

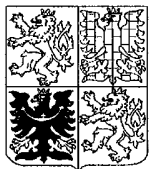
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3761

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.04.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **25.04.1997 25.04.1997**
16.01.1998 16.01.1998

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/044886 1997/845753**
1998/071676 1998/008543

(33) Země priority: **US US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.03.2000**
(Věstník č. 3/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/08212**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/49310**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. C1. ⁷:

C 12 N 15/19

C 07 K 14/52

C 12 N 15/62

C 07 K 19/00

C 07 K 16/24

C 07 K 16/42

C 12 Q 1/66

C 12 Q 1/68

G 01 N 33/52

G 01 N 33/60

(71) Přihlašovatel:

ZYMOGENETICS, INC., Seattle, WA,
US;

(72) Původce:

Presnell Scott R., Tacoma, WA, US;
Gilbert Terasa, Seattle, WA, US;
Whitmore Theodore E., Redmond, WA, US;
Foster Donald C., Lake Forest Park, WA, US;
Hart Charles E., Woodinville, WA, US;
Lehner Joyce M., Seattle, WA, US;
Martinez Theresa, Greenbank, WA, US;
Hoffmann Ross C., Seattle, WA, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
140 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Izolovaný polynukleotid který kóduje savčí Z
cyto 7 polypeptid expresivní vektor,
protilátka a způsob její přípravy

(57) Anotace:

Nové savčí Z cyto 7 polypeptidy, polynukleotidy kódující
polypeptidy a příbuzné sloučeniny a metody zahrnující
protilátky a anti-idiotypické protilátky.

Izolovaný polynukleotid, který kóduje savčí Z cyto 7 polypeptid, expresivní vektor, protilátka a způsob její přípravy

8650

Oblast techniky

Tento vynález patří do skupiny růstových faktorů, cytokininů, ovlivňujících buněčný metabolismus svou vazbou na protein, tj. působí zejména na proliferaci a diferenciaci buněk, zejména na proliferaci a diferenciaci buněk. Cytokiny jsou důležité při obnově normálních hladin krevních buněk u pacientů trpících anemií nebo podstupujících chemoterapii nádorových onemocnění.

Dosavadní stav techniky

Proliferace a diferenciaci buněk mnohobuněčných organismů je řízena hormony a polypeptidy růstových faktorů. Tyto difusní molekuly umožňují buňkám vzájemně komunikovat a fungovat ve vzájemné souhře při tvorbě a regeneraci poškozených tkání. Příklady hormonů a růstových faktorů včetně steroidních hormonů (např. estrogen, testosteron), parathyroidní hormon, folikuly stimulující hormon, interleukiny, z krevních destiček odvozený růstový faktor (PDGF = platelet derived growth factor), epidermální růstový faktor (EGF = epidermal growth factor), granulocyt - makrofág kolonie stimulující faktor (GM - CSF), erythropoietin (EPO) a kalcitonin.

Hormony a růstové faktory ovlivňují buněčný metabolismus vazbou na proteiny. Těmito proteiny mohou být integrální membránové proteiny, jež jsou napojeny na signální cesty v buňkách, tak jako druhé mediátorové systémy. Ostatní třídy proteinů jsou rozpustné molekuly stejně jako transkripční faktory.

Středem zvláštního zájmu jsou cytokininy, molekuly, které podporují proliferaci a/nebo diferenciaci buněk. Příklady cytokininů zahrnují erythropoetin (EPO), který stimuluje vývoj červených krvinek, thrombopoetin (TPO), který stimuluje vývoj buněčných linií makrofágů a granulocytové kolonie stimulující faktor (G-CSF), který stimuluje vývoj neutrofilů. Tyto cytokininy jsou důležité při obnově normálních hladin krevních buněk u pacientů trpících anemií nebo podstupujících chemoterapii nádorových onemocnění. Aktivita těchto cytokininů demonstrováné *in vivo* představují jejich obrovský klinický potenciál a potřebu dalších cytokininů, cytokinin agonistů a cytokinin antagonistů.

Podstata vynálezu

Navrhovaný vynález se obrací na tuto potřebu zajištění nového polypeptidu nazvaného cytokininu podobný faktor 7 (cytokinine-like factor 7), dále zde uváděný jako Z cyto 7 a příbuzné sloučeniny a metody.

Tedy jednou stránkou navrhovaného vynálezu je zajistit izolovaný Z cyto 7 polypeptid mající sekvence aminokyselin, jak je dále uvedeno. Jsou známy lidská i myší cDNA. Lidské sekvence jsou definovány SEQ ID č. 1 a 2. Myší nukleotid a sekvence aminokyselin jsou definovány SEQ ID č. 11 a 12.

Nukleotidová sekvence SEQ ID č. 1 obsahuje otevřený čtecí rámec kódující polypeptid s přibližně 180 aminokyselinami s počátečním Met, jak je vidět v SEQ ID č. 1 a SEQ ID č. 2. Předpovězená signální sekvence je složena z aminokyselinových zbytků 1 až 20 a výsledný předpokládaný zralý Z cyto 7 polypeptid je reprezentován sekvencí aminokyselin sahající od zbytku aminokyseliny 21, glutaminu ke a včetně zbytku aminokyseliny 180 fenylalaninu, též reprezentovaný SEQ ID č. 14. Údaje mapující peptidy ukazují, že zralý Z cyto 7 může být složen z mnoha N-koncových zralých variant obsahujících sekvence aminokyselin sahající od zbytku aminokyseliny 23, argininu ke a včetně zbytku aminokyseliny 180 SEQ ID č. 2, též definovaného SEQ ID č. 36; sekvencí aminokyselin sahající od zbytku aminokyseliny 27 serinu ke a včetně zbytku aminokyseliny 180 SEQ ID č. 2, též definovaného SEQ ID č. 37; sekvence aminokyselin definované zbytkem aminokyseliny 30, lysinem ke a včetně zbytku aminokyseliny 180 SEQ ID č. 2,

též definovaného SEQ ID č. 38; sekvence aminokyselin sahající od aminokyseliny 28 lysinu ke a včetně zbytku aminokyseliny 180 SEQ ID č. 2, také definovaný SEQ ID č. 41 a sekvence aminokyselin sahající od zbytku aminokyseliny 53 methioninu ke a včetně zbytku aminokyseliny 180, také definovaný SEQ ID č. 42. Jediné pozorované štěpení na karboxylovém konci je fenylalanin v poloze 180, který může být odštěpen. To se může stát u všech výše definovaných zralých Z cyto 7 polypeptidů, jejichž příklad je ukázán SEQ ID č. 43. Další varianty lidského Z cyto 7 jsou definovány SEQ ID č. 15 až 25. V dodatečném vyjádření obsahuje dále polypeptid afinitní přívěsek.

SEQ ID č. 11 a 12 definují myši Z cyto 7, kde zralý protein sahá od aminokyselinových zbytků zbytku aminokyseliny 21 histidinu ke a včetně zbytku aminokyseliny 180 fenylalaninu, také definovaný SEQ ID č. 39 nebo jako náhradního spojovacího místa od zbytku aminokyseliny 23, argininu, ke a včetně zbytku aminokyseliny 180 také definovaný SEQ ID č. 40. Navrhovaný vynález je též tvořen polypeptidy, které mají sekvenci aminokyselin alespoň z 90 % identickou, raději z 95 %, 97 % nebo 99 % identickou s výše definovanými Z cyto 7 polypeptidy.

Další vyjádření navrhovaného vynálezu se týká peptidu nebo polypeptidu, jehož aminokyselinová sekvence epitop nesoucí část Z cyto 7 polypeptidu má výše popsanou sekvenci aminokyselin. Peptidy nebo polypeptidy mající sekvenci aminokyselin epitop nesoucí části Z cyto 7 polypeptidu navrhovaného vynálezu včetně částí takových polypeptidů s alespoň devíti, raději alespoň 15 a více, nejlépe alespoň 30 až 50 aminokyselinami, ačkoli epitop nesoucí polypeptidy jakékoli délky až do a včetně úplné sekvence aminokyselin polypeptidu navrhovaného vynálezu popsaného výše jsou též obsaženy v prezentovaném vynálezu. Příklady uvedených polypeptidů jsou definovány sekvencemi aminokyselin SEQ ID č. 25 - 35. Jsou též nárokovány kterékoli z těch polypeptidů, jež jsou připojeny k jinému polypeptidu nebo nosné molekule.

Navrhovaný vynález dále obsahuje polypeptid definovaný SEQ ID č. 15 až 25, kde aminové konce uvedených polypeptidů jsou modifikovány a začínají buď u zbytku aminokyseliny 3, argininem; zbytku aminokyseliny 7, serinem; zbytku aminokyseliny 8, lysinem; zbytku aminokyseliny 10, lysinem nebo zbytku aminokyseliny 33 methioninem.

Navrhovaný vynález dále obsahuje polypeptid, kde polypeptid je polypeptid definovaný SEQ ID č. 2, 12, 14 až 25 a 36 až 42, přičemž sekvence aminokyselin končí u isoleucinů při zbytku aminokyselin 179 SEQ ID č. 2, u zbytku aminokyselin 159 SEQ ID č. 14 až 25, který odpovídá zbytku aminokyselin 157 SEQ ID č. 36, zbytku aminokyselin 153 SEQ ID č. 37, zbytku aminokyselin 150 SEQ ID č. 38, zbytku aminokyselin 159 SEQ ID č. 39, zbytku aminokyselin 157 SEQ ID č. 40, zbytku aminokyselin 152 SEQ ID č. 42, zbytku aminokyselin 127 SEQ ID č. 42.

Navrhovaný vynález dále obsahuje izolovaný peptid nebo polypeptid z výše popsaných peptidů nebo polypeptid mající sekvenci aminokyselin modifikovanou adicí, delecí a/nebo přemístěním jednoho nebo více zbytků aminokyselin a který řídí biologickou aktivitu uvedeného peptidu nebo polypeptidu.

Dalším zřetelem vynálezu je zajistit chimerický polypeptid skládající se nezbytně z první a druhé části spojených peptidovou vazbou. První část chimerického polypeptidu obsahuje nezbytně (a) Z cyto 7 polypeptid, jak je popsán výše, (b) allelické varianty výše popsaných polypeptidů. Druhá část chimerického polypeptidu obsahuje nezbytně jiný polypeptid tak jako afinitní přívěsek. V jednom vyjádření je afinitním přívěskem imunoglobulin F_c polypeptid. Vynález též zajišťuje expresivní vektory kódované chimerickými polypeptidy a hostitelské buňky transfektované pro produkci chimerických polypeptidů.

Další aspekt navrhovaného vynálezu opatřuje pro izolované molekuly nukleové kyseliny obsahující polynukleotid vybraný ze skupiny sestávající z: (a) nukleotidové sekvence kódující výše popsané Z cyto 7 polypeptidy; (b) nukleotidové sekvence kódující polypeptidy SEQ ID č. 14 až 40 a (c) nukleotidové sekvence komplementární ke kterékoli z nukleotidových sekvencí v (a) nebo (b).

Následující vyjádření vynálezu zahrnuje izolované molekuly nukleové kyseliny, která obsahuje polynukleotid mající nukleotidovou sekvenci alespoň z 90 % identickou, raději z 95 %, 97 %, 98 % nebo 99 % identickou ke kterékoli z nukleotidových sekvencí v (a), (b) nebo (c) uvedených výše nebo polynukleotid, který hybridizuje za přísných hybridizačních podmínek na polynukleotid mající nukleotidovou sekvenci (a), (b) nebo (c) výše uvedenou. Přídavné vyjádření nukleových kyselin předkládaného vynálezu se vztahuje k izolované molekule nukleové kyseliny obsahující aminokyselinu epitop nesoucí části Z cyto 7 polypeptidu.

V dalším aspektu tohoto vynálezu je zajištěn expresivní vektor obsahující (a) transkripční promotor, (b) DNA segment kódující výše popsany polypeptid, a (c) transkripční terminátor, kde promotor DNA segment a terminátor jsou operativně spojeny.

V třetím aspektu vynálezu je zajištěna kultivovaná eukaryotická buňka, do níž byl vpraven expresivní vektor, jak je uvedeno výše, přičemž tato buňka exprimuje protein polypeptidu kódovaného DNA segmentem.

V dalším vyjádření navrhovaného vynálezu je izolována protilátka, která se specificky váže k výše popsanému Z cyto 7 polypeptidu. Nárokován je též způsob přípravy protilátek, které se vážou k Z cyto 7 polypeptidu zahrnující očkování savce Z cyto 7 polypeptidem nebo Z cyto 7 epitop nesoucím polypeptidem tak, že savec produkuje proti polypeptidu protilátky a tyto protilátky jsou izolovány.

Tyto a ostatní aspekty vynálezu se stanou zřejmými v odkazech k následujícímu podrobnému popisu.

Nauka všech zde citovaných odkazů je v plném rozsahu uvedena zde v odkazech.

Termín afinitní přívěsek je zde použit k označení segmentu polypeptidu, který může být připojen k druhému polypeptidu za účelem purifikace nebo detekce druhého polypeptidu nebo zajištění poloh pro připojení druhého polypeptidu k substrátu. V principu jakýkoli peptid nebo protein, pro který je dostupná protilátka nebo jiné specificky vázané činidlo může být použit jako afinitní přívěsek. Afinitní přívěsky obsahují polyhistidinový úsek, protein A [Nilsson et al, *EMBO J.* 4 : 1075 (1985); Nilsson et al., *Methods Enzymol.* 198 : 3 (1991)], glutathion S transferázu [Smith and Johnson, *Gene* 67 : 31 (1988)], Glu-Glu afinitní přívěsek [Grussenmeyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 7952 - 4 (1985)], substanci P, FLAGTM peptid (Hopp et al., *Biotechnology* 6 : 1204 - 10 (1988), peptid vázající streptavidin, nebo jiný antigenní epitop nebo vazebnou doménu. Viz obecně Ford et al., *Protein Expression and Purification* 2: 95 - 107 (1991). DNA kódující afinitní přívěsky jsou dostupné od komerčních dodavatelů (např. Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Termín „alelická varianta“ označuje kterékoli dvě nebo více alternativních forem genů obsahujících stejný chromozomální lokus. Alelická variabilita se zvyšuje, přičemž mutací a výsledkem může být fenotypický polymorfismus v populacích. Genové mutace mohou být skryté (nedochází ke změně v kódovaném polypeptidu) nebo mohou kódovat polypeptidy, které mají změněnou sekvenci aminokyselin. Termín alelická varianta je zde též použit k označení proteinu kódovaného alelickou variantou genu.

Termín „expresivní vektor“ označuje DNA molekulu, lineární nebo cirkulární, která obsahuje segment kódující určitý polypeptid operativně spojený s přídatnými segmenty tak, aby byla zajištěna jeho transkripce. Takové přídatné segmenty mohou obsahovat promotor a sekvence terminátoru a mohou případně obsahovat jeden nebo více počátků replikace, jeden nebo více selektivních markerů, zesilovač transkripce, polyadenylační signál a podobně. Expresivní vektory jsou obvykle odvozeny od plazmidu nebo virové DNA, nebo mohou obsahovat prvky obojí.

Termín „izolovaný“, je-li užit v souvislosti s molekulou polynukleotidu, označuje, že polynukleotid byl odebrán z jeho přirozeného genetického prostředí, tudíž bez jiných okolních nebo nežádoucích kódujících sekvencí, a nachází se ve formě vhodné pro použití v systémech produkce proteinů metodami genového inženýrství. Takové izolované molekuly jsou ty, které byly separovány z jejich přirozeného prostředí a zahrnují cDNA a genomické klony. Izolované DNA molekuly tohoto vynálezu neobsahují ostatní geny, s nimiž jsou obvykle vázány, ale mohou obsahovat přirozeně se objevující 5' a 3' nepřeložitelné úseky jako jsou promotory a terminátory. Identifikace vázaných úseků je zřejmá odborníkům v oboru. Viz například Dynan and Tijan, *Nature* 316 : 774 - 78 (1985). Je-li v souvislosti s proteinem užit termín „izolovaný“, znamená to, že byl protein nalezen v podmínkách jiných, než je jeho přirozené prostředí, jako je oddělení z krve a zvířecí tkáně. V přednostní formě izolovaný protein ve své podstatě neobsahuje jiné proteiny, zejména jiné proteiny zvířecího původu. To je upřednostňováno pro zajištění proteinů ve vysoce purifikované formě, např. vyšší čistota než 95 %, raději vyšší čistota než 99 %.

Termín „operativně vázaný“, pokud se týká DNA segmentů znamená, že segmenty jsou uspořádány tak, aby jejich funkce byla v souladu se zamýšleným účelem, např. transkripce začíná v promotoru a pokračuje přes kódovací segment k terminátoru.

Termín „polynukleotid“ znamená jedno- nebo dvouřetězový polymer deoxyribonukleotidových nebo ribonukleotidových bází čtených od 5' k 3' konci. Polynukleotidy obsahují RNA a DNA a mohou být izolovány z přírodních zdrojů syntetizovaných *in vitro*, nebo připravených z kombinace přírodních a syntetických molekul.

Termín „komplementy polynukleotidových molekul“ označuje polynukleotidové molekuly, které mají komplementární sekvence bází a opačnou orientaci ve srovnání s referenční sekvencí. Například sekvence 5' ATGCACGGG 3' je komplementární k 5' CCCGTGCAT 3'.

Termín „degenerovaná nukleotidová sekvence“ označuje sekvenci nukleotidů, která obsahuje jeden nebo více degenerovaných kódů (jak lze srovnat s referenční polynukleotidovou molekulou, jež kóduje polypeptid). Degenerovaný kód obsahuje odlišné tripletty nukleotidů, ale kóduje stejný zbytek aminokyseliny (např. GAU a GAC tripletty oba kódují Asp).

Termín „promoter“ označuje část genu obsahující DNA sekvence, která zajišťuje vazbu RNA polymerázy a iniciaci transkripce. Promotorové sekvence se obvykle, ale ne vždy, nachází v 5' nekódujících úsecích genů.

Termín „sekreční signální sekvence“ označuje sekvenci DNA, která kóduje polypeptid („sekreční peptid“), jenž jako součást většího polypeptidu směřuje větší polypeptid skrz sekreční cestu buňky, v níž je syntetizován. Větší peptid je obvykle štěpen, aby se odstranil sekreční peptid během přenosu sekreční cestou.

Termín „receptor“ označuje s buňkou spojený protein, který se váže k bioaktivní molekule (např. ligand) a zprostředkovává účinek ligandu na buňku. Membránově vázané receptory jsou charakterizované multioblastní strukturou obsahující extracelulární oblast vázající ligand a intracelulární efektorovou oblast, která je typickou součástí v signální transdukcí. Vazbou ligandu na receptor dochází ke konformační změně v receptoru, která způsobí interakce mezi efektorovou oblastí a jinou (ými) molekulou (ami) v buňce. Tato interakce opět vede ke změně v metabolismu buňky. Metabolické děje, které jsou vázány na interakce receptor - ligand, zahrnují genové transkripce, fosforylaci, defosforylaci, zvyšuje se produkce cyklického AMP, mobilizace buněčného vápníku, mobilizace membránových lipidů, buněčná adheze (soudržnost), hydrolýza inositollipidů a hydrolýza fosfolipidů. Mnohé jaderné receptory též představují multioblastní strukturu, obsahují aminový konec, transaktivační oblast, oblast vázající DNA a oblast vázající ligand. Obecně receptory mohou být membránově vázané, cytosolické nebo jaderné; monomerní (např. receptor thyroïd stimulujícího hormonu, beta-adrenergický receptor) nebo multimerické (např. PDGF receptor, receptor růstového hormonu, IL - 3 receptor, GM - CSF receptor, G - CSF receptor, receptor erythropoetinu a IL - 6 receptor).

Termín „komplement/antikomplement pár“ označuje neidentické skupiny, které za vhodných podmínek tvoří nekovalentně spojené stabilní páry. Například biotin a avidin (nebo streptavidin) jsou prototypickými zástupci komplement/antikomplement páru. Jiné příkladné komplement/antikomplement páry zahrnují receptor/ligand páry, protilátka/antigen (nebo haptén nebo epitop) páry, antikódující/kódující polynukleotidové páry a podobně. Tam, kde je požadována následná disociace komplement/antikomplement páru, je komplement/antikomplement pár přednostně vázán afinitou $< 10^9 \text{ M}^{-1}$.

„Rozpusťný protein“ je protein polypeptid, který není vázán k buněčné membráně.

V preferovaných ztělesněních tohoto vynálezu budou izolované polynukleotidy hybridizovány za přísných podmínek na podobně velké úseky DNA SEQ ID č. 1 nebo sekvenci k ní komplementární. Obecně přísné podmínky jsou voleny tak, aby teplota byla asi o 5°C nižší, než bod tepelného tání (T_m = thermal melting point) specifické sekvence při definované iontové síle a pH. T_m je teplota (při definované iontové síle a pH), při níž 50 % cílové sekvence hybridizuje na dokonale padnoucí vzorek. Typické přísné podmínky jsou takové, při nichž je koncentrace soli přibližně 0,02 M nebo méně při pH 7 a teplotě alespoň asi 60°C . Jak bylo uvedeno dříve, izolované polynukleotidy tohoto vynálezu obsahují DNA a RNA. Metody izolace DNA a RNA jsou dobře známy v oboru. Celková RNA může být připravena za použití guanidín Hcl extrakce následované izolací centrifugací v CsCl gradientu [Chirgwin *et al.*, *Biochemistry* 18 : 52 - 94 (1979)]. Poly (A)⁺ RNA je připravena z celkové RNA za použití metody dle Aviv and Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1408 - 1412 (1972). Komplementární DNA (cDNA) je připravena z poly (A)⁺ RNA použitím známých metod. Polynukleotidy kódující 7 cyto 7 polypeptidy jsou pak identifikovány a izolovány například hybridizací nebo PCR.

Navíc polynukleotidy tohoto vynálezu mohou být syntetizovány použitím DNA syntetizátorů. Běžně je používána fosforamiditová metoda. Je-li pro aplikaci jako je syntéza genu nebo genových fragmentů požadována chemicky syntetizovaná dvouřetězová DNA, pak je každý komplementární řetězec tvořen odděleně. Příprava krátkých genů (60 až 80 bp) je technicky přímočará a může být provázena syntetizováním komplementárních řetězců a poté jejich spojením. Pro přípravu delších genů (> 300 bp) však musí být použita speciální strategie, protože schopnost párování každého cyklu během chemické syntézy DNA je zřídka 100 %. K překonání tohoto problému byly sestaveny syntetické geny

(dvouřetězové), a to v modulární formě z jednořetězových fragmentů o délce 20 až 100 nukleotidů. Kromě toho protein kódující sekvence, syntetické geny mohou být označeny koncovými sekvencemi, jež usnadňují inzerci do restrikčních endonukleázových míst klonovacího vektoru a mohly by být přidány jiné sekvence obsahující signály pro správnou iniciaci a terminaci transkripce a translace.

Viz Glick, Bernard R. and Jack J. Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA*, (ASM Press, Washington, D. C. 1994), Itakura, K. et al. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.* 53 : 323 - 356 (1984), and Climie, S. et al. Chemical synthesis of the thymidylate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 633 - 637 (1990).

Odborníkům v oboru bude zřejmé, že sekvence uvedené v SEQ ID č. 1 a 2 představují jednoduchou lidskou alelu. Existuje mnoho přirozeně se vyskytujících zralých N - koncových variant, které mají vedoucí sekvenci rozštěpenou na odlišných pozicích. Obsahují sekvence definované SEQ ID č. 14, 36, 37 a 38. Alelické varianty těchto sekvencí mohou být klonovány sondovací cDNA nebo poskytnuty genovými knihovnami od různých jednotlivců podle standartních procedur. Příklady variant lidského Z cyto 7 jsou reprezentovány polypeptidy SEQ ID č.: 15 - 25.

Myší Z cyto 7 cDNA a protein jsou uvedeny SEQ ID č. 11 a 12. Zralý Z cyto 7 polypeptid je definován SEQ ID č. 39 a 40.

Tento vynález dále též zajišťuje doplňkové proteiny a polynukleotidy z jiných druhů („species orthologs“). Zvláštní pozornost zasluhují Z cyto 7 polypeptidy z jiných druhů savců, zahrnujících myši, vepřové, ovčí, hovězí, psi, kočičí, koňské a ostatních primátů. „Species orthologs“ lidského Z cyto 7 proteinu mohou být klonovány za použití informací a sloučenin, které poskytuje tento vynález v kombinaci s konvenčními technikami klonování. Například cDNA může být klonována použitím mRNA získané z tkáně nebo buněčného typu, který exprimuje protein. Vhodné zdroje mRNA mohou být například identifikovány pomocí metody Northernova přenosu s nukleotidovými sondami uspořádanými ze sekvencí zde zveřejněných. Protein kódující cDNA může pak být izolována různými metodami jako sondováním s úplnou nebo částečnou lidskou nebo myší cDNA nebo s jednou nebo více degenerovanými

nukleotidovými sondami založenými na zde uvedených sekvencích. cDNA může být též klonována použitím polymerázové řetězové reakce nebo PCR (Mullis, U. S. Patent No. 4, 683, 202), použitím maticí uspořádaných ze zde uvedených sekvencí. V dalších metodách může být cDNA knihovna použita ke transformaci nebo transfekci hostitelských buněk a exprese příslušné cDNA může být detegována pomocí protilátky k příslušnému proteinu. Podobné techniky mohou být též použity k izolaci genových klonů. Jak je použit a nárokován jazyk „izolovaný polynukleotid, který kóduje polypeptid, uvedený polynukleotid je definován SEQ ID č. 2“ obsahuje všechny alelické varianty a „species orthologs“ polypeptidu SEQ ID č. 2.

Tento vynález zajišťuje též izolované proteinové polypeptidy, které jsou značně homologní vůči proteinovým polypeptidům SEQ ID č. 2 a jejich „species orthologs“. „Izolované“ znamená protein nebo polypeptid nacházející se v jiných podmínkách nežli jeho přírodním prostředí, tak jako oddělené z krve a zvířecí tkáně. Je dáána přednost tomu, aby izolovaný polypeptid byl v podstatě bez ostatních polypeptidů, zvláště jsou-li živočišného původu (zvířecího). Je preferováno zajistit polypeptidy ve vysoce purifikované formě, např. vyšší stupeň čistoty než 95 %, lépe vyšší stupeň čistoty než 99 %. Termín „značně homologní“ („substantially homologous“) je zde použit k označení polypeptidů, které mají 50 %, raději 60 %, nejlépe alespoň 80 % sekvence identické se sekvencí ukázanou v SEQ ID č. 2 nebo jejích „species orthologs“. Žádanější je, aby takové polypeptidy byly alespoň z 90 % identické, nejlépe z 95 % nebo více identické se SEQ ID č. 2 nebo jejích „species orthologs“. Procento identity sekvence se určuje konvenčními metodami. Viz například Altschul *et al.*, *Bull. Math. Bio.* 48: 603 - 616 (1986) a Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915 - 10919 (1992). Stručně řečeno, dvě sekvence aminokyselin jsou seřazeny za účelem optimalizace orientace žlábků, použitím „a gap opening penalty of 10, a gap extension penalty of 1 and the „blossom 62““ žlábková matrice dle Henikoffa a Henikoffa (tamtéž), jak je ukázáno v tabulce 2 (aminokyseliny jsou označeny standardními jednopísmenkovými kódy). Procento identity je pak vypočteno jako:

$$\frac{\text{celkový počet identických protějsků}}{\text{[délka delší sekvence plus počet jamek vnesených do delší sekvence za účelem seřazení dvou sekvencí]}} \times 100$$

Tabulka 2

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

Identita sekvencí polynukleotidových molekul je sestavena stejnými metodami užívajícími poměr uvedený výše.

Značně homologní proteiny a polypeptidy jsou charakterizovány tím, že mají jednu nebo více substitucí, delecí nebo adicí aminokyselin. Tyto změny jsou nejspíš méně přirozené, jsou to konzervativní substituce aminokyselin (viz tabulka 3) a jiné substituce, které významně neovlivňují konformaci nebo aktivitu proteinu nebo polypeptidu; malé delecce typicky od jedné do 30 aminokyselin a malá prodloužení aminových nebo karboxylových konců tak, jako methioninový zbytek aminového konce, malý vazebný peptid do asi 20 až 25 zbytků nebo malé prodloužení usnadňující purifikaci (afinitní přívěsek), tak jako polyhistidinový úsek, protein A [Nilsson *et al.*, *EMBO J.* 4 : 1075 (1985); Nilsson *et al.*, *Methods Enzymol.* 198 : 3, (1991)], glutathion S transferáza [Smith and Johnson, *Gene* 67 : 31, (1988)], nebo jiná antigenní epitop nebo vazebná doména. Viz obecně Ford *et al.*, *Protein Expression and Purification* 2: 95 - 107 (1991). DNA kódující afinitní přívěsky jsou dostupné od komerčních dodavatelů (např. Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Tabulka 3.Konzervativní substituce aminokyselin

Zásadité:	arginin lysin histidin
Kyselé:	kyselina glutamová kyselina asparagová
Polární:	glutamin asparagin
Hydrofóbní:	leucin izoleucin valin
Aromatické:	fenylalanin tryptofan tyrosin
Malé:	glycin alanin serin threonin methionin

Esenciální aminokyseliny přítomné v polypeptidech tohoto vynálezu mohou být identifikovány pomocí postupů známých v oboru tak jako místně cílená mutageneze nebo alaninem snímaná mutageneze (alanine - scanning mutagenesis) [Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081 - 1085 (1989); Bass *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4498 - 4502 (1991)]. V novějších technikách jsou uváděny jednoduché alaninové mutace u každého zbytku v molekule a výsledné mutované molekuly jsou testovány z hlediska biologické aktivity (např. ligand vázající a signální transdukce), aby byly identifikovány aminokyselinové zbytky, které jsou rozhodující pro aktivitu molekuly. Místa

interakce ligand - protein mohou být též určena analýzou krystalových struktur, které se určují takovými technikami, jako jsou nukleární magnetická rezonance, krystalografie nebo fotoafinitní značení. Viz například de Vos *et al.*, *Science* 255 : 306 - 312 (1992); Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224 : 899 - 904, 1992; Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 309 : 59 - 64 (1992). Identity esenciálních aminokyselin mohou být též vyvozeny z analýzy homologů s příbuznými proteiny.

Mnohočetné substituce aminokyselin mohou být provedeny a testovány pomocí známých metod mutagenese a třídění, tak jak je uvedeno v Reidhaar - Olson and Sauer, *Science* 241 : 53 - 57 (1988) nebo Bowie and Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 2152 - 2156 (1989). Krátce, tyto autoři uvádějí metody pro současné provedení náhodných mutací dvou nebo více pozic v polypeptidu, výběr funkčního polypeptidu a následné sekvencování mutagenizovaných polypeptidů za účelem určení spektra přípustných substitucí na každé pozici. Jiné metody, které mohou být použity, zahrnují fágové zobrazení, např. Lowman *et al.*, *Biochem.* 30 : 10832 - 10837 (1991); Ladner *et al.*, U. S. Patent No. 5, 223, 409; Huse, WIPO Publication WO 92/06204 a místně řízené mutagenese, Derbyshire *et al.*, *Gene* 46 : 145 (1986); Ner *et al.*, *DNA* 7 : 127 (1988).

Výše uvedené metody mutagenese mohou být kombinovány s vysoce účinnými metodami třídění („scriningu“) pro detekci klonovaných, mutagenizovaných proteinů v hostitelských buňkách. Nejvhodnější stanovení v tomto ohledu zahrnují zkoušky buněčné proliferace a níže uvedené zkoušky s vázaným ligandem, jehož podstatou je biosenzor. Mutagenizované molekuly DNA, které kódují aktivní proteiny nebo jejich části (např. ligand vážící fragmenty), mohou být znovu získány a rychle sekvencovány s použitím moderního zařízení. Tyto metody umožňují rychle určit důležitosti jednotlivých zbytků aminokyselin ve sledovaném polypeptidu a mohou být použity u polypeptidů neznámé struktury.

Použitím výše diskutovaných metod může běžný odborník v oboru připravit různé polypeptidy, které jsou značně homologní vůči SEQ ID č. 2 nebo jejím alelickým variantám a udržují si vlastnosti proteinu standardního typu. Jak je vyjádřeno a nárokováno v tomto jazyce „polypeptid definovaný SEQ ID č. 2“ zahrnuje všechny alelické varianty a „species orthologs“ polypeptidu.

Další vyjádření tohoto vynálezu zajišťuje pro peptid nebo polypeptid obsahujícím epitop nesoucí část polypeptidu tohoto vynálezu. Epitop této části polypeptidu je imunogenním nebo antigenním epitopem polypeptidu tohoto vynálezu. Oblast proteinu, k níž se protilátka může vázat, je definována jako „antigenní epitop“. Viz například Geysen, H. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 3998 - 4002 (1984).

Pokud se jedná o výběr peptidů nebo polypeptidů nesoucích antigenní epitop (např. který obsahuje oblast proteinové molekuly, na niž se může vázat protilátka), jsou v oboru dobře známé ty relativně krátké syntetické peptidy, které imitují část proteinové sekvence a jsou vhodné pro rutinní získávání antiséra, které reaguje s částečně imitovaným proteinem. Viz Sutcliffe, J. G. *et al. Science* 219 : 660 - 666 (1983). Peptidy schopné vyvolávat protein reaktivní sérum, jsou často zastoupeny v primární sekvenci proteinu, mohou být charakterizovány pomocí skupiny (skupinou) několika jednoduchých pravidel a nejsou vázány blízko imunodominantních oblastí neporušených proteinů (např. imunogenních epitopů) ani u aminových nebo karboxylových konců. Peptidy, které jsou příliš hydrofóbní a ty, které mají šest nebo méně zbytků, jsou obvykle neúčinné při vzbuzování protilátek, které se vážou na imitovaný protein, delší rozpustné peptidy, zvláště ty, které obsahují prolinové zbytky, jsou obvykle účinné.

Peptidy nesoucí antigenní epitop a polypeptidy tohoto vynálezu jsou proto užitečné pro imunizaci včetně monoklonálních protilátek, které se specificky vážou k polypeptidu tohoto vynálezu. Peptidy nesoucí antigenní epitop a polypeptidy tohoto vynálezu obsahují sekvence alespoň devíti, raději mezi 15 až asi 30 aminokyselin, v nichž jsou obsaženy sekvence aminokyselin polypeptidu tohoto vynálezu. Nicméně peptidy nebo polypeptidy obsahující delší část sekvence aminokyseliny tohoto vynálezu, která obsahuje od 30 do 50 aminokyselin nebo jakoukoli délku až do a včetně úplné aminokyselinové sekvence polypeptidu tohoto vynálezu, jsou také užitečné pro vzbuzování protilátek, které reagují s proteinem. Nejlépe, je-li aminokyselinová sekvence epitop nesoucího peptidu vybrána tak, aby zajistila podstatnou rozpustnost ve vodních rozpouštědlech (např. sekvencím obsahující relativně hydrofilní zbytky a hydrofóbní zbytky, je nejvhodnější se vyhnout); sekvence obsahující prolinové zbytky, jsou zvláště vhodné. Všechny polypeptidy uvedené v seznamu sekvencí obsahují antigenní epitopy za účelem použití podle tohoto vynálezu, nicméně zvláště upravené antigenní epitopy zahrnují peptidy definované SEQ ID č. 27 - 35.

Polynukleotidy, obecně cDNA sekvence uváděného vynálezu kódují výše popsané polypeptidy. Určitá cDNA sekvence, která kóduje polypeptid tohoto vynálezu, je složena ze série kodonů, každý aminokyselinový zbytek polypeptidu je kódován kodonem, přičemž každý kodon se skládá ze tří nukleotidů. Aminokyselinové zbytky jsou kódovány jejich příslušnými kodony, jak vidíme dále.

Alanin (Ala) je kódován GCA, GCC, GCG nebo GCT;
 Cystein (Cys) je kódován TGC nebo TGT;
 Kyselina asparagová (Asp) je kódována GAC nebo GAT;
 Kyselina glutamová (Glu) je kódována GAA nebo GAG;
 Fenyylalanin (Phe) je kódován TTC nebo TTT;
 Glycin (Gly) je kódován GGA, GGC, GGG nebo GGT;
 Histidin (His) je kódován CAC nebo CAT;
 Isoleucin (Ile) je kódován ATA, ATC nebo ATT;
 Lysin (Lys) je kódován AAA nebo AAG;
 Leucin (Leu) je kódován TTA, TTG, CTA, CTC, CTG nebo CTT;
 Methionin (Met) je kódován ATG;
 Asparagin (Asn) je kódován AAC nebo AAT;
 Prolin (Pro) je kódován CCA, CCC, CCG nebo CCT;
 Glutamin (Gln) je kódován CAA nebo CAG;
 Arginin (Arg) je kódován AGA, AGG, CGA, CGC, CGG nebo CGT;
 Serin (Ser) je kódován AGC, AGT, TCA, TCC, TCG nebo TCT;
 Threomin (Thr) je kódován ACA, ACC, ACG nebo ACT;
 Valin (Val) je kódován GTA, GTC, GTG nebo GTT;
 Tryptofan (Trp) je kódován TGG; a
 Tyrosin (Tyr) je kódován TAC nebo TAT.

Je třeba, aby bylo zřejmé, že podle tohoto vynálezu, kdy cDNA je nárokována jak je popsáno výše, se rozumí, že to, co je nárokováno, jsou oba smysly řetězce, tj. „sense strand“, „anti-sense strand“ (negativní řetězec a pozitivní řetězec) a DNA jako dvouřetězová, jež má oba řetězce „the sense“ a „anti-sense“ (negativní a pozitivní) spojené pomocí příslušných vodíkových vazeb. Je také nárokována mediátorová RNA (mRNA), která kóduje polypeptidy tohoto vynálezu a kterážto mRNA je kódována výše popsanou cDNA. Mediátorová RNA (mRNA) bude kódovat polypeptid za použití

stejných kodonů, které jsou definovány výše s tím rozdílem, že každý nukleotid thymín (T) je nahrazen nukleotidem uracilem (U).

Proteinové polypeptidy tohoto vynálezu obsahující proteiny v plné délce, fragmenty proteinů (např. receptor vázající fragmenty) a smíšené polypeptidy mohou být produkovány v hostitelských buňkách upravených pomocí metod genetického inženýrství za použití konvenčních technik tohoto oboru. Vhodné hostitelské buňky jsou takové typy buněk, které mohou být transformovány nebo transfektovány exogenní DNA a pěstovány v kultuře; zahrnují bakterie, plísňové buňky a kultivované vyšší eukaryotické buňky. Eukaryotické buňky, zejména kultivované buňky mnohobuněčných organismů, jsou zvláště vhodné. Techniky pro manipulaci klonovaných DNA molekul a vkládání exogenní DNA do různých hostitelských buněk jsou zveřejněny v Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2nd ed.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), a Ausubel *et al.*, *tamtéž*.

Obecně, sekvence DNA kódující Z cyto 7 polypeptid, je operativně vázána k ostatním genetickým prvkům, které jsou třeba pro její expresi, obecně obsahující transkripční promotor a terminátor s včleněným expresivním vektorem. Vektor by měl obsahovat též jeden nebo více volitelných markerů a jeden nebo více počátků replikace, ačkoli odborníkům v oboru je zřejmé, že v určitých systémech volitelné markery mohou být opatřeny na oddělených vektorech a replikace exogenní DNA může být vedena integrací do genomu hostitelské buňky. Výběr promotorů, terminátorů, volitelných markerů, vektorů a dalších prvků je záležitostí rutinní úpravy na úrovni běžných znalostí v oboru. Mnoho takových prvků je popsáno v literatuře a jsou dostupné prostřednictvím komerčních dodavatelů.

Směrování Z cyto 7 polypeptidu do sekrečního traktu hostitelské buňky, sekreční signální sekvence (též známá jako vedoucí sekvence, prepro sekvence nebo pre sekvence), je zajištěna v expresivním vektoru. Sekreční signální sekvence může být tím proteinem nebo může být odvozena z jiného sekretovaného proteinu (např. t-PA) nebo syntetizována *de novo*. Sekreční signální sekvence je připojena k Z cyto 7 DNA sekvenci ve správném čtecím rámci. Sekreční signální sekvence jsou obvykle umístěny 5' k DNA sekvenci kódující uvedený polypeptid, ačkoli určité signální sekvence mohou být umístěny kdekoli v uvedené DNA sekvenci (viz např. Welch *et al.*, U. S. Patent No. 5, 037, 743; Holland *et al.*, U. S. Patent No. 5, 143, 830).

Kultivované savčí buňky jsou nejvhodnějšími hostiteli v prezentovaném vynálezu. Metody pro vpravení exogenní DNA do savčích hostitelských buněk zahrnují fosforečnanem vápenatým zprostředkovaná transfekce, Wigler *et al.*, *Cell* 14 : 725 (1978); Corsaro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7 : 603 (1981); Graham and Van der Eb, *Virology* 52 : 456 (1973), electroporation, Neumann *et al.*, *EMBO J.* 1 : 841 - 845 (1982), DEAE - dextran mediated transfection, Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987), a lipozomy zprostředkovaná transfekce (Hawley - Nelson *et al.*, *Focus* 15 : 73 (1993); Ciccarone *et al.*, *Focus* 15 : 80 (1993). Příprava rekombinantních polypeptidů v kultivovaných savčích buňkách je uvedena například v Levinson *et al.*, U. S. Patent No. 4, 713, 339; Hagen *et al.*, U. S. Patent No. 4, 784, 950; Palmiter *et al.*, U. S. Patent No. 4, 579, 821; a Ringold, U. S. Patent No. 4, 656, 134. Vhodné kultivované savčí buňky zahrnují COS - 1 (ATCC No. CRL 1650), COS - 7 (ATCC No. CRL 1651), BHK (ATCC No. CRL 1632), BHK 570 (ATCC No. CRL 10314), 293 [ATCC No. CRL 1573; Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36 : 59 - 72 (1977)] a buněčné linie vaječniku čínské křečka (např. CHO - K1; ATCC No. CCL 61). Další vhodné buněčné linie jsou známy v oboru a dostupné z veřejných depozitářů jako je the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Obecně jsou preferovány silné transkripční promotory, tak jako promotory z SV - 40 nebo cytomegalovirus. Viz např. U. S. Patent No. 4, 956, 288. Jiné vhodné promotory obsahují ty z metalothioneinových genů (U. S. Patent Nos. 4, 579, 821 and 4, 601, 978) a adenoviry hlavní pozdní promotor.

Výběr léku je obvykle použit k výběru kultivovaných savčích buněk, do kterých je vložena cizí DNA. Takové buňky jsou obvykle nazývány „transfektanty“. Buňky, které byly kultivovány v přítomnosti selektivního činidla a jsou schopny předávat řečené geny k jejich progenům, se nazývají „stabilní transfektanty“. Nejvhodnějším selektivním markerem je gen kódující rezistence k antibiotiku neomycin. Selekcce je prováděna v přítomnosti léků typu neomycinu, jako je G - 418 nebo podobné. Selekcční systémy mohou být též použity ke zvýšení expresivní hladiny uvedených genů, tento proces se nazývá „amplifikace“. Amplifikace je prováděna s kultivovanými transfektanty v přítomnosti nízké hladiny selektivního činidla a pak zvýšením množství selektivního činidla, aby se vybraly buňky, které produkují vysoké hladiny produktů vložených genů. Vhodným amplifikačním selektivním markerem je dihydrofolát reduktáza, která způsobuje rezistenci vůči methotrexátu. Mohou být použity i geny rezistentní vůči jiným léčivům (např. hydromycinová rezistence, multiléčivová rezistence, puromycin - acetyltransferáza).

Jako hostitelé mohou být použity i jiné vyšší eukaryotické buňky zahrnující buňky hmyzu, rostlinné buňky a ptačí buňky. Transformace buněk hmyzu a produkce cizích polypeptidů v nich je uvedena v Guarino *et al.*, U. S. Patent No. 5, 162, 222; Bang *et al.*, U. S. Patent No. 4, 775, 624; a WIPO publikace WO 94/06463. Užití *agrobacterium rhizogenes* jako vektoru pro expresivní geny v rostlinných buňkách je zrekapitulováno v Sinkar *et al.*, *J. Biosci. (Bangalore)* 11 : 47 - 58 (1987).

Plisňové buňky včetně kvasničných buněk, zejména buňky rodu *Saccharomyces* mohou být též použity v tomto vynálezu jak pro produkci proteinových fragmentů, tak i pro fuze polypeptidů. Metody pro transformaci buněk kvasinek exogenní DNA a produkce rekombinantních polypeptidů z nich jsou uvedeny například v Kawasaki, U. S. Patent No. 4, 599, 311; Kawasaki *et al.*, U. S. Patent No. 4, 931, 373; Brake, U. S. Patent No. 4, 870, 008; Welch *et al.*, U. S. Patent No. 5, 037, 743; a Murray *et al.*, U. S. Patent No. 4, 845, 075. Transformované buňky jsou vybrány podle fenotypu určeného pomocí selektivního markeru, obvykle lékové rezistence nebo schopnosti růst v nepřítomnosti určité živiny (např. leucinu). Vhodným vektorovým systémem pro použití v kvasinkách je POT 1 vektorový systém uvedený v Kawasaki *et al.*, U. S. Patent No. 4, 931, 373, který umožňuje, aby transformované buňky byly vybrány podle růstu na mediu obsahujícím glukózu. Vhodné promotory a terminátory pro použití v kvasinkách jsou ze skupiny genů glykolytických enzymů (viz např. Kawasaki, U. S. Patent No. 4, 599, 311; Kingsman *et al.*, U. S. Patent No. 4, 615, 974; and Bitter, U. S. Patent No. 4, 977, 092) a genů alkoholdehydrogenázy. Viz též U. S. Patents Nos. 4, 990, 446; 5, 139, 936 and 4, 661, 454. Transformační systémy pro jiné kvasinky zahrnující *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* a *Candida maltosa* jsou známy v oboru. Viz například Gleeson *et al.*, *J. Gen. Microbiol.* 132 : 3459 - 3465 (1986) a Cregg, U. S. Patent No. 4, 882, 279. Buňky aspergillu mohou být využity podle metod uvedených v Mc Knight *et al.*, U. S. Patent No. 4, 935, 349. Metody transformace *Acremonium chrysogenum* jsou uvedeny v Sumino *et al.*, U. S. Patent No. 5, 162, 228. Metody transformace *Neurospora* jsou uvedeny v Lambowitz, U. S. Patent No. 4, 486, 533.

Transformované nebo transfektované hostitelské buňky jsou kultivovány podle běžných postupů v kultivačním médiu obsahujícím živiny a jiné složky potřebné pro růst vybraných hostitelských buněk. V oboru jsou známy různé druhy vhodných médií zahrnující definovaná i komplexní média, která obvykle obsahují zdroj uhlíku, zdroj dusíku, esenciální aminokyseliny, vitamíny a minerály. Média mohou též obsahovat takové složky, jako jsou růstové faktory nebo serum, dle požadavků. Růstové médium bude obvykle vybíráno pro buňky obsahující exogenně přidanou DNA, například léková selekce nebo nedostatek některé nezbytné živiny, která je doplněna selektivním markerem neseným na expresivním vektoru nebo ko-transfektovaná do hostitelské buňky.

Z hlediska jednoho aspektu uvedeného vynálezu je produkován buňkou nový protein a tato buňka je využita pro výběr receptoru nebo receptorů pro protein zahrnující přirozený receptor stejně jako agonisty a antagonisty přirozeného ligandu.

Exprimované rekombinantní polypeptidy (nebo chimerické polypeptidy) mohou být purifikovány použitím frakcionace a/nebo konvenční purifikační metody a média. Pro frakcionaci vzorků může být použito srážení síranem amonným a kyselá nebo chaotropní extrakce. Purifikační kroky mohou například obsahovat hydroxiapatit, vylučování na principu velikosti, chromatografické metody jako FPLC a vysoko účinnou kapalinovou chromatografii v obrácené fázi (reverse - phase high performance liquid chromatography). Vhodná média měniče aniontů zahrnují derivatizované dextrany, agarosu, celulózu, polyakrylamid, speciální kysličníky křemičité a podobně. PEI, DEAE, QAE a Q deriváty jsou nejvhodnější, zvláště pak jsou vhodné s DEAE Fast - Flow Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). Příklady chromatografických médií zahrnují ta média derivatizovaná fenylovými, butylovými nebo oktylovými skupinami, jako jsou Phenyl - Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl - Sepharose (Pharmacia) a podobně; nebo polyakrylové pryskyřice, jako je Amberchrom CG 71 (Toso Haas) a podobně. Vhodné pevné nosiče zahrnují skleněné kuličky, pryskyřice založené na křemičitanech, celulózové pryskyřice, agarozové kuličky, kuličky ze zesítené agarózy, polystyrenové kuličky, zesítené polyakrylamidové pryskyřice a podobně, které jsou nerozpustné za podmínek, při nichž mají být použity. Tyto nosiče mohou být (upraveny) modifikovány reaktivními skupinami, což umožňuje navázání proteinů pomocí aminových

skupin, karboxylových skupin, merkaptových skupin (-SH), hydroxylových a/nebo uhlovodíkových částí. Příklady párování chemikálií zahrnují bromkyanovou aktivaci, N - hydroxysukcinimidovou aktivaci, epoxidovou aktivaci, sulphydrylovou aktivaci, hydrazidovou aktivaci a karboxylové a aminové deriváty pro karboimidové párovací chemikálie. Tato a jiná pevná média jsou dobře známá a používána v oboru a jsou dostupná u komerčních dodavatelů. Metody pro vázání receptorů polypeptidů na nosná média jsou též dobře známé v oboru. Výběr zvláštních metod je záležitostí rutinního návrhu a je určován částečně podle vlastností vybraného nosiče. Viz například *Affinity Chromatography: Principles & Methods* (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988).

Polypeptidy uvedeného vynálezu mohou být izolovány využitím jejich vlastností. Například absorpční chromatografie immobilizovaných kovových iontů (immobilized metal ion adsorption chromatography = IMAC) může být použita pro purifikaci problémů s vysokým obsahem histidinu. Krátce, gel je nejprve „naplněn“ dvojmocnými kovovými ionty, aby se vytvořil chelat [E. Sulkowski, *Trends in Biochem.* 3 : 1 - 7 (1985)].

Proteiny s vysokým obsahem histidinu budou na tuto matici absorbovány s rozdílnými afinitami, závisujícími na použitých kovových iontech a budou chovány pomocí kompetitivní eluce, snižováním pH nebo použitím silných chelatačních činidel. Jiné metody purifikace zahrnují purifikaci glykozilovaných proteinů pomocí lektinové afinitní chromatografie a iontoměničové chromatografie [*Methods in Enzymol.*, Vol. 182 : 529 - 39], „Guide to Protein Purification“, M. Deutscher, (ed.), (Acad. Press, San Diego, 1990). Případně může být provedena fúze řečeného polypeptidu a afinitního přívěsku (např. polyhistidin, maltosu vázající protein, imunoglobulin doména) pro usnadnění purifikace. Za účelem usnadnění purifikace vyloučeného receptorového polypeptidu může být též provedeno prodloužení aminového nebo karboxylového konce, kdy je použit polyhistidinový přívěsek, substance P, FLAG[®] peptid [Hopp *et al.*, *Bio/Technology* 6 : 1204 - 1210 (1988)]; dostupné od Eastman Kodak Co., New Haven, CT), Glu - Glu afinitní přívěsek [Grussenmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 7952 - 4 (1985)] nebo může být k Z cyto 7 fúzován jiný polypeptid nebo protein, pro který je protilátka nebo jiné specifické vázající činidlo dostupné, což přispívá k lepší purifikaci.

Analýzou northernového přenosu expresí Z cyto 7 se prokázalo, že Z cyto 7 je exprimován zejména v míše. Analýzou míchy *in situ* se prokázalo, že tato exprese je lokalizována v neuronech a dorzálních výběžcích ganglia. Z toho důvodu může Z cyto 7 hrát roli v udržování míchy zahrnující buď gliální buňky nebo neurony. To znamená, že Z cyto 7 může být použit k léčení různých neurodegenerativních chorob, jako je amyotrofická laterální skleróza (ALS) nebo dymyelinizační choroby včetně roztroušené sklerózy. Z cyto 7 může být též použit k léčení smyslových neuropatií. Tkáňová specifita Z cyto 7 exprese naznačuje, že Z cyto 7 může být růstovým a/nebo udržovacím faktorem v míše.

Lokalizace genu Z cyto 7 na chromozomu 5 ukazuje, že Z cyto 7 je cytokinin, který může být k modulování aktivit buněk imunitního systému. Z cyto 7 může být též použit jako chemoreaktant neutrofilů v páteři. Mohl by být užitečný jako antiinfektivum při infekcích páteře. Mohl by též pomáhat při regulaci jiných cytokininů v míše. Z cyto 7 může být též podáván při léčení periferních neuropatií, jako je „Charcot - Marie - Tooth“ (CMT) choroba, která je lokalizovaná ve stejné chromosomální oblasti 5q jako Z cyto 7.

Skutečnost, že Z cyto 7 potlačuje růst BAF - 3 a TF - I buněk, jak je ukázáno v příkladech 11 a 12 níže, naznačuje, že Z cyto 7 může být použit k léčení autoimunitních chorob a eventuálně takových nádorů, jako jsou leukemie.

Tento vynález též zajišťuje též reagentie, které naleznou využití v diagnostických aplikacích. Například Z cyto 7 gen je silně exprimován v míše. Sonda obsahující Z cyto 7 DNA nebo RNA nebo jejich subsekvence může být použita k určení, zda je gen Z cyto 7 přítomen na chromozomu 5 nebo zda došlo k mutaci.

Uvedený vynález zajišťuje též reagentie s význačnou terapeutickou hodnotou. Z cyto 7 polypeptid (přírodně se vyskytující či rekombinantní), jeho fragmenty, protilátky a k nim anti idiotypické protilátky, spolu se sloučeninami, u nichž bylo zjištěno, že mají vazebnou afinitu k Z cyto 7 polypeptidu, mohou být využity při léčení podmínek spojených s abnormální fyziologií nebo vývojem včetně abnormální proliferace, např. nádorové podmínky nebo degenerativní podmínky. Například choroby nebo poruchy spojené s

abnormální expresi nebo abnormální signalizaci Z cyto 7 polypeptidu by mohly být pravděpodobným terčem pro agonistu nebo antagonistu Z cyto 7 polypeptidu.

Především může být Z cyto 7 použit k léčení zánětů. Zánět je výsledkem imunitní odpovědi na infekci nebo jako autoimunitní odpověď na vlastní antigen.

Léčebné dávky by měly být odměřeny tak, aby se optimalizovala bezpečnost a účinnost. Metody pro podávání zahrnují intravenózní, peritoneální, intramuskulární, subdurální, do míšní tekutiny nebo transdermální podávání.

Farmaceuticky přijatelné nosiče budou obsahovat vodu, fyziologický roztok pufrů; bude jmenováno několik. Rozmezí dávek se bude obvykle pohybovat od 0,1 μg do 1 mg na kilogram tělesné váhy za den. Nejlépe 1 μg až 100 μg za den. Nicméně lékař s běžnou znalostí v oboru může určit dle potřeby dávku vyšší nebo nižší. Úplnou diskuzi k složení léku a rozmezí dávkování lze nalézt v *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th Ed., (Mack Publishing Co., Easton, Penn., 1990) a *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 9th Ed. (Pergamon Press 1996).

Použití Z cyto 7 k povzbuzení růstu kosti a chrupavky

Bylo zjištěno, že Z cyto 7 stimuluje proliferaci chondrocytů i osteoblastů, jak ukazují níže uvedené příklady 7 a 9. Navíc Z cyto 7 stimuluje též ustálený stav hladiny glykosaminoglykanu přítomného v kulturách chondrocytů, jak ukazuje příklad 8. Tudiž Z cyto 7 může být použit ke stimulaci růstu kosti a chrupavky v mnoha různých terapeutických uspořádáních.

Z cyto 7 může být implantován do těla savců tak, že Z cyto 7 je v kontaktu s osteoblasty tak, že dochází k proliferaci osteoblastů a je stimulován

růst kosti. Například Z cyto 7 může být umístěn do matrice [s nebo bez kostního morfogenního proteinu (BMP)]. BMP (bone morphogenic protein) indukuje migraci mezenchymálních prekursorů osteoblastů k místu a následně indukuje diferenciaci mezenchymálních buněk do osteoblastu. Z cyto 7 pak dále stimuluje proliferaci osteoblastů. Vhodná matrice je tvořena částicemi porézního materiálu. Póry musí být takových rozměrů, aby dovolily progenitorovou buněčnou migraci a následnou diferenciaci a proliferaci. Ideální velikost částice by měla být v rozmezí 70 - 850 nm, nejlépe 150 - 420 nm. Matrice obsahující Z cyto 7 může být formována do tvaru obklopujícího kostní defekt. Příklady matricových materiálů jsou částicové, demineralizované, guanidinem extrahované zvláštní druhy kosti. Jiné potenciálně použitelné materiály pro matrici zahrnují kolagen, homopolymery a kopolymery kyseliny, glykolové kyseliny a kyseliny mléčné, hydroxiapatit, trikalciumfosfát a jiné kalciumfosfáty. Z cyto 7 může být vpraven do matrice v koncentraci dostatečné pro podporu proliferace osteoblastů, nejraději v koncentraci alespoň 1 µg/ml matrice. Roztok Z cyto 7 může být též přímo očkovan do místa fraktury nebo defektu kosti včetně oblastní degenerace kosti za účelem urychlení uzdravení fraktury nebo defektu příslušného místa. Příklady BMPů a použití matricí pro výrobu jsou uvedeny v PCT application publication number WO 92/07073, publication No. WO 91/05802, U. S. Patent No. 5, 645, 591 a U. S. Patent No. 5, 108, 753.

Z cyto 7 může být dále použit k léčení osteoporózy podáváním terapeuticky účinného množství pacientům. Nejvhodnější dávka by měla být 1 µg Z cyto 7 na kilogram tělesné váhy za den.

Jak bylo popsáno výše, bylo zjištěno, že Z cyto 7 může být použit k povzbuzení produkce chrupavky díky své schopnosti stimulace proliferace chondrocytů. Z cyto 7 může být vstříknut přímo do místa, kde má dojít k růstu chrupavky. Například Z cyto 7 může být vstříknut přímo do kloubů, které byly postiženy osteoartritidou nebo jiným poškozením kloubů, při kterém byla chrupavka silně opotřebována. Příkladem případu, kdy je třeba, aby dorostla nová chrupavka, jsou ramena a kolena poraněných atletů.

Chrupavka může být též vypěstována z chondrocytů odebraných individuu, tyto chondrocyty jsou kultivovány s Z cyto 7 tak, že proliferují a je možno chondrocyty reimplantovat zpět individuu tam, kde je třeba, aby byla produkována chrupavka.

Z cyto 7 může být též použit ke stimulaci regenerace dentinu nebo kosti, došlo-li k jejich úbytku v závislosti na periodontální chorobě. K tomuto účelu by mělo být okolí tkáně důrazně vyčistěno, podán roztok Z cyto 7, nejlépe injekčně, přímo do místa, které vyžaduje regeneraci dentinu.

Protilátky k Z cyto 7 polypeptidu mohou být purifikovány a pak podávány pacientovi. Tyto reagentie mohou být pro terapeutické použití kombinovány přídavnými aktivními nebo inertními přísadami, např. ve farmaceuticky přijatelných nosičích nebo rozpouštědlech a fyziologicky neškodnými stabilizátory a pomocnými látkami. Tyto kombinace mohou být sterilně filtrovány a uloženy do dávkové formy jako při lyofilizaci dávkovacích lahvičkách nebo uchovávány ve stabilizovaných vodních přípravcích. Tento vynález též uvažuje o použití protilátek, jejich vazebních fragmentů nebo jednořetězcových protilátek, protilátek zahrnujících formy, které nejsou vazebním komplementem.

Množství reagentií nezbytné pro účinné léčení závisí na mnoha rozdílných faktorech zahrnujících způsoby podávání, cílovém místě, psychologickém stavu pacienta a jiných podávaných medikacích. Tudiž používané dávky musí být odměřeny tak, aby se optimalizoval soulad bezpečnosti a účinnosti. Typické dávkování používané *in vitro* může být užitečným vodítkem pro množství užitečná při podávání těchto reagentií *in vivo*. Testování účinných dávek pro léčení konkrétních poruch na zvířatech zajišťuje následnou předpokládanou indikaci dávky u lidí. Metody pro podávání zahrnují orální, intravenózní, peritoneální, intramuskulární nebo transdermální podávání. Farmaceuticky přijatelné nosiče zahrnují vodu, fyziologický roztok, pufrý; bude jmenováno několik. Očekávaný rozsah dávek by měl být obvykle od 1 µg do 1 000 µg na kilogram tělesné váhy za den. Nicméně, dávky mohou být vyšší nebo nižší podle toho, jak určí ošetřující lékař s běžnou znalostí oboru. Pro úplnou diskuzi ke složení a rozmezí dávkování léku viz *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th Ed., (Mack Publishing Co., Easton, Penn., 1990), a *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 9th Ed. (Pergamon Press 1996).

Léčebné použití založené na nukleových kyselinách

Je-li savec mutantem nebo postrádá Z cyto 7 gen, může být složen Z cyto 7 gen do savčích buněk. V jednom z uspořádání je gen kódující Z cyto 7 polypeptid vložen *in vivo* do virového vektoru. Takové vektory obsahují zeslabené nebo defektní DNA viry, jako jsou Herpes simplex virus (HSV), papillomavirus, virus Epstein Barrové (EBV), adenovirus, adenoasociovaný virus (AAV) a podobně. Defektní viry, kterým úplně nebo téměř úplně chybí virové geny, jsou preferovány. Defektní virus není infekční, vloží-li se do buňky. Použití defektních virových vektorů dovozuje podávání k buňkám do specificky lokalizovaných oblastí bez nebezpečí, že by vektor mohl infikovat jiné buňky. Příklady konkrétních vektorů zahrnují, ale nelimitují, defektní vektor defektního herpes viru 1 (HSV 1) [Kaplitz *et al.*, *Molec. Cell. Neurosci.*, 2 : 320 - 330 (1991)], vektor oslabeného adenoviru, tak jak je vektor popsán v Stratford - Perricaudet *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 90 : 626 - 630 (1992) a vektor defektního adenoasociovaného viru [Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 61 : 3096 - 3101 (1987); Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 63 : 3822 - 3828 (1989)].

V jiném uspořádání může být gen vložen do retrovirového vektoru, např. jak je popsáno v Anderson *et al.*, U. S. Patent No. 5, 399, 346; Mann *et al.*, *Cell*, 33 : 153 (1983); Temin *et al.*, U. S. Patent No. 4, 650, 764; Temin *et al.*, U. S. Patent No. 4, 980, 289; Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62 : 1120 (1988); Temin *et al.*, U. S. Patent No. 5, 124, 263; International Patent Publication No. WO 95/07358, published March 16, 1995 by Dougherty *et al.*; a *Blood*, 82 : 845 (1993).

Vektor může být též vložen pomocí lipofekce *in vivo* s použitím lipozomů. K přípravě lipozomů pro *in vivo* transfekci genu kódujícího marker mohou být použity syntetické kationtové lipidy [Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 7413 - 7417 (1987); viz Mackey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 8027 - 8031 (1988)]. Použití lipofekce k vkládání exogenních genů do specifických orgánů *in vivo* má určité parciální výhody. Molekulární cílení liposomů ke specifickým buňkám představuje jednu z oblastí (využití) užitku. Je zřejmé, že směřování transfekce ke konkrétním buňkám představuje jednu oblast, užitku. Je zřejmé, že směřování transfekce ke konkrétním typům buněk by bylo zvláště výhodné ve tkáni s buněčnou heterogenitou, jako jsou pankreas, játra, ledviny a mozek. Lipidy mohou být chemicky spojovány s jinými

molekulami cílení. Cílené peptidy, např. hormony nebo neurotransmitery a proteiny jako protilátky nebo nepeptidové molekuly mohou být chemicky připojeny k lipozómům.

Je možné vyjmout buňky z těla a vložit do nich vektor jako je holý DNA plazmid a pak reimplantovat takto transformované buňky do těla. Holý DNA vektor pro genovou terapii může být vložen do požadované hostitelské buňky pomocí metod dobře známých v oboru, např. transfekce, elektroporace, mikroinjekce, transdukce, buněčná fúze, DEAE dextran, kalciumfosfátová precipitace, použitím genového díla nebo použitím DNA vektorového transportéru [viz např. Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267 : 963 - 967 (1992); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263 : 14621 - 14624 (1988)].

Z cyto 7 polypeptidy mohou být též použity k přípravě protilátek, které se specificky vážou na Z cyto 7 polypeptidy. Tyto protilátky mohou pak být použity k přípravě antiidiotypických protilátek. Termín „protilátky“, jak je zde použit, zahrnuje polyklonální protilátky, monoklonální protilátky, jejich antigen - vázající fragmenty, jako jsou F (ab')₂ a Fab fragmenty a podobné protilátky připravené metodami genetického inženýrství. Protilátky jsou definovány tak, aby při jejich specifické vazbě na Z cyto 7 polypeptid byla K_d větší nebo rovná 10⁷/M. Afinita monoklonální protilátky může být snadno určena jednou z metod běžných v oboru (viz například Scatchard, *ibid.*).

Metody přípravy polyklonálních a monoklonálních protilátek jsou dobře známy v oboru (viz například Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Second Edition) (Cold Spring Harbor, NY, 1989); a Hurrell, J. G. R., Ed., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications* (CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982). Jak je zřejmé pracovníku s běžnými znalostmi v oboru, polyklonální protilátky mohou být vytvářeny různých teplokrevných živočichů, jako jsou koně, krávy, kozy, ovce, psi, kuřata, králci, myši a krysy. Imunogenicitu Z cyto 7 polypeptidu lze zvýšit pomocí použití adjuvants, jako je Freundsovo úplné nebo neúplné adjuvants. K detekci protilátek, které se specificky vážou na Z cyto 7 polypeptidy, mohou být využity rozličné zkoušky známy pracovníkům v oboru. Příklady takových zkoušek jsou detailně popsány v *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (Eds.), (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Reprezentativní příklady takových zkoušek obsahují: souběžné imunoelektroforézy, radioimunologické zkoušky, radioimunoprecipitace, zkoušky s enzymem vázaným na imunosorbentu (enzyme - linked immunosorbent assays = ELISA),

metody bodového přenosu (dot blot assays), zkoušky inhibice nebo kompetice a sendvičová stanovení.

Jak by mělo být zřejmé pracovníkům s běžnou znalostí v oboru, polyklonální polyklonální protilátky mohou být vytvořeny očkováním různých teplokrevných zvířat, jako jsou koně, krávy, kozy, ovce, psi, kuřata, králíci, myši, křečci, guinejská prasata a krysy, Z cyto 7 polypeptidem nebo jeho fragmenty. Imunogenita Z cyto 7 polypeptidu může být zvýšena použitím adjuvants, jako je alum (aluminum hydroxid) nebo Freundsova kompletního nebo nekompletního adjuvants. Polypeptidy užitečné pro imunizaci zahrnují též fúzované polypeptidy jako jsou fúze Z cyto 7 nebo jeho částí s imunoglobulinovým polypeptidem nebo s proteinem vázajícím maltózu. Polypeptidový imunogen může být použit v plné délce molekuly nebo její části. Je-li část polypeptidu „hapténového typu“, pak může být část výhodně spojena nebo vázána na makromolekulární nosič (tak jako porézní přílipkový hemocyanin (KLH), hovězí sérový albumin (BSA) nebo tetanový toxoid) vhodný při imunizaci.

Termín „protilátky“, jak je zde použit, zahrnuje polyklonální protilátky, afinitně purifikované polyklonální protilátky, monoklonální protilátky a antigen vázající fragmenty jako $F(ab')_2$ a Fab proteolytické fragmenty. Metodami genetického inženýrství připravené intaktní protilátky nebo fragmenty jako jsou chimerické protilátky, Fv fragmenty, jednořetězcové protilátky a podobné stejně jako syntetické antigen vázající peptidy a polypeptidy jsou též obsaženy. Nehumánní protilátky mohou být humanizovány roubováním nehumánních CDR na humánní základní strukturní a konstantní úseky nebo včleněním úplných nehumánních variabilních domén [případně jejich potažení („cloaking“), tzv. „human - like“ povrchem při odstranění přechínavajících zbytků, kde výsledkem je maskovaná („veneered“) protilátka]. V některých případech mohou humanizované protilátky obsahovat nehumánní zbytky uvnitř variabilních úseků základních struktur domén, vhodnosti pro zvýšení vazebných charakteristik. Prostřednictvím humanizovaných protilátek lze zvýšit biologický poločas přeměny, tím snížena možnost nepříznivých imunitních reakcí při podávání lidem.

Jiné techniky pro tvoření nebo výběr protilátek zde užitečné zahrnují vystavení lymfocytů vlivu Z cyto 7 proteinu nebo peptidu *in vitro* a výběr protilátky z fágů nebo podobných vektorů na display genové banky (například pomocí imobilizovaného nebo značeného Z cyto 7 proteinu nebo peptidu).

Geny kódující polypeptidy, které mají potenciální Z cyto 7 polypeptid vázající domény mohou být získány screeningem v bance náhodných peptidů zobrazených na fágu („phage display“) nebo na bakterii jako je *E. coli*. Nukleotidové sekvence kódující polypeptidy mohou být získány mnoha způsoby, tak jako pomocí náhodné mutageneze a náhodné polynukleotidové syntézy. Tyto náhodné peptid zobrazující knihovny mohou být využity pro třídění (screening) peptidů, které interagují se známými cíly, kterými může být protein nebo polypeptid, tak jako ligand a nebo receptor, biologická nebo syntetická makromolekula, nebo organické či anorganické látky. Techniky pro tvorbu a třídění (screening) takových zobrazovacích knihoven náhodných peptidů jsou dobře známé v oboru (Ladner *et al.*, US Patent NO. 5, 223, 409; Ladner *et al.*, US Patent NO. 4, 946, 778; Ladner *et al.*, US Patent NO. 5, 403, 484 a Ladner *et al.*, US Patent NO. 5, 571, 698) a zobrazovací banky náhodných peptidů a soupravy pro screening takových knihoven jsou komerčně dostupné například od Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) a Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Zobrazovací knihovny náhodných peptidů mohou být tříděny pomocí zde uvedených Z cyto 7 sekvencí za účelem identifikace proteinů, které se vážou na Z cyto 7. Tyto „vazebné proteiny“, které interagují s Z cyto 7 polypeptidy mohou být použity pro značkovací buňky; pro izolování homologních polypeptidů pomocí afinitní purifikace, mohou být přímo nebo nepřímo navázány na léky, toxiny, radionuklidy a podobné. Tyto vazebné proteiny mohou být též použity v analytických metodách tak jako pro screening expresivních knihoven a neutralizační aktivity. Vazebné proteiny mohou být použity pro diagnostické zkoušky, pro určení cirkulujících hladin polypeptidů, pro detekci a kvantitaci rozpustných polypeptidů jako markerů skrytých patologií nebo nemocí. Tyto vazebné proteiny se mohou též účastnit jako Z cyto 7 „antagonisté“ k blokování Z cyto 7 vázající a signální transdukce *in vitro* a *in vivo*.

Protilátky mohou být též tvořeny genovou terapií. Zvířeti je podávána DNA nebo RNA, která kóduje Z cyto 7 nebo jeho imunogenní fragment tak, že buňky zvířat jsou transfektovány nukleovou kyselinou a exprimuje se protein, který v důsledku toho vyvolává imunogenní odpověď. Protilátky, které jsou pak zvířetem produkovány, jsou izolovány ve formě polyklonálních nebo monoklonálních protilátek.

Protilátky k Z cyto 7 mohou být použity pro značkovací buňky, které exprimují protein, pro afinitní purifikaci, v diagnostických zkouškách při určení cirkulačních hladin rozpustných proteinových polypeptidů a jako antagonisty k blokování ligand vázající a signální transdukce *in vitro* a *in vivo*.

Radiační hybridní mapování je technika genetiky somatických buněk vyvinutá pro konstrukci styčných map savčích chromozomů s vysokým rozlišením [Cox *et al.*, *Science* 250 : 245 - 250 (1990)]. Částečná nebo úplná znalost sekvence genů umožňuje sestavení PCR primerů vhodných pro použití s mapujícími panely chromozomálních radiačních hybridů. Komerčně dostupné radiační hybrid mapující panely, které pokrývají úplný lidský genom tak jako the Stanford G3 RH Panel a the Gene Bridge 4 RH Panel (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) jsou k dispozici. Tyto panely umožňují rychlou, na PCR založenou chromozomální lokalizaci a uspořádání genů, sekvencemi značených míst (STSs) a jiných nepolymorfických a polymorfických markerů v oblasti zájmu. Ta zahrnuje stanovení přímo úměrných fyzikálních vzdáleností mezi nově objevenými geny z oblasti zájmu a především mapované markery. Dokonalá znalost pozic (umístění) genů může být v mnoha případech zahrnujících: 1) určení, zda je sekvence částí existujících přilehlých sekvencí a připravených obklopujících genetických sekvencí v různých formách jako jsou YAC-, BAC- nebo cDNA klony, 2) opatření možného kandidáta genu pro nedědičné choroby, který vykazuje vazbu ke stejnému chromozomálnímu úseku, 3) pro křížené referenční organizmy jako myši, které mohou pomoci určit jakou funkci by mohl mít určitý gen.

Tento vynález též zajišťuje reagenty, které nacházejí uplatnění v diagnostických aplikacích. Například Z cyto 7 gen byl mapován na chromozomu 5 q 31. Vzorek Z cyto 7 nukleové kyseliny by mohl být použit ke zkoušce abnormalit na 5. chromozomu. Například vzorek obsahující Z cyto 7 DNA nebo RNA nebo jejich subsekvence může být určen ke zjištění, zda Z cyto 7 gen je přítomen na chromozomu 5 q 31 nebo zda došlo k mutaci. Detegovatelné chromozomální aberace v místě genu Z cyto 7 zahrnují aneuploidy, množství změn v kopírování genů, inserce, delece, restrikční změny míst a přeskupení. Takové aberace mohou být detegovány pomocí polynukleotidů tohoto vynálezu s využitím technik molekulární genetiky jako je analýza polymorfie délky restrikčních fragmentů (RFLP), analýza krátké tandemové repetice (STR) využívající PCR technik a jiné techniky geneticky

vázaných analýz známé v oboru [Sambrook *et al.*, *ibid.*; Ausubel, *et al.*, *ibid.*; Marian, A. J., *Chest*, 108: 255 - 265, (1995)].

Z cyto 7 mapy v úseku 5 q 31, který je „genovým shlukem“ („gene cluster“), který obsahuje skupinu cytokininů a cytokininových receptorů. Cytokiny zde shromážděné obsahují IL - 3, IL - 4, IL - 5, IL - 13, GM - CSF a M - CSF. Tento výsledek prokazuje pravost Z cyto 7 jako cytokininu.

Tento vynález je dále ilustrován několika následujícími příklady, jejichž výčet však není zdaleka úplný.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Klonování Z cyto 7

Z cyto 7 byl identifikován z exprinovaného sekvenčního přívěsku (EST) definovaného SEQ ID č. 3 na základě jeho homolognosti k Interleukinu - 17. Klon cDNA byl získán z banky cDNA lidský srdcí plodů. Plazmid obsahující cDNA byl naočkován (do proužků) na misky s LB 100 µg/ml ampicilinu a 100 µg/ml methicilinu. Vložený úsek (insert) byl určen tak, aby měl délku 717 párů bází se 180 aminokyselinami otevřeného čtecího rámce a předpokládanými 20 aminokyselinami signálního peptidu.

Příklad 2: Analýza northernového přenosu

Byly zkoušeny lidské násobné tkáňové přenosy 1, 2, 3 (Clontech), aby se určilo tkáňové rozdělení Z cyto 7. EcoRI/NotI fragment obsahující úplný Z cyto 7 kódující úsek byl vytvořen z EST 582069 klonu a použit pro zkoušku. Plazmický prep. EST 582069 byl připraven z 5 ml LB 100 µg/ml ampicilinu kultivách přes noc při 37 °C s použitím QIA prep Spin Miniprep Kit (Qiagen). 12 µl ze 100 ml bylo vyluhováno s 5 µl H bufru (Boehringer Mannheim), 12,5 jednotek EcoRI (Gibco BRL) a 12,5 jednotek Not I (New England Biolabs) v 50 µl reagovalo 2 hodiny při 37 °C. Výluh byl podroben elektroforéze na 0,7 % TBE agarózovém gelu a fragment byl vyříznut. K získání dalšího materiálu byl výluh opakován za stejných podmínek jako výše s tím rozdílem, že ve druhém výluhu bylo použito 24 µl EST 582069. Druhý výluh byl podroben elektroforéze na 0,7 % TBE agarózovém gelu a fragment byl vyříznut. DNA byla extrahována z obou plátků gelu pomocí rychlé soupravy pro gelovou extrakci (QIA quick Gel Extraction Kit) (Qiagen). 135 ng této DNA bylo označeno pomocí P³² za použití Multiprime DNA Labeling System (Amersham) a nezačleněná radioaktivita byla odstraněna na Nuc Trap Probe Purification Column (Stratagene). Mnohonásobné tkáňové přenosy a základní přenos lidské RNA byly prehybridizovány 3 hodiny s 10 ml Express Hyb Solution (Clontech) obsahujícím 1 mg DNA ze spermatu lososa, která byla povařena 5 minut, pak zmražená 1 minutu a přidána k 10 ml Express Hyb Solution, promíchána a přidána k přenosům. Hybridizace byla vedena přes noc při 65 °C. Podmínky na počátku promývání byly následující: 2X SSC, 0,05 % SDS RT po dobu 40 minut s několika výměnami roztoku, pod 0,1X SSC, 0,1 % SDS při 50 °C po dobu 40 minut, 1 výměna roztoku. Přenosy byly pak exponovány na film při -80 °C po dobu 5 hodin. Pak byla provedena cross hybridizace/pozadí přenosy (skvrny) byly následně promyty při 55 °C, pak při 65 °C 0,1 % X SSC, 0,1 % SDS po dobu 1 hodiny každý. Mícha vykazovala velmi vysokou expresi Z cyto 7 mRNA, zatímco průdušnice vykazovala slabou expresi m RNA. Velikost transkripce byla průměrně 0,75 kb.

Příklad 3: Značení a umístění chromozomů Z cyto 7.

Z cyto 7 byl mapován na chromozomu 5 s použitím komerčně dostupného „Gene Bridge 4 Radiation Hybrid Panel“ (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). „Gene Bridge 4 Radiation Hybrid Panel“ obsahuje PCR (PC detegovatelné) DNA ze všech 93 klonů radiálních hybridů plus dvě kontrolní DNA (HFL donor a A23 recipient). Veřejně dostupný WWW zásobník (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) umožňuje mapování v poměru k Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research's map radiálních hybridů lidského genomu (the „WICGR“ radiation hybrid map of the human genome), které byly konstruovány pomocí Gene Bridge 4 Radiation Hybrid Panel.

Pro mapování Z cyto 7 pomocí „Gene Bridge 4 RH Panel“ byly nasazeny 20 μ l reakce na PCR (detegovatelné) 96 - jamkové mikrotitrační desky (Stratagene, La Jolla, CA) a použity do „Robo Cycler Gradient 96“ tepelného cykleru (Stratagene). Každá z 95 PCR reakcí obsahovala po 2 μ l 10 X Klen Taq PCR reakční pufr (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), 1,6 μ l dNTPs mix (2,5 mM každá, PERKIN - ELMER, Foster City, CA), 1 μ l negativního primeru SEQ ID č. 4, 1 μ l pozitivního primeru SEQ ID č. 5, 2 μ l „Redi Load“ (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL), 0,4 μ l 50X Advantage Klen Taq Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Inc.), 25 ng DNA z jednotlivého hybridního klonu nebo kontrolního a x μ l ddH₂O deplť do celkového objemu 20 μ l. Reakce byly převrstveny stejným množstvím minerálního oleje a uzavřeny. Podmínky v PCR cykleru byly následující: počáteční 1 cyklus 5 minut denaturace při 95 °C, 35 cyklů po 1 minutě denaturace při 95 °C, 1 minuta temperování při 52 °C a 1 minuta temperování extenze při 72 °C následován posledním 1 cyklem extenze 7 minut při 72 °C. Reakce byly separovány elektroforézou na 3 % Nu Sieve GTG agarozovém gelu (FMC Bioproducts, Rockland, ME).

Výsledky ukazují, že Z cyto 7 mapy 490 . 89 cR z vrcholu lidského chromozomu 5 vážou skupinu na WICGR mapě radiačních hybridů. Jejím nejbližším proximálním markerem vzhledem k centromeru je D5S413 a její nejbližší distální marker je WI - 5208. Použitím obklopujících markerů byl Z cyto 7 umístěn na úseku 5q 31.3 -q32 na integrované LDB mapě chromozomu

5 (The Genetic Location Database, University of Southampton, WWW server: http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/).

Příklad 4: Konstrukce Z cyto 7 expresivních vektorů

Byly provedeny dvě konstrukce vektorů Z cyto 7 do FLAG sekvence aminokyselin (SEQ ID č. 10) a byly vloženy do N - koncových nebo C - koncových konců Z cyto 7 polypeptidu. Pro konstrukci, v níž byla připojena FLAG sekvence aminokyselin k N - konci Z cyto 7 byl vytvořen 473 bp Z cyto 7 PCR DNA fragment pomocí 1 μ l na 1/4 zředěného EST 582069 plazmidu prepu příkladu 2 a 20 pikomolů (pm) primeru SEQ ID č. 6 a 20 pm primeru SEQ ID č. 7. PCR reakce byla inkubována při 94 °C po dobu 1 minuty, pak proběhlo 5 cyklů, přičemž jednotlivý cyklus zahrnoval po 20 sekundách při 94 °C a 2 minuty při 64 °C. Pak následovalo 22 cyklů, přičemž každý cyklus zahrnoval 20 sekund při 94 °C a 2 minuty při 74 °C. Reakce byla ukončena inkubací při 74 °C po dobu 10 minut. 50 μ l PCR reakční směsi bylo vyluhováno s 30 jednotkami Bam HI (Boehringer Mannheim) a 120 jednotkami Xho I (Boehringer Mannheim) při 37 °C po dobu 2 hodiny. Vyloužená reakční směs byla podrobena elektroforéze na 1 % TBE gelu, DNA proužek byl vyříznut žiletkou a DNA, byla z gelu extrahována pomocí soupravy Qiaquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Vyříznutá DNA byla subklonována do plazmidu nfpzp9, který byl řezán s Bam a Xho. Nfpzp9 je expresivní vektor savčích buněk zahrnující expresivní kazetu obsahující myší metallothionein - I promotor, sekvenci kódující vedoucí tkáňový aktivátor plazminogenu (TPA), pak FLAG peptid (SEQ ID č. 10) a četná redukční místa. Dále následoval terminátor lidského růstového hormonu, *E. coli* počátek replikace a savčí jednotka savčího selektivního markeru exprese obsahující SV 40 promotor, zvyšovač a spouštěč replikaci, dihydrofolát reduktázový gen (DHFR) a SV 40 terminátor.

Pro konstrukci Z cyto 7 genu, do kterého byl vložen C - konec FLAG na C - konec Z cyto 7 polypeptidu byl vytvořen 543 bp Z cyto 7 PCR fragment s 1 μ l 1/4 ředěným EST 582069 plazmidového přípravku popsáno v příkladu 1 a po 20 pm od každého primeru SEQ ID č. 8 a SEQ ID č. 9. PCR reakce byla

inkubována při 94 °C po dobu 1 minuty, pak proběhlo 5 cyklů, přičemž každý cyklus zahrnoval 20 sekund při 94 °C a 2 minuty při 55 °C. Pak následovalo 22 cyklů, přičemž každý cyklus zahrnoval 20 sekund při 94 °C a 2 minuty při 74 °C. Reakce byla ukončena 10 minutovou extenzí při 74 °C. Úplná reakční směs byla nanesena na 1 % TBE gel, pak byla DNA vyříznuta žiletkou a DNA z gelu byla extrahována za použití QIAQUICK™ gelové extrakční soupravy. 20 µl se 35 µl získaných tímto způsobem bylo vyluhováno s 10 jednotkami Bam HI (Boehringer Mannheim) a 10 jednotkami EcoRI (Gibco BRL) po dobu 2 hodin při 37 °C. Vyloužená PCR směs byla podrobena elektroforéze na 1 % nin TBE gelu. DNA proužek byl vyříznut žiletkou a DNA byla z gelu za použití soupravy QIA quick ® Gel Extraction Kit (Qiagen). Extrahovaná DNA byla subklonována do plazmidu cfpzp9, který byl vyříznut pomocí EcoRI a BamHI. Plazmid cfpzp9 je savčí expresivní vektor obsahující expresivní kazetu, která má myší metallothionein - I promotor, četná restrikční místa pro vkládání kódujících sekvencí, sekvenci kódující FLAG peptid, (SEQ ID č. 10), stop kodon, terminátor lidského růstového hormonu, *E. coli* počátek replikace, jednotku savčího selektivního markeru exprese obsahující SV 40 promotor, zvyšovač a spouštěč replikace, DHFR gen a SV 40 terminátor.

Použitím protilátek k FLAG polypeptidům mohou být separovány FLAG - značené Z cyto 7 polypeptidy z buněčné supernatantové kapaliny.

Příklad 5: Klonování myšího Z cyto 7

Myší Z cyto 7 byl identifikován z EST SEQ ID č. 14 na základě své homologie k lidskému Z cyto 7. Byl objeven cDNA klon v knihovně myší embryonální cDNA, přičemž embrya byla 13,5 až 14,5 dne stará. Tato cDNA byla poskytnuta jako agarový „vpich“ obsahující *E. coli* transfektovanou plazmidem obsahujícím uvedenou cDNA, pak naočkována (do proužků) na misky obsahující LB 100 µg/ml ampicilinu, 25 µg/ml methicilinu. cDNA vložená do EST 660242 byla sekvencována. Bylo stanoveno, že inzert obsahuje 785 párů bází s otevřeným čtecím rámcem 180 aminokyselin a předpokládaných 20 aminokyselin signálního peptidu. Sekvence jsou definovány sekvencemi SEQ ID č. 11 a SEQ ID č. 12.

Příklad 6: Tkáňové rozdělení myšního Z cyto 7

Pro určování tkáňového rozdělení myšního Z cyto 7 byly zkoušeny tyto metody: myší násobný tkáňový nothernový přenos (Clontech, Palo Alto, CA), myší nothernový bodový přenos (Clontech), myší embryonální nothernový přenos a bodový přenos myší míchy.

Myší embryonální RNA byla izolována z myších embryí, která byla stará 6 až 9 dní od data fertilizace, přičemž byla použita souprava POLY (A) PURE[®] mRNA isolation kit (Ambion). 100 mg každého myšního embrya bylo rozštěpeno v 1 ml štěpícího pufru, pak homogenizováno a podrobeno vsádkové metodě (batch) podle výrobního protokolu. Pro northernový přenos bylo nanášeno 2 µg RNA na 1,5 %ní agarózový gel s 2,2 M formaldehydu. Gel byl provozován při 60 V po dobu čtyř hodin a 30 minut. RNA byla transferována přes noc na Nytranovou membránu, která byla předem zvlhčena v 20 X SSC. RNA byly zesíťeny na membránu pomocí UV světla a vypáleny při 80 °C po dobu 1 hodiny.

Myší míšní RNA byla též připravena pomocí izolační soupravy POLY (A) PURE[®] mRNA isolation kit (Ambion). Bodový přenos myší míchy byl proveden nanášením skvrn bodů s 1, 2 a 3 µl RNA při koncentraci 1 µg RNA/µl na Nytranovou membránu.

Not1/EcoRI fragment obsahující úplný Z cyto 7 kódující úsek byl vytvořen z klonu obsahujícího SEQ ID č. 12 (dále referován jako SEQ ID č. 12 klon) a byl použit pro zkoušku. Plazmidový prep SEQ ID č. 12 klonu byl připraven z 5 ml LB 100 µg/ml ampicilinu kultivovaného přes noc při 37 °C za použití soupravy QIAPREP SPIN MINIPREP kit (Qiagen). 4,66 µg bylo vyluhováno s 8 µl pufru s vysokou pufrovací schopností (Boehringer Mannheim), 20 jednotkami Not 1 (Biolabs) a 20 jednotkami EcoRI (Gibco

BRL) v 80 µl reakčního objemu při 37 °C po dobu 2 hodiny. Výluh byl podroben elektroforéze na 1,0 %ním TBE gelu a fragment s DNA byl vyříznut. DNA byla extrahována z gelového plátku za použití soupravy QIAQUICK® gel extraction kit (Qiagen). 98,8 ng tohoto fragmentu bylo označeno pomocí p³² za použití značícího systému MULTIMPRIME® DNA labeling system (Amersham) a nezačleněná radioaktivita byla odstraněna na patronové purifikační koloně NUCTRAP® (Stratagene).

Dva prepy northernového přenosu a dva prepy bodového přenosu byly prehybridizovány po dobu 3 hodiny při 65 °C následujícím způsobem. 1 mg spermatu lososa byl povařen 5 minut, zchlazen 1 minutu, smíchán s 10 ml EXPRESSHYB® roztokem a přidán k přenosům. Hybridizace byla vedena přes noc při 65 °C. Počáteční podmínky vymývání byly následující: 2 X SSC, 0,1 % SDS po dobu 40 minut při pokojové teplotě, pak 0,1 X SSC, 0,1 % SDS po dobu 40 minut při 50 °C. Přenosy byly exponovány na film přes noc při 80 °C. Northernové přenosy a myší bodový přenos byly dále vymyty s 0,1 % SSC, 0,1 % SDS při 60 °C, aby se odstranilo pozadí. Bodový přenos myší míchy byl promyt znovu důrazněji s 0,1 % X SSC, 0,1 % SDS při 65 °C za účelem potvrzení včasnějších výsledků.

Výsledky: Exprese myšího Z cyto 7 byla patrná v míše, slinné žláze a epididymis. Myší embryo vykazovalo expresi Z cyto 7 počínaje dnem 12 s maximem v 16. dni a končící 17. dnem od data fertilizace. Velikost transkripce byla průměrně 1 kb.

Příklad 7: Proliferace chondrocytů použitím Z cyto 7

Byla provedena zkouška proliferace chondrocytů za účelem určení účinku, jaký by mohl mít Z cyto 7 na proliferaci chondrocytů. Zkouška byla provedena s 20 %ními stékavými kulturami. Pro kontrolní pokus byl přidán ke kultuře chondrocytů hovězí sérový albumin místo Z cyto 7. Zkouškou byla měřena inkorporace 3H - thymidinu DNA vznikající v chondrocytech, Wahl *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 8 : 5016 - 5025 (1988).

Výsledky: Po vystavení kultury chondrocytů 1 $\mu\text{g/ml}$ Z cyto 7 byla pozorována 3,5 až 9 násobná stimulace proliferace chondrocytů. Stimulace chondrocytů pomocí Z cyto 7 byla pozorována u mnoha přípravků proteinů a byla pozorovatelná všeobecně u řady druhů. Naproti tomu kontrolní experiment s použitím BSA (hovězí sérový albumin) nevykazoval žádnou stimulaci chondrocytů.

Příklad 8: Příprava glykozaminoglykanu pomocí chondrocytů ošetřených Z cyto 7

Byla připravena 20 %ní stékavá kultura chondrocytů a byl aplikován Z cyto 7 v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Ve druhém pokusu byl navíc k Z cyto 7 k buněčné kultuře aplikován IL - 1 β . Ke kontrolní skupině byl ke kultuře chondrocytů přidán BSA. Hladina glykozaminoglykanu (GAG) produkovaného kulturou chondrocytů byla pak určena pomocí zkoušky s 1,9 - dimethylmethylenovým modrým barvivem, Fardale *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 888 : 173 - 177 (1987).

Výsledky: Chondrocyty, které byly kultivovány s Z cyto 7, vykazovaly 50 %ní zvýšení stálé přítomnosti GAG v kultuře chondrocytů. Navíc, jestliže byly chondrocyty kultivovány s Z cyto 7 a interleukinem - 1 β (IL - 1 β), zvýšila se produkce GAG 2,5krát ve srovnání s tím, byly-li chondrocyty kultivovány buď se Z cyto 7 nebo IL - 1 β samostatně. Buňky, které byly kultivovány s přidavkem BSA, nevykazovaly žádné zvýšení produkce GAG.

Příklad 9: Stimulace osteoblastu pomocí Z cyto 7

Buněčná linie CCC4 je osteoblastům podobná buněčná linie odvozená z p53 omráčené myši. Linie CCC4 byla transfekována pomocí plazmidu obsahujícího indukovatelný element sérové odpovědi (SRE = serum response element) řídícího expresi luciferázy. Stimulace SRE a následná exprese luciferázy naznačuje, že chemická entita pravděpodobně stimuluje osteoblasty.

CCC4 buňky byly kultivovány v přítomnosti 1 μ g Z cyto 7/ml kultivačního média. Kontrolní BSA, fibroblastový růstový faktor (FGF) a plateletami derivovaný růstový faktor (PDGF) byly přidány k různým kulturám CCC4 buněk. BSA byla negativní kontrola a FGF a PDGF byly pozitivní kontroly, protože jsou známy tím, že podporují proliferaci osteoblastů. Aktivita luciferázy byla určena přidavkem 40 μ l Promega luciferáze substrátu s použitím „2 second integrated read on Labsystems LUMINOSKAN[®]“.

Výsledky: Z cyto 7 stejně jako FGF a PDGF stimulují expresi luciferázy ve zkouškách ukazujících, že stimulují osteoblasty. Kontrolní pokus s BSA byl v této zkoušce negativní.

Příklad 10: Účinek Z cyto 7 na růst fibroblastů

Stékové kultury lidských kožních, plicních a fekálních plicních fibroblastů byly zaočkovány Z cyto 7, aby se určil účinek Z cyto 7 na růst fibroblastů. Jako pozitivní kontrola byl použit FGF a jako negativní kontrolní pokus byl použit BSA.

Výsledky: Z cyto 7 neměl žádný účinek na růst fibroblastů.

Pokus 11: Účinek Z cyto 7 na růst BaF3 buněk

Buňky BaF3, myší pre-B buněčné linie závislé na proliferaci IL-3 byly několikrát promyty základním médiem a pak umístěny do 96-jamkové plotny, každá jamka obsahovala průměrně 5 500 buněk/jamku. Buňky byly ošetřeny buď 1 µg/ml Z cyto 7 nebo 1 - 2 pg/ml IL-3 nebo kombinací obou Z cyto 7 a IL-3. V odděleném pokuse byly též přidány do jamek místo Z cyto 7 0,1 - 10 ng/ml TGFβ. Po inkubaci plotny při 37 °C po dobu 3 - 6 dnů v přítomnosti 5 % CO₂ bylo přidáno 20 µl „ALMAR blue“ do každé jamky a plotna byla inkubována 15 až 24 hodin při 37 °C. Plotna byla vyhodnocena pomocí fluorometru při excitační vlnové délce 544 nm a emisní vlnové délce 590 nm. Před přidavkem „ALMAR blue“ byla zkouška též posouzena prostým okem z hlediska stimulace nebo inhibice proliferace buněk. Základní médium obsahovalo RPMI 1 640 + 10 % HIA - FBS + L - glutamin + Na pyruvát.

Výsledky: Z cyto 7 a TGFβ význačně inhibují IL-3 řízenou proliferaci buněk BaF3. Nicméně jestliže byly přidány protilátky neutralizující TGFβ spolu s Z cyto 7, byla Z cyto 7 inhibice proliferace buněk BaF3 eliminována.

Příklad 12: Účinek Z cyto 7 na růst TF-1 buněk

Buňky TF-1, lidská leukemická buněčná linie, která je závislá na GM-CSF nebo IL-3, byly několikrát promyty základním médiem a umístěny na 96-jamkovou plotnu, přičemž každá jamka obsahovala průměrně 7 000 buněk/jamku. Buňky byly kokultivovány s 1 µg/ml Z cyto 7 a 100 - 200 pg/ml IL-3. V odděleném experimentu byl do jamek místo Z cyto 7 přidán TGFβ. Po

inkubaci plotny při 37 °C po dobu 3 až 6 dnů v přítomnosti 5 % CO₂ bylo do každé jamky přidáno 20 µl „ALMAR blue“ a protna byla inkubována 15 až 24 hodin při 37 °C. Pak byla plotna vyhodnocena pomocí fluorometru při excitační vlnové délce 544 nm a emisní vlnové délce 590 nm. Před přidavkem „ALMAR blue“ bylo též provedeno posouzení prostým okem z hlediska stimulace nebo inhibice proliferace buněk. Základní médium obsahovalo RPMI 1 640 + 10 % HIA - FBS + L - glutamin + Na pyruvát.

Výsledky: IL - 1β stimulace TF - 1 buněk je inhibována jak Z cyto 7, tak i TGF - β. Koncentrace Z cyto 7, při níž se objevila inhibice, byla vyšší, než 200 ng/ml; a koncentrace TGF - β, při které se objevila inhibice proliferace byla okolo 50 pg/ml.

27.12.99

SEZNAM SEKVENCÍ

(I) VŠEOBECNÉ INFORMACE

(i) ŽADATEL: Zymo Genetics, Inc.

1201 Eastlake Avenue East
Seattle
Wa
USA
98102

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Izolovaný polynukleotid, který kóduje savčí Z cyto 7 polypeptid, expresivní vektor, protilátka a způsob její přípravy.

(iii) POČET SEKVENCÍ: 43

(iv) KORESPONDENČNÍ ADRESA:

(A) ADRESÁT: Zymo Genetics, Inc.
(B) ULICE: 1201 Eastlake Avenue East
(C) MĚSTO: Seattle
(D) STÁT: WA
(E) ZEMĚ: USA
(F) ZIP: 98102

(v) FORMULÁŘ ČITELNÝ POČÍTAČEM:

(A) Typ média: disketa
(B) POČÍTAČ: IBM Compatible
(C) OPERAČNÍ SYSTÉM: DOS
(D) SOFTWARE: Fast SEQ pro Windows Version 2.0

(viii) PRÁVNÍ ZÁSTUPCE / AGENT INFORMACE:

(A) JMÉNO: Lunn, Paul G
(B) REGISTRAČNÍ ČÍSLO: 32, 743
(C) ODKAZY / ČÍSLO PŘIHRÁDKY: 97 - 15 PC

(2) INFORMACE PRO SEQ ID č.: 1:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 736 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZENÍ: Jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAK:

- (A) NÁZEV / KLÍČ: Kódující sekvence
- (B) UMÍSTĚNÍ: 57 ... 596
- (D) JINÉ INFORMACE:

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID č.: 1

GAATTCGGCA CGAGGAGGCG GGCAGCAGCT GCAGGCTGAC CTTGCAGCTT GGCGGA ATG	59
Met	
1	
GAC TGG CCT CAC AAC CTG CTG TTT CTT CTT ACC ATT TCC ATC TTC CTG	107
Asp Trp Pro His Asn Leu Leu Phe Leu Leu Thr Ile Ser Ile Phe Leu	
5 10 15	
GGG CTG GGC CAG CCC AGG AGC CCC AAA AGC AAG AGG AAG GGG CAA GGG	155
Gly Leu Gly Gln Pro Arg Ser Pro Lys Ser Lys Arg Lys Gly Gln Gly	
20 25 30	
CGG CCT GGG CCC CTG GCC CCT GGC CCT CAC CAG GTG CCA CTG GAC CTG	203
Arg Pro Gly Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Gln Val Pro Leu Asp Leu	
35 40 45	
GTG TCA CGG ATG AAA CCG TAT GCC CGC ATG GAG GAG TAT GAG AGG AAC	251
Val Ser Arg Met Lys Pro Tyr Ala Arg Met Glu Glu Tyr Glu Arg Asn	
50 55 60 65	

ATC GAG GAG ATG GTG GCC CAG CTG AGG AAC AGC TCA GAG CTG GCC CAG Ile Glu Glu Met Val Ala Gln Leu Arg Asn Ser Ser Glu Leu Ala Gln 70 75 80	299
AGA AAG TGT GAG GTC AAC TTG CAG CTG TGG ATG TCC AAC AAG AGG AGC Arg Lys Cys Glu Val Asn Leu Gln Leu Trp Met Ser Asn Lys Arg Ser 85 90 95	347
CTG TCT CCC TGG GGC TAC AGC ATC AAC CAC GAC CCC AGC CGT ATC CCC Leu Ser Pro Trp Gly Tyr Ser Ile Asn His Asp Pro Ser Arg Ile Pro 100 105 110	395
GTG GAC CTG CCG GAG GCA CGG TGC CTG TGT CTG GGC TGT GTG AAC CCC Val Asp Leu Pro Glu Ala Arg Cys Leu Cys Leu Gly Cys Val Asn Pro 115 120 125	443
TTC ACC ATG CAG GAG GAC CGC AGC ATG GTG AGC GTG CCG GTG TTC AGC Phe Thr Met Gln Glu Asp Arg Ser Met Val Ser Val Pro Val Phe Ser 130 135 140 145	491
CAG GTT CCT GTG CGC CGC CGC CTC TGC CCG CCA CCG CCC CGC ACA GGG Gln Val Pro Val Arg Arg Arg Leu Cys Pro Pro Pro Pro Arg Thr Gly 150 155 160	539
CCT TGC CGC CAG CGC GCA GTC ATG GAG ACC ATC GCT GTG GGC TGC ACC Pro Cys Arg Gln Arg Ala Val Met Glu Thr Ile Ala Val Gly Cys Thr 165 170 175	587
TGC ATC TTC TGAATCACCT GGCCCAGAAG CCAGGCCAGC AGCCCGAGAC CATCCTCCT Cys Ile Phe 180	645
TGCACCTTTG TGCCAAGAAA GGCCTATGAA AAGTAAACAC TGACTTTTGA AAGCCAGAAA AAAAAAAAAA AAAAAAATT CCTGCGGCCG C	705 736

(2) INFORMACE PRO SEQ ID č. 2:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 180 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) ŘETĚZENÍ: Jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(v) TYP FRAGMENTU: vnitřní

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID č.: 2:

Met Asp Trp Pro His Asn Leu Leu Phe Leu Leu Thr Ile Ser Ile Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Leu Gly Gln Pro Arg Ser Pro Lys Ser Lys Arg Lys Gly Gln
 20 25 30
 Gly Arg Pro Gly Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Gln Val Pro Leu Asp
 35 40 45
 Leu Val Ser Arg Met Lys Pro Tyr Ala Arg Met Glu Glu Tyr Glu Arg
 50 55 60
 Asn Ile Glu Glu Met Val Ala Gln Leu Arg Asn Ser Ser Glu Leu Ala
 65 70 75 80
 Gln Arg Lys Cys Glu Val Asn Leu Gln Leu Trp Met Ser Asn Lys Arg
 85 90 95
 Ser Leu Ser Pro Trp Gly Tyr Ser Ile Asn His Asp Pro Ser Arg Ile
 100 105 110
 Pro Val Asp Leu Pro Glu Ala Arg Cys Leu Cys Leu Gly Cys Val Asn
 115 120 125
 Pro Phe Thr Met Gln Glu Asp Arg Ser Met Val Ser Val Pro Val Phe
 130 135 140
 Ser Gln Val Pro Val Arg Arg Arg Leu Cys Pro Pro Pro Arg Thr
 145 150 155 160
 Gly Pro Cys Arg Gln Arg Ala Val Met Glu Thr Ile Ala Val Gly Cys
 165 170 175
 Thr Cys Ile Phe
 180

(2) INFORMACE PRO SEQ ID č.: 3:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKA:

- (A) DÉLKA: 397 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiný

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID č.: 3:

AGGCGGGCAN AGCTGCAGGC TGACCTTGCA GCTTGGCGGA ATGGAAGTGGC CTCACAACCT 60
 GCTGTTTCTT CTTACCATTT CCATCTTCCT GGGGCTGGGC AGCCAGGAGC CCCAAAAGCA 120
 AGAGGAAGGG GCAAGGGCGG CCTGGGCCCN TGGCCTGGCC TCACCAGGTG CCACTGGACC 180
 TGGTGTACAG GATGAAACCG TATGCCCCGA TGGAGGAGTA TGAGAGGAAC ATCGAGGAGA 240
 TGGTGGCCCA GCTGAGGAAC AGCTCANAAG CTGGCCCAGA GAAAGTGTGA GGTCAACTTG 300

CAGCTGTGGA TGTCCAACAA GAAGGAGCCT GTCTCCCTTG GGGCTACAAG CAATCAACCAC 360
CGACCCCAGC CGTATCCCCG TGGGACCTTG CCGGGAC 397

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 4:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 18 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiný

(vii) PŘÍMÝ ZDROJ:

(B) KLON: ZC 13265

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 4:

TTACCATTTC CATCTTCC

18

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 5:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 18 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: Jiný

(vii) PŘÍMÝ ZDROJ:

(B) KLON: ZC 13266

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 5:

CCCTTCCTCT TGCTTTTG

18

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 6:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 29 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: Jiný

(vii) PŘÍMÝ ZDROJ:

(B) KLON: ZC 13326

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 6:

CAAGGATCCC AGCCCAGGAG CCCCAAAAG

29

(2) INFORMACE PRO AEQ ID Č.: 7:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 30 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: Jiný

(vii) PŘÍMÝ ZDROJ:

(B) KLON: ZC 3330

(xi) POPIS STAVU: SEQ ID Č.: 7:

GACCTCGAGT CAGAAGATGC AGGTGCAGCC

30

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 8:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 30 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: Jiný

(vii) PŘÍMÝ ZDROJ:

(B) KLON: ZC 13325

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 8:

GTCGAATTCA TGGACTGGCC TCACAACCTG

30

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 9:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 27 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: Jiný
- (vii) PŘÍMÝ ZDROJ:
- (B) KLON: ZC 13327

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 9:

GAAGGATCCG AAGATGCAGG TGCAGCC

27

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 10:

- (i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:
 - (A) DÉLKA:
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 10:

Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Gly	Ser
1				5					10

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 11:

- (i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:
 - (A) DÉLKA: 692 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAK:

- (A) NÁZEV / KLÍČ: Kódující sekvence
- (B) UMÍSTĚNÍ: 50 ... 589
- (D) JINÉ INFORMACE:

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 11:

GGGGTTCCTG GCGGGTGGCA GCTGCGGGCC TGCCGCCTGA
CTTGGTGGG ATG GAC TGG Met Asp Trp

1

58

CCG CAC AGC CTG CTC TTC CTC CTG GCC ATC TCC ATC TTC CTG GCG CCA	106
Pro His Ser Leu Leu Phe Leu Leu Ala Ile Ser Ile Phe Leu Ala Pro	
5 10 15	
AGC CAC CCC CGG AAC ACC AAA GGC AAA AGA AAA GGG CAA GGG AGG CCC	154
Ser His Pro Arg Asn Thr Lys Gly Lys Arg Lys Gly Gln Gly Arg Pro	
20 25 30 35	
AGT CCC TTG GCC CCT GGG CCT CAT CAG GTG CCG CTG GAC CTG GTG TCT	202
Ser Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Gln Val Pro Leu Asp Leu Val Ser	
40 45 50	
CGA GTA AAG CCC TAC GCT CGA ATG GAA GAG TAT GAG CGG AAC CTT GGG	250
Arg Val Lys Pro Tyr Ala Arg Met Glu Glu Tyr Glu Arg Asn Leu Gly	
55 60 65	
GAG ATG GTG GCC CAG CTG AGG AAC AGC TCC GAG CCA GCC AAG AAG AAA	298
Glu Met Val Ala Gln Leu Arg Asn Ser Ser Glu Pro Ala Lys Lys Lys	
70 75 80	
TGT GAA GTC AAT CTA CAG CTG TGG TTG TCC AAC AAG AGG AGC CTG TCC	346
Cys Glu Val Asn Leu Gln Leu Trp Leu Ser Asn Lys Arg Ser Leu Ser	
85 90 95	
CCA TGG GGC TAC AGC ATC AAC CAC GAC CCC AGC CGC ATC CCT GCG GAC	394
Pro Trp Gly Tyr Ser Ile Asn His Asp Pro Ser Arg Ile Pro Ala Asp	
100 105 110 115	
TTG CCC GAG GCG CGG TGC CTA TGT TTG GGT TGC GTG AAT CCC TTC ACC	442
Leu Pro Glu Ala Arg Cys Leu Cys Leu Gly Cys Val Asn Pro Phe Thr	
120 125 130	
ATG CAG GAG GAC CGT AGC ATG GTG AGC GTG CCA GTG TTC AGC CAG GTG	490
Met Gln Glu Asp Arg Ser Met Val Ser Val Pro Val Phe Ser Gln Val	
135 140 145	
CCG GTG CGC CGC CGC CTC TGT CCT CAA CCT CCT CGC CCT GGG CCC TGC	538
Pro Val Arg Arg Arg Leu Cys Pro Gln Pro Pro Arg Pro Gly Pro Cys	
150 155 160	
CGC CAG CGT GTC GTC ATG GAG ACC ATC GCT GTG GGT TGC ACC TGC ATC	586
Arg Gln Arg Val Val Met Glu Thr Ile Ala Val Gly Cys Thr Cys Ile	
165 170 175	

TTC TGAGCCAACC ACCAACCCGG TGGCCTCTGC AACAACCCTC
CCTCCCTGCA CCCACT Phe

645

180

GTGACCCTCA AGGCTGATAA ACAGTAAACG CTGTTCTTTG
TAAAGGA

692

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 12:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 180 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(v) TYP FRAGMENTU: vnitřní

(xi) POPIS SEKvence: SEQ ID Č.: 12:

Met	Asp	Trp	Pro	His	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Ala	Ile	Ser	Ile	Phe	1	5	10	15
Leu	Ala	Pro	Ser	His	Pro	Arg	Asn	Thr	Lys	Gly	Lys	Arg	Lys	Gly	Gln	20	25	30	
Gly	Arg	Pro	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	His	Gln	Val	Pro	Leu	Asp	35	40	45	
Leu	Val	Ser	Arg	Val	Lys	Pro	Tyr	Ala	Arg	Met	Glu	Glu	Tyr	Glu	Arg	50	55	60	
Asn	Leu	Gly	Glu	Met	Val	Ala	Gln	Leu	Arg	Asn	Ser	Ser	Glu	Pro	Ala	65	70	75	80
Lys	Lys	Lys	Cys	Glu	Val	Asn	Leu	Gln	Leu	Trp	Leu	Ser	Asn	Lys	Arg	85	90	95	
Ser	Leu	Ser	Pro	Trp	Gly	Tyr	Ser	Ile	Asn	His	Asp	Pro	Ser	Arg	Ile	100	105	110	
Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Glu	Ala	Arg	Cys	Leu	Cys	Leu	Gly	Cys	Val	Asn	115	120	125	
Pro	Phe	Thr	Met	Gln	Glu	Asp	Arg	Ser	Met	Val	Ser	Val	Pro	Val	Phe	130	135	140	
Ser	Gln	Val	Pro	Val	Arg	Arg	Arg	Leu	Cys	Pro	Gln	Pro	Pro	Arg	Pro	145	150	155	160
Gly	Pro	Cys	Arg	Gln	Arg	Val	Val	Met	Glu	Thr	Ile	Ala	Val	Gly	Cys	165	170	175	
Thr	Cys	Ile	Phe													180			

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 13:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 497 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární topologie

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 13:

```

GGGGTTCCTG GCGGGTGGCA GCTGCGGGCC TGCCGCCTGA CTTGGTGGGA TGGACTGGCC    60
GCACAGCCTG CTCTTCCTCC TGGCCATCTC CATCTTCCTG GCGCCAAGCC ACCCCCGGAA    120
CACCAAAGGC AAAAGAAAAG GGCAAGGGAG GCCCAGTCCC TTGGCCCCTG GGCTCATCAG    180
GTGCCGCTGG ACCTGGTGTC TCGAGTAAAG CCCTACGCTC GAATGGAAGA GTATGAGCGG    240
AACCTTGGGG AGATGGTGGC CCAGCTGAGG AACAGCTCCG AGCCAGCCAA GAAGAAATGT    300
GAAGTCAATC TACAGCTGTG GTTGTCCAAC AAGAGGAGCC TGTCCCATG GGGCTACAGC    360
ATCAACCACG ACCCAGCCG CATCCCTGCG GACTTGCCCG AGGCGCGGTG CCTATGTTTG    420
GGTTGCGTGA ATCCCTTCAC CATGCAGGAG GACCGTAGCA TGGTGAGCGT GCCAGTGTTG    480
AGCCAGGTGC CGGTGCG

```

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 14:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 160 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 14:

```

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

```

Pro	Glu	Ala	Arg	Cys	Leu	Cys	Leu	Gly	Cys	Val	Asn	Pro	Phe	Thr	Met
			100					105					110		
Gln	Glu	Asp	Arg	Ser	Met	Val	Ser	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Gln	Val	Pro
		115					120				125				
Val	Arg	Arg	Arg	Leu	Cys	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg
	130				135					140					
Gln	Arg	Ala	Val	Met	Glu	Thr	Ile	Ala	Val	Gly	Cys	Thr	Cys	Ile	Phe
145				150						155				160	

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 15:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKA:

(A) DÉLKA: 160 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 15:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 16:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 160 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein
(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 16:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 17:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 160 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein
(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 17:

Gln	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Ser	Lys	Arg	Lys	Gly	Gln	Gly	Arg	Pro	Ala
1				5						10				15	

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 18:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DĚLKA: 160 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 18:

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

Gln	Glu	Asp	Arg	Ser	Met	Val	Ser	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Gln	Val	Pro
	115						120					125			
Val	Arg	Arg	Arg	Leu	Cys	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg
	130					135					140				
Gln	Arg	Ala	Val	Met	Glu	Thr	Ile	Ala	Val	Gly	Cys	Thr	Cys	Ile	Phe
145					150					155					160

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 19:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DĚLKA: 160 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 19:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 20:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DĚLKA: 160 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 20:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 21:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DĚLKA: 160 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 21:

Gln	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Ser	Lys	Arg	Lys	Gly	Gln	Gly	Arg	Pro	Gly
1				5				10					15		
Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	His	Gln	Val	Pro	Leu	Asp	Leu	Val	Ser	Arg
			20				25					30			

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 22:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 160 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 22:

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

Val	Arg	Arg	Arg	Leu	Cys	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg
130						135					140				
Gln	Arg	Ala	Val	Met	Glu	Thr	Ile	Ala	Val	Gly	Cys	Thr	Cys	Ile	Phe
145					150					155					160

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 23:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 160 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 23:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 24:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 160 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 24.

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 25:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 160 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 25:

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

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 26:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 97 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 26:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 27:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 100 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: protein
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 27:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 28:

- (i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:
 - (A) DÉLKA: 17 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: peptid
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 28:

Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Ser	Lys	Arg	Lys	Gly	Gln	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Leu
1				5					10					15		

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 29:

- (i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:
 - (A) DÉLKA: 17 aminokyselin

- (B) TYP: aminokyselina
- (C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: peptid
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 29:

Arg Met Lys Pro Tyr Ala Arg Met Glu Glu Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Glu
1 5 10 15

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 30:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 16 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: peptid
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 30:

Asn His Asp Pro Ser Arg Ile Pro Val Asp Leu Pro Glu Ala Arg Cys
1 5 10 15

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 31:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 19 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: peptid
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 31:

Pro Val Arg Arg Arg Leu Cys Pro Pro Pro Pro Arg Thr Gly Pro Cys Arg Gln
1 5 10 15
Arg

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 32:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 47 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptide

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 32:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 33:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 70 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 33:

Arg	Met	Lys	Pro	Tyr	Ala	Arg	Met	Glu	Glu	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu
1			5					10					15		
Glu	Met	Val	Ala	Gln	Leu	Arg	Asn	Ser	Ser	Glu	Leu	Ala	Gln	Arg	Lys
		20					25					30			
Cys	Glu	Val	Asn	Leu	Gln	Leu	Trp	Met	Ser	Asn	Lys	Arg	Ser	Leu	Ser
	35					40					45				
Pro	Trp	Gly	Tyr	Ser	Ile	Asn	His	Asp	Pro	Ser	Arg	Ile	Pro	Val	Asp
	50				55						60				
Leu	Pro	Glu	Ala	Arg	Cys										
65					70										

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 34:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 61 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: peptid
(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 34:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 35:

- (i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:
(A) DÉLKA: 73 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: peptid
(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 35:

Asn	His	Asp	Pro	Ser	Arg	Ile	Pro	Val	Asp	Leu	Pro	Glu	Ala	Arg	Cys
1				5					10					15	
Leu	Cys	Leu	Gly	Cys	Val	Asn	Pro	Phe	Thr	Met	Gln	Glu	Asp	Arg	Ser
		20						25					30		
Met	Val	Ser	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Gln	Val	Pro	Val	Arg	Arg	Arg	Leu
		35				40						45			
Cys	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Gln	Arg	Ala	Val	Met
50						55					60				
Glu	Thr	Ile	Ala	Val	Gly	Cys	Thr	Cys							
65					70										

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 36:

- (i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:
(A) DÉLKA: 158 aminokyselin

- (B) TYP: aminokyselina
(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: protein
(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 36:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 37:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 154 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: protein
(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 37:

Ser	Lys	Arg	Lys	Gly	Gln	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro
1				5				10					15		
His	Gln	Val	Pro	Leu	Asp	Leu	Val	Ser	Arg	Met	Lys	Pro	Tyr	Ala	Arg
		20						25				30			

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 38:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 151 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 38:

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

Pro Arg Thr Gly Pro Cys Arg Gln Arg Ala Val Met Glu Thr Ile Ala
 130 135 140
 Val Gly Cys Thr Cys Ile Phe
 145 150

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 39:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 160 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 39:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 40:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 158 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 40:

```

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

```

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 41:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 153 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 41:

```

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

```

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 42:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 128 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 42:

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

(2) INFORMACE PRO SEQ ID Č.: 43:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

(A) DÉLKA: 157 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZENÍ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID Č.: 43:

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

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Izolovaný polynukleotid, který kóduje savčí Z cyto 7 polypeptid nebo jeho varianty.

2. Izolovaný polynukleotid podle nároku 1, kde uvedený polynukleotid kóduje polypeptid vybraný ze skupiny SEQ ID č.: 2, SEQ ID č.: 12, SEQ ID č.: 14 - 27 a SEQ ID č.: 36 - 43.

3. Polynukleotid nároku 2, kde polypeptid kódovaný uvedeným polynukleotidem je definovaný SEQ ID č.: 15 - 25, kde aminové konce uvedených polypeptidů začínají u obou aminokyselinových zbytků 3, argininem; aminokyselinového zbytku 7, serinu; aminokyselinového zbytku 8, lysinu; aminokyselinového zbytku 10, lysin nebo aminokyselinový zbytek 33 methionin.

4. Polynukleotid podle nároku 2, kde polypeptid kódovaný uvedeným polynukleotidem je polypeptid definovaný SEQ ID č.: 2, 12, 14 - 25 a 36 až 42, kde konec aminokyselinových sekvencí u izoleucinů u aminokyselinového zbytku 179 SEQ ID č.: 2, u aminokyselinového zbytku 159 u SEQ ID č.: 14 - 25, který odpovídá aminokyselinovému zbytku 157 SEQ ID č.: 36, aminokyselinovému zbytku 153 SEQ ID č.: 37, aminokyselinovému zbytku 150 SEQ ID č.: 38, aminokyselinovému zbytku 159 SEQ ID č.: 39, aminokyselinovému zbytku 157 SEQ ID č.: 40, aminokyselinovému zbytku 152 SEQ ID č.: 42, aminokyselinovému zbytku 127 SEQ ID č.: 42.

5. Izolovaný polynukleotid kódující peptid nebo polypeptid, který má alespoň 15 aminokyselinových zbytků obsahujících epitop - nesoucí část polypeptidu SEQ ID č.: 2, 14 - 27 a 36 - 43.

6. Izolovaný polynukleotid podle nároku 5, kde je peptid nebo polypeptid vybraný ze skupiny skládající se ze SEQ ID č.: 28 - 35.

7. Polynukleotid podle nároku 5 nebo 6, kde peptid nebo polypeptid je fúzován k nosnému polypeptidu nebo jiné nosné molekule.

8. Polynukleotid, který kóduje peptid nebo polypeptid, který je z 90 %, 95 % nebo 99 % identický s polypeptidy podle nároků 1 - 7.

9. Expresivní vektor obsahující následující operativně vázané prvky:
transkripční promotor;
DNA segment definovaný podle nároku 1 - 8; a
transkripční terminátor.

10. Expresivní vektor obsahující následující operativně vázané prvky:
(a) transkripční promotor;
(b) DNA segment kódující chimerický polypeptid, kde se uvedený chimerický polypeptid nezbytně skládá z první a druhé části spojené peptidovou vazbou, uvedená první část obsahuje savčí polypeptid, jenž je aminokyselinovými sekvencemi SEQ ID č.: 2, 12, 14 - 43 a uvedená druhá část je druhý polypeptid nebo protein.
(c) transkripční terminátor.

11. Izolovaný savčí Z cyto 7 polypeptid nebo jeho varianty.

12. Izolovaný Z cyto 7 polypeptid podle nároku 11 vybraný ze skupiny sekvence aminokyselin skládajících se ze SEQ ID č.: 2, 12, 14 - 27 a 36 - 43.

13. Polypeptid podle nároku 12., kde polypeptid je polypeptid definovaný SEQ ID č. 15 - 25, kde aminové konce uvedených polypeptidů jsou modifikovány a začínají buď na aminokyselinovém zbytku 3 argininem; aminokyselinovém zbytku 7, serinem; aminokyselinovém zbytku 8 lysinem; aminokyselinovém zbytku 10 lysinem nebo na aminokyselinovém zbytku 33 methioninem.

14. Polypeptid podle nároku 12, kde polypeptid je polypeptid definovaný SEQ ID č.: 2, 12, 14 - 25 a 36 až 42, kde sekvence aminokyselinového konce u izoleucinů u aminokyselinového zbytku 179 SEQ ID č.: 2, u aminokyselinového zbytku 159 SEQ ID č.: 14 - 25, který odpovídá aminokyselinovému zbytku 157 SEQ ID č.: 36, aminokyselinovému zbytku 153 SEQ ID č.: 37, aminokyselinovému zbytku 150 SEQ ID č.: 38, aminokyselinovému zbytku 159 SEQ ID č.: 39, aminokyselinovému zbytku 157 SEQ ID č.: 40, aminokyselinovému zbytku 152 SEQ ID č.: 42, aminokyselinovému zbytku 127 SEQ ID č.: 42.

15. Izolovaný peptid nebo polypeptid, jenž má alespoň 15 aminokyselinových zbytků obsahujících epitop nesoucí část polypeptidu Z cyto 7 polypeptidu.

16. Peptid nebo polypeptid podle nároku 15, kde je uvedený peptid nebo polypeptid epitop nesoucí část polypeptidu SEQ ID č.: 2, 14 - 27 a 36 - 43.

17. Izolovaný peptid nebo polypeptid podle nároku 16, kde je peptid nebo polypeptid vybrán ze skupiny sekvence aminokyselin skládající se ze SEQ ID č.: 28 - 35.

18. Izolovaný peptid nebo polypeptid, který je 90 %m 95 % nebo 99 % identický s peptidy nebo polypeptidy podle nároků 12 - 17.

19. Izolovaný peptid nebo polypeptid podle nároků 12 - 17, mající sekvenci aminokyselin modifikovanou adicí, delecí a/nebo přemístěním jednoho nebo více aminokyselinových zbytků a které řídí biologickou aktivitu uvedeného peptidu nebo polypeptidu.

20. Protilátky, které se specificky vážou na savčí polypeptid, uvedený polypeptid je definovaný sekvencemi aminokyselin podle nároků 12 - 20.

21. Způsob přípravy protilátky, která se specificky váže na peptid nebo polypeptid podle nároků 12 - 19 zahrnující očkování zvířete uvedeným peptidem nebo polypeptidem nebo nukleovou kyselinou, která kóduje uvedený peptid nebo polypeptid, vyznačující se tím, že uvedené zvíře produkuje protilátky proti uvedenému peptidu nebo polypeptidu a izolací této protilátky.

22. Protilátka podle nároku 21, kde uvedená protilátka je buď polyklonální nebo monoklonální protilátkou.

23. Fragmenty protilátky, jednoduché řetězce protilátek nebo humanizované protilátky protilátek podle nároků 20 a 21.

24. Anti-idiotypická protilátka protilátky podle nároků 21 - 23.