції за допомогою CpG (Фіг. 8). Вважали, що IPC диференціюються на різні клітини одразу після стимуляції за допомогою CpG. Вказали, що антитіло проти ILT7 цього винаходу є корисним як стадійно специфічне антитіло до IPC. Далі підтвердили, що IPC у лімфоцитах периферійної крові людини не диференціювалися у присутності IFN $\alpha$ , у тому випадку, коли коефіцієнт виживання був високим, експресія ILT7 зберігалася на IPC, далі ILT7 був стабільно присутнім на IPC при аутоімунних хворобах з можливістю, що інтерферон у сироватці був на високому рівні.

#### С. Дослідження специфічності антитіла проти ILT7

ILT7 належить до родини ILT/LIR, та існує багато молекул з високою гомологією, особливо з високою гомологією у позаклітинній ділянці (Фіг. 9). Повідомлялося, що мРНК молекул, особливо таких як ILT2 та ILT3, експресуються у IPC (Ju et al. Gene 331, 159-164, 2004). Внаслідок цього реактивність цих молекул підтверджували із застосуванням трансгенних клітин.

#### С-1) Клонування молекули ILT1 та виробництво векторів експресії

кДНК синтезували з РНК, що походить з мигдалини людини, застосовуючи праймер oligo dT та Superscript Choice System для набору синтезу кДНК. Далі, адаптер NotI вшили у вектор pME18S, розщеплений NotI, внаслідок чого отримали бібліотеку кДНК мигдалини людини.

Ген ILT1 з міткою FLAG на С-закінченні ампліфікували шляхом ПЛР, застосовуючи отриману бібліотеку кДНК як матрицю, а також застосовуючи праймери з наступними послідовностями основ. 1 одиницю полімерази ДНК KOD Plus (виробляється TOYOBO CO., LTD.) застосовували для ПЛР. Умови реакції були наступними: 25 циклів ПЛР [при 94°C протягом 15 секунд, при 55°C протягом 30 секунд та при 68°C протягом 2 хвилин] після 1 циклу ПЛР при 94°C протягом 2 хвилин.

Передній праймер (SEQ ID NO: 22): 5' CCG etc gag ATG ACC CCC ATC CTC ACG GTC C 3'.

Зворотній праймер (SEQ ID NO: 23): 5' CTA Gac tag tTC A[CT TAT CGT CGT CAT CCT TGT AAT C]CC TCC CGG CTG CAT CTT G 3'.

У вищезгаданих послідовностях праймерів кожна підкреслена частина у дужках показує послідовність основ, що кодує приєднану мітку FLAG, а кожна маленька літера показує сайт розщеплення для рестрикційного ферменту XhoI або SpeI. Фрагменти ДНК, ампліфіковані ПЛР, розщепили XhoI та SpeI, які потім відокремили шляхом гель-електрофорезу. Одержали фрагменти ДНК приблизно у 2 т.п.н., а потім їх вшили у вектор pME18X, розщеплений XhoI та SpeI за таким самим способом, як описано вище. Потім побудували плазмиду, здатну експресувати бажаний злитий білок, тобто pME18X-C-FLAGILT1. Послідовність основ та амінокислотну послідовність наведено у SEQ ID NOs: 24 та 25.

#### С-2) Виробництво експресуючих клітин та дослідження реактивності антитіла

Стосовно ILT2 (SEQ ID NO: 26) та ILT3 (SEQ ID NO: 28), застосовували вектори експресії, у яких відповідні гени клонувалися до сайтів XbaI або XhoI pcDNA4.1 (виробляється Invitrogen). ДНК наступних комбінацій ввели у клітини 293T (7x10<sup>5</sup> клітин) за таким способом, як описано у (С-1). Через два дні після введення здійснили аналіз проточної цитометрії, а потім проаналізували антитіло проти ILT7.



(1) 1 мкг pMEI 8X-N-FLAG ILT7 + 1 мкг pME18X-Мус-FcR $\gamma$

(2) 0,5 мкг pMEI 8X-C-FLAG ILT1 + 0,5 мкг pMEI 8X-Мус-FcR $\gamma$  + 0,5 мкг pcDNA4.1-ILT2 + 0,5 мкг pcDNA4.1-ILT3

Внаслідок цього будь-які антитіла не реагували на клітини, у яких експресувався ILT1. Тому припустили, що ці антитіла проти ILT7 специфічно розпізнавали молекули ILT7 на IPC (Фіг. 10).

Приклад 3

Вплив антитіла проти ILT7 на здатність виробляти IFN людини

Лімфоцити периферійної крові людини інокулювали у 96-лунковому планшеті по  $2 \times 10^5$  клітин/лунку, які вступили у реакцію з 5 мкг/мл різних антитіл при 37°C. Через одну годину культивування до реакції додали вірус грипу PR8. Через 24 години культивування вимірили IFN $\alpha$  у культуральній надосадовій рідині за допомогою набору ЕЛАЙЗА (Bender Med System). Внаслідок цього виробництво інтерферону інгібувалося після додавання антитіла проти ILT7 (Фіг. 11). А саме, визначили, що на виробництво інтерферону IPC впливало антитіло проти ILT7 цього винаходу.

Приклад 4

CDC-активність антитіла проти ILT7

А. Виробництво моноклонального антитіла проти ILT7

Клон, що виробляє моноклональне антитіло, отримали за таким самим способом, як описано у від (А-1) до (А-4) Прикладу 2. Реактивність досліджували за таким самим способом, як описано у (В) Прикладу 2, а специфічність досліджували за таким самим способом, як описано у (С) Прикладу 2. Внаслідок цього отримали гібридами #37, #28 та #33, які виробляли моноклональні антитіла проти ILT7 з гарною реактивністю та специфічністю. CDC-активність вимірювали так, як описано далі, застосовуючи моноклональне антитіло проти ILT7, де вироблялося три види цих гібридом.

В. Визначення CDC-активності

В-1) Попереднього дня перед цільовим виробництвом лінії клітин-мішеней (клітинна лінія ILT7-CHO) наступну ДНК ввели у клітини CHO-k1, які інокулювали по  $6 \times 10^5$  клітин на чашку (діаметром 6 см), застосовуючи Effectene Transfection Reagent (виробляється QLAGEN), а потім резистентні штами зібрали, застосовуючи 800 мкг/мл Zeocin (виробляється Invitrogen).

Введена ДНК: 1 мкг pcDNA3.1-C-FLAG ILT7 + 2 мкг pME18X-Мус FcR $\gamma$ .

Після цього клітинну лінію, яка суттєво експресувала ILT7, отримали, застосовуючи клітинний сортер (BD FACSAria, виробляється Becton Dickinson). Аналізом проточної цитометрії підтвердили, що вибрана клітинна лінія суттєво експресувала ILT7. Операцію аналізу із застосуванням проточної цитометрії здійснювали згідно зі способом, описаним у (А-4) Прикладу 2, за виключенням того, що для проточної цитометрії застосовували BD FACSCaliber (виробляється BD). Наступні антитіла застосовували для первинного антитіла та вторинного антитіла, відповідно.

Первинне антитіло: 5 мкг/мл антитіла проти ILT7 миші (#37).

Вторинне антитіло: R-рикоеритрин (R-PE)-кон'юговане анти-мишаче імуноглобулін-специфічне поліклональне антитіло козла (BD).

В-2) Реакція клітин-мішеней на антитіла проти ILT7

Отримані клітини-мішені, як описано у (В-1) (клітини ILT7-CHO), одержали, застосовуючи 5 мМ розчин EDTA/PBS, а потім суспендували у середовищі CDC з наведеним далі складом, так щоб концентрація становила  $4 \times 10^5$  клітин/мл. Суспензію розподілили без залишків на 96-лунковому планшеті по 50 мкл/лунку.

Середовище CDC:

RPMI1640,

0,1% BSA (альбумін бичачої сироватки),

100 одиниць/мл пеніциліну,

100 мкг/мл стрептомицину,

10 мМ Hepes (pH 7,6),

2 мМ L-глутаміну.

50 мкл розчину антитіла проти ILT7, приготовленого у середовищі CDC, додали до кожної лунки та змішали так, щоб кінцева концентрація антитіл становила 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл та 5 мкг/мл. Потім туди додали 50 мкл середовища CDC, що містило комплемент з наведеним далі складом, та змішали так, щоб кінцева концентрація комплементу становила 6%, а потім культивували при 37°C протягом 2 годин.

Середовище CDC, що містило комплімент:

1 мл комплементу молодого кроля (Catalog No.: CL3441, виробляється CEDARLANE),

Середовище CDC (див. вище).

Потім суспензію центрифугували (умови центрифугування: при 250 g протягом 4 хвилин) та надосадову рідину одержали, звертаючи увагу на те, щоб вона не була забруднена клітинами. LDH у надосадовій рідині вимірювали за звичайним способом, що було визначено як "Кількість LDH, що витікали з клітини-мішені завдяки активності комплекменту" (Експериментальний зразок).

Наступні параметри також приготували, щоб визначити CDC-активність.

Спонтанне виділення LDH з клітин-мішеней: тільки клітини-мішені культивували у такому ж самому об'ємі, як і зразок, та приготували.

Максимальне виділення LDH з клітин-мішеней: тільки клітини-мішені культивували у такому ж самому об'ємі, як і зразок, а потім до них додали розчин TritonX-100, включений у набір, за 60 хвилин до одержання надосадової рідини, так щоб кінцева концентрація становила 0,8%, та приготували.

Контроль корекції об'єму: таку ж саму кількість TritonX-100, яку додавали, коли готували максимальне виділення LDH з клітин-мішеней, додали до культурального середовища такого ж об'єму, що й у зразка, та приготували.

Основа культурального середовища: приготували культуральне середовище такого ж самого об'єму, що й у зразка, та розчин, до якого додавали CDC-середовище, що містило комплемент, додавали до культурального середовища, так щоб був приготований такий же самий об'єм, що й у зразка.

Такий самий об'єм культурального середовища, що й у зразка, відняли від абсорбції Максимальної мішені та Спонтанної мішені. Розчин, до якого додавали CDC-середовище, що містило комплемент, додавали до культурального середовища так, щоб мати такий самий об'єм, що й у зразка, відняли від абсорбції Експериментального зразка та коректували. CDC-активність підраховували, застосовуючи наступне рівняння. Результати наведено у Таблиці 1 та Фіг. 12. Навіть у тому випадку, коли застосовувалися моноклональні антитіла проти ILT7, отримані з гібридами, 80% або більше CDC-активності спостерігали, коли концентрація антитіла становила 0,5 мкг/мл або більше.

$$\text{CDC-активність (\%)} = \frac{\text{Експериментальний зразок} - \text{Спонтанна мішень}}{\text{Максимальна мішень} - \text{Контрольний об'єм} - \text{Спонтанна мішень}} \times 100$$

Таблиця 1

	Концентрація антитіл (мкг/мл)	Цитотоксичність (середня)	Цитотоксичність (стандартне відхилення)
#37	0,1	14,78	3,16
	0,5	85,50	0,60
	1	86,13	2,93
	5	90,26	1,87
	0,1	18,52	0,60
#28	0,5	80,97	1,62
	1	83,64	1,99
	5	88,17	3,32
	0,1	4,42	1,58
	0,5	82,16	3,35
#33	1	85,39	2,78
	5	86,18	1,71
	0,1	1,53	0,60
	0,5	1,47	2,50
	1	3,68	2,90
Мишачий IgG2a	5	3,06	1,72
	0	2,10	0,49
Без Ab	0	2,10	0,49

#### Порівняльний приклад 1

Точно таку ж операцію виконували за таким самим способом, як описано у (B) та (C) Прикладу 4, за тим винятком, що IgG2a миші застосовували замість антитіла проти ILT7. Результати наведено у Прикладі 4, а також у Таблиці 5 та Фіг. CDC-активність до клітин-мішеней не спостерігали в антитілах, відмінних від моноклонального антитіла проти ILT7.

#### Приклад 5

Інтерналізація антитіла проти ILT7 до клітин-мішеней

А. Моноклональне антитіло проти ILT7

Застосовували наступні моноклональні антитіла проти ILT7. Моноклональні антитіла проти ILT7: #17, #26, #37, #28 та #33.

#### В. Спостереження інтерналізації

##### В-1) Виробництво лінії клітин-мішеней (клітинна лінія ILT7-CHO)

5 Лінію клітин-мішеней (клітинну лінію ILT7-CHO) отримали за таким самим способом, як описано у (В-1) Прикладу 4.

##### В-2) Реакція клітин-мішеней на антитіло проти ILT7

Одержані клітини ILT7-CHO суспендували у буфері з температурою льоду (Т(-) + 10% FBS) з наступним складом при  $1 \times 10^6$  клітин/мл, застосовуючи 5 мМ розчин EDTA/PBS.

10 Середовище Т (-):

RPMI1640,

100 одиниць/мл пеніциліну,

100 мкг/мл стрептомицину,

10 мМ Hepes (pH 7,6),

15 2 мМ L-глутаміну,

1 мМ пірувату натрію,

50 мкМ 2-меркаптоетанолу,

10% нагрітої дезактивованої фетальної бичачої сироватки.

20 1 мл суспензії, яку описано вище, помістили у пробірку для центрифугування об'ємом 15 мл, потім центрифугували (умови центрифугування: при 1200 обертах за хвилину, при 4°C протягом 5 хвилин), а потім надосадову рідину відкинули. 200 мкл суспензії моноклонального антитіла проти ILT7 (10 мкг/мл) додали до клітинних осадів, перемішали, а потім інкубували при 4°C протягом 30 хвилин, потім двічі промили холодним як лід середовищем Т (-) (кількість середовища, що застосовувалася: 10 мл для промивання, умови центрифугування: при 1200 обертах за хвилину, при 4°C протягом 5 хвилин).

25 В-3) Модифікація імунного комплексу ILT7 - антитіло проти ILT7, присутнього на поверхні клітин-мішеней

Після цього імунний комплекс ILT7 - антитіло проти ILT7, присутній на поверхні клітин, модифікували вторинним антитілом, яке помітили флюоресценцією з метою виявлення.

30 Специфічний спосіб описано далі. APC-мічене поліклональне антитіло козла проти мишачого імуноглобуліну (Номер у каталозі: 550826BD, виробляється Biosciences), що містило холодне як лід середовище Т (-), додали до клітинних осадів, отриманих так, як описано у (В-2), потім інкубували в умовах затемнення при 4°C протягом 20 хвилин, а потім двічі промили холодним як лід середовищем Т (-) (кількість середовища, що застосовувалася: 10 мл для одного промивання, умови центрифугування: при 1200 обертах за хвилину, при 4°C протягом 5 хвилин). Потім туди додали холодне як лід середовище Т (-) і застосовували як суспензію  $1 \times 10^6$  клітин/мл.

##### В-4) Індукція інтерналізації шляхом інкубації при 37°C

40 Суспензію, отриману так, як описано у (В-3), рівними частинами розподілили у дві пробірки (тобто, пробірки (а) та (б)). Пробірки (а) та (б) інкубували при 37°C та 4°C, відповідно, в умовах затемнення протягом 60 хвилин. Після інкубації до них додали 1% FBS/PBS (холодний як лід) з метою припинення інтерналізації. Отриманий розчин центрифугували (умови центрифугування: при 1200 обертах за хвилину, при 4°C протягом 5 хвилин), а потім надосадову рідину відкинули, потім промили двічі 1% FBS/PBS (холодним як лід) (кількість розчину: 10 мл для одного промивання, умови центрифугування: при 1200 обертах за хвилину, при 4°C протягом 5 хвилин).

45 В-5) Модифікація імунного комплексу ILT7 - антитіло проти ILT7, що залишився на поверхні клітин-мішеней після інкубації

50 Імунний комплекс ILT7 - антитіло проти ILT7, що залишився на клітинній поверхні після інкубації, модифікували третинним антитілом з метою виявлення за допомогою флюоресценції. Специфічний спосіб описано далі. 20 мкл суспензії, що містило третинні антитіла (FITC-мічене антитіло осла проти козячого IgG (номер у каталозі: sc-2024, виробляється Santa cruz biotechnology)) додали до клітинних осадів, отриманих так, як описано у (В-4), а потім перемішали та залишили в умовах затемнення на 15 хвилин при 4°C. Отриманий розчин промили (кількість розчину: 10 мл для одного промивання, умови центрифугування: 1200 обертів за хвилину, при 4°C протягом 5 хвилин).

##### В-6) Аналіз антитіла проти ILT7, присутнього у клітинах-мішенях

60 Після цього 150 мкл 1% FBS/PBS додали до клітинних осадів, отриманих так, як описано у (В-5), а потім суспендували та зібрали у мікротитрувальну пробірку об'ємом 1,2 мл, а потім здійснили аналіз проточної цитометрії. Під час аналізу середню інтенсивність флюоресценції

(MPI) кожної клітини проаналізували окремо у FITC та APC. Далі підраховали коефіцієнт інтенсивності флюоресценції (%) за наступним рівнянням.

$$\text{Коефіцієнт інтенсивності флюоресценції (\%)} = \frac{\text{Середня інтенсивність флюоресценції клітин, інкубованих при 37°C протягом 60 хвилин}}{\text{Середня інтенсивність флюоресценції клітин, інкубованих при 4°C протягом 60 хвилин}} \times 100$$

5

Результати наведено у Таблиці 2, Таблиці 3 та Фіг. 13.

Таблиця 2

	FITC			APC		
	Середня інтенсивність флюоресценції		Коефіцієнт інтенсивності флюоресценції (%)	Середня інтенсивність флюоресценції		Коефіцієнт інтенсивності флюоресценції (%)
	Температура інкубації (°C)			Температура інкубації (°C)		
	4	37		4	37	
#17	35,7	15,9	44,5	1384	1320	95,4
#26	29,8	16,5	55,4	844	816	96,7
#37	51,0	28,5	55,9	2194	2155	98,2
#28	40,6	19,3	47,5	1746	1709	97,9
#33	47,7	22,6	47,4	1882	1845	98,0
IgG2a	3,7	4,2	116,2	3	3.64	121,3

Таблиця 3

	Зразки первинних антитіл	Коефіцієнт інтенсивності флюоресценції (%)	
		APC	FITC
Приклад 5	Антитіло #17 проти ILT7	95,4	44,5
	Антитіло #26 проти ILT7	96,7	55,4
	Антитіло #37 проти ILT7	98,2	55,9
	Антитіло #28 проти ILT7	97,9	47,5
	Антитіло #33 проти ILT7	98,0	47,4
Порівняльний приклад 2	Мишачий IgG2a	121,3	116,2

10

Інтенсивність флюоресценції FITC - це індикатор кількості імунного комплексу ILT7 - антитіло проти ILT7, який залишився на клітинній поверхні після інкубації. Середня інтенсивність флюоресценції FITC стосовно клітин, інкубованих при 37°C протягом 60 хвилин, становить приблизно 50% порівняно з клітинами, інкубованими при 4°C.

15

З іншого боку, інтенсивність флюоресценції APC - це індикатор кількості імунного комплексу ILT7 - антитіло проти ILT7, присутнього на клітинній поверхні до початку інкубації. Імунний комплекс ILT7 - антитіло проти ILT7 виявляється незважаючи на те, чи є він присутнім на клітинній поверхні, чи його включено у клітини після інкубації. У Прикладі 5 інтенсивність флюоресценції APC після інкубації у випадку інкубації при 37°C дорівнювала інтенсивності флюоресценції APC у випадку інкубації при 4°C. Це вказує на те, що імунний комплекс ILT7 - антитіло проти ILT7 може бути присутнім в будь-якій ділянці клітин-мішеней, навіть коли інкубацію здійснюють при будь-якій температурі. Як згадувалося вище, визначили, що моноклональне антитіло проти ILT7 спричиняє інтерналізацію ILT7 внаслідок інкубації при 37°C.

20

Порівняльний приклад 2

25

Точно таку саму операцію виконували за таким самим способом, як описано у Прикладі 5, за тим винятком, що мишачий IgG2a застосовували замість антитіла проти ILT7. Результати наведено у Прикладі 5, а також у Таблиці 2, Таблиці 3 та Фіг. 13. У випадку, коли застосовували мишачий IgG2a, будь-які зміни в інтенсивності флюоресценції FITC та APC не спостерігали, отже, визначили, що мишачий IgG2a не викликає інтерналізацію ILT7.

30

Приклад 6

Стосується структури моноклонального антитіла миші проти ILT7 людини

Послідовності варіабельних ділянок

A. Клонування кДНК, що кодує варіабельну ділянку антитіла проти ILT7 миші

A-1) Стосовно гібридом, що виробляють антитіла проти ILT7 миші

Наступні гібридами застосовували як гібридами, що виробляють антитіла проти ILT7 миші.

5 Гібридома #11 (Номер доступу: FERM BP-10704).

Гібридома #17 (Номер доступу: FERM BP-10705).

A-2) Виділення загальних РНК

10 Загальні РНК виділили з гібридом, описаних у (A-1), застосовуючи комерційно доступний набір "RNeasy Mini Kit" (номер у каталозі: 74106, виробляється Qiagen) згідно з інструкцією, що додається до набору. В обох випадках приблизно 200 мкг загальних РНК отримали з  $1 \times 10^7$  гібридом.

A-3) Ампліфікація та фрагментація кДНК, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга миші

15 кДНК, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга миші, ампліфікували за способом 5'RACE, застосовуючи 5 мкг загальних РНК, виділених так, як описано у (A-2). Стосовно ампліфікації: застосовували комерційно доступний набір "5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA ENDS, Version 2.0 Kit" (номер у каталозі: 18374-058, виробляється Invitrogen). Це специфічно описується наступним способом. По-перше, кДНК першого ланцюга синтезували з загальних РНК, отриманих так, як описано у (A-2), за допомогою зворотної транскриптази (ревертази).  
20 (ревертази). Послідовності основ анти смислових праймерів (GSP1), які застосовувалися у цей час, наведено у Таблиці 4.

Таблиця 4 Праймери для ампліфікації гена, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга миші

Використані гібридоми	Найменування праймерів	SEQ ID No.	Послідовність
#11	Mu IgG3VH5RACE-GSP1	30	5' CCA TAG TTC CAT TTT ACA GTT ACC 3' (24-мер)
	Mu IgG3VH5RACE-GSP2	31	5' GGG ACC AAG GGA TAG ACA GA 3' (20-мер)
#17	Mu IgG2aVH5RACE-GSP1	32	5' TCC AGA GTT CCA GGT CAA GGT CAC 3' (24-мер)
	Mu IgG2aVH5RACE-GSP2	33	5' GCC AGT GGA TAG ACC GAT GG 3' (20-мер)

25 Після цього загальні РНК розщепили RNaseH, а кДНК першого ланцюга, що залишилася як єдиний ланцюг, очистили способом, що застосовує агарозний гель з низькою точкою плавлення (1,5%). Далі dC (тобто нуклеотидний гомополімер) приєднали до 3'-закінчення кДНК першого ланцюга, застосовуючи термінальну дезоксинуклеотидил трансферазу (TdT). кДНК ампліфікували за способом ПЛР, застосовуючи якірні праймери (SEQ ID NO: 34), що мають нуклеотидний полімер, комплементарний до dC (якірна послідовність) на 3'-закінченні, та антисмислові праймери (GSP2), наведені у Таблиці 4. Далі отримані продукти ПЛР застосовували як матриці. кДНК ампліфікували за способом ПЛР Nested, застосовуючи праймер AUAP (SEQ ID NO: 35) та антисмисловий праймер (GSP2), наведений у Таблиці 4. Далі продукти ПЛР очистили за способом, що застосовує агарозний гель з низькою точкою плавлення (1,5%).

Якірний праймер для 5'RACE (SEQ ID NO: 34)

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3' (36-мер)

Праймер AUAP для 5'RACE (SEQ ID NO: 35)

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3' (20-мер)

40 A-4) Ампліфікація та фрагментація кДНК, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга миші

кДНК, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга миші, ампліфікували з загальних РНК, виділених так, як описано у (A-2), за таким самим способом, як описано у (A-3). Послідовності основ праймерів, що застосовувалися у цей час, наведено у Таблиці 5. Отримані продукти ПЛР  
45 очистили за способом, що застосовує агарозний гель з низькою точкою плавлення (1,5%).

Таблиця 5 Праймери, що застосовуються для ампліфікації гена, що кодує  
варіабельну ділянку легкого ланцюга миші

Викорис- тані гіб- ридоми	Найменування праймерів	SEQ ID No.	Послідовність
#1K, #17	Mu IgVL5RACE-GSP1	36	5' TTC ACT GCC ATC AAT CTT CCA CTT 3' (24-мер)
	Mu IgVL5RACE-GSP2	37	5' GAT GGA TAC AGT TGG TGC AGC 3' (21-мер)

#### A-5) Підтвердження послідовності основ кДНК та визначення ділянки CDR

- Варіабельну ділянку важкого ланцюга, отриману так, як описано у (A-3), та фрагмент кДНК  
5 варіабельної ділянки легкого ланцюга, отриманої так, як описано у (A-4), клонували до вектора  
pCR4 Blunt-TOPO, застосовуючи комерційно доступний набір "Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit"  
(номер у каталозі: 1325137, виробляється Invitrogen) згідно з інструкцією, що додається до  
набору, а потім ввели до компетентних клітин *Escherichia coli*, внаслідок чого отримали  
10 трансформант *Escherichia coli*. Вищезгадану плазмиду отримали з трансформанта, потім  
підтвердили послідовність основ кДНК у плазміді, застосовуючи автоматичний секвенатор ДНК  
"PCR-based ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer" (виробляється Applied Biosystems). Правильні  
послідовності екстрагували шляхом вилучення транскриптів, отриманих з дезактивованої РНК  
15 внаслідок зсуву рамки та несмислових мутацій навколо гіперваріабельної ділянки (далі  
позначається як "ділянка CDR"). Далі гомологію послідовності основ кДНК, яку включено у  
плазмиду, порівняли з базою даних Kabat та визначили послідовності гіперваріабельної ділянки  
та варіабельної ділянки у відповідних варіабельних ділянках. Також, стосовно гібридоми #37,  
отриманої у Прикладі 4, послідовності ділянки CDR та варіабельної ділянки у варіабельних  
ділянках визначили із застосуванням такої ж самої процедури, як описано у від (A-1) до (A-5)  
Прикладу 6, застосовуючи гібридому #17. Послідовності основ кДНК варіабельних ділянок  
20 важкого ланцюга та варіабельних ділянок легкого ланцюга моноклональних антитіл проти ILT7,  
вироблених кожною гібридомою, та амінокислотні послідовності, що кодуються цими  
послідовностями, наведено у наступних SEQ ID NOs.

	Варіабельна ділянка важкого ланцюга	Варіабельна ділянка легкого ланцюга
#11	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 40
	(послідовність основ)	(послідовність основ)
	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 41
#17	(амінокислотна послідовність)	(амінокислотна послідовність)
	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 44
	(послідовність основ)	(послідовність основ)
#37	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 45
	(амінокислотна послідовність)	(амінокислотна послідовність)
	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 48
	(послідовність основ)	(послідовність основ)
	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 49
	(амінокислотна послідовність)	(амінокислотна послідовність)

#### Підтвердження ізотипу константної ділянки

- Стосовно культуральної надсадової рідини гібридоми ізотип константної ділянки  
отриманого моноклонального антитіла підтвердили, застосовуючи комерційно доступний набір  
30 для визначення ізотипу моноклонального антитіла миші (номер у каталозі: MMT1, виробляється  
Serotec Product). Константна ділянка важкого ланцюга антитіла миші #11 проти ILT7 людини  
була Igγ3, а константна ділянка легкого ланцюга була Igκ. Далі кожна константна ділянка  
важкого ланцюга антитіла миші #17 проти ILT7 людини та антитіла миші #37 проти ILT7 людини  
була Igγ2a, та кожна константна ділянка легкого ланцюга була Igκ.

#### Приклад 7

- 35 Виробництво химерних антитіл

#### A. Клонування кДНК, що кодує константну ділянку IgG людини

- Константну ділянку важкого ланцюга IgG1 людини та константну ділянку легкого ланцюга Ig  
каппа людини вибрали з бібліотеки кДНК IPC людини. Потім вибрані ділянки клонували до  
40 вектора pCR4 Blunt-TOPO, застосовуючи комерційно доступний набір "Zero Blunt TOPO PCR  
Cloning Kit" (номер у каталозі: 1325137, виробляється Invitrogen) згідно з інструкцією, що  
додається до набору, а потім ввели у компетентні клітини *Escherichia coli*, внаслідок чого  
отримали трансформант *Escherichia coli*. Вищезгадану плазмиду отримали з трансформанта,

потім послідовність основ кДНК у плазміді підтвердили, застосовуючи автоматичний секвенатор ДНК "PCR-based ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer" (виробляється Applied Biosystems).

В. Зшивання варіабельної ділянки з константною ділянкою та клонування

Застосовували відповідно кДНК, що кодує константну ділянку важкого ланцюга, отриману так, як описано у (А), та кДНК, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга, отриману так, як описано у (А-5) Прикладу 6. Обидві ДНК мають ділянку, у якій послідовність основ ДНК перекривається. Потім отримали ДНК з подвійним ланцюгом, застосовуючи спосіб розширення перекривання, що застосовує цю ділянку. Специфічний процес є наступним.

С-1) Приготування кДНК, що кодує важкий ланцюг химерного антитіла ILT7

"Плазмиду з кДНК, що кодує варіабельні ділянки #11 та #17 важкого ланцюга", яку отримали так, як описано у (А-5), перетравили рестрикційними ферментами NotI та XbaI, потім очистили за способом, що застосовує агарозний гель (1,5%). Отримані продукти розчинили у кожному буфері TE з наведеним далі складом, так щоб концентрація становила 100 пмоль/мкл, щоб приготувати розчин фрагмента кДНК, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга.

Буфер TE:

10 mM Tris-HCl,

1 mM EDTA,

pH 7,5-8,0.

Далі, "плазмиду з кДНК, що кодує константну ділянку важкого ланцюга", отриману так, як описано у В, обробили за таким самим способом, як описано вище, щоб приготувати 100 пмоль/мкл розчину. Після цього обидва розчини змішали та потім обидві ділянки перекривання гібридизували, спочатку витримуючи їх при 70°C протягом 10 хвилин, а потім витримуючи їх при 37°C протягом 5 хвилин. Після цього кДНК ампліфікували шляхом способу ПЛР та отриману кДНК перетравили рестрикційними ферментами NotI та XbaI, а потім очистили шляхом способу, що застосовує агарозний гель з низькою точкою плавлення (1,5%).

С-2) Приготування кДНК, що кодує легкий ланцюг химерного антитіла ILT7

Застосовували відповідно кДНК, що кодує константну ділянку легкого ланцюга, отриману так, як описано у (А), та кДНК, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга, отриману так, як описано у (А-5) Прикладу 6. кДНК, що кодує легкий ланцюг химерного антитіла ILT7 отримали за таким самим способом, як описано у (С-1), застосовуючи ці кДНК.

С-3) Клонування

кДНК, отриману так, як описано у (С-1), клонували до вектора плазмиди pcDNA3.1-Zeocin (виробляється Invitrogen), застосовуючи NotI та XbaI як сайти клонування, щоб отримати вектор експресії важкого ланцюга химерного антитіла ILT7. Далі кДНК, отриману так, як описано у (С-2), клонували до вектора плазмиди pcDNA3.1-hygromycin (виробляється Invitrogen), застосовуючи NotI та XbaI як сайти клонування, для отримання вектора експресії легкого ланцюга химерного антитіла ILT7. Назви кожного вектора наведено у Таблиці 6.

Таблиця 6

Назви векторів плазмід

	Важкий ланцюг химерного антитіла ILT7 для експресії	Легкий ланцюг химерного антитіла ILT7 для експресії
#11	pcDNA-#11VH	pcDNA-#11VL
#17	pcDNA-#17VH	pcDNA-#17VL

D. Експресія химерного антитіла ILT7

D-1) Тимчасова трансформація

1 мкг вектора експресії важкого ланцюга химерного антитіла ILT7 та 1 мкг вектора експресії легкого ланцюга химерного антитіла ILT7, які отримали так, як описано у (С-3), спільно трансфектували до клітин 293T, застосовуючи набір трансфекції ефектином (номер у каталозі 301427, виробляється Qiagen). Після цього отримані продукти культивували при 37°C, застосовуючи культуральне модифіковане за способом Дульбеко середовище Ігла (DMEM) з доданою 2% FBS низького IgG з наступним складом.

Культуральне модифіковане за DMEM середовище з доданою 2% FBS низького IgG:

Культуральне модифіковане за DMEM середовище (номер у каталозі: D5796, виробляється Sigma),  
2% FBS низького IgG (номер у каталозі: SH30151.03, виробляється HyClone),  
2 mM L-Глутаміну,

100 одиниць/мл пеніциліну,  
100 мкг/мл стрептомицину,  
pH від 7,2 до pH 7,4.

- Після введення векторів отримане середовище культивували протягом 96 годин та зібрали  
5 культуральну надосадову рідину. Потім клітинні фрагменти видалили шляхом центрифугування, внаслідок чого отримали сирий розчин антитіла.

#### D-2) Гомеостатична трансформація

- 1 мкг вектора експресії важкого ланцюга химерного антитіла ILT7 та 1 мкг вектора експресії  
легкого ланцюга химерного антитіла ILT7, які отримали так, як описано у (C-3), спільно  
10 трансфектували до клітин YB 2/0 (клітини, що походять з мієломи щурів, ATCC#CRL-1622),  
застосовуючи набір трансфекції ефектином (номер у каталозі 301427, виробляється Qiagen).  
Серед векторів плазмиди, що застосовуються, вектор для експресії важкого ланцюга - це маркер  
стійкості до зеоцину, та вектор для експресії легкого ланцюга - це маркер стійкості до  
гігromіцину. Отже, клітини, у які було введено обидва вектори, можна вирощувати у  
15 культуральному середовищі, до якого одночасно додається зеоцин та гігromіцин. Потім клітини  
культивували у культуральному середовищі RPMI, до якого додали зеоцин та гігromіцин, та  
вибрали резистентний штам.

Культуральне середовище RPMI з доданими зеоцином-гігromіцином:

- Культуральне середовище RPMI1640 (номер у каталозі: R8758, виробляється Sigma),  
20 10% FBS (фетальна бичача сироватка),  
0,01 M HEPES (N-2-гідроксietилпшеразин-N'-2-етансульфонова кислота),  
1 mM пірувату натрію,  
2 mM L-глутаміну,  
100 одиниць/мл пеніциліну,  
25 100 мкг/мл стрептомицину,  
55 мкM 2-меркаптоетанолу,  
0,5 мг/мл зеоцину,  
0,5 мг/мл гігromіцину,  
pH від 7,2 до pH 7,4.

- Через три дні після цього кількість виробленого антитіла у культуральній надосадовій рідині  
визначили за способом ЕЛАЙЗА. Вибрали клітинну лінію, що виробляє химерне антитіло ILT7, з  
високим рівнем експресії та клітини, що суттєво збільшилися. Крім того, одиничне клонування  
вибраних клітинних ліній виконували за способом клітинного сортера, внаслідок чого отримали  
наступні клітинні лінії:

- 35 клітинна лінія, що виробляє химерне антитіло ILT7#11: клітинна лінія # 11-5 та клітинна лінія  
#11-16;

клітинна лінія, що виробляє химерне антитіло ILT7#17: клітинна лінія #17-24.

- Вищезгадані клітинні лінії (клітинну лінію #11-5, клітинну лінію #11-16 та клітинну лінію #17-  
24) відповідно культивували у культуральному середовищі RPMI з доданою 5% FBS з  
40 наведеним далі складом. Температура інкубації та тривалість інкубації становили 37°C та 96  
годин, відповідно.

Культуральне середовище RPMI з доданою 5% FBS:

- культуральне середовище RPMI1640 (номер у каталозі: R8758S, виробляється Sigma),  
45 5% FBS,  
0,01 M HEPES,  
1 mM пірувату натрію,  
2 mM L-глутаміну,  
100 одиниць/мл пеніциліну,  
100 мкг/мл стрептомицину,  
50 55 мкM 2-меркаптоетанолу,  
pH від 7,2 до pH 7,4.

Культуральну надосадову рідину зібрали, а потім клітинні фрагменти видалили шляхом  
центрифугування, внаслідок чого отримали сирий розчин антитіла.

#### Е. Очищення антитіл

- Кожний сирий розчин антитіла, отриманий так, як описано у (D-1) та (D-2), очистили на  
афінній колонці білка А (rProtein A Sepharose FF, номер у каталозі: 17-1279-01, виробляється  
Amersham Pharmacia). Умови очищення були наступними. Афінне очищення виконували,  
застосовуючи фізіологічний розчин з фосфатним буфером (-) (PBS) з наведеним далі складом  
як буфер адсорбції, та 0,1 M буфер з цитрату натрію (pH 3) як буфер елюювання, згідно з  
60 інструкцією, що додається. 1 M Tris-HCl (pH 8,0) додали до елююваних фракцій, щоб довести



pH до приблизно 7,2. Вимірювали оптичну щільність при 450 та 620 нм, а потім вибрали лунки, які демонстрували позитивну реакцію. Стосовно концентрації очищених антитіл визначили абсорбцію при 280 нм та підраховали на основі значення 1,38 оптичної щільності/мг/мл. Взаємозв'язок між отриманими химерними антитілами ILT7, гібридами, з яких походить ген варіабельної ділянки, та клітинами-хазяїнами наведено у Таблиці 7.

Буфер PBS (-):

0,2 г/л монокалій дигідроген фосфату,

0,2 г/л хлориду калію,

8 г/л хлориду натрію,

1,15 г/л безводного динатрій моногідроген фосфату.

Таблиця 7

## Отримані химерні антитіла

Найменування отриманих химерних антитіл	Використані гібридами	Форма трансформації	Уведені клітини
Химерне антитіло #11 ILT7	#11	Тимчасова трансформація	293T
Химерне антитіло #17 ILT7	#17		
Химерне антитіло #11-5 ILT7	#11	Гомеостатична	YB2/O
Химерне антитіло #11-16 ILT7	#11		
Химерне антитіло #17-24 ILT7	#17		

Послідовності основ кДНК та амінокислотні послідовності важких та легких ланцюгів отриманих химерних антитіл наведено далі, відповідно. В кожній амінокислотній послідовності амінокислотна послідовність від N-закінчення до -1 - це сигнальна послідовність, а амінокислотна послідовність від 1 до C-закінчення - це амінокислотна послідовність зрілого білка. Тобто, важкий та легкий ланцюги, що складають ці химерні антитіла, складаються з амінокислотної послідовності від 1 до C-закінчення кожної з наступних амінокислотних послідовностей.

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг
#11	SEQ ID NO: 50 (послідовність основ) SEQ ID NO: 51 (амінокислотна послідовність)	SEQ ID NO: 52 (послідовність основ) SEQ ID NO: 53 (амінокислотна послідовність)
#17	SEQ ID NO: 54 (послідовність основ) SEQ ID NO: 55 (амінокислотна послідовність)	SEQ ID NO: 56 (послідовність основ) SEQ ID NO: 57 (амінокислотна послідовність)

## Промислова придатність

Цим винаходом пропонується імуноген, корисний у виробництві антитіла, що специфічно розпізнає ILT7 людини, та спосіб виробництва антитіла проти ILT7, який використовує цей імуноген. Антитіло, яке специфічно розпізнає ILT7 людини, цього винаходу специфічно розпізнає ILT7 у присутності родини ILT. Внаслідок цього, антитіло цього винаходу можна застосовувати для виявлення та виділення ILT7 людини. Наприклад, розташування ILT7 можна також проаналізувати, застосовуючи антитіло цього винаходу. Вважають, що ILT7 - це молекула, що є тісно пов'язаною з диференціюванням та функціонуванням IPC або дендритних клітин. Отже, антитіло, що розпізнає ILT7 з високою специфічністю, є корисним для аналізу функції IPC або дендритних клітин. Відомим є IPC-подібні (що мають характеристику, у якій експресується BDCA-2) ракові клітини (Chaper of L et al. Eur. J. Immunol. 34; 418-426, 2004, Maeda T et al., Int. J. Hematol. 81; 148-154, 2005). Підтвердження експресії ILT7 у цих клітинах може дозволити діагностувати рак та отримати терапевтичний агент.

У випадку аутоімунних хвороб, наприклад, вказується на глибокий взаємозв'язок між  $IFN\alpha$ , що виробляється IPC, та розвитком псоріазу, який є хворобою шкіри (Nestle FO et al., J. Exp. Med. 202, 135-143, 2005). Внаслідок цього ступінь суворості псоріазу можна досліджувати шляхом ідентифікації IPC у тканині шкіри пацієнтів з псоріазом, тобто у зразках біопсії, застосовуючи антитіло проти ILT7.

Відомо, що розвиток СНІДу у пацієнтів, інфікованих ВІЛ, корелює з кількістю ІРС. А саме, багато ІРС спостерігали у пацієнтів, у яких не було симптомів, та зменшення ІРС спостерігали на початку хвороби (Soumells V. et al., Blood 98; 906-912, 2001). Отже, це є ефективним для передбачення прогнозу вірусної інфекції, такої як ВІЛ.

Наприклад, ІLT7 - це молекула, що експресується специфічно у ІРС людини. Внаслідок цього, антитіло проти ІLT7 цього винаходу можна застосовувати для виявлення, ідентифікації або виділення ІРС. ІРС - це клітини, що виробляють більшу частину інтерферону типу 1. Отже, виявлення, ідентифікація або виділення є важливою метою під час діагностування та дослідження хвороб, що залучають інтерферон типу 1. Стосовно таких хвороб, можна проілюструвати різні автоімунні хвороби та інфекції, у утворення патологічного стану яких залучається інтерферон.

Крім того, антитіло проти ІLT7 цього винаходу має інгібіторний вплив на активність ІРС. Отже, активність ІРС можна інгібувати, застосовуючи антитіло проти ІLT7 цього винаходу. Крім того, хвороби, що залучають інтерферон типу 1, можна лікувати, інгібуючи активність ІРС. Специфічно, антитіло проти ІLT7 цього винаходу є корисним для різних автоімунних хвороб та інфекцій, в утворення патологічного стану яких залучається інтерферон. Зокрема, оскільки антитіло проти ІLT7 має високу специфічність, воно може ефективно видалити ІРС.

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується із позаклітинним доменом ІLT7 людини, або фрагмент антитіла, який містить його антиген-зв'язувальну ділянку, де моноклональне антитіло містить амінокислотні послідовності згідно з будь-якою з наступних від i) до iii), такі як CDR1, CDR2 та CDR3 у варіабельній ділянці важкого ланцюга та варіабельній ділянці легкого ланцюга:

i) CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга: SDYAWN (SEQ ID NO: 58);  
CDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга: YISYSGSTSYNPSLKSR (SEQ ID NO: 59); та

CDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга: SPPYYAMDY (SEQ ID NO: 60);  
CDR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга: KASQDVGTA (SEQ ID NO: 61);  
CDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга: WASTRHT (SEQ ID NO: 62); та

CDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга: QQYSSYPLT (SEQ ID NO: 63);  
ii) CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга: SYWIH (SEQ ID NO: 64);  
CDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга: RIYPGTGSTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 65); та

CDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга: YPTYDWYFDV (SEQ ID NO: 66);  
CDR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга: RASQSISNYLH (SEQ ID NO: 67);  
CDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга: YASQSI (SEQ ID NO: 68);

CDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга: QQSNSWPLT (SEQ ID NO: 69);

iii) CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга: SDYAWN (SEQ ID NO: 70);  
CDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга: YISYSGSTSYNPSLKSR (SEQ ID NO: 71);

CDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга: ALPLPWFAY (SEQ ID NO: 72);  
CDR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга: KASQDVGTA (SEQ ID NO: 73);

CDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга: WASTRHT (SEQ ID NO: 74); та

CDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга: QQYSSYPYT (SEQ ID NO: 75).

2. Моноклональне антитіло або фрагмент антитіла за п. 1, де моноклональне антитіло специфічно зв'язується з клітиною людини, що виробляє інтерферон.

3. Моноклональне антитіло або фрагмент антитіла за п. 1, де моноклональне антитіло містить зрілу послідовність амінокислотної послідовності, що вибрана з будь-якої з наступних комбінацій від (a) до (c) як варіабельна ділянка важкого ланцюга та варіабельна ділянка легкого ланцюга:

a) варіабельна ділянка важкого ланцюга SEQ ID NO: 39 та варіабельна ділянка легкого ланцюга SEQ ID NO: 41;

b) варіабельна ділянка важкого ланцюга SEQ ID NO: 43 та варіабельна ділянка легкого ланцюга SEQ ID NO: 45; та

c) варіабельна ділянка важкого ланцюга SEQ ID NO: 47 та варіабельна ділянка легкого ланцюга SEQ ID NO: 49.

4. Моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується із позаклітинним доменом ІLT7 людини, або фрагмент антитіла, який містить його антиген-зв'язувальну ділянку, де моноклональне

антитіло продукується гібридомою ILT7#11, депонованою за номером доступу FERM BP-10704, або гібридомою ILT7#17, депонованою за номером доступу FERMBP-10705.

5. Полінуклеотид, який кодує моноклональне антитіло або фрагмент антитіла за п. 1 або п. 3.

6. Вектор, який містить полінуклеотид, що кодує моноклональне антитіло або фрагмент антитіла за п. 1 або п. 3.

7. Трансформована клітина, яка утримує вектор за п. 6 у стані здатності до експресії.

8. Спосіб виробництва моноклонального антитіла або фрагмента антитіла за п. 1 або п. 3, який передбачає етапи культивування трансформованої клітини за п. 7 та одержання моноклонального антитіла або фрагмента антитіла, який містить його антиген-зв'язувальну ділянку, з цієї культури.

9. Гібридома, яка виробляє будь-яке моноклональне антитіло за п. 1 або п. 2.

10. Гібридома, яка виробляє моноклональне антитіло, яке специфічно зв'язується із позаклітинним доменом ILT7, при цьому гібридома депонована за номером доступу FERM BP-10704 або за номером доступу FERM BP-10705.

11. Спосіб виробництва моноклонального антитіла, який передбачає етапи: культивування гібридоми за п. 10 та збирання моноклонального антитіла з цієї культури.

12. Спосіб виробництва клітини, що виробляє моноклональне антитіло за п. 1, який передбачає наступні етапи:

(1) введення імунній тварині клітини, що експресує екзогенний білок, який містить позаклітинний домен ILT7 людини, та екзогенну молекулу, яка зв'язана з ILT7 людини; та

(2) вибір виробляючої антитіла клітини, яка виробляє антитіло, яке специфічно зв'язується з ILT7 людини, з виробляючих антитіла клітин імунних тварин.

13. Спосіб за п. 12, де молекула, яка зв'язана з ILT7 людини, - це білок клітинної мембрани.

14. Спосіб за п. 13, де білок клітинної мембрани - це  $\gamma$ -ланцюг рецептора Fc.

15. Спосіб за п. 14, де клітина, що експресує ILT7 людини та молекулу, що зв'язана з ILT7 людини, - це клітина, що утримує у стані здатності до експресії наступні (а) та (б):

(а) екзогенний полінуклеотид, що кодує амінокислотну послідовність, яка містить позаклітинний домен ILT7 людини; та

(б) екзогенний полінуклеотид, що кодує  $\gamma$ -ланцюг рецептора Fc.

16. Спосіб за п. 15, де клітина - це тваринна клітина.

17. Спосіб за п. 16, де клітина - це клітина, що походить від людини.

18. Спосіб за п. 17, де клітина, що походить від людини, - це клітина 293T.

19. Спосіб за п. 12, який додатково включає етап клонування клітини, що виробляє антитіло, отриманої за способом за п. 12.

20. Спосіб виробництва моноклонального антитіла за п. 1, який передбачає етапи культивування клітини, що виробляє антитіло, за способом за п. 12 та одержання моноклонального антитіла з цієї культури.

21. Моноклональне антитіло за п. 1, яке можна отримати за наступними етапами:

(1) введення імунній тварині клітини, яка екзогенно експресує білок, який містить позаклітинний домен ILT7 людини, та молекулу, яка зв'язана з ILT7 людини;

(2) вибір виробляючої антитіла клітини, яка виробляє антитіло, яке специфічно зв'язується з ILT7 людини, з виробляючих антитіла клітин імунних тварин; та

(3) культивування вибраної на етапі (2) клітини, яка виробляє антитіла, та одержання антитіла, здатного розпізнавати ILT7 людини, з цієї культури.

22. Імуноген для виробництва антитіла за п. 1, який включає тваринну клітину, у якій утримуються у стані здатності до екзогенної експресії (а) полінуклеотид, що кодує амінокислотну послідовність, яка містить позаклітинний домен ILT7 людини, та (б) полінуклеотид, що кодує  $\gamma$ -ланцюг рецептора Fc; або її фракцію клітинної мембрани.

23. Імуноген за п. 22, де тваринна клітина - це клітина, що походить від людини.

24. Спосіб виявлення клітини, що виробляє інтерферон, який передбачає етапи: контактування моноклонального антитіла за п. 1 або фрагмента антитіла, який містить його антиген-зв'язувальну ділянку, із випробовуваною клітиною та виявлення моноклонального антитіла або фрагмента антитіла, який містить його антиген-зв'язувальну ділянку, зв'язаного з клітиною.

25. Реагент для виявлення клітини, що виробляє інтерферон, який містить моноклональне антитіло за п. 1 або фрагмент антитіла, який містить його антиген-зв'язувальну ділянку.

26. Спосіб інгібування *in vitro* активності клітини, що виробляє інтерферон, який передбачає етап контактування будь-якого з наступних компонентів з клітиною, яка виробляє інтерферон:

(а) моноклонального антитіла за п. 1, що інгібує активність клітини, яка виробляє інтерферон, або фрагмента антитіла, який містить його антиген-зв'язувальну ділянку;

- (b) імуноглобуліну, у який уведена гіперваріабельна ділянка моноклонального антитіла, описаного у (a), або фрагмента імуноглобуліну, який містить його антиген-зв'язувальну ділянку.
27. Спосіб інгібування у живому організмі активності клітини, яка виробляє інтерферон, який передбачає етап введення живому організму будь-якого з наступних компонентів:
- 5 (a) моноклонального антитіла за п. 1, що інгібує активність клітини, яка виробляє інтерферон, або фрагмента антитіла, який містить його антиген-зв'язувальну ділянку;
- (b) імуноглобуліну, у який уведена гіперваріабельна ділянка моноклонального антитіла, описаного у (a), або фрагмента імуноглобуліну, який містить його антиген-зв'язувальну ділянку; та
- 10 (c) полінуклеотиду, що кодує будь-який компонент, описаний у (a) або (b).
28. Спосіб за п. 26 або 27, де активність клітини, яка виробляє інтерферон, є наслідком або активності клітини, що виробляє інтерферон, або виживання клітини, що виробляє інтерферон, або їх обох.
29. Інгібітор активності клітини, яка виробляє інтерферон, який містить будь-який з наступних компонентів як активний інгредієнт:
- 15 (a) моноклональне антитіло за п. 1, що інгібує активність клітини, яка виробляє інтерферон, або фрагмент антитіла, який містить його антиген-зв'язувальну ділянку;
- (b) імуноглобулін, у який уведена гіперваріабельна ділянка моноклонального антитіла, описаного у (a), або фрагмент імуноглобуліну, який містить його антиген-зв'язувальну ділянку;
- 20 (c) полінуклеотид, що кодує будь-який компонент, описаний у (a) або (b).
30. Інгібітор активності клітини, яка виробляє інтерферон, за п. 29, де активність клітини, яка виробляє інтерферон, є наслідком або активності клітини, що виробляє інтерферон, або виживання клітини, що виробляє інтерферон, або їх обох.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> GINKGO BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.  
 <120> Антитіло проти ILT7  
 <130> G2-A0501P  
 <150> JP 2005-366465  
 <151> 2005-12-20  
 <160> 76  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 1577  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (24)..(1520)  
 <220>  
 <221> сигнальний білок  
 <222> (24)..(71)  
 <220>  
 <221> зрілий білок  
 <222> (72)..(1520)  
 <400> 1  
 cagggccagg aggaggagat gcc atg acc ctc att ctc aca agc ctg ctc ttc 53  
 Met Thr Leu Ile Leu Thr Ser Leu Leu Phe  
 -15 -10  
 ttt ggg ctg agc ctg ggc ccc agg acc cgg gtg cag gca gaa aac cta 101  
 Phe Gly Leu Ser Leu Gly Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Glu Asn Leu  
 -5 -1 1 5 10  
 ccc aaa ccc atc ctg tgg gcc gag cca ggt ccc gtg atc acc tgg cat 149  
 Pro Lys Pro Ile Leu Trp Ala Glu Pro Gly Pro Val Ile Thr Trp His  
 15 20 25  
 aac ccc gtg acc atc tgg tgt cag ggc acc ctg gag gcc cag ggg tac 197  
 Asn Pro Val Thr Ile Trp Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Gln Gly Tyr  
 30 35 40  
 cgt ctg gat aaa gag gga aac tca atg tcg agg cac ata tta aaa aca 245  
 Arg Leu Asp Lys Glu Gly Asn Ser Met Ser Arg His Ile Leu Lys Thr  
 45 50 55  
 ctg gag tct gaa aac aag gtc aaa ctc tcc atc cca tcc atg atg tgg 293  
 Leu Glu Ser Glu Asn Lys Val Lys Leu Ser Ile Pro Ser Met Met Trp  
 60 65 70  
 gaa cat gca ggg cga tat cac tgt tac tat cag agc cct gca ggc tgg 341  
 Glu His Ala Gly Arg Tyr His Cys Tyr Tyr Gln Ser Pro Ala Gly Trp  
 75 80 85 90  
 tca gag ccc agc gac ccc ctg gag ctg gtg gtg aca gcc tac agc aga 389  
 Ser Glu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Ala Tyr Ser Arg

	95	100	105	
ccc acc ctg tcc gca ctg cca agc cct gtg gtg acc tca gga gtg aac				437
Pro Thr Leu Ser Ala Leu Pro Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Val Asn	110	115	120	
gtg acc ctc cgg tgt gcc tca cgg ctg gga ctg ggc agg ttc act ctg				485
Val Thr Leu Arg Cys Ala Ser Arg Leu Gly Leu Gly Arg Phe Thr Leu	125	130	135	
att gag gaa gga gac cac agg ctc tcc tgg acc ctg aac tca cac caa				533
Ile Glu Glu Gly Asp His Arg Leu Ser Trp Thr Leu Asn Ser His Gln	140	145	150	
cac aac cat gga aag ttc cag gcc ctg ttc ccc atg ggc ccc ctg acc				581
His Asn His Gly Lys Phe Gln Ala Leu Phe Pro Met Gly Pro Leu Thr	155	160	165	170
ttc agc aac agg ggt aca ttc aga tgc tac ggc tat gaa aac aac acc				629
Phe Ser Asn Arg Gly Thr Phe Arg Cys Tyr Gly Tyr Glu Asn Asn Thr	175	180	185	
cca tac gtg tgg tcg gaa ccc agt gac ccc ctg cag cta ctg gtg tca				677
Pro Tyr Val Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro Leu Gln Leu Leu Val Ser	190	195	200	
ggc gtg tct agg aag ccc tcc ctc ctg acc ctg cag ggc cct gtc gtg				725
Gly Val Ser Arg Lys Pro Ser Leu Leu Thr Leu Gln Gly Pro Val Val	205	210	215	
acc ccc gga gag aat ctg acc ctc cag tgt ggc tct gat gtc ggc tac				773
Thr Pro Gly Glu Asn Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Val Gly Tyr	220	225	230	
atc aga tac act ctg tac aag gag ggg gcc gat ggc ctc ccc cag cgc				821
Ile Arg Tyr Thr Leu Tyr Lys Glu Gly Ala Asp Gly Leu Pro Gln Arg	235	240	245	250
cct ggc cgg cag ccc cag gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc acc ctg				869
Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu	255	260	265	
agc cct gtg agc cgc tcc tac ggg ggc cag tac aga tgc tac ggc gca				917
Ser Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala	270	275	280	
cac aac gtc tcc tcc gag tgg tcg gcc ccc agt gac ccc ctg gac atc				965
His Asn Val Ser Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile	285	290	295	
ctg atc gca gga cag atc tct gac aga ccc tcc ctc tca gtg cag ccg				1013
Leu Ile Ala Gly Gln Ile Ser Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro	300	305	310	
ggc ccc acg gtg acc tca gga gag aag gtg acc ctg ctg tgt cag tca				1061
Gly Pro Thr Val Thr Ser Gly Glu Lys Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser	315	320	325	330
tgg gac ccg atg ttc act ttc ctt ctg acc aag gag ggg gca gcc cat				1109
Trp Asp Pro Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala His	335	340	345	
ccc ccg ttg cgt ctg aga tca atg tac gga gct cat aag tac cag gct				1157
Pro Pro Leu Arg Leu Arg Ser Met Tyr Gly Ala His Lys Tyr Gln Ala				

```

          350          355          360
gaa ttc ccc atg agt cct gtg acc tca gcc cac gcg ggg acc tac agg      1205
Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg
          365          370          375

tgc tac ggc tca cgc agc tcc aac ccc tac ctg ctg tct cac ccc agt      1253
Cys Tyr Gly Ser Arg Ser Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser
          380          385          390

gag ccc ctg gag ctc gtg gtc tca gga gca act gag acc ctc aat cca      1301
Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Ala Thr Glu Thr Leu Asn Pro
          395          400          405          410

gca caa aag aag tca gat tcc aag act gcc cca cac ctc cag gat tac      1349
Ala Gln Lys Lys Ser Asp Ser Lys Thr Ala Pro His Leu Gln Asp Tyr
          415          420          425

aca gtg gag aat ctc atc cgc atg ggt gtg gct ggc ttg gtc ctg ctg      1397
Thr Val Glu Asn Leu Ile Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Leu Leu
          430          435          440

ttc ctc ggg att ctg tta ttt gag gct cag cac agc cag aga agc ccc      1445
Phe Leu Gly Ile Leu Leu Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Pro
          445          450          455

cca agg tgc agc cag gag gca aac agc aga aag gac aat gca ccc ttc      1493
Pro Arg Cys Ser Gln Glu Ala Asn Ser Arg Lys Asp Asn Ala Pro Phe
          460          465          470

aga gtg gtg gag cct tgg gaa cag atc tgatgatctg aggaggttct      1540
Arg Val Val Glu Pro Trp Glu Gln Ile
          475          480

ggaagactgg ggcagcagtt ggggaagtgt ctgctga      1577

<210> 2
<211> 499
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Leu Ile Leu Thr Ser Leu Leu Phe Phe Gly Leu Ser Leu Gly
-15 -10 -5 -1

Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Glu Asn Leu Pro Lys Pro Ile Leu Trp
1 5 10 15

Ala Glu Pro Gly Pro Val Ile Thr Trp His Asn Pro Val Thr Ile Trp
20 25 30

Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Gln Gly Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Gly
35 40 45

Asn Ser Met Ser Arg His Ile Leu Lys Thr Leu Glu Ser Glu Asn Lys
50 55 60

```

Val	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro	Ser	Met	Met	Trp	Glu	His	Ala	Gly	Arg	Tyr	
65					70					75					80	
His	Cys	Tyr	Tyr	Gln	Ser	Pro	Ala	Gly	Trp	Ser	Glu	Pro	Ser	Asp	Pro	
				85					90					95		
Leu	Glu	Leu	Val	Val	Thr	Ala	Tyr	Ser	Arg	Pro	Thr	Leu	Ser	Ala	Leu	
			100					105					110			
Pro	Ser	Pro	Val	Val	Thr	Ser	Gly	Val	Asn	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Ala	
		115					120					125				
Ser	Arg	Leu	Gly	Leu	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ile	Glu	Glu	Gly	Asp	His	
	130					135					140					
Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Leu	Asn	Ser	His	Gln	His	Asn	His	Gly	Lys	Phe	
145					150					155					160	
Gln	Ala	Leu	Phe	Pro	Met	Gly	Pro	Leu	Thr	Phe	Ser	Asn	Arg	Gly	Thr	
				165					170					175		
Phe	Arg	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Glu	Asn	Asn	Thr	Pro	Tyr	Val	Trp	Ser	Glu	
			180					185					190			
Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Gln	Leu	Leu	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Arg	Lys	Pro	
		195					200					205				
Ser	Leu	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Pro	Val	Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Asn	Leu	
	210					215					220					
Thr	Leu	Gln	Cys	Gly	Ser	Asp	Val	Gly	Tyr	Ile	Arg	Tyr	Thr	Leu	Tyr	
225					230					235					240	
Lys	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Leu	Pro	Gln	Arg	Pro	Gly	Arg	Gln	Pro	Gln	
				245					250					255		
Ala	Gly	Leu	Ser	Gln	Ala	Asn	Phe	Thr	Leu	Ser	Pro	Val	Ser	Arg	Ser	
			260					265					270			
Tyr	Gly	Gly	Gln	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Gly	Ala	His	Asn	Val	Ser	Ser	Glu	
		275					280					285				
Trp	Ser	Ala	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Asp	Ile	Leu	Ile	Ala	Gly	Gln	Ile	
	290					295					300					
Ser	Asp	Arg	Pro	Ser	Leu	Ser	Val	Gln	Pro	Gly	Pro	Thr	Val	Thr	Ser	
305					310					315					320	



Gly Glu Lys Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Asp Pro Met Phe Thr  
325 330 335

Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala His Pro Pro Leu Arg Leu Arg  
340 345 350

Ser Met Tyr Gly Ala His Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro  
355 360 365

Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Arg Ser  
370 375 380

Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val  
385 390 395 400

Val Ser Gly Ala Thr Glu Thr Leu Asn Pro Ala Gln Lys Lys Ser Asp  
405 410 415

Ser Lys Thr Ala Pro His Leu Gln Asp Tyr Thr Val Glu Asn Leu Ile  
420 425 430

Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ile Leu Leu  
435 440 445

Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Pro Pro Arg Cys Ser Gln Glu  
450 455 460

Ala Asn Ser Arg Lys Asp Asn Ala Pro Phe Arg Val Val Glu Pro Trp  
465 470 475 480

Glu Gln Ile

<210> 3  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Штучна

<220>  
<223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 3  
ctccaacccc tacctgctgt c

21

<210> 4  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Штучна  
<220>

<223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 4  
 ttcccaaggc tccaccactc t 21

<210> 5  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 5  
 cctcaatcca gcacaaaaga agt 23

<210> 6  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 6  
 cggatgagat tctccactgt gtaa 24

<210> 7  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 7  
 ccacccatgg caaattcc 18

<210> 8  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 8  
 tgggatttcc attgatgaca ag 22

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 9  
 cagggccagg aggaggagat g 21

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна  
  
 <220>  
 <223> штучно синтезована послідовність праймера  
  
 <400> 10  
 tcagcagaca cttccccaac t 21  
  
 <210> 11  
 <211> 105  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна  
  
 <220>  
 <223> штучно синтезована послідовність праймера  
  
 <400> 11  
 ccgctcgaga tgaccctcat tctcacaagc ctgctcttct ttgggctgag cctgggcat 60  
 tacaaggatg acgacgataa gcccaggacc cgggtgcagg caaaa 105  
  
 <210> 12  
 <211> 31  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна  
  
 <220>  
 <223> штучно синтезована послідовність праймера  
  
 <400> 12  
 ctagactagt tcagatctgt tcccaaggct c 31  
  
 <210> 13  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна  
  
 <220>  
 <223> штучно синтезована послідовність праймера  
  
 <400> 13  
 ccgctcgaga tgaccctcat tctcacaagc 30  
  
 <210> 14  
 <211> 55  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна  
  
 <220>  
 <223> штучно синтезована послідовність праймера  
  
 <400> 14  
 ctagactagt tcacttatcg tcgtcatcct tgtaatcgat ctgttccaa ggctc 55

<210> 15  
 <211> 313  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (7)..(267)

<400> 15  
 cccaag atg att cca gca gtg gtc ttg ctc tta ctc ctt ttg gtt gaa 48  
 Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu  
 1 5 10  
 caa gca gcg gcc ctg gga gag cct cag ctc tgc tat atc ctg gat gcc 96  
 Gln Ala Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala  
 15 20 25 30  
 atc ctg ttt ctg tat gga att gtc ctc acc ctc ctc tac tgt cga ctg 144  
 Ile Leu Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu  
 35 40 45  
 aag atc caa gtg cga aag gca gct ata acc agc tat gag aaa tca gat 192  
 Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp  
 50 55 60  
 ggt gtt tac acg ggc ctg agc acc agg aac cag gag act tac gag act 240  
 Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr  
 65 70 75  
 ctg aag cat gag aaa cca cca cag tag ctttagaata gatgcggtca 287  
 Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln  
 80 85  
 tattcttctt tggcttctgg ttcttc 313

<210> 16  
 <211> 86  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16  
 Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu  
 20 25 30  
 Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile  
 35 40 45  
 Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val  
 50 55 60  
 Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys  
 65 70 75 80



Cys Ser Gln Glu Ala Asn Ser Arg Lys Asp Asn Ala Pro Phe Arg Val  
1 5 10 15

Val Glu Pro Trp Glu Gln Ile  
20

<210> 22  
<211> 31  
<212> ДНК  
<213> Штучна

<220>  
<223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 22  
ccgctcgaga tgacccccat cctcacgggc c

31

<210> 23  
<211> 55  
<212> ДНК  
<213> Штучна

<220>  
<223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 23  
ctagactagt tcacttatcg tcgtcatcct tgtaatccct cccggctgca tcttg

55

<210> 24  
<211> 1425  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1425)

<400> 24  
atg acc ccc atc ctc acg gtc ctg atc tgt ctc ggg ctg agt ctg ggc  
Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly  
1 5 10 15

48

ccc agg acc cac gtg cag gca ggg cac ctc ccc aag ccc acc ctc tgg  
Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp  
20 25 30

96

gct gag cca ggc tct gtg atc atc cag gga agt cct gtg acc ctc agg  
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ile Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg  
35 40 45

144

tgt cag ggg agc ctt cag gct gag gag tac cat cta tat agg gaa aac  
Cys Gln Gly Ser Leu Gln Ala Glu Glu Tyr His Leu Tyr Arg Glu Asn  
50 55 60

192

aaa tca gca tcc tgg gtt aga cgg ata caa gag cct ggg aag aat ggc  
Lys Ser Ala Ser Trp Val Arg Arg Ile Gln Glu Pro Gly Lys Asn Gly  
65 70 75 80

240

cag ttc ccc atc cca tcc atc acc tgg gaa cac gca ggg cgg tat cac Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr His 85 90 95	288
tgt cag tac tac agc cac aat cac tca tca gag tac agt gac ccc ctg Cys Gln Tyr Tyr Ser His Asn His Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Leu 100 105 110	336
gag ctg gtg gtg aca gga gcc tac agc aaa ccc acc ctc tca gct ctg Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala Leu 115 120 125	384
ccc agc cct gtg gtg acc tta gga ggg aac gtg acc ctc cag tgt gtc Pro Ser Pro Val Val Thr Leu Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln Cys Val 130 135 140	432
tca cag gtg gca ttt gac ggc ttc att ctg tgt aag gaa gga gaa gat Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Asp 145 150 155 160	480
gaa cac cca caa cgc ctg aac tcc cat tcc cat gcc cgt ggg tgg tcc Glu His Pro Gln Arg Leu Asn Ser His Ser His Ala Arg Gly Trp Ser 165 170 175	528
tgg gcc atc ttc tcc gtg ggc ccc gtg agc ccg agt cgc agg tgg tcg Trp Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg Trp Ser 180 185 190	576
tac agg tgc tat gct tat gac tcg aac tct ccc tat gtg tgg tct cta Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Leu 195 200 205	624
ccc agt gat ctc ctg gag ctc ctg gtc cca ggt gtt tct aag aag cca Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro 210 215 220	672
tca ctc tca gtg cag cca ggt cct atg gtg gcc cct ggg gag agc ctg Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Met Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu 225 230 235 240	720
acc ctc cag tgt gtc tct gat gtc ggc tac gac aga ttt gtt ctg tat Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr 245 250 255	768
aag gag gga gaa cgt gac ttc ctc cag cgc cct ggt tgg cag ccc cag Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Trp Gln Pro Gln 260 265 270	816
gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc acc ctg ggc cct gtg agc ccc tcc Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro Ser 275 280 285	864
cac ggg ggc cag tac aga tgc tac agt gca cac aac ctc tcc tcc gag His Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala His Asn Leu Ser Ser Glu 290 295 300	912
tgg tcg gcc ccc agt gac ccc ctg gac atc ctg atc aca gga cag ttc Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Phe 305 310 315 320	960
tat gac aga ccc tct ctc tcg gtg cag ccg gtc ccc aca gta gcc cca Tyr Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Val Pro Thr Val Ala Pro 325 330 335	1008

gga aag aac gtg acc ctg ctg tgt cag tca cgg ggg cag ttc cac act 1056  
 Gly Lys Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Arg Gly Gln Phe His Thr  
                   340                  345                  350

ttc ctt ctg acc aag gag ggg gca ggc cat ccc cca ctg cat ctg aga 1104  
 Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Gly His Pro Pro Leu His Leu Arg  
                   355                  360                  365

tca gag cac caa gct cag cag aac cag gct gaa ttc cgc atg ggt cct 1152  
 Ser Glu His Gln Ala Gln Gln Asn Gln Ala Glu Phe Arg Met Gly Pro  
                   370                  375                  380

gtg acc tca gcc cac gtg ggg acc tac aga tgc tac agc tca ctc agc 1200  
 Val Thr Ser Ala His Val Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ser Leu Ser  
                   385                  390                  395                  400

tcc aac ccc tac ctg ctg tct ctc ccc agt gac ccc ctg gag ctc gtg 1248  
 Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser Leu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val  
                   405                  410                  415

gtc tca gca tcc cta ggc caa cac ccc cag gat tac aca gtg gag aat 1296  
 Val Ser Ala Ser Leu Gly Gln His Pro Gln Asp Tyr Thr Val Glu Asn  
                   420                  425                  430

ctc atc cgc atg ggt gtg gct ggc ttg gtc ctg gtg gtc ctc ggg att 1344  
 Leu Ile Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Leu Val Val Leu Gly Ile  
                   435                  440                  445

ctg cta ttt gag gct cag cac agc cag aga agc cta caa gat gca gcc 1392  
 Leu Leu Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Leu Gln Asp Ala Ala  
                   450                  455                  460

ggg agg gat tac aag gat gac gac gat aag tga 1425  
 Gly Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
                   465                  470

<210> 25  
 <211> 474  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly  
 1                  5                  10                  15

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

Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ile Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg  
                   35                  40                  45

Cys Gln Gly Ser Leu Gln Ala Glu Glu Tyr His Leu Tyr Arg Glu Asn  
                   50                  55                  60

Lys Ser Ala Ser Trp Val Arg Arg Ile Gln Glu Pro Gly Lys Asn Gly  
 65                  70                  75                  80



Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr His  
85 90 95

Cys Gln Tyr Tyr Ser His Asn His Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Leu  
100 105 110

Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala Leu  
115 120 125

Pro Ser Pro Val Val Thr Leu Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln Cys Val  
130 135 140

Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Asp  
145 150 155 160

Glu His Pro Gln Arg Leu Asn Ser His Ser His Ala Arg Gly Trp Ser  
165 170 175

Trp Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg Trp Ser  
180 185 190

Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Leu  
195 200 205

Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro  
210 215 220

Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Met Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu  
225 230 235 240

Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr  
245 250 255

Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Trp Gln Pro Gln  
260 265 270

Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro Ser  
275 280 285

His Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala His Asn Leu Ser Ser Glu  
290 295 300

Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Phe  
305 310 315 320

Tyr Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Val Pro Thr Val Ala Pro  
325 330 335

Gly Lys Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Arg Gly Gln Phe His Thr  
340 345 350

Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Gly His Pro Pro Leu His Leu Arg  
355 360 365

Ser Glu His Gln Ala Gln Gln Asn Gln Ala Glu Phe Arg Met Gly Pro  
370 375 380

Val Thr Ser Ala His Val Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ser Leu Ser  
385 390 395 400

Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser Leu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val  
405 410 415

Val Ser Ala Ser Leu Gly Gln His Pro Gln Asp Tyr Thr Val Glu Asn  
420 425 430

Leu Ile Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Leu Val Val Leu Gly Ile  
435 440 445

Leu Leu Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Leu Gln Asp Ala Ala  
450 455 460

Gly Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys  
465 470

<210> 26  
<211> 1953  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1953)

<400> 26  
atg acc ccc atc ctc acg gtc ctg atc tgt ctc ggg ctg agt ctg ggc 48  
Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly  
1 5 10 15

ccc cgg acc cac gtg cag gca ggg cac ctc ccc aag ccc acc ctc tgg 96  
Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp  
20 25 30

gct gaa cca ggc tct gtg atc acc cag ggg agt cct gtg acc ctc agg 144  
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg  
35 40 45

tgt cag ggg ggc cag gag acc cag gag tac cgt cta tat aga gaa aag 192  
Cys Gln Gly Gly Gln Glu Thr Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys  
50 55 60

aaa aca gca ccc tgg att aca cgg atc cca cag gag ctt gtg aag aag Lys Thr Ala Pro Trp Ile Thr Arg Ile Pro Gln Glu Leu Val Lys Lys 65 70 75 80	240
ggc cag ttc ccc atc cca tcc atc acc tgg gaa cat gca ggg cgg tat Gly Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr 85 90 95	288
cgc tgt tac tat ggt agc gac act gca ggc cgc tca gag agc agt gac Arg Cys Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Ala Gly Arg Ser Glu Ser Ser Asp 100 105 110	336
ccc ctg gag ctg gtg gtg aca gga gcc tac atc aaa ccc acc ctc tca Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ile Lys Pro Thr Leu Ser 115 120 125	384
gcc cag ccc agc ccc gtg gtg aac tca gga ggg aat gta acc ctc cag Ala Gln Pro Ser Pro Val Val Asn Ser Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln 130 135 140	432
tgt gac tca cag gtg gca ttt gat ggc ttc att ctg tgt aag gaa gga Cys Asp Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly 145 150 155 160	480
gaa gat gaa cac cca caa tgc ctg aac tcc cag ccc cat gcc cgt ggg Glu Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly 165 170 175	528
tcg tcc cgc gcc atc ttc tcc gtg ggc ccc gtg agc ccg agt cgc agg Ser Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg 180 185 190	576
tgg tgg tac agg tgc tat gct tat gac tcg aac tct ccc tat gag tgg Trp Trp Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Glu Trp 195 200 205	624
tct cta ccc agt gat ctc ctg gag ctc ctg gtc cta ggt gtt tct aag Ser Leu Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Leu Gly Val Ser Lys 210 215 220	672
aag cca tca ctc tca gtg cag cca ggt cct atc gtg gcc cct gag gag Lys Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Ile Val Ala Pro Glu Glu 225 230 235 240	720
acc ctg act ctg cag tgt ggc tct gat gct ggc tac aac aga ttt gtt Thr Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ala Gly Tyr Asn Arg Phe Val 245 250 255	768
ctg tat aag gac ggg gaa cgt gac ttc ctt cag ctc gct ggc gca cag Leu Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Leu Ala Gly Ala Gln 260 265 270	816
ccc cag gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc acc ctg ggc cct gtg agc Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser 275 280 285	864
cgc tcc tac ggg ggc cag tac aga tgc tac ggt gca cac aac ctc tcc Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser 290 295 300	912
tcc gag tgg tcg gcc ccc agc gac ccc ctg gac atc ctg atc gca gga Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly 305 310 315 320	960

cag ttc tat gac aga gtc tcc ctc tcg gtg cag ccg ggc ccc acg gtg Gln Phe Tyr Asp Arg Val Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val 325 330 335	1008
gcc tca gga gag aac gtg acc ctg ctg tgt cag tca cag gga tgg atg Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Gln Gly Trp Met 340 345 350	1056
caa act ttc ctt ctg acc aag gag ggg gca gct gat gac cca tgg cgt Gln Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Trp Arg 355 360 365	1104
cta aga tca acg tac caa tct caa aaa tac cag gct gaa ttc ccc atg Leu Arg Ser Thr Tyr Gln Ser Gln Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met 370 375 380	1152
ggc cct gtg acc tca gcc cat gcg ggg acc tac agg tgc tac ggc tca Gly Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser 385 390 395 400	1200
cag agc tcc aaa ccc tac ctg ctg act cac ccc agt gac ccc ctg gag Gln Ser Ser Lys Pro Tyr Leu Leu Thr His Pro Ser Asp Pro Leu Glu 405 410 415	1248
ctc gtg gtc tca gga ccg tct ggg ggc ccc agc tcc ccg aca aca ggc Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Gly Gly Pro Ser Ser Pro Thr Thr Gly 420 425 430	1296
ccc acc tcc aca tct ggc cct gag gac cag ccc ctc acc ccc acc ggg Pro Thr Ser Thr Ser Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly 435 440 445	1344
tcg gat ccc cag agt ggt ctg gga agg cac ctg ggg gtt gtg atc ggc Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly 450 455 460	1392
atc ttg gtg gcc gtc atc cta ctg ctc ctc ctc ctc ctc ctc ttc Ile Leu Val Ala Val Ile Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe 465 470 475 480	1440
ctc atc ctc cga cat cga cgt cag ggc aaa cac tgg aca tcg acc cag Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln 485 490 495	1488
aga aag gct gat ttc caa cat cct gca ggg gct gtg ggg cca gag ccc Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro 500 505 510	1536
aca gac aga ggc ctg cag tgg agg tcc agc cca gct gcc gat gcc cag Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln 515 520 525	1584
gaa gaa aac ctc tat gct gcc gtg aag cac aca cag cct gag gat ggg Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys His Thr Gln Pro Glu Asp Gly 530 535 540	1632
gtg gag atg gac act cgg agc cca cac gat gaa gac ccc cag gca gtg Val Glu Met Asp Thr Arg Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala Val 545 550 555 560	1680
acg tat gcc gag gtg aaa cac tcc aga cct agg aga gaa atg gcc tct Thr Tyr Ala Glu Val Lys His Ser Arg Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser 565 570 575	1728

```

cct cct tcc cca ctg tct ggg gaa ttc ctg gac aca aag gac aga cag      1776
Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln
      580              585              590

gcg gaa gag gac agg cag atg gac act gag gct gct gca tct gaa gcc      1824
Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ala Ser Glu Ala
      595              600              605

ccc cag gat gtg acc tac gcc cag ctg cac agc ttg acc ctt aga cgg      1872
Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg
      610              615              620

aag gca act gag cct cct cca tcc cag gaa ggg ccc tct cca gct gtg      1920
Lys Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Pro Ser Pro Ala Val
      625              630              635              640

ccc agc atc tac gcc act ctg gcc atc cac tag                          1953
Pro Ser Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His
      645              650

<210> 27
<211> 650
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
1              5              10              15

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

Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg
35              40              45

Cys Gln Gly Gly Gln Glu Thr Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys
50              55              60

Lys Thr Ala Pro Trp Ile Thr Arg Ile Pro Gln Glu Leu Val Lys Lys
65              70              75              80

Gly Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr
85              90              95

Arg Cys Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Ala Gly Arg Ser Glu Ser Ser Asp
100              105              110

Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ile Lys Pro Thr Leu Ser
115              120              125

Ala Gln Pro Ser Pro Val Val Asn Ser Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln
130              135              140

```

Cys Asp Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly  
 145 150 155 160  
 Glu Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly  
 165 170 175  
 Ser Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg  
 180 185 190  
 Trp Trp Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Glu Trp  
 195 200 205  
 Ser Leu Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Leu Gly Val Ser Lys  
 210 215 220  
 Lys Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Ile Val Ala Pro Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ala Gly Tyr Asn Arg Phe Val  
 245 250 255  
 Leu Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Leu Ala Gly Ala Gln  
 260 265 270  
 Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser  
 275 280 285  
 Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser  
 290 295 300  
 Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly  
 305 310 315 320  
 Gln Phe Tyr Asp Arg Val Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val  
 325 330 335  
 Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Gln Gly Trp Met  
 340 345 350  
 Gln Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Trp Arg  
 355 360 365  
 Leu Arg Ser Thr Tyr Gln Ser Gln Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met  
 370 375 380  
 Gly Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser  
 385 390 395 400

Gln Ser Ser Lys Pro Tyr Leu Leu Thr His Pro Ser Asp Pro Leu Glu  
405 410 415

Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Gly Gly Pro Ser Ser Pro Thr Thr Gly  
420 425 430

Pro Thr Ser Thr Ser Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly  
435 440 445

Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly  
450 455 460

Ile Leu Val Ala Val Ile Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe  
465 470 475 480

Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln  
485 490 495

Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro  
500 505 510

Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln  
515 520 525

Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys His Thr Gln Pro Glu Asp Gly  
530 535 540

Val Glu Met Asp Thr Arg Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala Val  
545 550 555 560

Thr Tyr Ala Glu Val Lys His Ser Arg Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser  
565 570 575

Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln  
580 585 590

Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ala Ser Glu Ala  
595 600 605

Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg  
610 615 620

Lys Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Pro Ser Pro Ala Val  
625 630 635 640

Pro Ser Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His  
645 650

```

<210> 28
<211> 1347
<212> DHK
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1347)

<400> 28
atg atc ccc acc ttc acg gct ctg ctc tgc ctc ggg ctg agt ctg ggc      48
Met Ile Pro Thr Phe Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
1          5          10          15

ccc agg acc gac atg cag gca ggg ccc ctc ccc aaa ccc acc ctc tgg      96
Pro Arg Thr Asp Met Gln Ala Gly Pro Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp
20          25          30

gct gag cca ggc tct gtg atc agc tgg ggg aac tct gtg acc atc tgg      144
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ser Trp Gly Asn Ser Val Thr Ile Trp
35          40          45

tgt cag ggg acc ctg gag gct cgg gag tac cgt ctg gat aaa gag gaa      192
Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Arg Glu Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Glu
50          55          60

agc cca gca ccc tgg gac aga cag aac cca ctg gag ccc aag aac aag      240
Ser Pro Ala Pro Trp Asp Arg Gln Asn Pro Leu Glu Pro Lys Asn Lys
65          70          75          80

gcc aga ttc tcc atc cca tcc atg aca gag gac tat gca ggg aga tac      288
Ala Arg Phe Ser Ile Pro Ser Met Thr Glu Asp Tyr Ala Gly Arg Tyr
85          90          95

cgc tgt tac tat cgc agc cct gta ggc tgg tca cag ccc agt gac ccc      336
Arg Cys Tyr Tyr Arg Ser Pro Val Gly Trp Ser Gln Pro Ser Asp Pro
100         105         110

ctg gag ctg gtg atg aca gga gcc tac agt aaa ccc acc ctt tca gcc      384
Leu Glu Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala
115         120         125

ctg ccg agt cct ctt gtg acc tca gga aag agc gtg acc ctg ctg tgt      432
Leu Pro Ser Pro Leu Val Thr Ser Gly Lys Ser Val Thr Leu Leu Cys
130         135         140

cag tca cgg agc cca atg gac act ttc ctt ctg atc aag gag cgg gca      480
Gln Ser Arg Ser Pro Met Asp Thr Phe Leu Leu Ile Lys Glu Arg Ala
145         150         155         160

gcc cat ccc cta ctg cat ctg aga tca gag cac gga gct cag cag cac      528
Ala His Pro Leu Leu His Leu Arg Ser Glu His Gly Ala Gln Gln His
165         170         175

cag gct gaa ttc ccc atg agt cct gtg acc tca gtg cac ggg ggg acc      576
Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Val His Gly Gly Thr
180         185         190

tac agg tgc ttc agc tca cac ggc ttc tcc cac tac ctg ctg tca cac      624
Tyr Arg Cys Phe Ser Ser His Gly Phe Ser His Tyr Leu Leu Ser His
195         200         205

```



ccc agt gac ccc ctg gag ctc ata gtc tca gga tcc ttg gag ggt ccc Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Ile Val Ser Gly Ser Leu Glu Gly Pro 210 215 220	672
agg ccc tca ccc aca agg tcc gtc tca aca gct gca ggc cct gag gac Arg Pro Ser Pro Thr Arg Ser Val Ser Thr Ala Ala Gly Pro Glu Asp 225 230 235 240	720
cag ccc ctc atg cct aca ggg tca gtc ccc cac agt ggt ctg aga agg Gln Pro Leu Met Pro Thr Gly Ser Val Pro His Ser Gly Leu Arg Arg 245 250 255	768
cac tgg gag gta ctg atc ggg gtc ttg gtg gtc tcc atc ctg ctt ctc His Trp Glu Val Leu Ile Gly Val Leu Val Val Ser Ile Leu Leu Leu 260 265 270	816
tcc ctc ctc ctc ttc ctc ctc ctc caa cac tgg cgt cag gga aaa cac Ser Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Gln His Trp Arg Gln Gly Lys His 275 280 285	864
agg aca ttg gcc cag aga cag gct gat ttc caa cgt cct cca ggg gct Arg Thr Leu Ala Gln Arg Gln Ala Asp Phe Gln Arg Pro Pro Gly Ala 290 295 300	912
gcc gag cca gag ccc aag gac ggg ggc cta cag agg agg tcc agc cca Ala Glu Pro Glu Pro Lys Asp Gly Gly Leu Gln Arg Arg Ser Ser Pro 305 310 315 320	960
gct gct gac gtc cag gga gaa aac ttc tgt gct gcc gtg aag aac aca Ala Ala Asp Val Gln Gly Glu Asn Phe Cys Ala Ala Val Lys Asn Thr 325 330 335	1008
cag cct gag gac ggg gtg gaa atg gac act cgg cag agc cca cac gat Gln Pro Glu Asp Gly Val Glu Met Asp Thr Arg Gln Ser Pro His Asp 340 345 350	1056
gaa gac ccc cag gca gtg acg tat gcc aag gtg aaa cac tcc aga cct Glu Asp Pro Gln Ala Val Thr Tyr Ala Lys Val Lys His Ser Arg Pro 355 360 365	1104
agg aga gaa atg gcc tct cct ccc tcc cca ctg tct ggg gaa ttc ctg Arg Arg Glu Met Ala Ser Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu 370 375 380	1152
gac aca aag gac aga cag gca gaa gag gac aga cag atg gac act gag Asp Thr Lys Asp Arg Gln Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu 385 390 395 400	1200
gct gct gca tct gaa gcc ccc cag gat gtg acc tac gcc cgg ctg cac Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Arg Leu His 405 410 415	1248
agc ttt acc ctc aga cag aag gca act gag cct cct cca tcc cag gaa Ser Phe Thr Leu Arg Gln Lys Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu 420 425 430	1296
ggg gcc tct cca gct gag ccc agt gtc tat gcc act ctg gcc atc cac Gly Ala Ser Pro Ala Glu Pro Ser Val Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His 435 440 445	1344
taa	1347

<210> 29  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Met Ile Pro Thr Phe Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Pro Arg Thr Asp Met Gln Ala Gly Pro Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp  
 20 25 30

Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ser Trp Gly Asn Ser Val Thr Ile Trp  
 35 40 45

Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Arg Glu Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Glu  
 50 55 60

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

Ala Arg Phe Ser Ile Pro Ser Met Thr Glu Asp Tyr Ala Gly Arg Tyr  
 85 90 95

Arg Cys Tyr Tyr Arg Ser Pro Val Gly Trp Ser Gln Pro Ser Asp Pro  
 100 105 110

Leu Glu Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala  
 115 120 125

Leu Pro Ser Pro Leu Val Thr Ser Gly Lys Ser Val Thr Leu Leu Cys  
 130 135 140

Gln Ser Arg Ser Pro Met Asp Thr Phe Leu Leu Ile Lys Glu Arg Ala  
 145 150 155 160

Ala His Pro Leu Leu His Leu Arg Ser Glu His Gly Ala Gln Gln His  
 165 170 175

Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Val His Gly Gly Thr  
 180 185 190

Tyr Arg Cys Phe Ser Ser His Gly Phe Ser His Tyr Leu Leu Ser His  
 195 200 205

Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Ile Val Ser Gly Ser Leu Glu Gly Pro  
 210 215 220

Arg Pro Ser Pro Thr Arg Ser Val Ser Thr Ala Ala Gly Pro Glu Asp  
 225 230 235 240

Gln Pro Leu Met Pro Thr Gly Ser Val Pro His Ser Gly Leu Arg Arg  
 245 250 255

His Trp Glu Val Leu Ile Gly Val Leu Val Val Ser Ile Leu Leu Leu  
 260 265 270

Ser Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Gln His Trp Arg Gln Gly Lys His  
 275 280 285

Arg Thr Leu Ala Gln Arg Gln Ala Asp Phe Gln Arg Pro Pro Gly Ala  
 290 295 300

Ala Glu Pro Glu Pro Lys Asp Gly Gly Leu Gln Arg Arg Ser Ser Pro  
 305 310 315 320

Ala Ala Asp Val Gln Gly Glu Asn Phe Cys Ala Ala Val Lys Asn Thr  
 325 330 335

Gln Pro Glu Asp Gly Val Glu Met Asp Thr Arg Gln Ser Pro His Asp  
 340 345 350

Glu Asp Pro Gln Ala Val Thr Tyr Ala Lys Val Lys His Ser Arg Pro  
 355 360 365

Arg Arg Glu Met Ala Ser Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu  
 370 375 380

Asp Thr Lys Asp Arg Gln Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu  
 385 390 395 400

Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Arg Leu His  
 405 410 415

Ser Phe Thr Leu Arg Gln Lys Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu  
 420 425 430

Gly Ala Ser Pro Ala Glu Pro Ser Val Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His  
 435 440 445

<210> 30

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована послідовність праймера

```

<400> 30
ccatagttcc attttacagt tacc
24

<210> 31
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність праймера

<400> 31
gggaccaagg gatacacaga
20

<210> 32
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність праймера

<400> 32
tccagagttc caggtcaagg tcac
24

<210> 33
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність праймера

<400> 33
gccagtgat agaccgatgg
20

<210> 34
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність праймера

<220>
<221> модифікована основа
<222> (24)..(25)
<223> I

<220>
<221> модифікована основа
<222> (29)..(30)
<223> I

<220>
<221> модифікована основа
<222> (34)..(35)
<223> I

```

```

<400> 34
ggccacgcgt cgactagtac gggnnngggnn gggnnng
36

<210> 35
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність праймера

<400> 35
ggccacgcgt cgactagtac
20

<210> 36
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність праймера

<400> 36
ttcactgccca tcaatcttcc actt
24

<210> 37
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність праймера

<400> 37
gatggataca gttggtgcag c
21

<210> 38
<211> 408
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(408)

<220>
<221> сигнальний білок
<222> (1)..(54)

<220>
<221> зрілий білок
<222> (55)..(408)

<400> 38
atg aga gtg ctg att ctt ttg tgg ctg ttc aca gcc ttt cct ggt atc
Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile
-15 -10 -5
48

```

```

ctg tct gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct      96
Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
  -1  1                               5                               10

tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc      144
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
  15                               20                               25                               30

agt gat tat gcc tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg      192
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
                               35                               40                               45

gag tgg atg ggc tac ata agc tac agt ggt agc act agc tac aac cca      240
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
                               50                               55                               60

tct ctc aaa agt cga atc tct atc act cga gac aca tcc aag aac cag      288
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
                               65                               70                               75

ttc ttc ctg cag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat      336
Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
                               80                               85                               90

tac tgt gca aga tct ccc cct tac tat gct atg gac tac tgg ggt caa      384
Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
  95                               100                               105                               110

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca                                     408
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
                               115

```

<210> 39  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 39

```

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile
      -15                               -10                               -5

```

```

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
  -1  1                               5                               10

```

```

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
  15                               20                               25                               30

```

```

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
      35                               40                               45

```

```

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
      50                               55                               60

```

```

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
      65                               70                               75

```

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
80 85 90

Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
95 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 40  
<211> 381  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(381)

<220>  
<221> сигнальний білок  
<222> (1)..(60)

<220>  
<221> зрілий білок  
<222> (61)..(381)

<400> 40  
atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct 48  
Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
-20 -15 -10 -5  
ggg gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc 96  
Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
-1 1 5 10  
aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat 144  
Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
15 20 25  
gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct 192  
Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
30 35 40  
aaa cta ctg att tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat 240  
Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
45 50 55 60  
cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc 288  
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75  
aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc 336  
Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser  
80 85 90  
agc tat cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 381  
Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
95 100 105

<210> 41  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 41

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
 -20 -15 -10 -5

Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 -1 1 5 10

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 15 20 25

Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 30 35 40

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
 45 50 55 60

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser  
 80 85 90

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 95 100 105

<210> 42  
 <211> 414  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(414)

<220>  
 <221> сигнальний білок  
 <222> (1)..(57)

<220>  
 <221> зрілий білок  
 <222> (58)..(414)

<400> 42  
 atg gga tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt  
 Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 -15 -10 -5

48



```

gtc cac tgc cag gtc cag ctg aag cag tct gga gct gag ctg gtg agg      96
Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
      -1  1                    5              10

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag act tct gga tac atc ttc      144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe
      15                    20              25

acc agc tac tgg att cac tgg gta aaa cag agg tct gga cag ggc ctt      192
Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
      30                    35              40              45

gag tgg att gca agg att tat cct gga act ggt agt act tac tac aat      240
Glu Trp Ile Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn
                        50              55              60

gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc      288
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
                        65              70              75

act gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aaa tct gag gac tct gct gtc      336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Val
                        80              85              90

tat ttc tgt gca aga tac cct acc tac gac tgg tac ttc gat gtc tgg      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
      95                    100              105

ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca      - - -      414
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      110                    115

<210>  43
<211> 138
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400>  43

Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
      -15                    -10              -5

Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
      -1  1                    5              10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe
      15                    20              25

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
      30                    35              40              45

Glu Trp Ile Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn
                        50              55              60

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
                        65              70              75

```

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Val  
80 85 90

Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
95 100 105

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
110 115

<210> 44  
<211> 381  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(381)

<220>  
<221> сигнальний білок  
<222> (1)..(60)

<220>  
<221> зрілий білок  
<222> (61)..(381)

<400> 44  
atg gtt ttc aca cct cag att ctt gga ctt atg ctt ttc tgg att tca 48  
Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser  
-20 -15 -10 -5  
gcc tcc aga ggt gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct 96  
Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
-1 1 5 10  
gtg act cca gga gat aga gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agt caa agt 144  
Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
15 20 25  
att agc aac tac cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca 192  
Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro  
30 35 40  
agg ctt ctc atc aag tat gct tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc 240  
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser  
45 50 55 60  
agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac 288  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn  
65 70 75  
agt gtg gag act gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac 336  
Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn  
80 85 90  
agc tgg ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 381  
Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
95 100 105

<210> 45  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 45

Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser  
-20 -15 -10 -5

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
-1 1 5 10

Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
15 20 25

Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro  
30 35 40

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser  
45 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn  
65 70 75

Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn  
80 85 90

Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
95 100 105

<210> 46  
<211> 408  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(408)

<220>  
<221> сигнальний білок  
<222> (1)..(54)

<220>  
<221> зрілий білок  
<222> (55)..(408)

<400> 46

atg aga gtg ctg att ctt ttg tgg ctg ttc aca gcc ttt cct ggt atc 48  
Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile  
-15 -10 -5

ctg tct gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct 96

```

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
-1 1 5 10

tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc 144
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
15 20 25 30

agt gat tat gcc tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg 192
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
35 40 45

gag tgg atg ggc tac ata agc tac agt ggt agc act agc tac aac cca 240
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
50 55 60

tct ctc aaa agt cga atc tct atc act cga gac aca tcc aag aac cag 288
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
65 70 75

ttc ttc ctg cag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat 336
Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
80 85 90

tac tgt gca aga gcc ctc cca tta ccc tgg ttt gct tac tgg ggc caa 384
Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Pro Leu Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
95 100 105 110

ggg act ctg gtc act gtc tct gca 408
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 47
<211> 136
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 47

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile
-15 -10 -5

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
-1 1 5 10

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
15 20 25 30

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
35 40 45

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
65 70 75

```

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
80 85 90

Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Pro Leu Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
95 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115

<210> 48  
<211> 381  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(381)

<220>  
<221> сигнальний білок  
<222> (1)..(60)

<220>  
<221> зрілий білок  
<222> (61)..(381)

<400> 48  
atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct 48  
Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
-20 -15 -10 -5  
  
ggt gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc 96  
Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
-1 1 5 10  
  
aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat 144  
Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
15 20 25  
  
gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct 192  
Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
30 35 40  
  
aaa cta ctg att tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat 240  
Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
45 50 55 60  
  
cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc 288  
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75  
  
aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc 336  
Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser  
80 85 90  
  
agc tat cct tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 381  
Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
95 100 105

<210> 49  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 49

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
 -20 -15 -10 -5

Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 -1 1 5 10

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 15 20 25

Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 30 35 40

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
 45 50 55 60

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser  
 80 85 90

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 95 100 105

<210> 50  
 <211> 1401  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> Штучно синтезована нуклеотидна послідовність

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1398)

<220>  
 <221> сигнальний білок  
 <222> (1)..(54)

<220>  
 <221> зрілий білок  
 <222> (55)..(1398)

<400> 50  
 atg aga gtg ctg att ctt ttg tgg ctg ttc aca gcc ttt cct ggt atc  
 Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile

48

	-15		-10		-5		
	ctg tct gat gtg cag ctt	cag gag tcg gga cct	ggc ctg gtg aaa cct	96			
	Leu Ser Asp Val Gln Leu	Gln Glu Ser Gly Pro	Gly Leu Val Lys Pro				
	-1 1	5	10				
	tct cag tct ctg tcc ctc	acc tgc act gtc act	ggc tac tca atc acc	144			
	Ser Gln Ser Leu Ser Leu	Thr Cys Thr Val Thr	Gly Tyr Ser Ile Thr				
	15	20	25				30
	agt gat tat gcc tgg aac	tgg atc cgg cag ttt	cca gga aac aaa ctg	192			
	Ser Asp Tyr Ala Trp Asn	Trp Ile Arg Gln Phe	Pro Gly Asn Lys Leu				
		35	40				45
	gag tgg atg ggc tac ata	agc tac agt ggt agc	act agc tac aac cca	240			
	Glu Trp Met Gly Tyr Ile	Ser Tyr Ser Gly Ser	Thr Ser Tyr Asn Pro				
		50	55				60
	tct ctc aaa agt cga atc	tct atc act cga gac	aca tcc aag aac cag	288			
	Ser Leu Lys Ser Arg Ile	Ser Ile Thr Arg Asp	Thr Ser Lys Asn Gln				
		65	70				75
	ttc ttc ctg cag ttg aat	tct gtg act act gag	gac aca gcc aca tat	336			
	Phe Phe Leu Gln Leu Asn	Ser Val Thr Thr Glu	Asp Thr Ala Thr Tyr				
		80	85				90
	tac tgt gca aga tct ccc	cct tac tat gct atg	gac tac tgg ggt caa	384			
	Tyr Cys Ala Arg Ser Pro	Pro Tyr Tyr Ala Met	Asp Tyr Trp Gly Gln				
	95	100	105				110
	gga acc tca gtc acc gtc	tcc tca gcc tcc acc	aag ggc cca tcg gtc	432			
	Gly Thr Ser Val Thr Val	Ser Ser Ala Ser Thr	Lys Gly Pro Ser Val				
		115	120				125
	ttc ccc ctg gca ccc tcc	tcc aag agc acc tct	ggg ggc aca gcg gcc	480			
	Phe Pro Leu Ala Pro Ser	Ser Lys Ser Thr Ser	Gly Gly Thr Ala Ala				
		130	135				140
	ctg ggc tgc ctg gtc aag	gac tac ttc ccc gaa	ccg gtg acg gtg tcg	528			
	Leu Gly Cys Leu Val Lys	Asp Tyr Phe Pro Glu	Pro Val Thr Val Ser				
		145	150				155
	tgg aac tca ggc gcc ctg	acc agc ggc gtg cac	acc ttc ccg gct gtc	576			
	Trp Asn Ser Gly Ala Leu	Thr Ser Gly Val His	Thr Phe Pro Ala Val				
		160	165				170
	cta cag tcc tca gga ctc	tac tcc ctc agc agc	gtg gtg acc gtg ccc	624			
	Leu Gln Ser Ser Gly Leu	Tyr Ser Leu Ser Ser	Val Val Thr Val Pro				
	175	180	185				190
	tcc agc agc ttg ggc acc	cag acc tac atc tgc	aac gtg aat cac aag	672			
	Ser Ser Ser Leu Gly Thr	Gln Thr Tyr Ile Cys	Asn Val Asn His Lys				
		195	200				205
	ccc agc aac acc aag gtg	gac aag aaa gtt gag	ccc aaa tct tgt gac	720			
	Pro Ser Asn Thr Lys Val	Asp Lys Lys Val Glu	Pro Lys Ser Cys Asp				
		210	215				220
	aaa act cac aca tgc cca	ccg tgc cca gca cct	gaa ctc ctg ggg gga	768			
	Lys Thr His Thr Cys Pro	Pro Cys Pro Ala Pro	Glu Leu Leu Gly Gly				
		225	230				235
	ccg tca gtc ttc ctc ttc	ccc cca aaa ccc aag	gac acc ctc atg atc	816			
	Pro Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met Ile				

240	245	250	
tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gac gtg agc cac gaa			864
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu			
255	260	265	270
gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat			912
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	275	280	285
aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt			960
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
	290	295	300
gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag			1008
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
	305	310	315
gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag			1056
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	320	325	330
aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac			1104
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	335	340	345
acc ctg ccc cca tcc ccg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg			1152
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	355	360	365
acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg			1200
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
	370	375	380
gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg			1248
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
	385	390	395
ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac			1296
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	400	405	410
aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat			1344
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	415	420	425
gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg			1392
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445
ggt aaa tga			1401
Gly Lys			

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 466

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучний

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетичний конструкт

&lt;400&gt; 51



```

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile
      -15                -10                -5

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
      -1  1                5                10

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
      15                20                25                30

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
              35                40                45

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
              50                55                60

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
              65                70                75

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
              80                85                90

Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95                100                105                110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
              115                120                125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
              130                135                140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
              145                150                155

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
      160                165                170

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
      175                180                185                190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
              195                200                205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
              210                215                220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
              225                230                235

```

```

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 240                               245                   250

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
255                               260                   265                   270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
                275                               280                   285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
                290                               295                   300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
          305                               310                   315

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
          320                               325                   330

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
335                               340                   345                   350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
                355                               360                   365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
          370                               375                   380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
          385                               390                   395

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
          400                               405                   410

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
415                               420                   425                   430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
          435                               440                   445

Gly Lys

```

```

<210> 52
<211> 705
<212> ДНК
<213> Штучна

```

```

<220>
<223> Штучно синтезована нуклеотидна послідовність

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(702)

<220>
<221> сигнальний білок
<222> (1)..(60)

<220>
<221> зрілий білок
<222> (61)..(702)

<400> 52
atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct      48
Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
-20                      -15                      -10                      -5

ggt gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc      96
Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
          -1  1                      5                      10

aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat      144
Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
          15                      20                      25

gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct      192
Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
          30                      35                      40

aaa cta ctg att tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat      240
Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
45                      50                      55                      60

cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc      288
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                      65                      70                      75

aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc      336
Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser
          80                      85                      90

agc tat cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga      384
Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
          95                      100                      105

act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag      432
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          110                      115                      120

ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat      480
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
125                      130                      135                      140

ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg      528
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
                      145                      150                      155

ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc      576
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          160                      165                      170

tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa      624

```

```

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
    175                      180                      185

cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc      672
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
    190                      195                      200

gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgc tag      705
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    205                      210

<210> 53
<211> 234
<212> PRT
<213> Штучний

<220>
<223> Синтетичний конструкт

<400> 53

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
-20                      -15                      -10                      -5

Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
    -1  1                      5                      10

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
    15                      20                      25

Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
    30                      35                      40

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
45                      50                      55                      60

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
    65                      70                      75

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser
    80                      85                      90

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
    95                      100                      105

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
    110                      115                      120

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
125                      130                      135                      140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
    145                      150                      155

```

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 160 165 170

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 175 180 185

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 190 195 200

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 205 210

<210> 54  
 <211> 1407  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> Штучно синтезована нуклеотидна послідовність

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1404)

<220>  
 <221> сигнальний білок  
 <222> (1)..(57)

<220>  
 <221> зрілий білок  
 <222> (55)..(1404)

<400> 54  
 atg gga tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48  
 Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 -15 -10 -5

gtc cac tgc cag gtc cag ctg aag cag tct gga gct gag ctg gtg agg 96  
 Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg  
 -1 1 5 10

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag act tct gga tac atc ttc 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe  
 15 20 25 30

acc agc tac tgg att cac tgg gta aaa cag agg tct gga cag ggc ctt 192  
 Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu  
 35 40 45

gag tgg att gca agg att tat cct gga act ggt agt act tac tac aat 240  
 Glu Trp Ile Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn  
 50 55 60

gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288  
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 65 70 75

act gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aaa tct gag gac tct gct gtc Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Val 80 85 90	336
tat ttc tgt gca aga tac cct acc tac gac tgg tac ttc gat gtc tgg Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp 95 100 105 110	384
ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115 120 125	432
tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr 130 135 140	480
gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr 145 150 155	528
gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 160 165 170	576
gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 175 180 185 190	624
gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195 200 205	672
cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser 210 215 220	720
tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu 225 230 235	768
ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 240 245 250	816
atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 255 260 265 270	864
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275 280 285	912
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg ccg gag gag cag tac aac agc acg Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 290 295 300	960
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 305 310 315	1008
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 320 325 330	1056

```

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag 1104
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
335          340          345          350

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc 1152
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
          355          360          365

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg 1200
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
          370          375          380

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct 1248
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
          385          390          395

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc 1296
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
          400          405          410

gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg 1344
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
415          420          425          430

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg 1392
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
          435          440          445

tct ccg ggt aaa tga 1407
Ser Pro Gly Lys
          450

```

<210> 55  
 <211> 468  
 <212> PRT  
 <213> Штучний

<220>  
 <223> Синтетичний конструкт

<400> 55

```

Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
          -15          -10          -5

```

```

Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
          -1  1          5          10

```

```

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe
          15          20          25

```

```

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
          30          35          40          45

```

```

Glu Trp Ile Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn

```

50

55

60

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 65 70 75  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 80 85 90  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
 95 100 105  
 Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 110 115 120 125  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 130 135 140  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 160 165 170  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 175 180 185  
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 190 195 200 205  
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
 210 215 220  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 225 230 235  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 240 245 250  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 255 260 265  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 270 275 280 285  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 290 295 300  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305 310 315



Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 320 325 330  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 335 340 345  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
 350 355 360 365  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 370 375 380  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 385 390 395  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 400 405 410  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 415 420 425  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 430 435 440 445

Ser Pro Gly Lys

<210> 56  
 <211> 705  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> Штучно синтезована нуклеотидна послідовність

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(702)

<220>  
 <221> сигнальний білок  
 <222> (1)..(60)

<220>  
 <221> зрілий білок  
 <222> (61)..(702)

<400> 56  
 atg gtt ttc aca cct cag att ctt gga ctt atg ctt ttc tgg att tca 48  
 Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser  
 -20 -15 -10 -5  
 gcc tcc aga ggt gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct 96

```

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
      -1 1
      5
      10
gtg act cca gga gat aga gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agt caa agt      144
Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
      15
      20
      25
att agc aac tac cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca      192
Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro
      30
      35
      40
agg ctt ctc atc aag tat gct tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc      240
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
      45
      50
      55
      60
agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
      65
      70
      75
agt gtg gag act gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac      336
Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Ser Asn
      80
      85
      90
agc tgg ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga      384
Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
      95
      100
      105
act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag      432
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
      110
      115
      120
ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat      480
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
      125
      130
      135
      140
ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg      528
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
      145
      150
      155
ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc      576
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
      160
      165
      170
tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa      624
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
      175
      180
      185
cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc      672
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
      190
      195
      200
gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgc tag      705
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      205
      210

```

<210> 57

<211> 234

<212> PRT

<213> Штучний

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 57

Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser  
-20 -15 -10 -5

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
-1 1 5 10

Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
15 20 25

Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro  
30 35 40

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser  
45 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn  
65 70 75

Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn  
80 85 90

Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
95 100 105

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
110 115 120

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
125 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
145 150 155

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
160 165 170

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
175 180 185

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
190 195 200

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
205 210

<210> 58

<211> 6

<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ  
<222> (1)..(6)  
<223> CDR

<400> 58

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn  
1 5

<210> 59  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ  
<222> (1)..(17)  
<223> CDR

<400> 59

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

Arg

<210> 60  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ  
<222> (1)..(9)  
<223> CDR

<400> 60

Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5

<210> 61  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ  
<222> (1)..(11)  
<223> CDR

<400> 61

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala  
1 5 10

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ

<222> (1)..(7)

<223> CDR

<400> 62

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ

<222> (1)..(9)

<223> CDR

<400> 63

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ

<222> (1)..(5)

<223> CDR

<400> 64

Ser Tyr Trp Ile His  
1 5

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ  
<222> (1)..(17)  
<223> CDR

<400> 65

Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 66  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ  
<222> (1)..(10)  
<223> CDR

<400> 66

Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 67  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ  
<222> (1)..(11)  
<223> CDR

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu His  
1 5 10

<210> 68  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ  
<222> (1)..(7)  
<223> CDR

<400> 68

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
1 5

<210> 69  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ  
 <222> (1)..(9)  
 <223> CDR

<400> 69

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 70  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ  
 <222> (1)..(6)  
 <223> CDR

<400> 70

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn  
 1 5

<210> 71  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ  
 <222> (1)..(17)  
 <223> CDR

<400> 71

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

Arg

<210> 72  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

```

<220>
<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ
<222> (1)..(9)
<223> CDR

<400> 72

Ala Leu Pro Leu Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5

```

```

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ
<222> (1)..(11)
<223> CDR

<400> 73

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10

```

```

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ
<222> (1)..(7)
<223> CDR

<400> 74

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

```

```

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ
<222> (1)..(9)
<223> CDR

<400> 75

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

```

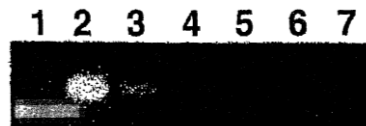
```

<210> 76
<211> 4

```

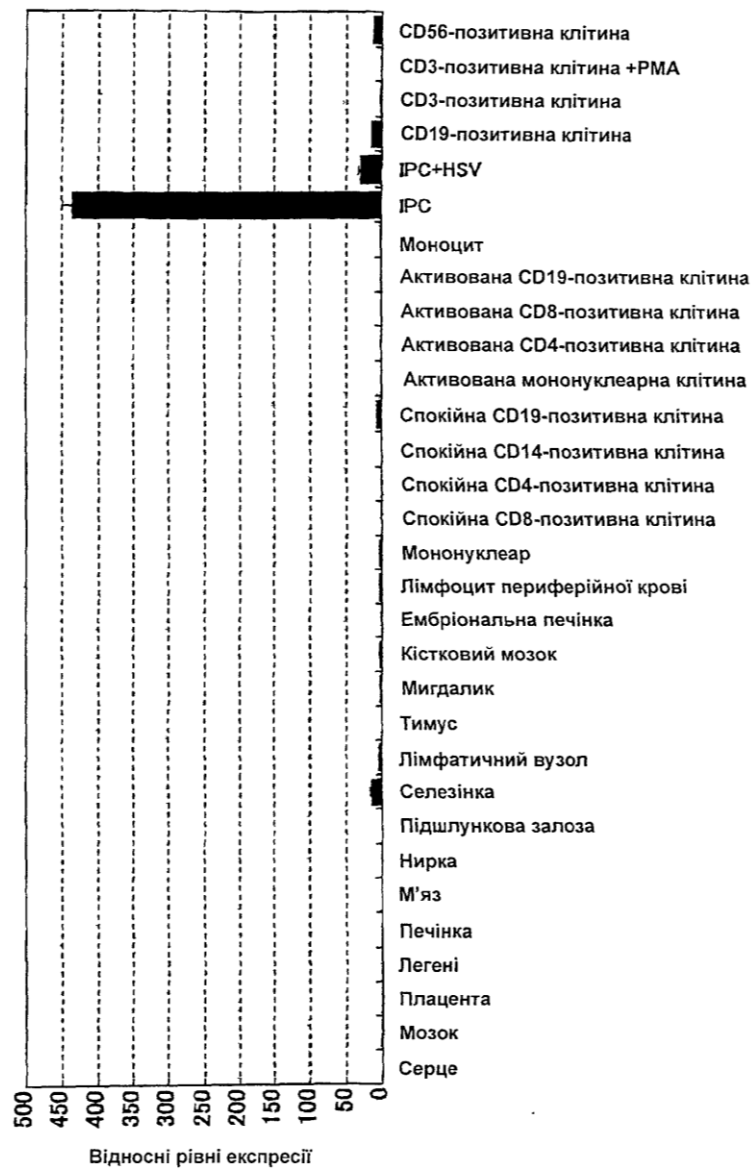


<212> PRT  
 <213> Штучний  
 <220>  
 <223> Штучно синтезована білкова послідовність  
 <220>  
 <221> ЗМІШАНА ВЛАСТИВІСТЬ  
 <222> (2) .. (3)  
 <223> Хаа може бути будь-якою природно виникаючою амінокислотою  
 <400> 76  
 Tyr Хаа Хаа Leu  
 1



1. Моноцит
2. IPC
3. IPC+HSV
4. В-клітина (CD19-позитивна)
5. Т-клітина (CD3-позитивна)
6. Активована Т-клітина
7. NK-клітина (CD56-позитивна)

Fig. 1a



Фіг. 1b

(a) Сигнальна послідовність

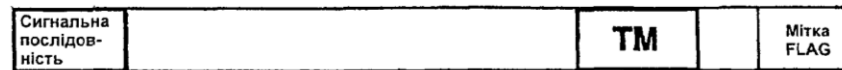
MTLILTSLLFFGLSLGPRTRVQAENLPKPI LWAEPGPVITWHNPVTIWCQGTLEAQGYRL  
 DKEGNSMSRHI LKTLSESENKVKLSIPSMWEHAGRYHCYYQSPAGWSEPSDPLELVVTAY  
 SRPTLSALPSPVVTSGVNVTLRCASRLGLGRFTLIEEGDHRLSWTLNSHQHNGKFQALF  
 PMGPLTFSNRGTFRCYGYENNTPYVWSEPSDPLQLLVSGVSRKPSLLTLQGPVVTGENL  
 TLQCGSDVGYIRYTLYKEGADGLPQRPGRPQAGLSQANFTLSPVSRSYGGQYRCYGAHN  
 VSSEWSAPSDPLDIL IAGQISDRPSLSVQPGPTVTSGEKVTLLCQSWDPMFTFLLTKEGA  
 AHPPLRLRSMYGAHKYQAEFPMSPVTSAHAGTYRCYGSRSSNPYLLSHPSEPLELVVSGA  
 TETLNPAQKKSDSKTAPHLQDYTVENLIRMGVAGLVLLFLGILLFEAQHSQRSPPRCSQE  
 ANSRKDNAPFRVVEPWEQI (SEQ ID NO:2) Трансмембранна ділянка (TM)

(b)

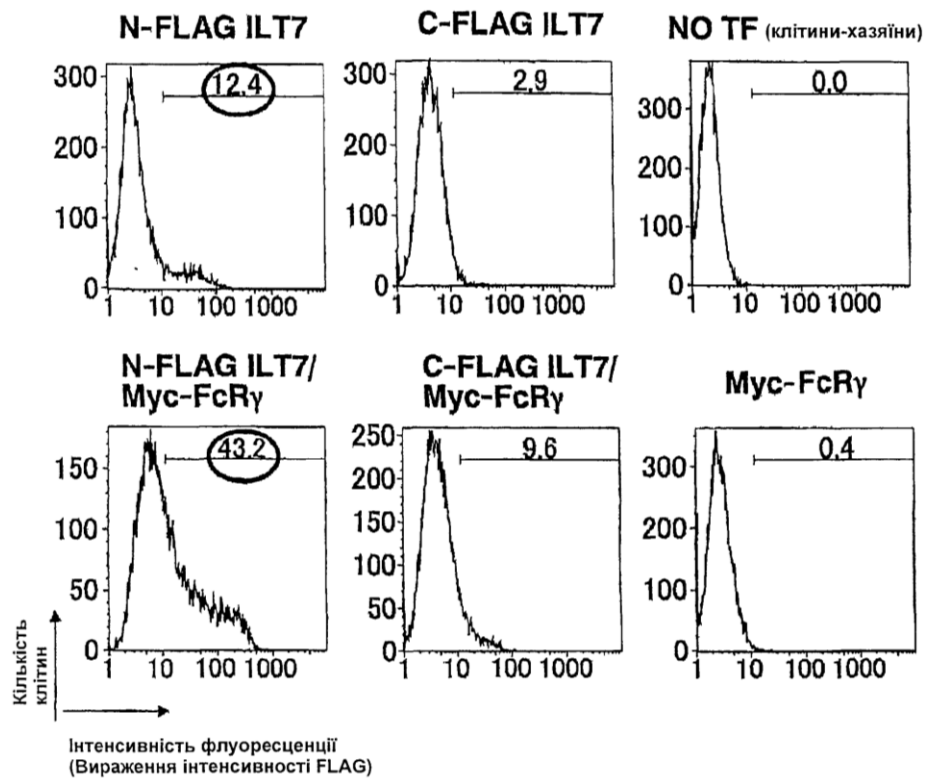
N-FLAG ILT7(57 кДа)



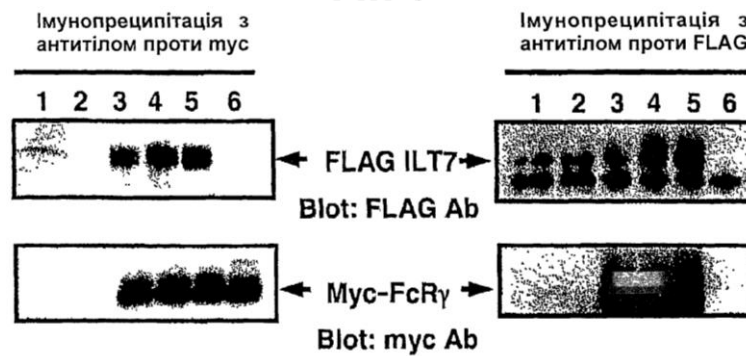
C-FLAG ILT7(57 кДа)



Фіг. 2



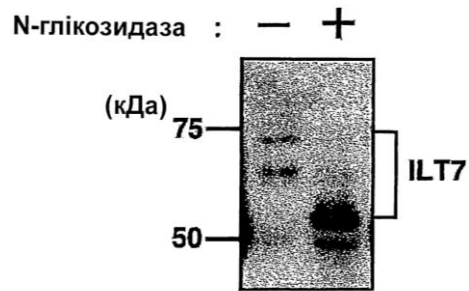
Фіг. 3



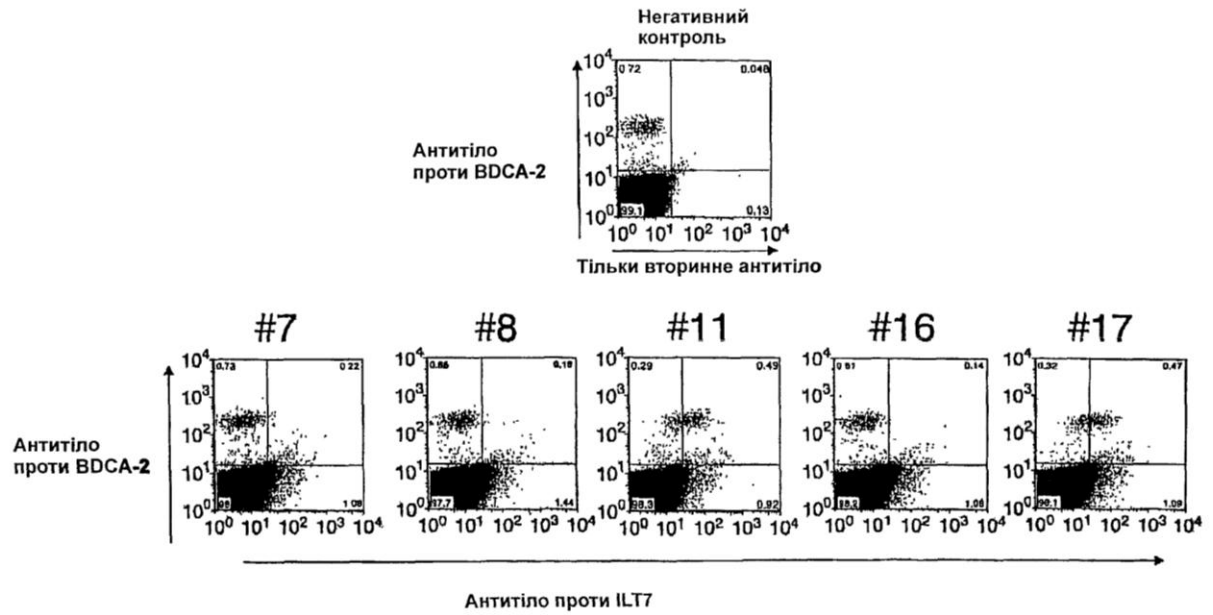
Уведені до клітин гени

1. N-FLAG ILT7
2. C-FLAG ILT7
3. N-FLAG ILT7 + Мус-FcR  $\gamma$
4. N-FLAG ILT7 + Мус-FcR  $\gamma$
5. C-FLAG ILT7 + Мус-FcR  $\gamma$
6. Мус-FcR  $\gamma$

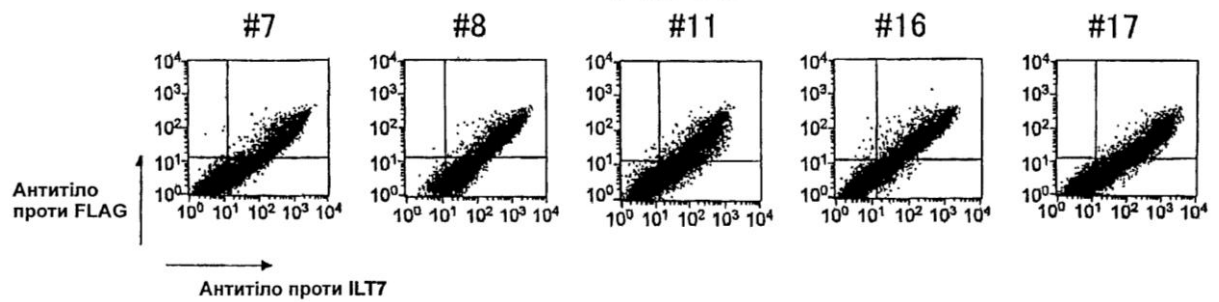
Фіг. 4



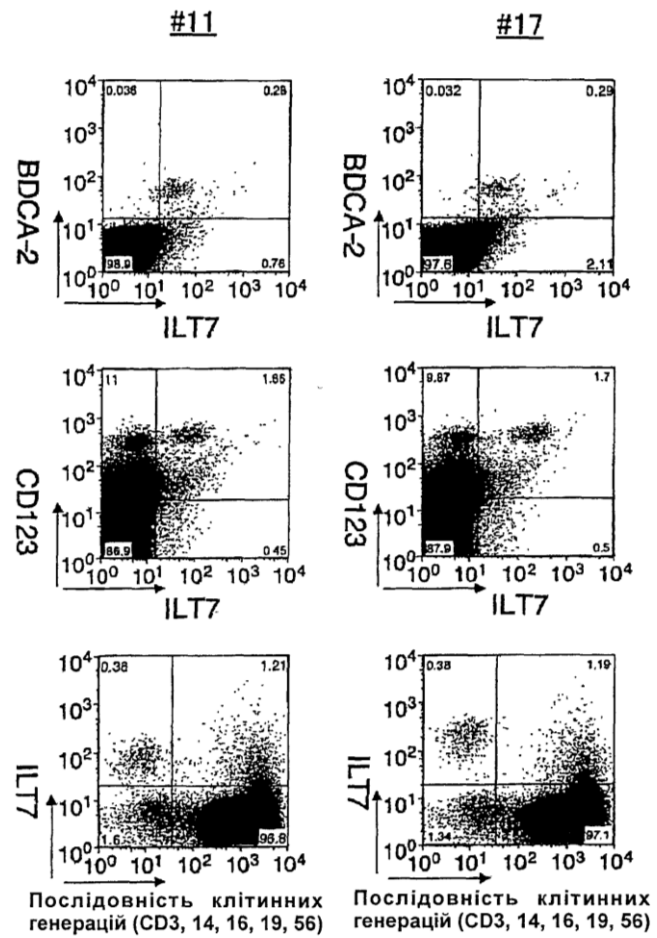
Фиг. 5



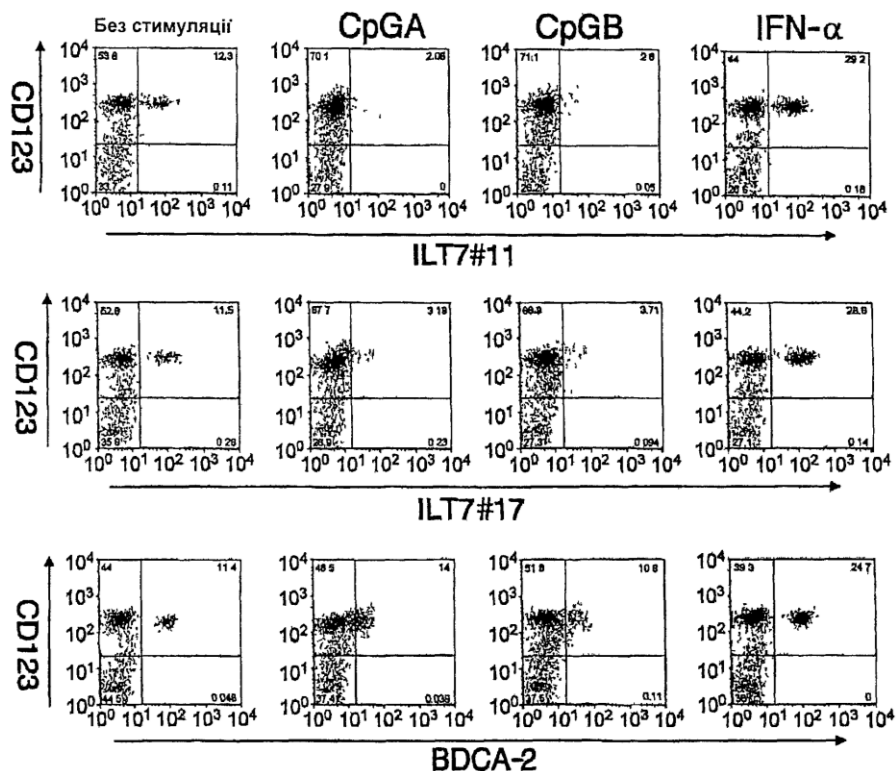
Фиг. 6a



Фиг. 6b



Фіг. 7



Фіг. 8

ILT7	1	MTL	ILT	SLL	FF	GL	SL	GP	RT	RV	QA	EN	LP	KP	IL	WA	EP	GP	VI	TW	HN	PV	TI	WC	QG	TL	EA	QY	RL	60																					
ILT5	1	MTP	ALT	TALL	CL	GL	SL	GP	RT	RV	QA	GP	FP	PK	PTL	WA	EP	GP	SV	IT	WG	SP	VT	TI	WC	QG	SL	EA	QY	RL	60																				
ILT8	1	MTP	IL	TV	LIC	L	GL	SL	GP	RT	HV	QA	GP	FP	PK	PTL	WA	EP	GP	SV	IT	WG	SP	VT	TI	WC	QG	SL	EA	QY	RL	60																			
LIR6	1	MTP	I	V	T	V	LIC	L	R	L	SL	GP	RT	HV	QA	G	T	L	P	K	P	T	L	WA	EP	GP	SV	IT	Q	G	S	P	V	T	L	W	C	Q	G	I	L	E	T	O	E	Y	R	L	60		
ILT1	1	MTP	IL	TV	LIC	L	GL	SL	GP	RT	HV	QA	G	H	L	P	K	P	T	L	WA	EP	GP	SV	IT	Q	G	S	P	V	T	L	R	C	Q	G	S	L	E	A	QY	E	Y	R	L	60					
ILT6	1	MT	S	I	L	T	V	LIC	L	GL	SL	GP	RT	HV	QA	G	F	L	P	K	P	T	L	WA	EP	GP	SV	IT	Q	G	S	P	V	T	L	R	C	Q	G	S	L	E	A	QY	E	Y	R	L	60		
ILT2	1	MTP	IL	TV	LIC	L	GL	SL	GP	RT	HV	QA	G	H	L	P	K	P	T	L	WA	EP	GP	SV	IT	Q	G	S	P	V	T	L	R	C	Q	G	S	L	E	A	QY	E	Y	R	L	60					
ILT4	1	MTP	I	V	T	V	LIC	L	GL	SL	GP	RT	HV	QA	G	T	G	T	I	P	K	P	T	L	WA	EP	GP	SV	IT	Q	G	S	P	V	T	L	S	C	Q	G	S	L	E	A	QY	E	Y	R	L	60	
LIR8	1	MT	L	T	L	S	V	LIC	L	GL	S	V	GP	RT	C	V	QA	G	T	L	P	K	P	T	L	WA	EP	GP	SV	I	A	R	G	K	P	V	T	L	W	C	Q	G	P	L	E	T	E	Y	R	L	60
ILT3	1	M	I	P	T	F	T	A	L	L	C	L	GL	SL	GP	RT	D	M	QA	G	P	L	P	K	P	T	L	WA	EP	GP	SV	IT	WG	N	S	V	T	TI	WC	Q	G	T	L	E	A	R	E	Y	R	L	60

ILT7	61	K	E	G	N	S	M	S	R	H	I	L	K	T	L	E	S	E	N	K	V	K	L	S	I	P	S	M	M	E	H	A	G	R	Y	H	C	Y	Y	Q	S	P	A	G	-	W	S	E	P	S	D	P	L	E	L	V	T	-	118				
ILT5	61	D	K	E	G	S	P	E	P	L	D	R	N	N	P	L	E	P	K	N	K	A	R	F	S	I	P	S	M	T	E	H	H	A	G	R	Y	R	C	H	Y	Y	S	S	A	G	-	W	S	E	P	S	D	P	L	E	L	V	M	T	G	-	119
ILT8	61	D	K	E	G	S	P	E	P	W	D	R	N	N	P	L	E	P	K	N	K	A	R	F	S	I	P	S	I	T	E	H	H	A	G	R	Y	R	C	H	Y	Y	S	S	A	G	-	W	S	E	P	S	D	A	L	E	L	V	M	T	G	-	119
LIR6	61	Y	R	E	K	K	T	A	P	W	I	T	R	I	P	Q	E	I	V	K	K	G	O	F	P	I	P	S	I	T	W	E	H	T	G	R	Y	R	C	F	Y	G	S	H	T	A	G	W	S	E	P	S	D	P	L	E	L	V	T	G	-	120	
ILT1	61	Y	R	E	N	K	B	A	S	W	V	R	R	I	O	E	P	G	K	N	-	G	O	F	P	I	P	S	I	T	W	E	H	A	G	R	Y	H	C	Q	Y	Y	S	H	N	H	S	-	E	Y	S	D	P	L	E	L	V	T	G	-	118		
ILT6	61	Y	R	E	K	K	T	A	L	W	I	T	R	I	P	Q	E	L	V	K	K	G	O	F	P	I	P	S	I	T	W	E	H	A	G	R	Y	C	C	I	Y	G	S	H	T	V	G	L	S	E	S	S	D	P	L	E	L	V	T	G	-	120	
ILT2	61	Y	R	E	K	K	T	A	P	W	I	T	R	I	P	Q	E	L	V	K	K	G	O	F	P	I	P	S	I	T	W	E	H	A	G	R	Y	C	C	I	Y	G	S	H	T	V	G	L	S	E	S	S	D	P	L	E	L	V	T	G	-	120	
ILT4	61	Y	R	E	K	K	B	A	S	W	V	R	R	I	P	Q	E	L	V	K	K	G	O	F	H	I	P	S	I	T	W	E	H	T	G	R	Y	C	C	Q	Y	Y	S	R	A	R	-	W	S	E	L	S	D	P	L	V	L	V	M	T	G	-	119
LIR8	61	D	K	E	G	L	P	W	A	R	K	R	Q	N	P	L	E	P	G	A	K	A	K	F	H	I	P	S	T	V	Y	D	S	A	G	R	Y	R	C	Y	Y	E	T	P	A	G	-	W	S	E	P	S	D	P	L	E	L	V	A	T	G	-	119
ILT3	61	D	K	E	S	P	A	P	W	D	R	Q	N	P	L	E	P	K	N	K	A	R	F	S	I	P	S	M	T	E	D	Y	A	G	R	Y	R	C	Y	Y	R	S	P	V	G	-	W	S	Q	P	S	D	P	L	E	L	V	M	T	G	-	119	

ILT7	119	A	Y	S	R	P	T	L	S	A	L	P	S	P	V	V	T	S	G	V	N	V	T	L	R	C	A	S	R	L	G	L	G	R	F	T	L	I	E	E	G	D	H	R	L	S	W	T	L	N	S	H	O	H	N	H	G	K	F	Q	A	-	178
ILT5	120	F	Y	N	K	P	T	L	S	A	L	P	S	P	V	V	A	S	G	G	N	M	T	L	R	C	G	S	O	K	G	Y	H	F	V	L	M	K	E	G	E	H	O	L	P	R	T	L	D	S	O	O	L	H	S	G	G	F	Q	A	-	179	
ILT8	120	A	Y	S	K	P	T	L	S	A	L	P	S	P	V	V	A	S	G	G	N	M	T	L	R	C	G	S	O	K	G	Y	H	F	V	L	M	K	E	G	E	H	O	L	P	R	T	L	D	S	O	O	L	H	S	G	G	F	Q	A	-	179	
LIR6	121	A	Y	I	K	P	T	L	S	A	L	P	S	P	V	V	T	S	G	G	N	V	T	L	R	C	S	O	V	A	F	D	G	F	I	L	C	K	E	G	E	D	E	H	P	O	C	L	N	S	O	P	R	T	H	G	W	S	R	A	-	180	
ILT1	119	A	Y	S	K	P	T	L	S	A	L	P	S	P	V	V	T	S	G	G	N	V	T	L	R	C	S	O	V	A	F	D	G	F	I	L	C	K	E	G	E	D	E	H	P	O	C	L	N	S	H	A	R	G	S	S	R	A	-	178			
ILT6	121	A	Y	S	K	P	T	L	S	A	L	P	S	P	V	V	T	S	G	G	N	V	T	L	R	C	S	O	V	A	F	D	G	F	I	L	C	K	E	G	E	D	E	H	P	O	C	L	N	S	H	A	R	G	S	S	R	A	-	180			
ILT2	121	A	Y	I	K	P	T	L	S	A	L	P	S	P	V	V	T	S	G	G	N	V	T	L	R	C	S	O	V	A	F	D	G	F	I	L	C	K	E	G	E	D	E	H	P	O	C	L	N	S	O	P	R	T	H	G	W	S	R	A	-	180	
ILT4	120	A	Y	P	K	P	T	L	S	A	L	P	S	P	V	V	T	S	G	G	N	V	T	L	R	C	S	O	V	A	F	D	G	F	I	L	C	K	E	G	E	D	E	H	P	O	C	L	N	S	O	P	R	T	H	G	W	S	R	A	-	179	
LIR8	120	F	Y	A	E	P	T	L	L	A	L	P	S	P	V	V	A	S	G	G	N	V	T	L	R	C	D	T	L	D	G	L	L	T	F	V	L	V	E	E	-	E	O	K	L	P	R	T	L	Y	S	O	K	L	P	K	G	P	S	Q	A	-	178
ILT3	120	A	Y	S	K	P	T	L	S	A	L	P	S	P	L	V	T	S	G	K	S	V	T	L	R	C	S	R	S	P	M	D	T	F	L	L	I	K	E	R	A	A	H	P	L	H	L	R	S	-	E	H	G	A	Q	Q	H	Q	A	-	178		

Фіг. 9a

```

IL77 179 LFPMPGLTFSSNRGTFRCYGYENNTPYVWSHPSPDPLQLLVSGVSRKPSLLTLQGPVVTPGE 238
IL75 180 LFPVGPVNPFSHRWRFTCYYYXMYNTFQVWSHPSPDPLLEILPSGVSRKPSLLTLQGPVLAPGQ 239
IL78 180 LFPVGPVNPFSHRWRFTCYYYXMYNTFQVWSHPSPDPLLEILPSGVSRKPSLLTLQGPVLAPGQ 239
LIR6 181 IFSVGPVSPSRRRWSYRCYAYDSNSPFWWSLPSDLLLELLVVGVSKKPSLSVQPGPIVAPGE 240
IL71 179 IFSVGPVSPSRRRWSYRCYAYDSNSPYVWSLPSDLLLELLVVGVSKKPSLSVQPGPIVAPGE 238
IL76 181 IFSVGPVSPSRRRWSYRCYGYDSRAPYVWSLPSDLLLELLVVGVSKKPSLSVQPGPIVAPGE 240
IL72 181 IFSVGPVSPSRRRWSYRCYAYDSNSPYVWSLPSDLLLELLVVGVSKKPSLSVQPGPIVAPGE 240
IL74 180 IFSVGPVSPSRRRWSYRCYGYDLSNPYVWSLPSDLLLELLVVGVSKKPSLSVQPGPIVAPGE 239
LIR8 179 LFPVGPVTPSCRWRFRCYYYRKNPQVWSHPSPDPLLEILPSGVSRKPSLLIPQGSVVARGG 238
IL73 179 EFPMSPVTSVHGGTYRCFSSSHGFSHYLLSHPSDPLLEILVSGSLE-----GPRPSP-- 228

```

```

IL77 239 NLTLQCGSDVGYIIRYTLYKEGADGLP-ORPGRQPOAGLSQANFTLSPVSRSYGGQYRCY 297
IL75 240 SLTLQCGSDVGYDRFVLYKEGERDGL-ORPGRQPOAGLSQANFTLGPVSPSHGGQYRCY 298
IL78 240 SLTLQCGSDVGYDRFVLYKEGERDGL-ORPGRQPOAGLSQANFTLGPVSPSHGGQYRCY 298
LIR6 241 SLTLQCGSDVGYDRFVLYKEGERDGL-OLPGPQPOAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCY 299
IL71 239 SLTLQCGSDVGYDRFVLYKEGERDGL-ORPGRQPOAGLSQANFTLGPVSPSHGGQYRCY 297
IL76 241 KLTFLQCGSDAGYDRFVLYKEGERDGL-ORPGRQPOAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCY 299
IL72 241 SLTLQCGSDAGYDRFVLYKEGERDGL-OLAGAOPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCY 299
IL74 240 SLTLQCGSDVGYDRFVLYKEGERDGL-OLPGPQPOAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCY 298
LIR8 239 SLTLQCGSDVGYDRFVLYKEGERDGL-OLPGPQPOAGLSQANFTLGPVSRSHGGQYRCY 297
IL73 229 - - - - -TRSVSTAGAPEDQPLMPTGSPVPHSGLRRHWEVLTGLVVSILLLSLLLFLLQLHWRQG 286

```

```

IL77 298 AHNVSSEWSAPSDPLDILITAGQISDRPSLSVQPGPTVTSGEKVTLTLCQSWDPMFTFLLTK 357
IL75 299 AHNLSSEWSAPSDPLNILLMAGQIYDVTVLSAQPGPTVASGENVTLLCQSWQFDTFLLTK 358
IL78 299 AHNLSSEWSAPSDPLNILLMAGQIYDVTVLSAQPGPTVASGENVTLLCQSWQFDTFLLTK 358
LIR6 300 AYNLSSEWSAPSDPLDILITAGQIFRGRPFISVHPGPTVASGENVTLLCQSWQFHTFLLTK 359
IL71 298 AHNLSSEWSAPSDPLDILITAGQIFRGRPFISVHPGPTVASGENVTLLCQSWQFHTFLLTK 357
IL76 300 AYNLSSEWSAPSDPLDILITAGQIFRGRPFISVHPGPTVASGENVTLLCQSWQFHTFLLTK 359
IL72 300 AYNLSSEWSAPSDPLDILITAGQIFRGRPFISVHPGPTVASGENVTLLCQSWQFHTFLLTK 359
IL74 299 AHNLSSEWSAPSDPLDILITAGQIFRGRPFISVHPGPTVASGENVTLLCQSWQFHTFLLTK 358
LIR8 298 AHNLSSEWSAPSDPLDILITAGQIFRGRPFISVHPGPTVASGENVTLLCQSWQFHTFLLTK 357
IL73 287 KHRTLAQRQADFO-----RPPGAAEFEPKDGGLQRRSSPAADVQGENFCAAVK 334

```

Фиг. 9b

```

IL77 358 EGAAHPFLRLRSMYGAHKYQAEFFMSPVTSAHAGTYRCYGSRSSNPYLLSHFPSEPLELVV 417
IL75 359 EGAAHPFLRLRSMYGAHKYQAEFFMSPVTSAHAGTYRCYGSYSSNPYLLSHFPSEPLELMV 418
IL78 359 EGAAHPFLRLRSMYGAHKYQAEFFMSPVTSAHAGTYRCYGSYSSNPYLLSHFPSEPLELMV 418
LIR6 360 AGAADAPFLRLRSIHEYPKYQAEFFMSPVTSAHAGTYRCYGSLSNPYLLSHFPSEPLELMV 419
IL71 358 EGAGHPPLHLRSEHQAOQNOAEFFMSPVTSAHAGTYRCYGSLSNPYLLSHFPSEPLELVV 417
IL76 360 EGAAHDPFLRLRSKRQSHKYQAEFFMSPVTSAHAGTYRCYGSLSNPYLLSHFPSEPLELVV 419
IL72 360 EGAAHDPFLRLRSIHEYPKYQAEFFMSPVTSAHAGTYRCYGSLSNPYLLSHFPSEPLELVV 419
IL74 359 AGAADAPFLRLRSIHEYPKYQAEFFMSPVTSAHAGTYRCYGSLSNPYLLSHFPSEPLELVV 418
LIR8 358 EGAAHPFLCLKSKYQSYRHQAEFFMSPVTSAHAGTYRCYSAIRSYPYLLSSPSYPQELVV 417
IL73 335 NTQFEDQVEMDTQRQSPHD-----EDPQAVTYAKVKHSRPRREMSPSPS-PLSGEF 383

```

трансмембранный диланка

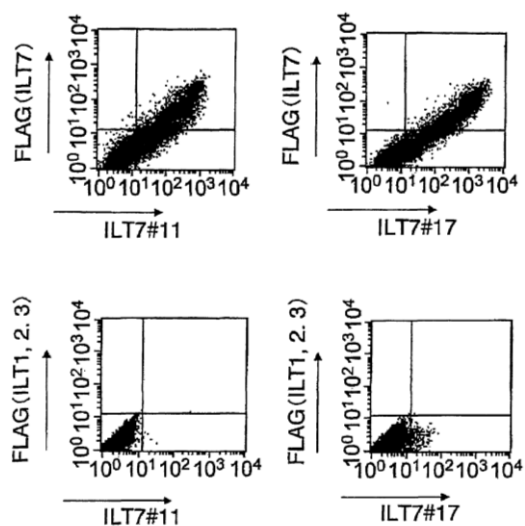
```

IL77 418 SGATETLNPAOKKSDSK-----TAPHLODYTVENLIRMGVAGLVLLFGLIL 463
IL75 419 SGHSGGSILPPTGPPS-----TPGLCRYLEVLIGVSVAFVLLFLLLF 461
IL78 419 SG-----ASHAKDYTVENLIRMGAGLVLLVFLGIL 447
LIR6 420 SGAAETLSEPPONKSDSKAG-AAANTLSPSQNKTAHPQDYTVENLIRMGAGLVLLVFLGIL 478
IL71 418 SASLGQHP-----QDYTVENLIRMGVAGLVLLVFLGIL 449
IL76 420 SGAAETLSEPPONKSDSKAG-E----- 439
IL72 420 SGPSGGPSPTTGTSTSG-PEDQPLTPTGSDPQSGGLGRHLGVVIGILVAVVLLLLLL 478
IL74 419 SGPSMGSSPTTGTSTSG-PEDQPLTPTGSDPQSGGLGRHLGVVIGILVAVVLLLLLL 478
LIR8 418 SGPSGDPSSLPTGSTPTPG-PEDQPLTPTGLDPQSGGLGRHLGVVIGVSVAFVLLFLLLF 476
IL73 384 LDTKDR-----QAEEDRQMDTEAASEAPQDVTYARLH 416

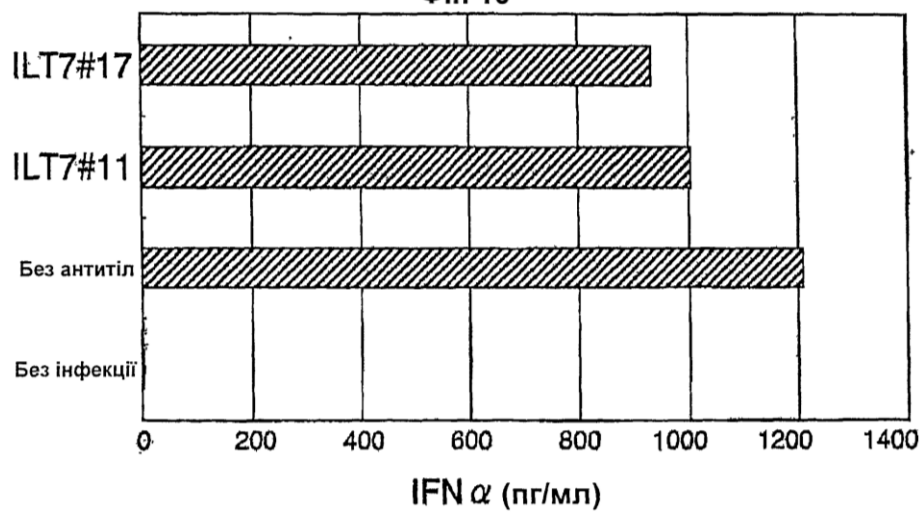
```

Фиг. 9c

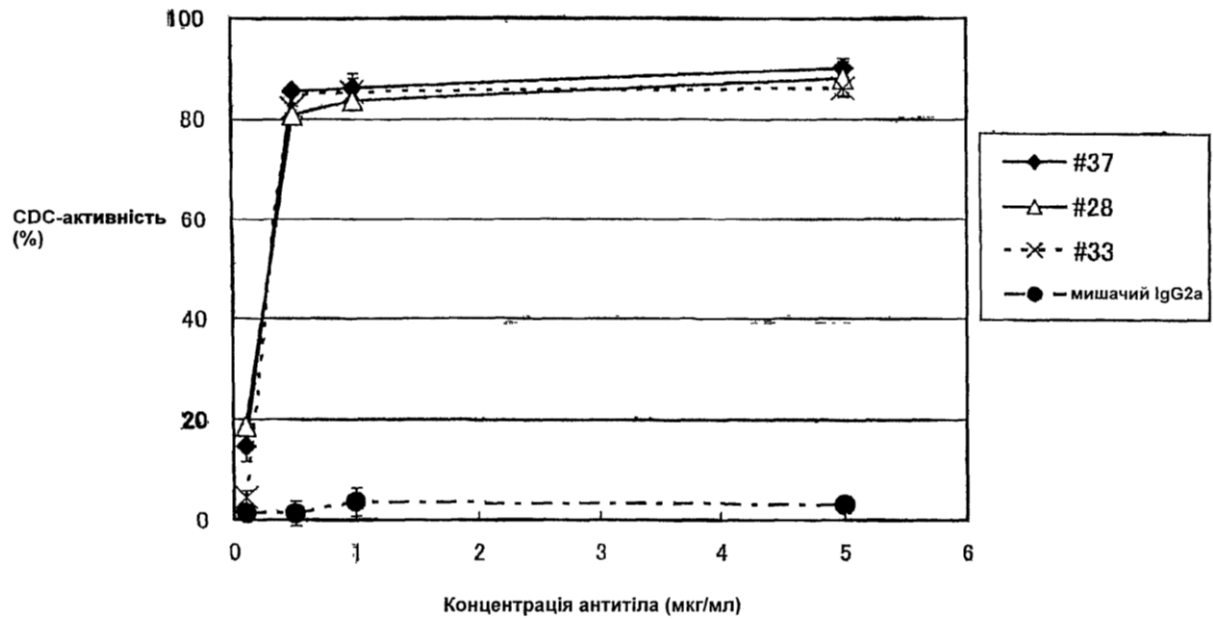




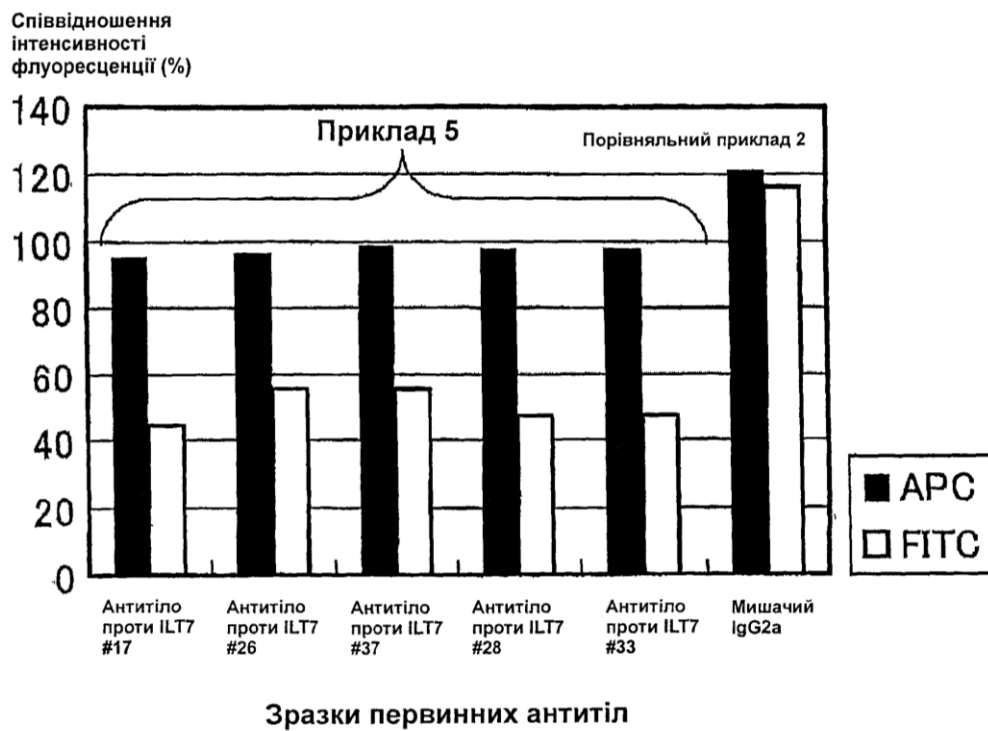
Фіг. 10



Фіг. 11



Фіг. 12



Фіг. 13

Комп'ютерна верстка О. Гапоненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601