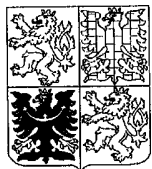


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 17.07.1998

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 18.07.1997

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1997/053154

(33) Země priority: US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 14.06.2000
(Věstník č. 6/2000)

(86) PCT číslo: PCT/US98/14864

(87) PCT číslo zveřejnění: WO99/04000

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 105

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. C1. 7:

C 12 N 15/12
C 07 K 14/47
C 12 Q 1/68
C 12 N 15/62
C 07 K 19/00
C 12 N 5/10
G 01 N 33/50
A 61 K 48/00
A 61 K 38/17
C 07 K 16/18

(71) Přihlašovatel:

ZYMOGENETICS, INC., Seattle, WA,
US;

(72) Původce:

Sheppard Paul O., Redmond, WA, US;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

Izolovaný polypeptid, fúzní protein, expresní vektor, kultivovaná buňka nesoucí zmíněný expresní vektor, způsob přípravy zmíněného polypeptidu, farmaceutický prostředek s obsahem zmíněného polypeptidu, protilátka, vazebný protein, izolovaný polynukleotid a oligonukleotidová sonda nebo primer

(57) Anotace:

Molekuly polynukleotidů a polypeptidů, kódující zsig37, nový člen rodiny proteinů mající kolagenu podobnou doménu a globulární doménu. Zmíněné polypeptidy jsou schopné dimerizace nebo oligomerizace a mohou být, stejně jako polynukleotidy, které je kódují, či oligonukleotidové sondy nebo primery, odvozené od sekvence zmíněných polynukleotidů, použity pro jejich studium. Řešení se dále zabývá protilátkami a vazebnými proteiny, specificky vázícími zsig37, expresním vektorem kódujícím zmíněný polypeptid, kultivovanou buňkou nesoucí zmíněný expresní vektor a exprimující vektorem kódovaný protein a farmaceutickým prostředkem s obsahem zmíněného polypeptidu.

IZOLOVANÝ POLYPEPTID, FÚZNÍ PROTEIN, EXPRESNÍ VEKTOR, KULTIVOVANÁ BUŇKA NESOUCÍ ZMÍNĚNÝ EXPRESNÍ VEKTOR, ZPŮSOB PŘÍPRAVY ZMÍNĚNÉHO POLYPEPTIDU, FARMACEUTICKÝ PROSTŘEDEK S OBSAHEM ZMÍNĚNÉHO POLYPEPTIDU, PROTILÁTKA, VAZEBNÝ PROTEIN, IZOLOVANÝ POLYNUKLEOTID A OLIGONUKLEOTIDOVÁ SONDA NEBO PRIMER.

Oblast techniky

Předmětem navrhovaného vynálezu jsou polypeptidy mající aminokyselinovou sekvenci vysoce homologickou s aminokyselinovou sekvencí proteinů specificky sekretovaných tukovými buňkami (adipocyty). Polypeptidy podle navrhovaného vynálezu jsou určeny k použití pro modulaci energetické homeostáze, pro studium tohoto fenoménu a pro prevenci a léčbu onemocnění spojených s nevyváženým energetickým metabolismem.

Dosavadní stav techniky

Energetická rovnováha (zahrnující energetický metabolismus, nutriční stav, ukládání tuků a podobně) je důležitým ukazatelem zdravotního stavu. Tato energetická homeostáze zahrnuje příjem potravy a metabolismus uhlovodíků a lipidů za účelem tvorby energie nezbytné pro funkce řízené vůlí i pro funkce na vůli nezávislé. Metabolismus proteinů může vést také k tvorbě energie, ale častěji je jeho důsledkem tvorba svalové hmoty nebo oprava poškozených svalů. Kromě jiného vede nerovnováha energetického metabolismu k nadbytečné nebo naopak nedostatečné tvorbě tukové tkáně.

Tvorba a ukládání tuku jsou ovlivněny inzulinem. Inzulín například stimuluje transport glukózy do buněk, kde je tato metabolizována na α -glycerolfosfát, který je používán při esterifikaci mastných kyselin, což umožňuje jejich ukládání ve formě triglyceridů. Adipocyty (tukové buňky) navíc exprimují specifický transportní protein který zvyšuje transfer volných mastných kyselin do adipocytů. Adipocyty dále produkují do prostředí několik proteinů, které pravděpodobně ovlivňují homeostatickou kontrolu metabolismu glukózy a lipidů. Mezi tyto adipocyty sekretované proteiny patří adiposin, faktory komplementu C3 a B, tumor nekrotizující faktor α (TNF- α), produkt genu *ob* a Acrp30. Dále existují jisté důkazy předpokládající existenci inzulinem regulované sekreční dráhy u adipocytů. Scherer *et al.*, J. Biol. Chem. 270 (45): 26746-9, 1995. Nadbytečná

nebo naopak nedostatečná produkce zmíněných látek, která má částečně za následek nadbytečnou nebo naopak nedostatečnou tvorbu tukové tkáně, může vést k patologickým stavům přímo nebo nepřímo asociovaným s obezitou nebo anorexií.

Acrp30 je 247 aminokyselin dlouhý polypeptid, který je produkován výhradně adipocyty. Polypeptid Acrp30 je tvořen amino-koncovou signální sekvencí, 27 aminokyselin dlouhou vmezeřenou sekvencí, která nevykazuje homologii s žádným známým proteinem, dále 22 dokonalými Gly-Xaa-Pro nebo nedokonalými Gly-Xaa-Xaa repeticemi typickými pro kolagen a karboxy-koncovou globulární doménou (viz. Scherer *et al.*, J. Biol. Chem. 270 (45): 26746-9, 1995 a mezinárodní patentová přihláška WO 96/39429). Acrp30 je lidský sérový protein, vyskytuje se v poměrně hojně a vykazuje strukturní podobnost (především v oblasti C-koncové globulární domény) s faktorem komplementu Clq a s proteinem z letního séra hibernujících živočichů *Tamias sibiricus* (Hib27). Exprese Acrp30 je během diferenciacie adipocytu indukována více než stokrát. Předpokládáme, že Acrp30 lze použít pro ovlivňování energetické rovnováhy a pro identifikaci adipocytů v testovaných vzorcích.

Dalším sekretovaným proteinem, který je pravděpodobně produkován výhradně adipocyty, je apM1, popsán například v Maeda *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 221:286-9, 1996. 4517 pb velký klon obsahuje 244 aminokyselin dlouhý otevřený čtecí rámec a dlouhou 3' netranslatovanou oblast. Protein je tvořen signální sekvencí, amino-koncovou sekvencí nepodobnou sekvenci pro kolagen, dále 22 dokonalými Gly-Xaa-Pro nebo nedokonalými Gly-Xaa-Xaa repeticemi typickými pro kolagen a karboxy-koncovou oblastí vykazující homologii s kolagenem X, kolagenem VIII a proteinem komplementu Clq.

Faktor komplementu Clq je tvořen šesti kopiemi tří příbuzných polypeptidů (řetězce A, B a C), z nichž každý je dlouhý přibližně 225 aminokyselin a každý obsahuje amino-koncovou doménu typickou pro kolagen a karboxy-koncovou globulární doménu. Šest trojitě helikálních oblastí je tvořeno kolagenovými doménami šesti A, šesti B a šesti C řetězců. Clq je tudíž tvořen šesti globulárními hlavami spojenými s centrální vláknitou oblastí šesti kolagenu podobnými „stopkami“ (Sellar *et al.*, Biochem. J. 274:481-90, 1991). Taková stavba proteinu je často popisována jako kytice růží. Acrp30 má podobnou strukturu kytice, ale je tvořen jen jedním typem polypeptidových řetězců.

Molekuly schopné modulovat energetickou homeostázi jsou vyhledávané především za účelem studia tohoto fenoménu a kvůli prevenci a léčbě energetické nerovnováhy. Dále jsou vyhledávané molekuly schopné modulovat sekreční dráhy

adipocytů, neboť mohou být použity pro nepřímou modulaci energetické homeostáze a dále jsou vhodným objektem dalšího výzkumu.

Navrhovaný vynález se zabývá takovými polypeptidy a jejich použitím ať již výše zmíněným způsobem, nebo i dalšími způsoby, zřejmými odborníkům na zde používané techniky.

Podstata vynálezu

Jedním z aspektů navrhovaného vynálezu je izolovaný polypeptid obsahující sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická s aminokyselinovou sekvencí aminokyselinových zbytků 26-281 SEQ ID NO:2, kde zmíněná sekvence obsahuje Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina a kde zmíněná sekvence obsahuje karboxy-koncovou globulární část. V jednom z provedení vynálezu vykazuje polypeptid nejméně 90% identitu s aminokyselinami 26-281 SEQ ID NO:2. V dalším z provedení vynálezu vykazuje polypeptid nejméně 90% identitu s aminokyselinami 22-281 SEQ ID NO:2. V dalším z provedení vynálezu obsahuje polypeptid aminokyselinové zbytky 1-281 sekvence SEQ ID NO:2 nebo sekvence SEQ ID NO:44. V dalším z provedení vynálezu je polypeptid kovalentně vázán N-koncovou nebo C-koncovou částí k jednotce vybrané ze skupiny obsahující afinitní skupiny, toxiny, radionukleotidy, enzymy nebo fluorofory. V dalším, podobném provedení vynálezu je dále zavedeno mezi zmíněnou sekvencí aminokyselinových zbytků a zmíněnou afinitní skupinu místo pro proteolytické štěpení. V dalším z možných provedení vynálezu je navrhován izolovaný polypeptid vybraný ze skupiny obsahující: a) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická s aminokyselinovou sekvencí aminokyselinových zbytků 99 až 140 SEQ ID NO:2; b) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická s aminokyselinovou sekvencí aminokyselinových zbytků 140 nebo 141 až 281 SEQ ID NO:2 a c) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická s aminokyselinovou sekvencí aminokyselinových zbytků 99 až 281 SEQ ID NO:2.

V dalším z provedení je předmětem navrhovaného vynálezu fúzní protein, který je tvořen v zásadě dvěma částmi spojenými peptidovou vazbou, kdy zmíněná první část je tvořena polypeptidem, vybraným ze skupiny obsahující: a) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická s aminokyselinovou sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2; b)

polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků odpovídající SEQ ID NO:2, a to počínaje aminokyselinou 1, 22 nebo 26 a konče aminokyselinou 281; c) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků odpovídající SEQ ID NO:44, a to počínaje aminokyselinou 1, 22 nebo 26 a konče aminokyselinou 281; d) část polypeptidu zsig37 tak jak ukazují SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, obsahující kolagenu podobnou doménu, nebo část kolagenu podobné domény, dostatečnou aby byla schopna dimerizace nebo oligomerizace; e) část polypeptidu zsig37 tak jak ukazují SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, obsahující globulární doménu nebo aktivní místo globulární domény, nebo f) část polypeptidu zsig37 tak jak ukazují SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, obsahující kolagenu podobnou doménu a globulární doménu; a zmíněná druhá část proteinu obsahuje nějaký jiný polypeptid. V jednom z provedení navrhovaného vynálezu je první část proteinu vybrána ze skupiny obsahující : a) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, odpovídající sekvenci 99 až 140 SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44; b) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, odpovídající sekvenci 140 nebo 141 až 281 SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44 a c) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, odpovídající sekvenci 99 až 281 SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44.

V dalším z provedení je předmětem vynálezu fúzní protein obsahující sekreční signální sekvenci mající aminokyselinovou sekvenci odpovídající aminokyselinám 1 až 21 nebo 1 až 25 SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, kde je zmíněná sekreční signální sekvence operativně připojena k dalšímu polypeptidu.

V dalším z provedení vynálezu je předmětem vynálezu expresní vektor obsahující následující operativně spojené elementy: promotor transkripce, segment DNA kódující polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2 a kde zmíněná sekvence obsahuje Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina; C-koncovou globulární část a terminátor transkripce. V dalším z provedení je obsažen DNA segment kódující polypeptid, který je nejméně z 90 % identický se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2. V dalším z provedení kóduje DNA segment polypeptid, který je nejméně z 90 % identický se sekvencí aminokyselinových zbytků 22 až 281 SEQ ID NO:2. V dalším z provedení kóduje DNA segment polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků odpovídající aminokyselinám 1 až 281 SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44. V dalším z provedení kóduje DNA segment polypeptid, který má na svém N-konci nebo C-konci kovalentně vázanou afinitní skupinu. V dalším z provedení vynálezu DNA

segment dále kóduje sekreční signální sekvenci, operativně připojenou ke zmíněnému polypeptidu. V dalším z provedení vynálezu obsahuje sekreční signální sekvence aminokyselinové zbytky 1 až 21 nebo 1 až 25 SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44.

V dalším z provedení je předmětem vynálezu kultivovaná buňka do které byl vnesen expresní vektor obsahující následující operativně spojené elementy: promotor transkripce, segment DNA kódující polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2 a kde zmíněná sekvence obsahuje Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina; C-koncovou globulární část a terminátor transkripce, kde zmíněná buňka exprimuje zmíněný polypeptid kódovaný zmíněným DNA segmentem.

V dalším z provedení je předmětem vynálezu způsob přípravy polypeptidu zahrnující: kultivaci buněk do kterých byl vnesen expresní vektor obsahující následující operativně spojené elementy: promotor transkripce, segment DNA kódující polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2 a kde zmíněná sekvence obsahuje Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina; C-koncovou globulární část a terminátor transkripce a kde zmíněná buňka exprimuje zmíněný polypeptid kódovaný zmíněným DNA segmentem; a izolaci zmíněného exprimovaného polypeptidu.

V dalším z provedení vynálezu je předmětem vynálezu farmaceutický prostředek obsahující polypeptid, kde zmíněný polypeptid obsahuje sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2 a kde zmíněná sekvence obsahuje Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina, C-koncovou globulární část a terminátor transkripce, v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.

Předmětem vynálezu je dále protilátka, která specificky rozpoznává epitop polypeptidu, kde zmíněný polypeptid obsahuje sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2 a kde zmíněná sekvence obsahuje Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina; a C-koncovou globulární část.

Předmětem vynálezu je dále vazebný protein, který specificky váže epitop polypeptidu, kde zmíněný polypeptid obsahuje sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2 a kde zmíněná sekvence obsahuje Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina; a C-koncovou globulární část.

Předmětem vynálezu je dále izolovaný polynukleotid kódující polypeptid, kde zmíněný polypeptid obsahuje sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2 a kde zmíněná sekvence obsahuje Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina, C-koncovou globulární část. V jednom z provedení vynálezu je sekvence zmíněného polypeptidu nejméně z 90 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2. V dalším z provedení vynálezu je sekvence zmíněného polypeptidu nejméně z 90 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 22 až 281 SEQ ID NO:2. V dalším z provedení obsahuje polypeptid aminokyselinové zbytky 1 až 281 SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44. V dalším z provedení vynálezu je zmíněný polynukleotid DNA.

Dále je předmětem vynálezu izolovaný polynukleotid vybraný ze skupiny obsahující a) sekvenci nukleotidů počínaje nukleotidem 465 a konče nukleotidem 688 SEQ ID NO:1, b) sekvenci nukleotidů počínaje nukleotidem 688 a konče nukleotidem 1016 SEQ ID NO:1, c) sekvenci nukleotidů počínaje nukleotidem 691 a konče nukleotidem 1016 SEQ ID NO:1, d) sekvenci nukleotidů počínaje nukleotidem 465 a konče nukleotidem 1016 SEQ ID NO:1, e) sekvenci nukleotidů počínaje nukleotidem 364 a konče nukleotidem 490 SEQ ID NO:43, f) sekvenci nukleotidů počínaje nukleotidem 490 a konče nukleotidem 912 SEQ ID NO:43, g) sekvenci nukleotidů počínaje nukleotidem 364 a konče nukleotidem 912 SEQ ID NO:43, h) sekvenci nukleotidů počínaje nukleotidem 364 a konče nukleotidem 490 SEQ ID NO:43, i) polynukleotid kódující polypeptid, kde sekvence aminokyselinových zbytků zmíněného polypeptidu je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 99, 140 nebo 141 až 281 SEQ ID NO:2, j) polynukleotid kódující polypeptid, kde sekvence aminokyselinových zbytků zmíněného polypeptidu je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 99 až 140 SEQ ID NO:2, k) nukleotidové sekvence komplementární k sekvencím a), b), c), d), e), f), g), h), i) nebo j) a l) degenerované nukleotidové sekvence a), b), c), d), e), f), g), h), i), j) nebo k).

Dále je předmětem vynálezu izolovaný polynukleotid kódující fúzní protein který je tvořen v zásadě dvěma částmi spojenými peptidovou vazbou, kdy zmíněná první část je tvořena polypeptidem, vybraným ze skupiny obsahující: a) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická s aminokyselinovou sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2; b) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků odpovídající SEQ ID NO:2, a to počínaje aminokyselinou 1, 22 nebo 26 a konče aminokyselinou 281; c) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků odpovídající SEQ ID NO:44, a to počínaje aminokyselinou 1, 22 nebo 26 a konče aminokyselinou 281; d) část polypeptidu zsig37 tak jak ukazují SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, obsahující kolagenu podobnou doménu, nebo část kolagenu podobné domény, dostatečnou aby byla schopna dimerizace nebo oligomerizace; e) část polypeptidu zsig37 tak jak ukazují SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, obsahující globulární doménu nebo aktivní místo globulární domény, nebo f) část polypeptidu zsig37 tak jak ukazují SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, obsahující kolagenu podobnou doménu a globulární doménu; a zmíněná druhá část proteinu obsahuje nějaký jiný polypeptid.

V dalším z provedení je předmětem vynálezu izolovaný polynukleotid kódující fúzní protein obsahující sekreční signální sekvenci mající aminokyselinovou sekvenci odpovídající aminokyselinám 1 až 21 nebo 1 až 25 SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, kde je zmíněná sekreční signální sekvence operativně připojena k dalšímu polypeptidu.

V dalším z provedení je předmětem vynálezu oligonukleotidová sonda nebo primer, jež obsahuje nejméně 14 bezprostředně po sobě následujících nukleotidů polynukleotidu se sekvencí SEQ ID NO:23 nebo polynukleotidu komplementárního k SEQ ID NO:23.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1: Mnohočetné porovnání sekvencí zsig37 polypeptidu podle navrhaného vynálezu; HUMUPST2_1 (Maeda *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 221(2): 286-9, 1996); C1QA_HUMAN (Sellar *et al.*, Biochem. J. 274: 481-90, 1991), Reid, Biochem. J. 179: 367-71 1979 a Reid *et al.*, Biochem. J. 203: 559-69, 1982); HP25_TAMAS (Takamatsu *et al.*, Mol. Cell. Biol. 13: 1516-21, 1993 a Kondo & Kondo, J. Biol. Chem. 267: 473-8, 1992); HP27_TAMAS (Takamatsu *et al.*, Mol. Cell. Biol. 13: 1516-21, 1993 a Kondo & Kondo, J. Biol.

Chem. 267: 473-8, 1992) a CERL_RAT (Wada & Ohtani, Brain. Res. Mol. Brain Res. 9: 71-7, 1991).

Obrázek 2: Matice znázorňující procento identity aminokyselinové sekvence při mnohočetném porovnání šesti výše zmíněných sekvencí (obr. 1).

Detailní popis vynálezu:

Než přistoupíme k detailnímu popisu podstaty vynálezu, mohlo by být užitečné v zájmu porozumění definovat následující termíny.

Termínem „afinitní skupina“ zde označujeme část peptidu, která je navázána k polypeptidu za účelem purifikace nebo detekce polypeptidu, nebo která obsahuje místa umožňující navázání polypeptidu k odpovídajícímu substrátu. V zásadě může být použit jako afinitní skupina kterýkoliv peptid nebo protein, proti kterému existuje protilátka nebo jiná specifická vazebná látka. Mezi afinitní skupiny patří například sekvence několika po sobě následujících histidinových zbytků (polyhisitidin), protein A (Nilsson *et al.*, EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilsson *et al.*, Methods in Enzymology 198: 3, 1991), glutathion S transferáza (Smith and Johnson, Gene 67: 31, 1988), substance P, FlagTM peptid (Hopp *et al.*, Biotechnology 6: 1204-1210, 1988; dostupné od Eastman Kodak Co., New Haven, CT), streptavidin vazebný peptid, nebo další antigenní epitopy nebo vazebné domény. Pro obecný přehled viz. Ford *et al.*, Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991. DNA kódující afinitní skupiny jsou komerčně běžně dostupné (např. Pharmacia Biotech, Piscataway NJ).

Termínem „alelická varianta“ je označována kterákoliv ze dvou nebo více alternativních forem genu, zaujímající stejný lokus na chromozómu. Alelické varianty vznikají přirozeně mutací a mohou mít za následek fenotypický polymorfismus v rámci populace. Genové mutace mohou být tiché (tj. nemají za následek změnu v kódovaném polypeptidu), nebo může mutovaný gen kódovat polypeptid s odlišnou aminokyselinovou sekvencí. Termínem alelická varianta je zde také označován protein kódovaný alelickou variantou genu.

Termíny „N-koncový nebo amino-koncový“ a „C-koncový nebo karboxy-koncový“ jsou zde používány pro určení pozice v rámci polypeptidu nebo proteinu. Tam kde to souvislosti umožňují, jsou tyto termíny používány spolu s odkazem na konkrétní sekvenci nebo část polypeptidu nebo proteinu, a to za účelem bližšího popisu vzdálenosti nebo relativní pozice. Například určitá sekvence umístěná na C-konci referenční sekvence proteinu je umístěna blíže k C-konci referenční sekvence, ale není nutně umístěna na C-konci celého proteinu.

Termínem „pár komplement/anti-komplement“ jsou označovány neidentické jednotky, které tvoří za určitých podmínek nekovalentně asociovaný stabilní pár. Prototypem takového páru komplement/anti-komplement je například pár biotin a avidin (nebo streptavidin). Dalšími příklady mohou být páry receptor/ligand, protilátka/antigen (nebo haptén či epitop), pár komplementárních polynukleotidů a podobně. Pokud je žádoucí následující disociace páru komplement/anti-komplement, má tento pár s výhodou vazebnou afinitu $<10^9 \text{ M}^{-1}$.

Termín „komplementární molekula polynukleotidu“ označuje molekulu polynukleotidu, která má komplementární sekvenci dusíkatých bází a opačnou orientaci vzhledem k původní sekvenci. Například k sekvenci 5' ATGCACGGG 3' je komplementární sekvence 5' CCCGTGCAT 3'.

Termín „přilehlá sekvence“ označuje polynukleotid, který obsahuje sekvenci identickou nebo komplementární k sekvenci jiného polynukleotidu. Přilehlé sekvence se také nazývají přesahující „overlap“, tj. „přesahují“ určitou polynukleotidovou sekvenci, a to buď v celé její délce, nebo alespoň částečně. Reprezentativním příkladem takové přilehlé sekvence k sekvenci 5'-ATGGCTTAGCTT-3' jsou sekvence 5'-TAGCTTgagtct-3' a 3'-gtcgacTACCGA-5'. Termín „degenerovaná nukleotidová sekvence“ označuje nukleotidovou sekvenci, která obsahuje jeden nebo i více degenerovaných kodonů (v porovnání s původní molekulou polynukleotidu, která kóduje polypeptid). Degenerované kodony jsou tvořeny odlišnými triplety nukleotidů, ale kódují stejnou aminokyselinu (například GAU i GAC triplety shodně kódují aminokyselinu Asp).

Termínem „expresní vektor“ je zde označována molekula DNA, lineární nebo cyklická, která obsahuje část DNA kódující polypeptid, který je předmětem našeho zájmu, operativně připojenou k dalším segmentům DNA jež zajišťují transkripci zmíněné kódující části DNA. Mezi takové segmenty patří například promotor nebo terminační sekvence, jeden nebo více počátků replikace (ori), dále může být obsažen jeden nebo více selekčních markerů, zesilovací sekvence, polyadenylační signál a podobně. Expresní vektory jsou obvykle odvozeny od plazmidové nebo virové DNA, nebo mohou obsahovat části obou.

Termín „izolovaný“ ve vztahu k polynukleotidu označuje polynukleotid, který byl vyjmut ze svého přirozeného genetického prostředí a tudíž neobsahuje žádné nadbytečné nebo nechtěné kódující sekvence a je ve formě vhodné pro použití pro produkci proteinu metodami genového inženýrství. Takové izolované molekuly jsou ty, které byly odděleny ze svého přirozeného prostředí a zahrnují cDNA a genomové klony. Izolované molekuly DNA podle vynálezu byly zbaveny všech ostatních genů, se kterými jsou běžně asociovány, ale mohou obsahovat přirozeně

se vyskytující 5' a 3' netranslatované oblasti, jakými jsou například promotory nebo terminátory. Identifikace takových asociovaných oblastí je odborníkům zřejmá (viz. například Dynan and Tijan, *Nature* 316: 774-78, 1985).

Termínem „izolovaný polypeptid“ nebo „izolovaný protein“ zde označujeme polypeptid nebo protein, který se nachází v podmínkách odlišných od svého přirozeného prostředí, tj. například izolovaný od krve nebo živočišné tkáně. Je s výhodou, pokud izolovaný polypeptid neobsahuje žádné další polypeptidy, zvláště pak další polypeptidy živočišného původu. S výhodou jsou polypeptidy ve vysoce purifikované formě, tj. v čistotě více než 95%, ještě raději pak více než 99%. Při použití v tomto kontextu nevylučuje termín „izolovaný“ přítomnost shodného polypeptidu v alternativní fyzikální formě, například ve formě dimeru nebo alternativně glykosylovaného nebo jinak derivatizovaného proteinu.

Termín „operativně spojený“ při popisu segmentů DNA označuje segmenty, které jsou uspořádány tak, že fungují ve vzájemné shodě a ve správném pořadí tak, aby zajistily požadovaný výsledek, např. transkripce začíná na promotoru, pokračuje přes kódující segment a je ukončena terminátorem.

Termínem „ortholog“ je označován polypeptid nebo protein získaný z jednoho druhu, který je funkční částí polypeptidu nebo proteinu z jiného druhu. Odlišnosti v sekvencích mezi orthology jsou výsledkem druhového rozrůznění.

„Paralogy“ jsou odlišné ale strukturně příbuzné proteiny pocházející z jednoho organismu. Předpokládá se, že se paralogy vyvinuly cestou duplikace genů. Vzájemnými paralogy jsou například α -globin, β -globin a myoglobin.

Termín „polynukleotid“ označuje jednořetězcový nebo dvouřetězcový polymer deoxyribonukleotidů nebo ribonukleotidů čtený od 5'- ke 3'- konci. Mezi polynukleotidy patří RNA a DNA, které mohou být izolovány z přirozených zdrojů, mohou být syntetizovány *in vitro*, nebo mohou být připraveny kombinací přirozených a syntetických molekul. Velikost polynukleotidu se vyjadřuje v počtu párů bazí (zkracováno pb), počtu nukleotidů (zkratka nt) nebo kilobazích (kb). Kde to souvislosti dovolí, mohou poslední dva údaje popisovat jak jednořetězcovou, tak i dvojřetězcovou molekulu. Je-li takto popisována dvojřetězcová molekula, je termín použit k vyjádření celkové délky molekuly a rozumí se, že je ekvivalentní termínu „počet párů bazí“. Odborníkům je zřejmé, že se mohou oba řetězce dvojřetězcového polynukleotidu co do délky navzájem nepatrně lišit a že na koncích může jeden z řetězců přesahovat, což bývá výsledkem enzymatického štěpení. Všechny nukleotidy dvojřetězcového polynukleotidu tudíž nemusí tvořit páry. Takové přesahující konce většinou nejsou delší než 20 nt.

Termínem „polypeptid“ je označován polymer aminokyselinových zbytků, spojených navzájem peptidovou vazbou. Polypeptid může být přirozeného původu, nebo může být připraven synteticky. Polypeptidy obsahující méně než 10 aminokyselinových zbytků jsou obvykle nazývány „peptidy“.

Termínem „sonda a/nebo primer“ může být označována RNA a nebo DNA. DNA může být buď cDNA nebo genomová DNA. Polynukleotidové sondy nebo primery jsou jednořetězcové nebo dvojřetězcové molekuly DNA nebo RNA, obvykle se jedná o syntetické oligonukleotidy, ale mohou být připraveny i z cDNA klonů nebo genomových sekvencí či sekvencí k nim komplementárních. Analytické sondy jsou obvykle dlouhé nejméně 20 nukleotidů, ačkoliv někdy mohou být použity i kratší sondy (14-17 nukleotidů). PCR primery jsou dlouhé nejméně 5 nukleotidů, raději pak 15 nt a více, nejraději pak 20 až 30 nukleotidů. Krátké polynukleotidy mohou být použity v případě, kdy chceme analyzovat jen malou část genomu. V případě analýzy velkých genových celků mohou polynukleotidové sondy obsahovat celý exon nebo ještě větší část genomu. Sondy mohou být značeny tak aby mohly být snadno detekovatelné, například enzymem, biotinem nebo radionuklidem, fluoroforem, chemiluminiscenční látkou, paramagnetickými částicemi a podobně. Všechny zmíněné látky jsou komerčně dostupné a to z mnoha různých zdrojů, například Molecular Probes, Inc.; Eugene, OR, Amersham Corp., Arlington Heights, IL. Značení je prováděno v oboru běžně známými metodami.

Termínem „promotor“ je označována část genu obsahující DNA sekvenci, která umožňuje vazbu RNA polymerázy a iniciaci transkripce. Promotorové sekvence se nachází nejčastěji (ale ne vždy) na 5'- nekódujícím konci genu.

Termínem „receptor“ označujeme protein asociovaný s buňkou, který se váže s bioaktivní molekulou (tzv. ligandem) a zprostředkuje účinek ligandu na buňku. Membránově vázané receptory jsou charakterizovány multi-doménovou strukturou, která zahrnuje extracelulární ligand-vazebnou doménu a intracelulární efektorovou doménu, která je typicky součástí dráhy přenosu signálu. Vazbou ligandu k receptoru dochází ke konformační změně receptoru, která má za následek interakci mezi efektorovou doménou receptoru a další molekulou (nebo molekulami) buňky. Tato interakce potom vede ve svém důsledku ke změně metabolismu buňky. Mezi metabolické pochody, které jsou spojeny s interakcí receptor-ligand, patří transkripce genu, fosforylace, defosforylace, zvýšení produkce cyklického AMP, mobilizace buněčných zásob vápenatých iontů, mobilizace membránových lipidů, buněčná adheze, hydrolýza lipidů na bázi inozitolu, hydrolýza fosfolipidů. Většina jaderných receptorů také vykazuje multi-

doménovou strukturu zahrnující amino-koncovou transaktivační doménu, DNA-vazebnou doménu a ligand-vazebnou doménu. Obecně dělíme receptory na membránově vázané, cytosolické a jaderné, monomerní (například receptor pro TSH, tj. hormon stimulující štítnou žlázu, nebo beta-adrenergní receptor) a multimerní (například PDGF receptor, receptor pro růstový hormon, IL-3 receptor, GM-CSF receptor, G-CSF receptor, receptor pro erythropoetin a IL-6 receptor).

Termínem „sekreční signální sekvence“ zde označujeme DNA sekvenci kódující polypeptid (tzv. sekreční peptid), který je součástí většího polypeptidu a který směřuje tento větší polypeptid odpovídající sekreční cestou ven z buňky ve které byl syntetizován. Zmíněný větší polypeptid je obvykle v některém místě sekreční dráhy štěpen a sekreční peptid je takto odstraněn.

Termínem „rozpuštěný receptor“ je zde označován polypeptid s funkcí receptoru, který není vázán na buněčnou membránu. Rozpuštěnými receptory jsou nejčastěji receptory vážící ligand, které postrádají transmembránovou a cytoplazmatickou doménu. Rozpuštěné receptory mohou navíc obsahovat například afinitní sekvenci, která usnadňuje purifikaci receptoru, nebo aminokyselinovou sekvenci umožňující přichycení polypeptidu k substrátu, nebo konstantní doménu imunoglobulinu. Mnoho povrchových buněčných receptorů má své přirozeně se vyskytující rozpustné protějšky, které vznikají proteolytickým štěpením nebo translací z alternativně sestříhané mRNA. O receptoru říkáme že postrádá transmembránové a intracelulární segmenty, pokud postrádá dostatečně velkou část těchto segmentů, tak aby již nebylo možné ukotvení receptoru v membráně nebo přenos signálu do buňky.

Termínem „varianta sestříhu“ označujeme alternativní formy RNA transkribované z jednoho genu. Varianty sestříhu vznikají přirozeně alternativním sestříhem míst uvnitř transkribované RNA molekuly a nebo méně často mezi odděleně transkribovanými molekulami RNA a výsledkem může být několik transkribovaných mRNA pocházejících z jednoho genu. Varianty sestříhu mohou kódovat polypeptidy s odlišnou aminokyselinovou sekvencí. Termín „varianta sestříhu“ je zde také používán pro označení proteinu kódovaného variantou sestříhu mRNA transkribovanou z genu.

Údaje o molekulové hmotnosti a délce polymerů, získané nepřesnými analytickými metodami (např. gelovou elektroforézou) jsou zde uváděny jen jako přibližné hodnoty. Pokud je taková hodnota vyjádřena jako „asi“ X nebo „přibližně“ X, jedná se o hodnotu určenou s přesností $\pm 10\%$, tj. $X \pm 10\%$.

Všechny publikace, které jsou zde citovány, jsou zde v celém svém rozsahu zahrnuty pouze jako literární odkaz.

Navrhovaný vynález je zčásti založen na objevu nové DNA sekvence, kódující polypeptid, který vykazuje homologii s proteinem Acrp30 (tj. adipocyte complement related protein) (viz. například Scherer *et al.*, J. Biol. Chem. 270 (45): 26746-9, 1995. Sekvence polypeptidu Acrp30 je zde uvedena pod číslem SEQ ID NO:3. Acrp30 je pravděpodobně vysoce příbuzný s lidským proteinem apM1 (HUMPST2_1 na obrázcích 1 a 2). Nejmarkantnější odlišnosti byly pozorovány v oblasti sekreční sekvence.

Nová DNA sekvence kóduje polypeptid, který se skládá z amino-koncové signální sekvence, z přilehlé N-koncové oblasti jež nevykazuje žádnou homologii, z pozměněné kolagenové domény tvořené repetitivy Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro a z karboxy-koncové globulární domény. Nová polynukleotidová sekvence také obsahuje dlouhou 3' nepřekládanou oblast. Obecná struktura polypeptidu popsáná výše je společná i Acrp30 i HUMUPST2_1; vyjimku tvoří kolagenu podobná doména, která je u obou zmíněných proteinů delší než odpovídající oblast zsig37 polypeptidů. Také HUMPST2_1 sekvence je charakterizována dlouhou 3' nepřekládanou oblastí. Dále Acrp30 i všechny ostatní sekvence, porovnávané na obrázku 1 (s vyjimkou CERL-RAT), sdílí konzervovaný cysteinový zbytek v pozici 187 sekvence polypeptidu zsig37 (viz. obr. 1 a SEQ ID NO:2). Další oblasti homologie, které se nacházejí v karboxy-koncových globulárních oblastech porovnávaných proteinů, jsou zde popsány jako vhodné primery pro vyhledávání dalších členů této rodiny proteinů. Acrp30 by byl například při hledání pomocí zmíněných primerů identifikován jako protein patřící do zmíněné rodiny. Polypeptidy zsig37 podle navrhovaného vynálezu také pravděpodobně obsahují místo pro N-glykosylaci (aminokyselina Asn93 SEQ ID NO:2).

Analýza tkáňové distribuce mRNA odpovídající této nové DNA s pomocí 30 nt sondy SEQ ID NO:4 prokázala, že exprese byla vyšší v srdci a placentě. Méně intenzivní signály byly pozorovány v ledvinné tkáni, vaječníku, nadledvinkách a v kosterním svalstvu a slabý signál poskytovala při Northern blot analýze většina ostatních tkání. Protein byl nazván polypeptid zsig37.

Nové zsig37 polypeptidy byly nejprve identifikovány dotazem na EST databázi. Porovnávány byly sekreční signální sekvence charakterizované startovací aminokyselinou methioninem proti směru transkripce, dále hydrofobní oblastí asi 13 aminokyselin dlouhou a specifickým místem pro proteolytické štěpení; tím byl výběr zúžen na sekretované proteiny. Polypeptidy odpovídající EST a splňující zmíněná kritéria byly dále porovnávány se známými sekvencemi za účelem identifikace sekretovaných proteinů vykazujících homologii se známými ligandy. Byla objevena jediná EST sekvence a bylo předpovězeno, že se jedná o

sekretovaný protein. Nový polypeptid, kódovaný plnou délkou cDNA umožňuje prokázání homologického vztahu s proteinem Acrp30 z adipocytů (SEQ ID NO:3) a s proteinem apM1, který je také produkovan adipocyty (HUMPST2_1 na obr. 1 a 2). O něco vzdálenější homologie byla prokázána v případě A řetězce proteinu komplementu C1Q, dvou faktorů pozorovaných u aktivujících hybernujících živočichů *Eutamias sibiricus* (HP25_TAMAS a HP27_TAMAS) a u krysího mozkového proteinu (CERL_RAT), viz. obr. 1 a 2.

Úplná sekvence polypeptidu zsig37 byla získána z jediného klonu, o kterém jsme předpokládali, že ho obsahuje, kde zmíněný klon byl získán z knihovny mozkových nádorových tkání. Mezi další knihovny, ve kterých by bylo možné takové klony hledat, patří například knihovny tkání srdečních, z placenty, vaječníků, nadledvinek, ledvin, kosterního svalstva, tukové tkáně a podobně.

Nukleotidovou sekvenci N-konce EST znázorňuje SEQ ID NO:1 a z ní odvozenou aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:2. Jak již bylo výše obecně popsáno, polypeptid zsig37 obsahuje signální sekvenci, která zahrnuje aminokyseliny 1 (Met) až 21 (Gly). Alternativní signální sekvence zahrnuje aminokyseliny 1 (Met) až 25 (Ser). Maturovaný polypeptid tudíž počíná aminokyselinou 22 (Leu) nebo 26 (Arg) a končí aminokyselinou 281 (Pro). N-konec maturovaného polypeptidu (aminokyseliny 22 (Leu) až 98 (Lys)) nevykazuje homologii s žádným známým proteinem. Mezi aminokyselinami 99 (Gly) a 140 (Arg) se nachází zkrácená kolagenová doména, která obsahuje jednu dokonalou Gly-Xaa-Pro a 13 nedokonalých Gly-Xaa-Xaa repetit. V porovnání s touto doménou Acrp30 obsahuje 22 dokonalých nebo nedokonalých repetit. Polypeptid zsig37 dále obsahuje karboxy-koncovou globulární doménu, která zahrnuje aminokyseliny 141 (Cys) až 281 (Pro). Zdá se, že polypeptidy zsig37, Acrp30 a HUMUPST2_1 jsou homologní v oblasti kolagenové domény a globulární domény, ale nikoliv v N-koncové části maturovaného polypeptidu.

Předmětem navrhovaného vynálezu jsou také fragmenty polypeptidu zsig37. Mezi preferované fragmenty patří kolagenu podobná doména polypeptidů zsig37, která zahrnuje aminokyseliny 99 (Gly) až 140 (Arg) SEQ ID NO:2, část zsig37 polypeptidu obsahující kolagenu podobnou doménu nebo část kolagenu podobné domény, schopnou dimerizace nebo oligomerizace. Tyto fragmenty jsou zvláště vhodné při studiu dimerizace nebo oligomerizace kolagenu nebo při přípravě fúzních proteinů, která bude podrobněji popsána dále v textu. Polynukleotidy kódující takové fragmenty jsou také předmětem navrhovaného vynálezu včetně skupiny zahrnující a) polynukleotidové molekuly obsahující sekvenci nukleotidů znázorněnou jako SEQ ID NO:1, a to počínaje nukleotidem 1, 171, 234, 246 nebo

465 a konče nukleotidem 589; b) polynukleotidové molekuly kódující fragment polypeptidu zsig37, jehož aminokyselinová sekvence je nejméně z 80 % identická s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO:2 počínaje aminokyselinou 99 (Gly) a konče aminokyselinou 140 (Arg); c) molekuly komplementární k molekulám a) a b) a d) degenerované nukleotidové sekvence kódující fragment kolagenu podobné domény polypeptidu zsig37.

Mezi další preferované fragmenty patří globulární doména polypeptidů zsig37, odpovídající aminokyselinám 140 (Arg) nebo 141 (Cys) až 281 (Pro) SEQ ID NO:2, tj. úsek polypeptidu zsig37 obsahující globulární doménu nebo její aktivní část. Tyto fragmenty jsou zvláště vhodné pro studium nebo modulaci energetické rovnováhy nebo přenosu nervového vzruchu (neurotransmise), a to především v závislosti na dietě nebo stresu. Takové fragmenty mohou být také nositeli anti-mikrobiální aktivity. Polynukleotidy kódující takové fragmenty jsou ovšem také předmětem navrhovaného vynálezu, včetně skupiny zahrnující a) polynukleotidové molekuly obsahující sekvenci nukleotidů znázorněnou jako SEQ ID NO:1, a to počínaje nukleotidem 587 nebo 590 a konče nukleotidem 1016; b) polynukleotidové molekuly kódující fragment polypeptidu zsig37, jehož aminokyselinová sekvence je nejméně z 80 % identická s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO:2 počínaje aminokyselinou 141 (Cys) a konče aminokyselinou 281 (Pro); c) molekuly komplementární k molekulám a) a b) a d) degenerované nukleotidové sekvence kódující fragment polypeptidu zsig37 zahrnující jeho globulární doménu nebo její část.

Jiný fragment polypeptidu zsig37 podle vynálezu zahrnuje jak kolagenu podobnou doménu, tak i globulární doménu, tj. aminokyseliny 99 (Gly) až 281 (Pro) SEQ ID NO:2. Předmětem vynálezu jsou také polynukleotidy kódující zmíněné fragmenty, včetně skupiny zahrnující a) polynukleotidové molekuly obsahující sekvenci nukleotidů znázorněnou jako SEQ ID NO:1, a to počínaje nukleotidem 465 a konče nukleotidem 1016; b) polynukleotidové molekuly kódující fragment polypeptidu zsig37, jehož aminokyselinová sekvence je nejméně z 80 % identická s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO:2 počínaje aminokyselinou 99 (Gly) a konče aminokyselinou 281 (Pro); c) molekuly komplementární k molekulám a) a b) a d) degenerované nukleotidové sekvence kódující fragment polypeptidu zsig37 zahrnující jeho kolagenu podobnou doménu a globulární doménu.

Předmětem vynálezu jsou dále degenerované sondy odvozené od sekvencí polynukleotidů, popsaných výše. Předmětem vynálezu jsou také sondy odvozené od komplementů výše zmíněných polynukleotidů.

Předmětem vynálezu jsou také polynukleotidové molekuly (molekuly DNA a RNA), které kódují výše popsané polypeptidy zsig37. Odborníkům je jistě zřejmé, že vzhledem k tomu, že genetický kód je degenerovaný, může mezi sekvencemi zmíněných polynukleotidů existovat značná variabilita. SEQ ID NO:23 je degenerovaná DNA sekvence, která zahrnuje všechny DNA kódující zsig37 polypeptid podle SEQ ID NO:2. Odborníkům je jistě zřejmé, že SEQ ID NO:23 také určuje všechny možné RNA sekvence kódující SEQ ID NO:2, a to substitucí U (uracilu) za T (thymin). Tudíž jsou i polynukleotidy kódující polypeptidy zsig37 a obsahující nukleotidy 1 až 842 SEQ ID NO:23, stejně jako jejich RNA ekvivalenty, předmětem navrhovaného vynálezu. V tabulce 1 jsou uvedeny jednopísmenné kódy použité v SEQ ID NO:23 pro označení degenerovaných nukleotidů. Sloupec „rozlišení“ shrnuje nukleotidy, popsané odpovídajícím jednopísmenným kódem. Ve sloupci „komplement“ jsou uvedeny jednopísmenné kódy komplementárních nukleotidů (skupin nukleotidů). Například kód „Y“ označuje buď cytozin (C) nebo thymin (T) a k němu komplementární „R“ označuje adenin (A) nebo guanin (G), neboť A je komplementární k T a G je komplementární k C.

TABULKA 1

NUKLEOTID	ROZLIŠENÍ	KOMPLEMENT	ROZLIŠENÍ
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A/G	Y	C/T
Y	C/T	R	A/G
M	A/C	K	G/T
K	G/T	M	A/C
S	C/G	S	C/G
W	A/T	W	A/T
H	A/C/T	D	A/G/T
B	C/G/T	V	A/C/G
V	A/C/G	B	C/G/T
D	A/G/T	H	A/C/T
N	A/C/G/T	N	A/C/G/T

Degenerované kodony použité v SEQ ID NO:23, zahrnující všechny možné kodony pro danou aminokyselinu, jsou shrnuty v tabulce 2.

TABULKA 2

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

Odborník samozřejmě zaznamená jistou nejednoznačnost degenerovaných kodonů, které reprezentují všechny možné kodony kódující jednu aminokyselinu. Například degenerovaný kodon pro serin (WSN) může v některých případech kódovat aminokyselinu arginin (AGR) a degenerovaný kodon pro arginin (MGN) může v některých případech kódovat serin (AGY). Podobný vztah existuje mezi degenerovanými kodony pro leucin a fenylalanin. Některé polynukleotidy představované degenerovanou sekvencí tedy mohou kódovat variabilní aminokyselinové sekvence, ovšem odborník takovou sekvenční variantu snadno identifikuje porovnáním s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO:2. Funkčnost takových sekvenčních variant může být snadno testována tak jak je to popsáno zde.

Odborníkům je také zřejmé, že různé druhy mohou vykazovat různé preference při využívání jednotlivých kodonů („preferential codone usage“). Obecně se tímto jevem zabývají například Grantham *et al.*, Nuc. Acid Res. 8: 1893-1912, 1980; Hass *et al.*, Curr. Biol. 6: 315-24, 1996; Wain-Hobson *et al.*, Gene 13: 355-64, 1981; Grosjean and Fiers, Gene 18: 199-209, 1982; Holm, Nuc. Acid Res. 14: 3075-87, 1986; nebo Ikemura, J. Mol. Biol. 158: 573-97, 1982. Termíny „preferenční využívání kodonu“ nebo „preferované kodony“ jsou odborné termíny popisující kodony, které jsou v buňkách daného druhu pro určitou aminokyselinu používány významně častěji než ostatní možné kodony pro tuto aminokyselinu (viz. tabulka 2). Například aminokyselina threonin (Thr) může být kódována kodony ACA, ACC, ACG nebo ACT, ovšem v savčích buňkách je nejčastěji využíván kodon ACC. Buňky jiných živých organismů, například hmyzu, kvasinek, virů nebo bakterií mohou preferovat jiné Thr kodony. Preferované kodony pro buňky konkrétních druhů mohou být do polynukleotidů podle vynálezu vneseny celou řadou obecně známých metod. Vnesení sekvence preferovaného kodonu do rekombinantní DNA může například zvýšit produkci proteinu, neboť učiní translaci proteinu v buňkách daného druhu efektivnější. Sekvence degenerovaných kodonů, znázorněná jako SEQ ID NO:23 slouží jako templát pro optimalizaci exprese polynukleotidů v různých typech buněk nejrůznějších organismů, které se pro dané účely v oboru běžně používají a které jsou zde popsány. Sekvence obsahující preferované kodony může být dále testována a dále optimalizována pro expresi v buňkách různých druhů a dále může být testována její funkčnost tak, jak je to popsáno zde.

Fragmenty zsig37 mohou být hodnoceny s ohledem na jejich anti-mikrobiální vlastnosti, a to v oboru známými metodami, viz. například Barsum *et al.*, Eur. Respir. J. 8(5): 709-14, 1995; Sandovsky-Losica *et al.*, J. Med. Vet. Mycol.

(England) 28(4): 279-287, 1990; Mehentee *et al.*, J. Gen. Microbiol. (England) 135 (Pt 8): 2181-8, 1989; Segal and Savage, Journal of Medical and Veterinary Mycology 24: 477-479, 1986 a podobně. V případě potřeby je možné účinnost fragmentu zsig37 v daných podmínkách porovnat s účinností proteinů o kterých je známo, že jsou v těchto podmínkách funkční, například proteiny bohaté prolinem, lysozym, histatiny, laktoperoxidáza a podobně. Dále mohou být fragmenty polypeptidu zsig37 posuzovány v kombinaci s jednou nebo více dalšími anti-mikrobiálními látkami, a to s ohledem na synergický účinek. Odborníkům je jistě zřejmé, že anti-mikrobiální vlastnosti zsig37 polypeptidů, fúzních proteinů, agonistů, antagonistů a protilátek mohou být hodnoceny obdobným způsobem.

Jako neurotransmitery nebo modulátory nervového přenosu mohou fragmenty zsig37 polypeptidů, stejně jako zsig37 polypeptidy, fúzní proteiny, agonisté, antagonisté nebo protilátky podle vynálezu ovlivňovat také koncentraci vápenatých iontů, svalovou kontrakci, sekreci hormonů, syntézu DNA nebo buněčný růst, přeměnu inositolfosfátu, uvolňování arachidonátů, aktivaci fosfolipázy C, vyprazdňování žaludku, aktivaci neutrofilů u člověka nebo schopnost ADCC, produkci superoxidového iontu a podobně. Hodnocení takových vlastností je prováděno běžně známými metodami, z nichž některé jsou popsány zde.

Vliv zsig37 polypeptidu, fragmentu, fúzního peptidu, agonisty nebo antagonisty na intracelulární hladinu vápníku lze stanovit běžně známými metodami, popsány například v Dobrzanski *et al.*, Regulatory Peptides 45: 341-52, 1993 a podobně. Vliv zsig37 polypeptidu, fragmentu, fúzního peptidu, agonisty nebo antagonisty na svalovou kontrakci lze stanovit běžně známými metodami, popsány například v Smits & Lebevre, J. Auton. Pharmacol. 14: 383-92, 1994; Belloli *et al.*, J. Vet. Pharmacol. Therap. 17: 379-83, 1984; Maggi *et al.*, Regulatory Peptides 53: 259-74, 1994 a podobně. Vliv zsig37 polypeptidu, fragmentu, fúzního peptidu, agonisty nebo antagonisty na sekreci hormonů lze stanovit běžně známými metodami jako jsou například metody pro stanovení uvolňování prolaktinu popsané v Henriksen *et al.*, J. of Receptor and Signal Transduction research 15(1-4): 529-41, 1995 a podobně. Vliv zsig37 polypeptidu, fragmentu, fúzního peptidu, agonisty nebo antagonisty na syntézu DNA nebo buněčný růst lze stanovit běžně známými metodami, popsány například v Dobrzanski *et al.*, Regulatory Peptides 45: 341-52, 1993 a podobně. Vliv zsig37 polypeptidu, fragmentu, fúzního peptidu, agonisty nebo antagonisty na přeměnu inositolfosfátu lze stanovit běžně známými metodami, popsány například v Dobrzanski *et al.*, Regulatory Peptides 45: 341-52, 1993 a podobně.

Také vliv zsig37 polypeptidu, fragmentu, fúzního peptidu, agonisty nebo antagonisty na uvolňování arachidonátů lze stanovit běžně známými metodami, viz. například v Dobrzanski *et al.*, Regulatory Peptides 45: 341-52, 1993 a podobně. Vliv zsig37 polypeptidu, fragmentu, fúzního peptidu, agonisty nebo antagonisty na aktivaci fosfolipázy C lze také stanovit běžně známými metodami, viz. například v Dobrzanski *et al.*, Regulatory Peptides 45: 341-52, 1993 a podobně. Vliv zsig37 polypeptidu, fragmentu, fúzního peptidu, agonisty nebo antagonisty na vyprazdňování žaludku lze stanovit běžně známými metodami, popsány například v Varga *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 286: 109-112, 1995 a podobně. Vliv zsig37 polypeptidu, fragmentu, fúzního peptidu, agonisty nebo antagonisty na aktivaci lidských neutrofilů a schopnost ADCC lze stanovit běžně známými metodami, popsány například v Wozniak *et al.*, Immunology 78: 629-34, 1993 a podobně. Vliv zsig37 polypeptidu, fragmentu, fúzního peptidu, agonisty nebo antagonisty na tvorbu superoxidového aniontu lze stanovit běžně známými metodami, popsány například v Wozniak *et al.*, Immunology 78: 629-34, 1993 a podobně.

Navrhovaný vynález se dále týká zsig37 fúzních proteinů. Fúzní proteiny podle vynálezu obsahují například 1) polypeptid vybraný ze skupiny obsahující: a) molekuly polypeptidů obsahující sekvenci aminokyselinových zbytků tak jak ji zobrazuje SEQ ID NO:2, počínaje aminokyselinou 1 (Met), 22 (Leu) nebo 26 (Arg) a konče aminokyselinou 281 (Pro); b) molekuly polypeptidů obsahující sekvenci aminokyselinových zbytků tak jak ji zobrazuje SEQ ID NO:2, počínaje aminokyselinou 99 (Gly) a konče aminokyselinou 140 (Arg), tedy část zsig37 polypeptidu obsahující kolagenu podobnou doménu nebo její část schopnou dimerizace nebo oligomerizace; c) molekuly polypeptidů obsahující sekvenci aminokyselinových zbytků tak jak ji zobrazuje SEQ ID NO:2, počínaje aminokyselinou 140 (Arg) nebo 141 (Cys) a konče aminokyselinou 281 (Pro), tedy část zsig37 polypeptidu obsahující globulární doménu nebo její aktivní část; d) molekuly polypeptidů obsahující sekvenci aminokyselinových zbytků tak jak ji zobrazuje SEQ ID NO:2, počínaje aminokyselinou 99 (Gly) a konče aminokyselinou 281 (Pro), tedy část polypeptidu zsig37 obsahující kolagenu podobnou doménu a globulární doménu; a 2) další polypeptid. Dalším polypeptidem může být v tomto případě alternativní nebo doplňková globulární doména, alternativní nebo doplňková kolagenu podobná doména, signální peptid pro usnadnění sekrece fúzního proteinu a podobně. Globulární doména komplementu váže IgG, globulární doména zsig37 polypeptidu, fragmentu nebo fúzního proteinu bude mít tedy pravděpodobně podobnou úlohu.

Polypeptidy zsig37 počínající aminokyselinou 1 (Met) a končící aminokyselinou 281 (Pro); alternativní maturované polypeptidy zsig37 počínající aminokyselinou 22 (Leu) nebo 26 (Arg) a končící aminokyselinou 281 (Pro), nebo jejich alternativní vedoucí sekvence počínající aminokyselinou 1 (Met) a končící aminokyselinou 21 (Gly) nebo 25 (Ser), mohou být použity pro studium sekrece proteinů z buněk. V jednom z výhodných provedení navrhovaného vynálezu jsou připraveny maturované polypeptidy jako fúzní proteiny s hypotetickými sekrečními signálními sekvencemi; plazmid nesoucí regulační oblasti řídící expresi fúzního proteinu je vnesen do testovaných buněk a je sledována exprese maturovaného proteinu. V jiném z výhodných provedení tohoto aspektu navrhovaného vynálezu jsou alternativní vedoucí sekreční sekvence připraveny jako fúzní proteiny s alternativními proteiny vybranými pro sekreci; plazmid nesoucí regulační oblasti řídící expresi fúzního proteinu je vnesen do testovaných buněk a je sledována exprese zmíněného proteinu. Monitorování sekrece daného proteinu je prováděno běžně používanými technikami, například HPLC a podobně. Vysoce konzervované aminokyseliny, především ty, které se nacházejí v karboxykoncové globulární doméně polypeptidu zsig37, mohou být použity pro identifikaci nových členů této proteinové rodiny. Například RT-PCR (polymerázová řetězová reakce s použitím reverzní transkriptázy) může být použita pro amplifikaci sekvencí kódujících konzervované motivy z RNA získané z celé řady různých zdrojových tkání. Zvláště vhodné jsou v tomto případě degenerované primery navržené podle konzervovaných sekvencí. Konkrétně jsou velmi vhodné následující primery:

1. Aminokyseliny 269-274 SEQ ID NO:2 (odpovídající nukleotidům 975-992 SEQ ID NO:1);
2. Aminokyseliny 191-196 SEQ ID NO:2 (odpovídající nukleotidům 741-758 SEQ ID NO:1);
3. Aminokyseliny 163-168 SEQ ID NO:2 (odpovídající nukleotidům 657-674 SEQ ID NO:1);
4. Aminokyseliny 173-178 SEQ ID NO:2 (odpovídající nukleotidům 687-704 SEQ ID NO:1);
5. Aminokyseliny 243-248 SEQ ID NO:2 (odpovídající nukleotidům 897-914 SEQ ID NO:1);

Navrhovaný vynález se také zabývá degenerovanými sondami odvozenými od polynukleotidů popsaných výše. Sonden odpovídající komplementům výše uvedených polynukleotidů jsou také předmětem vynálezu.

Izolované polynukleotidy podle vynálezu budou za stringentních podmínek s výhodou hybridizovat s podobně velkými úseky SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 nebo s jejich komplementárními sekvencemi. Obecně jsou za stringentní podmínky považovány následující: teplota asi o 5 °C nižší než je teplota tání (T_m) specifické sekvence při definované iontové síle a pH. T_m je teplota (při definované iontové síle a pH), při které 50 % cílových sekvencí hybridizuje s dokonale komplementární sondou. Typické stringentní podmínky jsou takové, kdy koncentrace solí dosahuje asi 0,03 M, pH je 7 a teplota je nejméně 60 °C.

Předmětem navrhovaného vynálezu je dále farmaceutický prostředek obsahující purifikovaný zsig37 polypeptid spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem. Farmaceutický prostředek je určen pro použití k modulaci energetické rovnováhy u savců nebo k ochraně endoteliálních buněk před poškozením.

V otázce modulace energetické rovnováhy, zsig37 polypeptidy ovlivňují buněčné metabolické reakce. Mezi tyto metabolické reakce patří adipogeneze, glukoneogeneze, glykogenolýza, lipogeneze, příjem glukózy, syntéza proteinů, termogeneze, kyslíkový metabolismus a podobně. Charakter exprese zsig37 polypeptidu odpovídá expresi v buňkách endoteliální tkáně. V otázce ochrany endoteliálních buněk může být polypeptid zsig37 použit pro ochranu orgánů, pro ochranu při konzervaci hlubokým zmrazením, v chirurgii pro prevenci poškození následkem ischemie a/nebo zánětu a podobně. Exprese polypeptidu zsig37 v srdeční tkáni předpokládá, že protein může ovlivňovat uvolňování acetylcholinu a/nebo norepinefrinu. Polypeptidy zsig37 mohou nalézt použití také jako neurotransmitery nebo modulátory nervového přenosu, což napovídá exprese polypeptidu ve tkáních asociovaných se sympatickým nebo parasympatickým nervstvem. V souvislosti s tím mohou být zsig37 polypeptidy využity jako modulátory příjmu živin, například příjmu 2-deoxy-glukózy buňkami mozkové tkáně a podobně.

Mezi dalšími obecně známými a používanými metodami nebo zde popsány metodami můžeme uvést například stanovení energetické rovnováhy u savců pomocí monitorování jedné nebo více následujících metabolických funkcí: adipogeneze, glukoneogeneze, glykogenolýza, lipogeneze, příjem glukózy, syntéza proteinů, termogeneze, kyslíkový metabolismus a podobně. Tyto metabolické funkce jsou monitorovány v oboru běžně používanými technikami (*in vitro* nebo na živočišných modelech); bližší popis viz. následující text. Například vliv

inzulinu na regulaci hladiny glukózy se uplatňuje především v játrech, kosterních svalech a v tukové tkáni. Inzulín se v těchto třech typech tkání váže na své buněčné receptory a iniciuje tkáňově specifickou reakci, která má za následek například inhibici produkce glukózy a stimulaci využívání glukózy. V játrech inzulín stimuluje příjem glukózy a inhibuje glukoneogenezi a glykogenolýzu. V kosterních svalech a v tukové tkáni působí inzulín jako stimulátor příjmu, ukládání a využívání glukózy.

Jsou známé metody pro monitorování všech výše zmíněných metabolických funkcí. Zkušený odborník je tedy schopen stanovit schopnost zsig37 polypeptidů, fragmentů, fúzních proteinů, protilátek, agonistů nebo antagonistů ovlivňovat metabolické funkce. Příklady jednotlivých technik jsou uvedeny dále.

Adipogeneze, glukoneogeneze a glykogenolýza jsou vzájemně spjaté pochody ovlivňující energetickou rovnováhu u savců, které mohou být hodnoceny známými metodami s použitím například *ob/ob* myši nebo *db/db* myši. *Ob/ob* myši jsou inbrední myši, mutované v obou alelách *ob* (obezitního) genu (mutovaný gen je neaktivní). Taková zvířata trpí hyperfagií a sníženým metabolismem a předpokládá se, že jsou deficientní v produkci cirkulujícího OB proteinu. Myši s genotypem *db/db* jsou inbrední myši mající homozygotní inaktivující mutaci v *db* (diabetickém) lokusu. Myši s genotypem *db/db* jsou fenotypově podobné *ob/ob* myším, ovšem *db/db* navíc vykazují i diabetický fenotyp. Takové *db/db* myši jsou pravděpodobně rezistentní k účinkům cirkulujícího OB proteinu. Pro stanovení zmíněných parametrů existuje také celá řada *in vitro* metod.

Inzulínem stimulovaná lipogeneze může být například monitorována měřením inkorporace ^{14}C -acetátu do struktury triglyceridů (Mackall *et al.*, J. Biol. Chem. 251: 6462-6464, 1976) nebo měřením akumulace triglyceridů (Kletzien *et al.*, Mol. Pharmacol. 41: 393-398, 1992).

Příjem glukózy může být stanoven například testem sledujícím inzulínem stimulovaný transport glukózy. Netransfektované diferencované L6 svalové buňky („myotubes“) (pěstované bez přítomnosti G418) jsou umístěny v DMEM s obsahem 1 g/l glukózy, 0,5 až 1 % BSA, 20 mM HEPES a 2 mM glutaminu. Po 2 až 5 hodinách kultivace je médium vyměněno za čerstvé DMEM médium bez přídavku glukózy s obsahem 0,5 až 1 % BSA, 20 mM HEPES 1 mM pyruvátu a 2 mM glutaminu. Dále je přidána odpovídající koncentrace inzulínu nebo IGF-1 nebo ředící řada testované látky a buňky jsou inkubovány po dobu 20 až 30 minut. Poté je přidána ^3H nebo ^{14}C značená deoxyglukóza do finální koncentrace $\approx 50 \text{ IM}$ a buňky jsou inkubovány po dobu 10 až 30 minut. Poté jsou buňky rychle promyty chladným pufrem (například PBS) a poté lyzovány vhodným lyzačním činidlem

(například 1% SDS nebo 1 N NaOH). Množství zabudované radioaktivní látky je poté v lyzátu stanoveno pomocí scintilačního počítače. Radioaktivita přijatá buňkou určuje po odečtení nespecifických vazeb, určených inkubací buněk v přítomnosti cytocholasinu b (inhibitoru glukózového transportu), úroveň transportu glukózy. Další metody jsou popsány například v Manchester *et al.*, Am. J. Physiol. 266 (Endocrinol. Metab. 29): E326-E333, 1994 (inzulínem stimulovaný transport glukózy).

Syntéza proteinů může být hodnocena například porovnáním precipitace ^{35}S -methioninem značených proteinů následně po inkubaci testovaných buněk s ^{35}S -methioninem a ^{35}S -methioninem a s předpokládaným modulátorem syntézy proteinů.

Termogeneze může být hodnocena například tak jak je to popsáno v B. Stanley v *The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides*, W. Colmers and C. Wahlestedt (eds.), Humana Press, Ottawa, 1993; str. 457-509; C. Billington *et al.*, Am. J. Physiol. 260: R321, 1991; N. Zarjevski *et al.*, Endocrinology 133: 1753, 1993; C. Billington *et al.*, Am. J. Physiol. 266: R1765, 1994; Heller *et al.*, Am. J. Physiol. 252 (4 Pt 2): R661-7, 1987 a Heller *et al.*, Am. J. Physiol. 245(3): R321-8, 1983. Také úroveň metabolismu, která může být měřena mnoha různými technikami, je nepřímým ukazatelem termogeneze.

Využívání kyslíku může být hodnoceno například tak jak je to popsáno v Heller *et al.*, Pflugers. Arch. 369(1): 55-9, 1977. Tato metoda také zahrnuje analýzu hypothalamické teploty a metabolické produkce tepla. Využívání kyslíku a termoregulace Byly u člověka hodnoceny také metodou popsanou v Haskell *et al.*, J. Appl. Physiol. 51(4): 948-954, 1981.

Mezi dalšími metodami, popsány v odborné literatuře nebo v tomto textu, můžeme zmínit metodu hodnocení ochrany buněk savčí endoteliální tkáně pomocí monitorování funkce endoteliální tkáně. Například funkce srdce (aorty) může být hodnocena pomocí monitorování uvolňování acetylcholinu, uvolňování norepinefrinu a dalších podobných parametrů. Tyto parametry jsou monitorovány technikami (ať již na vzorcích tkáně, nebo na živočišných modelech), které jsou odborníkům dobře známé a které jsou podrobněji vysvětleny dále.

Uvolňování acetylcholinu a norepinefrinu může být sledováno například pomocí HPLC. Levy, *Electrophysiology of the Sinoatrial Nodes*, Alan R. Liss, Inc., 187-197, 1998 popisuje měření norepinefrinu na výtoku z koronárního sinu. U živočichů může být navíc ovlivněna srdeční činnost elektricky („electrical pace“) a výsledky mohou být monitorovány tak jak to popisuje Elsner, European Heart

Journal 16 (Supplement N): 52-8, 1995 a Reiffel and Kuehnert, PACE 17 (Part 1): 349-65, 1994.

Mezi dalšími metodami, popsanými v odborné literatuře nebo v tomto textu, můžeme zmínit metodu hodnocení funkce přenosu nervového vzruchu monitorováním příjmu 2-deoxy-glukózy v mozkové tkáni. Tento parametr je stanovován technikami (ať již na vzorcích tkáně, nebo na živočišných modelech), které jsou odborníkům dobře známé, například autoradiograficky. Vhodné monitorovací techniky jsou popsány například v Kilduff *et al.*, J. Neurosci. 10: 2463-75, 1990; příbuzné metody pro hodnocení „hibernujícího srdce“ jsou popsány v Gerber *et al.*, Circulation 94(4): 651-8, 1996 a Fallavollita *et al.*, Circulation 95(7): 1900-1909, 1997.

Polypeptidy zsig37, jejich fragmenty, fúzní polypeptidy, agonisté a antagonisté mohou být dále použity jako vhodné modulátory anti-mikrobiální funkce nebo přenosu nervového vzruchu. Například složka komplementu C1q hraje roli při obraně hostitele proti infekčním agens, jako jsou například bakterie nebo viry. Je známo, že C1g má několik specializovaných funkcí. C1q například spouští kaskádu komplementu, a to interakcí s navázanou protilátkou nebo s CRP (C-reaktivním proteinem). C1q dále přímo interaguje s některými bakteriemi, RNA viry, mykoplazmami, krystaly kyseliny močové, s lipidem A (složkou bakteriálního endotoxinu) a s membránami některých intracelulárních organel. Předpokládá se, že C1q vazbou na C1q receptor podněcuje fagocytózu. C1q také pravděpodobně podporuje hostitelský obranný systém působením na zvýšení tvorby protilátek. Viz. například Johnston, Pediatr. Infekt. Dis. J. 12(11): 933-941, 1993. Rozpustné molekuly podobné C1q mohou být tedy vhodnými anti-mikrobiálními látkami podněcujícími lýzi nebo fagocytózu infekčních agens.

Polypeptidy zsig37 podle vynálezu také vykazují homologii s látkami, které jsou pravděpodobnými modulátory neurotransmise. Jak je vidět na obrázku 1, zsig37 polypeptidy jsou homologní následujícími proteiny: HP25_TAMAS (Takamatsu *et al.*, Mol. Cell. Biol. 13: 1516-21, 1993 a Kondo & Kondo, J. Biol. Chem. 267: 473-8, 1992); HP27_TAMAS (Takamatsu *et al.*, Mol. Cell. Biol. 13: 1516-21, 1993 a Kondo & Kondo, J. Biol. Chem. 267: 473-8, 1992) a CERL_RAT (Wada & Ohtani, Brain. Res. Mol. Brain Res. 9: 71-7, 1991). HP25 a HP27 jsou polypeptidy, nacházející se v aktivním (letním) séru hibernujících *Eutamias sibiricus*. CERL je přítomen v krysím mozečku. Polypeptidy zsig37, jejich fragmenty, fúzní polypeptidy, agonisté a antagonisté mohou být tedy vhodné pro použití pro modulaci přenosu nervového vzruchu například vazbou neurotransmiterů na jejich receptory.

Hybridizační mapování pomocí radioaktivně značených sond je metodou buněčné genetiky, vyvinutou za účelem mapování savčích chromozómů s vysokým rozlišením (Cox *et al.*, *Science* 250: 245-250, 1990). Částečná nebo úplná znalost sekvence genů umožňuje navržení PCR primerů, vhodných pro použití při mapování chromozómu pomocí hybridizace s radioaktivně značenými sondami. Panely radioaktivně značených hybridizačních sond, pokrývající celý lidský genom jsou komerčně dostupné, například Stanford G3 RH Panel a GeneBridge 4 RH Panel (Research Genetics, Inc. Huntsville, AL). Tyto panely umožňují rychlou lokalizaci genů v rámci chromozómu, založenou na principu PCR a následně objednání těchto genů, oblastí značených určitou sekvencí (STSs, tj. „sequence-tagged sites“) a dalších nepolymorfních a polymorfních markerů v rámci oblasti, která je předmětem našeho zájmu. To zahrnuje přímé stanovení poměrných fyzických vzdáleností mezi nově objevenými geny, které jsou předmětem našeho zájmu, a dříve zmapovanými markery. Přesná znalost pozice genů může být užitečná pro řadu aplikací včetně: 1) určení, zda je sekvence součástí nějakého existujícího většího celku a získání okolních genetických sekvencí v různých formách jako jsou například YAC-, BAC-, nebo cDNA klony; 2) navržení genu jako možného kandidáta na původce dědičného onemocnění, které vykazuje vazbu s odpovídající oblastí chromozómu; 3) použití v referenčních modelových organismech jako jsou například myši, kde mohou napomáhat k určení funkce některého konkrétního genu.

Výsledky prokázaly že gen kódující zsig37 polypeptid je součástí chromozómu 17, oblasti 17q25.2. mapování bylo provedeno s použitím NIGMS Human/Rodent Somatic Cell Hybrid Mapping Panel Number 2 (National Institute of General Medical Sciences, Coriell Institute of medical Research).

Navrhovaný vynález se dále týká reagensů, které nacházejí použití v diagnostických aplikacích. Tak například gen zsig37, sonda obsahující zsig37 DNA nebo RNA nebo jejich sled, mohou být použity pro stanovení přítomnosti genu zsig37 na chromozómu 17 nebo pro stanovení případných mutací zmíněného genu. Zjistitelné chromozomální aberace v genu zsig37 zahrnují aneuploidii, změny v počtu kopií genu, inserce, delece, změny restričních míst, genové přestavby a jiné. Zmíněné aberace mohou nastat uvnitř kódující sekvence, v intronech nebo v lemovací sekvenci včetně upstream promotoru a regulačních oblastí a mohou se projevit jako fyzické změny v kódující sekvenci nebo jako změny v intenzitě exprese genu.

Obecně zahrnují zmíněné diagnostické metody následující kroky: a) získání genetického vzorku od pacienta b) inkubace genetického vzorku s

polynukleotidovou sondou nebo primerem (viz. výše) za podmínek umožňujících hybridizaci polynukleotidu s komplementární polynukleotidovou sekvencí za vzniku prvního reakčního produktu a c) porovnání prvního reakčního produktu s kontrolním reakčním produktem. Rozdíl mezi prvním reakčním produktem a kontrolním reakčním produktem je indikátorem genetické abnormality u sledovaného pacienta. Mezi genetické vzorky pro použití podle navrhovaného vynálezu patří genomová DNA, RNA a cDNA. Polynukleotidové sondy nebo primery mohou být DNA nebo RNA molekuly a obsahují část SEQ ID NO:1, komplementu k SEQ ID NO:1 nebo RNA ekvivalent zmíněných sekvencí. Vhodnými testovacími metodami jsou v tomto případě v oboru obecně známé techniky molekulární genetiky jako například analýza délkového polymorfismu restričních fragmentů (RFLP), analýza krátkých tandemových repetitiv (STR), analýzy využívající PCR, ligační reakce (Barany, PCR Methods and Applications 1: 5-16, 1991), analýzy využívající ochrany části sekvence proti štěpení ribonukleázami (ribonuclease protection assay) a mnohé další (Sambrook *et al.*, *ibid.*, Ausbel *et al.*, *ibid.*; Marian, Chest 108: 255-65, 1995). Ribonuclease protection assay (viz. např. Ausbel *et al.*, *ibid.*, ch. 4) využívá hybridizace RNA sondy se vzorkem pacientovy RNA; vzniklý reakční produkt (RNA-RNA hybrid) je poté vystaven účinkům RNázy. Dvojřetězcové úseky RNA (tedy ty, které byly komplementární a hybridizovaly spolu) jsou proti štěpení RNázou chráněny. Pro PCR analýzy je pacientův genetický vzorek inkubován s párem polynukleotidových primerů a oblast mezi primery je amplifikována. Změny ve velikosti a nebo množství produktu získaného amplifikací ukazují na mutační změnu v pacientově DNA. Další PCR technikou je analýza jednořetězcového konformačního polymorfismu („single strand conformational polymorphism analysis“, SSCP) (Hayashi, PCR Methods and Applications 1: 34-8, 1991).

Stavem asociovaným se 17q25.2 je porucha ukládání glykogenu II („glycogen storage disease II“). Polypeptid zsig37 může být tedy vhodný pro použití při studiu, prevenci nebo léčbě (například genovou terapií) tohoto stavu. Pokud má savčí organismus mutovaný zsig37 gen, nebo ho dokonce postrádá, může být zsig37 gen do savčích buněk uměle vnesen. V jednom z provedení navrhovaného vynálezu je gen kódující zsig37 polypeptid vnesen *in vivo* do virového vektoru. Takovým vektorem je atenuovaný nebo defektní DNA virus, jako například (ale nikoliv výhradně) virus herpes simplex (HSV), papillomavirus, virus Epstein Barrové (EBV), adenovirus, adeno-asociovaný virus (AAV) a podobně. Defektní viry, které úplně a nebo téměř úplně postrádají virové geny, jsou vhodnější. Defektní virus není po vnesení do buněk infekční. Používání defektních virových

vektorů umožňuje jejich vnášení do buněk ve specifických, lokalizovaných oblastech bez nebezpečí že by mohl virus infikovat okolní buňky. Konkrétními příklady vektorů jsou defektní herpes virus 1 (HSV1) (Kaplitt *et al.*, Molec. Cell Neurosci. 2: 320-330, 1991), atenuovaný adenovirový vektor popsáný v Stradford-Perricaudet *et al.*, J. Clin. Invest. 90: 626-630, 1992 a defektní adeno-asociovaný virový vektor (Samulski *et al.*, J. Virol. 61: 3096-3101, 1987; Samulski *et al.*, J. Virol. 63: 3822-3828, 1989). Tento seznam příkladů však v žádném případě není konečný.

V dalším z provedení vynálezu může být gen vnesen do retrovirového vektoru, jaké jsou popsány například 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; Internatinal Patent Publication No. WO 95/07358, March 16, 1995, Dougherty *et al.* a Blood 82: 845, 1993.

Alternativně může být vektor do buněk vnesen *in vivo* lipofekcí s pomocí lipozómů. Pro přípravu lipozómů 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 pro vnášení exogenních genů do specifických orgánů *in vivo* má některé praktické výhody. Jednou z oblastí těchto výhod je molekulární cílení lipozómů do specifických buněk. Je zřejmé, že cílená transfekce do konkrétních buněk představuje jednu z oblastí výhod. Je také zřejmé, že cílená transfekce do konkrétních buněk je zvláště výhodná v případě tkání heterogenních v zastoupení buněčných druhů, jako je například pankreas, játra, ledviny či mozek. Lipidy mohou být chemicky vázány s jinými molekulami za účelem cílení. S lipidy mohou být chemicky vázány za účelem cílení peptidy, například hormony nebo neurotransmitery, proteiny jako například antibiotika a také nepeptidové molekuly.

Je také možné vyjmout buňky z těla, vnést vektor ve formě nahého DNA plazmidu do buněk a poté implantovat transfektované buňky zpět do těla. Nahý DNA vektor pro genovou terapii může být vnesen do požadovaných hostitelských buněk obecně známými metodami, například transfekcí, elektroporací, mikroinjekcí, transdukci, fúzí buněk, pomocí DEAE dextranu, kalcium fosfátové precipitace, nástřelu genu nebo transportéru DNA vektoru, viz. například Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 963-967, 1992, Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 263: 14621-14624, 1988 a Johnston and Tang, Methods in Cell Biology 43: 353-65, 1994.

Dalším aspektem navrhovaného vynálezu jsou antisense polynukleotidové prostředky, které jsou komplementární k segmentu polynukleotidů uvedených v SEQ ID NO:1. Takové syntetické antisense oligonukleotidy jsou navrženy tak, aby vázaly mRNA kódující zsig37 polypeptidy a inhibovaly tak translaci takové mRNA. Takové antisense oligonukleotidy jsou vhodné jako inhibitory exprese genů kódujících zsig37 polypeptidy v buněčných kulturách nebo v odpovídajícím organismu.

Polypeptidy zsig37 mohou být použity také pro analýzu energetické účinnosti u savců. Polypeptidy zsig37 nalezené v séru nebo ve tkáňových vzorcích mohou být indikátorem schopnosti savců ukládat živiny a v případě vyšší účinnosti také sklonů k obezitě. Konkrétně se navrhovaný vynález zabývá způsoby detekce polypeptidu zsig37 zahrnujícími:

inkubaci vzorku, který pravděpodobně obsahuje polypeptid zsig37, s protilátkou navázanou na pevný nosič, kde zmíněná protilátka váže epitop zsig37 polypeptidu; promytí imobilizované protilátky s navázaným polypeptidem za účelem odmytí kontaminant,

inkubaci imobilizované protilátky s navázaným polypeptidem s druhou protilátkou namířenou proti dalšímu epitopu zsig37 polypeptidu, kde zmíněná druhá protilátka je asociována se značkou umožňující detekci a

detekci zmíněné značky. Koncentrace zsig37 polypeptidu v testovaném vzorku je indikátorem energetické účinnosti u testovaného savce. Tato informace může napomáhat analýze výživy savce. Potencionálně může být tato informace užitečná i pro identifikaci a/nebo zacílení energeticky deficientní tkáně.

Mezi dalšími navrhovanými aspekty vynálezu jsou předmětem vynálezu protilátky, které specificky váží polypeptidy zsig37, popsané výše. Takové protilátky jsou, kromě jiného, vhodné pro přípravu anti-idiotypových protilátek. Dalším aspektem navrhovaného vynálezu je způsob identifikace agonistů nebo antagonistů polypeptidů zsig37, popsaných výše, kde zmínění agonisté nebo antagonisté mohou mít cenné vlastnosti, které budou dále podrobněji popsány. Jedním z aspektů vynálezu je způsob identifikace agonistů polypeptidu zsig37 zahrnující získání buněk, rozpoznávajících tyto agonisty, kultivaci těchto buněk v přítomnosti testované látky, porovnání buněčné odpovědi s buňkami kultivovanými v přítomnosti polypeptidu zsig37 a selekci testovaných látek, vykazujících stejný typ buněčné odpovědi.

Dalším z aspektů vynálezu je způsob identifikace antagonistů polypeptidu zsig37 zahrnující získání buněk, rozpoznávajících zsig37 polypeptid, kultivaci první části buněk v přítomnosti zsig37 polypeptidu, kultivaci druhé části buněk v přítomnosti

zsig37 polypeptidu a testované látky a detekci poklesu buněčné odpovědi u druhé části buněk v porovnání s první částí buněk. Kromě již zmíněných testů mohou být vzorky testovány na inhibici aktivity zsig37 celou řadou testů, navržených pro měření vazby na receptor nebo stimulace či inhibice buněčné odpovědi, závislé na zsig37. Buněčné linie, vykazující odpověď na zsig37, mohou být například transfektovány konstruktem reportérového genu, který je citlivý k buněčné dráze, stimulované zsig37. Konstrukty s reportérovým genem tohoto typu jsou v oboru známé a obecně obsahují zsig37-DNA citlivý element, operativně spojený s genem kódujícím snadno stanovitelný protein, například luciferázu. DNA citlivý element může zahrnovat například, ale nikoliv výhradně, cAMP citlivé elementy (CRE), elementy citlivé k hormonům (HRE), element citlivý k inzulinu (IRE) (nasrin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5273-7, 1990) a elementy citlivé k séru (SRE) (Shaw *et al.*, Cell 56: 563-72, 1989). Elementy citlivé k cAMP jsou souhrnně popsány například v Roestler *et al.*, J. Biol. Chem. 263 (19): 9063-6, 1988 a Habener, Molec. Endocrinol. 4 (8): 1087-1094, 1990. Elementy citlivé k hormonům popisuje Beato, Cell 56: 335-344, 1989. U sloučenin, roztoků, směsí nebo extraktů je testována schopnost inhibovat aktivitu zsig37 u cílové populace buněk, která se projevuje poklesem stimulace exprese reportérového genu zsig37. Testy tohoto typu detekují látky, které přímo blokují vazbu zsig37 na receptory na povrchu buněk, stejně jako látky které blokují procesy v buněčných pochodech, které jsou vyvolány vazbou receptoru a ligandu. Alternativně může být u zmíněných sloučenin nebo dalších vzorků testována schopnost přímo blokovat vazbu zsig37 na receptor zsig37 s navázanou značkou, kterou lze snadno detekovat (příkladem může být ^{125}I , biotin, křenová peroxidáza, FITC a podobně). U tohoto typu testů je schopnost inhibovat vazbu značeného zsig37 k receptoru indikátorem inhibiční aktivity, která může být dále potvrzena dalšími sekundárními testy. Receptory, používané v rámci zmíněných testů vazby, mohou být buněčné receptory nebo izolované, imobilizované receptory.

Dalším aspektem navrhovaného vynálezu je metoda pro studium inzulinu. Taková metoda podle vynálezu zahrnuje inkubaci adipocytů v kultivačním médiu s obsahem zsig37 polypeptidu, monoklonální protilátky, agonisty nebo antagonisty zmíněného polypeptidu a buď s nebo bez přídavku inzulinu a sledování změn v sekreci proteinů nebo diferenciaci adipocytů.

Anti-mikrobiální ochranné látky mohou působit přímo nebo nepřímo. Látky, působící cestou asociace s membránou nebo tvorbou pórů, působí přímo na mikroorganismus. Antimikrobiální látky mohou působit také enzymaticky, tj. mohou například rozkládat ochranné látky mikroorganismů nebo jejich buněčné

stěny nebo membrány. Anti-mikrobiální látky, schopné inhibovat proliferaci mikroorganismů nebo jejich působení, či schopné rozrušit integritu mikroorganismů některým z mechanismů, zmíněných výše, jsou vhodné pro prevenci kontaminace buněčných kultur mikroby citlivými ke zmíněným anti-mikrobiálním látkám. Takové způsoby prevence kontaminace zahrnují kultivaci buněk v přítomnosti účinného množství zmíněného zsig37 polypeptidu nebo jeho agonisty či antagonisty.

Polypeptidy zsig37 nebo jejich agonisté mohou být použity v buněčných kulturách jako reagentie pro *in vitro* studie exogenní infekce mikroorganismy, například bakteriemi, viry nebo houbami. Stejně tak mohou být tyto látky použity pro studium infekce *in vivo* na živočišných modelech.

Navrhovaný vynález se dále zabývá metodami studia savčího buněčného metabolismu. Takové metody podle vynálezu zahrnují inkubaci studovaných buněk, například lidských vaskulárních endoteliálních buněk, s a nebo bez přídavku zsig37 polypeptidu, monoklonální protilátky, agonisty nebo antagonisty a sledování změn v adipogenezi, glukoneogenezi, glykogenolýze, lipogenezi, příjmu glukózy a podobně.

Dalším z aspektů vynálezu je způsob studia dimerizace nebo oligomerizace. Zmíněný způsob studia dimerizace nebo oligomerizace podle vynálezu zahrnuje inkubaci zsig37 polypeptidů, fragmentů nebo fúzních proteinů, obsahujících kolagenu podobnou doménu, samostatně nebo spolu s dalšími polypeptidy nesoucími kolagenu podobné domény a sledování asociací, vzniklých mezi kolagenu podobnými doménami. Takové asociace jsou ověřeny HPLC, cirkulárním dichroizmem a podobně.

Jak bylo výše zmíněno, izolované polynukleotidy podle vynálezu zahrnují DNA a RNA. Způsoby izolace DNA a RNA jsou v oboru dobře známé. Obecně je s výhodou izolovat RNA z mozkových nádorů, srdce, placenty, tukové tkáně a podobně, ovšem DNA může být také připravena s použitím RNA z jiných tkání, nebo může být izolována jako genomová DNA. Celková RNA může být připravena s použitím guanidin/HCl extrakce následované izolací pomocí centrifugace v CsCl gradientu (Chirgwin *et al.*, Biochemistry 18: 52-94, 1979). Poly (A)⁺ RNA je připravena z celkové RNA s použitím metod podle Aviv and Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408-1412, 1972. Komplementární DNA (cDNA) je připravena podle poly (A)⁺ RNA s použitím známých metod. Polynukleotidy, kódující zsig37 polypeptidy, jsou poté identifikovány a izolovány například hybridizací nebo pomocí PCR.

Navrhovaný vynález se dále zabývá odpovídajícími polypeptidy a polynukleotidy z jiných druhů (orthology nebo paralogy). Jinými druhy mohou být například (ale nikoliv výhradně) savci, ptáci, obojživelníci, plazi, ryby, hmyz a další obratlovci i bezobratlí. Zvláštní význam mají zsig37 polypeptidy z dalších druhů savců, například myši, krysy, prasečí, ovčí, hovězí, koňské, kočičí, psí a zsig37 polypeptidy primátů. Orthology lidských proteinů mohou být klonovány s použitím prostředků a informací podle navrhovaného vynálezu v kombinaci s běžnými klonovacími technikami. Například cDNA může být klonována s pomocí mRNA získané z tkáně nebo buněk exprimujících protein. Vhodný zdroj mRNA může být identifikován metodou Northern blot s pomocí sond navržených na základě sekvencí podle vynálezu. Z mRNA získané z pozitivní tkáně nebo buněčné linie je poté připravena knihovna. cDNA kódující zsig37 polypeptid může být poté izolována celou řadou způsobů, například hybridizací s totální nebo částečnou lidskou cDNA nebo s jedním nebo více soubory degenerovaných sond, odvozených od sekvencí podle vynálezu. cDNA může být také klonována pomocí PCR (Mullis, U.S. patent 4,683,202) za použití primerů navržených na základě sekvencí podle vynálezu. cDNA knihovna může být použita pro transformaci nebo transfekci hostitelských buněk a exprese požadované cDNA může být poté detekována protilátkami proti zsig37 polypeptidu. Podobné techniky mohou být aplikovány také v případě izolace genomických klonů. Orthology mohou být identifikovány také vyhledáváním v druhově specifických EST databázích s použitím sekvencí podle vynálezu. EST kódující myši zsig37 ortholog byl objeven při prohledávání myši EST databáze (viz. níže). Myši ortholog (SEQ ID NO:43) vykazuje 77% identitu s lidskou sekvencí na úrovni nukleotidové sekvence a 77% identitu na úrovni aminokyselinové sekvence.

Odborníkům je jistě zřejmé, že sekvence SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:2 představují jedinou alelu lidské zsig37 DNA a zsig37 proteinu a že jistě existují další alelické varianty a také možnost alternativního sestřihu. Alelické varianty této sekvence mohou být klonovány pomocí hybridizace cDNA nebo genomových knihoven z různých jedinců standardními technikami. Alelické varianty DNA sekvence zobrazené jako SEQ ID NO:1 včetně těch, které obsahují tiché mutace a těch, kde mutace mají za následek změnu v aminokyselinové sekvenci, jsou také předmětem vynálezu stejně jako alelické varianty SEQ ID NO:2. Předmětem vynálezu jsou také cDNA, vytvořené alternativním sestřihem mRNA a mající vlastnosti zsig37 polypeptidu, stejně jako polypeptidy kódované takovými cDNA a mRNA. Alelické varianty a varianty sestřihu těchto sekvencí mohou být klonovány pomocí

hybridizace cDNA nebo genomových knihoven z různých jedinců nebo tkání standardními, v oboru dobře známými metodami.

Navrhovaný vynález se také zabývá izolovanými zsig37 polypeptidy, které jsou v podstatě homologní s polypeptidy dle SEQ ID NO:2 a jejich druhově specifickými homology/orthology. Termín „v podstatě homologní“ je zde použit pro označení polypeptidů, vykazujících nejméně 50%, raději pak nejméně 60% a nejraději alespoň 80% identitu se sekvencemi SEQ ID NO:2, jejich paralogy nebo orthology. Zmíněné polypeptidy jsou s výhodou nejméně z 90 %, ještě raději pak nejméně z 95 a více % identické se SEQ ID NO:2 nebo jejími orthology nebo paralogy. Procento identity sekvencí je stanoveno konvenčními metodami, viz. například Altschul *et al.*, Bull. Math. Bio. 48: 603-616, 1986 a Henikoff a Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919, 1992. Krátce, dvě aminokyselinové sekvence jsou porovnány tak aby bylo optimalizováno skóre s použitím následujících parametrů: „gap opening penalty“ 10 (postih za vytvoření mezery); „gap extension penalty“ 1 (postih za prodloužení mezery); a „blosum 62“ bodovací matice dle Henikoff a Henikoff (ibid.) viz. tabulka 3 (aminokyseliny jsou označeny standardním jednopísmenným kódem). Procento identity je poté vypočítáno jako:

celkový počet identických párů

x 100

[délka delší sekvence + počet mezer vnesených do
delší sekvence z účelem uspořádání a porovnání
obou sekvencí]

15.03.00

Tabulka 3

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-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 stanovena podobným způsobem a s použitím stejné rovnice, jaká je uvedena pro výpočet podobnosti proteinových sekvencí.

V podstatě homologní proteiny a polypeptidy jsou charakterizovány jako sekvence mající jednu nebo více aminokyselinových substitucí, delecí nebo adicí. Tyto záměny jsou s výhodou minoritních charakteru, tj. konzervativní aminokyselinové substituce (viz. tabulka 4) a další substituce, které nikterak významně neovlivní skládání nebo aktivitu proteinu nebo polypeptidu; krátké delece, typicky dlouhé 1 až 30 aminokyselin a krátké amino- nebo karboxy-koncové extenze, například amino-koncový methionin, krátký spojovací peptid (20 až 25 aminokyselin) nebo krátká sekvence vykazující afinitu k nějakému substrátu. Polypeptidy obsahující afinitní sekvence mohou dále obsahovat místo, rozpoznávané a štěpené proteolytickým enzymem, umístěné mezi zsig37 polypeptidem a afinitní sekvencí. S výhodou je takovým místem například místo specificky štěpené thrombinem nebo faktorem Xa.

Tabulka 4

Konzervativní aminokyselinové substituce

Bazické:	arginin
	lyzin
	histidin
Kyselé:	kyselina glutamová
	kyselina asparagová
Polární:	glutamin
	asparagin
Hydrofobní:	leucin
	izoleucin
	valin
Aromatické:	fenylalanin
	tryptofan
	tyrozin
Malé:	glycin
	alanin
	serin
	threonin
	methionin

Proteiny podle navrhovaného vynálezu mohou dále obsahovat aminokyseliny, které se přirozeně nevyskytují. Mezi tyto aminokyseliny patří například *trans*-3-methylprolin, 2,4-methanoprolin, *cis*-4-hydroxyprolin, *trans*-4-hydroxyprolin, N-methylglycin, *allo*-threonin, methylthreonin, hydroxyethylcystein, hydroxyethylhomocystein, nitroglutamin, homoglutamin, kyselina pipekolová, thiazolidin karboxylová kyselina, dehydroprolin, 3- a 4-methylprolin, 3,3-dimethylprolin, *tert*-leucin, norvalin, 2-azafenylalanin, 3-azafenylalanin, 4-azafenylalanin a 4-fluorofenylalanin. Tento výběr však není v žádném případě limitující. Je známo několik metod pro inkorporaci aminokyselin, které se přirozeně nevyskytují, do struktury proteinů. Příkladem může být *in vitro* systém kde jsou nesmyslné mutace suprimovány s použitím chemicky aminoacylovaných supresorových tRNA. Způsoby syntézy aminokyselin a aminoacylace tRNA jsou v oboru známy. Transkripce a translace plazmidů, nesoucích nesmyslné mutace, jsou prováděny v bezbuněčném systému obsahujícím S30 extrakt z *E. coli* a komerčně dostupné enzymy a další reagenty. Proteiny jsou purifikovány chromatografií. Viz. například Robertson *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 113: 2722, 1991; Ellman *et al.*, Methods Enzymol. 202: 301, 1991; Cung *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10145-9, 1993. Další metodou je translace v oocytech rodu *Xenopus*, do kterých je mikroinjekcí vpravena mutovaná mRNA a chemicky aminoacylované supresorové tRNA (Turcatti *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 19991-8, 1996). Třetím způsobem je kultivace buněk *E. coli* bez přítomnosti přirozeně se vyskytující aminokyseliny, která má být nahrazena (například fenylalaninu) a v přítomnosti požadované aminokyseliny (aminokyselin), která se přirozeně nevyskytuje (například 2-azafenylalaninu, 3-azafenylalaninu, 4-azafenylalaninu nebo 4-fluorofenylalaninu). Aminokyseliny, které se přirozeně nevyskytují, jsou zabudovány do struktury proteinů na místo jejich přirozeně se vyskytujících protějšků (viz. Koide *et al.*, Biochem. 33: 7470-6, 1994). Přirozeně se vyskytující aminokyselinové zbytky mohou být konvertovány na ty, které se v přírodě nevyskytují, *in vitro* chemickou modifikací. Chemická modifikace může být kombinována s místně specifickou mutagenézí, čímž může být ještě rozšířen rozsah substitucí (Wynn and Richards, Protein Sci. 2: 395-403, 1993).

V aminokyselinové sekvenci zsig37 může být proveden omezený počet nekonzervativních substitucí, tj. mohou být zařazeny aminokyseliny, které nejsou kódovány genetickým kódem a nevyskytují se přirozeně.

Esenciální aminokyseliny mohou být v polypeptidech podle vynálezu identifikovány v oboru známými technikami, například místně specifickou mutagenézí nebo alanine-scanning mutagenézí (Cunningham and Wells, Science

244: 1081-5, 1989; *Bass et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4498-502, 1991). Druhá z technik je založena na vnesení vždy jediné alaninové mutace na místo každého aminokyselinového zbytku v molekule a u výsledných mutantních molekul je testována jejich biologická aktivita (například schopnost ovlivňovat energetickou rovnováhu) a tak jsou stanoveny aminokyselinové zbytky, které jsou kritické pro zachování biologické aktivity molekuly. Viz. například *Hilton et al.*, J. Biol. Chem. 271: 4699-708, 1996. Fyzikální analýzou struktury mohou být určena i místa zodpovědná za vazbu ligand-receptor nebo jiné biologické interakce. Vhodnými technikami jsou například nukleární magnetická rezonance, krystalografie, elektronová difrakce, nebo fotoafinitní značení ve spojení s mutací aminokyselin v potencionálním místě kontaktu. Viz. například *de Vos et al.*, Science 255: 306-12, 1992; *Smith et al.*, J. Mol. Biol. 224: 899-904, 1992; *Wlodaver et al.*, FEBS Letters 309: 59-64, 1992. Esenciální aminokyseliny mohou být stanoveny také analýzou homologii s příbuznými polypeptidy.

Mnohočetné aminokyselinové substituce mohou být prováděny i testovány pomocí známých způsobů mutagenese a známých testovacích metod, viz. například *Reidhaar-Olson and Sauer*, Science 241: 53-7, 1988 nebo *Bowie and Sauer*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-6, 1989. Krátce, tyto autoři popisují techniky pro simultánní randomizaci dvou nebo více pozic v polypeptidu a následné sekvenování mutovaných polypeptidů za účelem stanovení spektra přípustných substitucí v každé pozici. Mezi další metody, které mohou být použity, patří fágová expozice (např. *Lownam et al.*, Biochem. 30: 10832-7, 1991; *Ladner et al.*, U.S. patent No. 5,223,409; *Huse*, WIPO Publication WO 92/06204) a oblastně-specifická mutagenese (*Derbyshire et al.*, Gene 46: 145, 1986; *Ner et al.*, DNA 7: 127, 1988).

Varianty navrhovaných λ 37 DNA a polypeptidových sekvencí mohou být připraveny metodou náhodné mutagenese přenosem DNA („DNA shuffling“) tak jak ji popisuje *Stemmer*, Nature 370: 389-91, 1994, *Stemmer*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-51, 1994 a WIPO Publication WO 97/20078. Krátce, varianty DNA jsou tvořeny *in vitro* homologní rekombinací, náhodnou fragmentací rodičovské DNA následovanou opětovným sestavením pomocí PCR, čímž vznikají náhodně umístěné bodové mutace. Tato technika může být modifikována použitím rodiny rodičovských DNA, jako jsou například alelické varianty nebo DNA pocházející z různých druhů, čímž je do procesu vnesena další, širší variabilita. Selektce mutant s požadovanou aktivitou, následovaná další mutagenézí a dalšími testy, je rychlou metodou „vývoje“ sekvencí výběrem žádoucích mutací a zároveň vyloučením nežádoucích mutací.

Metody mutagenese, které byly popsány výše, mohou být kombinovány s vysoce účinnými automatizovanými metodami testování aktivity klonovaných mutovaných polypeptidů v hostitelských buňkách. Mutované molekuly DNA, kódující aktivní polypeptidy (například schopné modulovat energetickou rovnováhu) mohou být pomocí moderního vybavení z hostitelských buněk izolovány a rychle sekvenovány. Tyto moderní metody umožňují rychlou determinaci důležitosti jednotlivých aminokyselinových zbytků v sekvenci polypeptidu, který je předmětem našeho zájmu, a mohou být aplikovány i na polypeptidy neznámé struktury.

S použitím výše zmíněných metod může odborník identifikovat a/nebo připravit širokou škálu polypeptidů, které jsou v podstatě homologní s aminokyselinovými zbytky 22 až 281 SEQ ID NO:2, nebo jejich alelickými variantami a které zachovávají schopnost modulovat energetickou rovnováhu nebo jiné vlastnosti proteinu divokého typu. Takové polypeptidy mohou obsahovat navíc některé aminokyseliny, například další kolagenové repetice Gly-Xaa-Pro nebo Gly-Xaa-Xaa typu. Takové polypeptidy mohou také obsahovat další polypeptidové segmenty, které byly obecně popsány výše.

Polypeptidy podle vynálezu včetně proteinů plné délky, jejich fragmentů a fúzních proteinů mohou být produkovány v geneticky upravených hostitelských buňkách běžně známými způsoby. Vhodné hostitelské buňky jsou takové, které mohou být transformovány nebo transfektovány exogenní DNA a které rostou v kultuře. Takovými buňkami mohou být buňky bakterií, hub a některé kultivované buňky vyšších eukaryot. Eukaryotické buňky, zvláště kultury buněk mnohobuněčných organismů, jsou zvláště vhodné. Techniky pro manipulaci s klonovanou DNA a pro vnášení exogenní DNA do různých typů hostitelských buněk jsou popsány v Sambrook *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Ny, 1989 a Ausbel *et al.*, (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY 1987.

Obecně, DNA sekvence kódující zsig37 polypeptid podle navrhovaného vynálezu je operativně spojena s dalšími genetickými elementy, nezbytnými pro expresi zmíněné sekvence, obecně zahrnujícími promotor a terminátor transkripce uvnitř expresního vektoru. Vektor také obvykle obsahuje jeden nebo více selekčních markerů a jeden nebo více počátků replikace, ačkoliv odborníci vědí, že u některých systémů jsou selekční markery umístěny na zvláštních vektorech a replikace exogenní DNA může být zajištěna integrací vektoru do genomu hostitelské buňky. Výběr promotorů, terminátorů, selekčních markerů, vektorů a dalších elementů je věcí rutiny a zkušeností odborného pracovníka. Množství

takových elementů je popsáno v literatuře a běžně dostupné od komerčních dodavatelů.

Aby bylo možné nasměrovat zsig37 do sekreční dráhy hostitelské buňky, musí expresní vektor obsahovat také operativně připojenou sekreční signální sekvenci (známou také jako vedoucí sekvenci, signální sekvenci, prepro-sekvenci nebo pre-sekvenci). Sekreční signální sekvence může být buď vlastní signální sekvence zsig37 polypeptidu, nebo může být odvozena od signální sekvence jiného sekretovaného proteinu (např. t-PA), nebo může být syntetizována *de novo*. Sekreční signální sekvence je připojena k DNA sekvenci polypeptidu zsig37 ve správném čtecím rámci. Sekreční signální sekvence je obvykle umístěna v 5'pozici vzhledem k DNA sekvenci kódující polypeptid, který je předmětem našeho zájmu, ačkoliv některé signální sekvence mohou být umístěny kdekoli v DNA sekvenci, určené pro sekreci (viz. např. Welch *et al.*, U.S. patent No. 5,037,743; Holland *et al.*, U.S. patent No. 5,143,830). Naopak signální sekvence polypeptidu zsig37 (aminokyseliny 1-21 nebo 1-25 SEQ ID NO:2) může být stejným způsobem použita pro zajištění sekrece alternativního proteinu.

Sekreční signální sekvence polypeptidů podle navrhovaného vynálezu mohou být použity také pro směřování jiných polypeptidů do sekreční dráhy hostitelských buněk. Předmětem navrhovaného vynálezu jsou i takové fúzní polypeptidy. Signální fúzní polypeptid může být připraven tak, že je běžně známými a zde popsanými technikami sekreční signální sekvence odvozená od aminokyselinových zbytků 1-22 nebo 1-25 SEQ ID NO:2 operativně spojena s jiným polypeptidem. Sekreční signální sekvence fúzních polypeptidů podle vynálezu je s výhodou N-terminálně fúzována s jiným peptidem aby směřovala tento jiný peptid do sekreční dráhy hostitelské buňky. Takové konstrukty nacházejí v oboru nesčetně uplatnění. Například, tyto nové fúzní konstrukty sekrečních signálních sekvencí mohou řídit sekreci aktivní složky proteinu, který za normálních okolností není sekretován, například receptoru. Takové fúzní konstrukty mohou být použity pro zajištění sekrece peptidů *in vivo* i *in vitro*.

Savčí buňky pěstované v kultuře jsou pro potřeby navrhovaného vynálezu vhodnými hostitelskými buňkami. Způsob vnášení exogenní DNA do savčích hostitelských buněk zahrnuje transfekci usnadněnou fosforečnanem vápenatým (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), elektroporaci (Neumann *et al.*, EMBO J. 1: 841-845, 1982), transfekci zprostředkovanou DEAE-dextranem (Ausbel *et al.*, eds. Current protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. NY, 1987), transfekci zprostředkovanou lipozómy (Hawley-

Nelson *et al.*, Focus 15: 73, 1993; Ciccarone *et al.*, Focus 15: 80, 1993) a vnášení pomocí virových vektorů (A. Miller and G. Rosman, BioTechniques 7: 980-90, 1989; Q. Wang and M. Finer, Nature Med. 2: 714-16, 1996). Produkce rekombinantních polypeptidů v kultuře savčích buněk je popsána 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. Vhodnými savčími buňkami, pěstovanými v kultuře, jsou například COS-1 (ATCC No. CRL 1650), COS-7 (ATCC No. CRL 1651), BHK 570 (ATCC No. CRL 10314), 293 (ATCC NO. CRL 1573; Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977) a vaječnickové buňky čínského křečka (Chinese hamster ovary cells, například CHO-K1; ATCC No. CCL 61). V oboru jsou známy i další vhodné buněčné linie, dostupné ve veřejných sbírkách jako je například American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Obecně jsou vhodné silné transkripční promotory, například SV-40 promotor nebo promotor cytomegaloviru. Viz. například U.S. patent No. 4,956,288. Dalšími vhodnými promotory jsou metalothioneinové geny (U.S. patenty 4,579,821 a 4,601,978) a hlavní adenovirový pozdní promotor.

Selekčním faktorem, který je obecně nejčastěji používán pro selekci kultivovaných savčích buněk, do kterých byla vnesena exogenní DNA, je selekce na některá léčiva. Buňky, do kterých byla vnesena exogenní DNA se obvykle nazývají „transfektanty“. Buňky, které byly kultivovány v přítomnosti selekčního agens a jsou schopné přenášet gen, který je předmětem našeho zájmu, na potomstvo, se nazývají „stabilní transfektanty“. Výhodným selekčním markerem je gen kódující rezistenci k antibiotiku neomycinu. Selektce je poté prováděna v přítomnosti antibiotika neomycinového typu, například G-418 a podobně. Selektční systémy mohou být použity také pro zvýšení úrovně exprese genu, který je předmětem našeho zájmu, a to procesem zvaným amplifikace. Amplifikací se zde rozumí kultivace transfektantů v přítomnosti nízké koncentrace selekční látky a následné zvýšení koncentrace selekční látky za účelem selekce buněk, které produkují vysoké množství produktů cizorodých, vnesených genů. Zvláště vhodným selekčním markerem pro amplifikaci je dihydrofolát reduktáza, která buňkám uděluje rezistenci k methotrexátu. Ovšem mohou být použity i jiné rezistenci kódující geny (např. gen pro rezistenci k hygromycinu, geny pro mnohočetnou rezistenci („multi-drug resistance“), gen pro puromycin acetyltransferázu). Jiné markery, které pozmění fenotyp buněk, například zelený fluorescenční protein, povrchové buněčné proteiny jako CD4, CD8, MHC I, placentální alkalická fosfatáza a podobně, mohou být použity pro vyřídění

transfektantů od netransfektovaných buněk metodami jako je například FACS nebo separace pomocí magnetických kuliček.

Jako hostitelské buňky mohou být použity i jiné buňky vyšších eukaryot včetně buněk rostlin, hmyzu a ptáků. Použití *Agrobacterium rhizogenes* ve funkci vektoru pro vnášení expresních genů do rostlinných buněk bylo popsáno Sinkar *et al.*, J. Biosci. (Bangalore) 11: 47-58, 1987. Transformaci hmyzích buněk a produkci cizorodých polypeptidů v těchto buňkách popisuje Guarino *et al.*, U.S. patent No. 5,162,222 a WIPO publication WO 94/06463. Hmyzí buňky mohou být infikovány rekombinantním bakulovirem, obvykle odvozeným od *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV). Viz. King and Possee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, London, Chapman & Hall; O'Reilly *et al.*, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York, Oxford University Press., 1994; Richardson C.D., Ed. Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995. Další způsob přípravy rekombinantních zsig37 bakulovirů využívá systém založený na transpozónech, popsáný Luckowem (Luckow *et al.*, J. Virol. 67: 4566-79, 1993). Tento systém, využívající transferových vektorů, je prodáván v sadě Bac-to-Bac™ (Life Technologies, Rockville, MD). Tento systém využívá transferového vektoru pFastBac1™ (Life Technologies) obsahujícího transpozon Tn7 k přenosu DNA kódující zsig37 polypeptid do bakulovirového genomu, udržovaného v buňkách *E. coli* ve formě velkého plazmidu nazývaného „bacmid“. Viz. Hill-Perkins and Possee, J. Gen. Virol. 71: 971-6, 1990; Bonning *et al.*, J. Gen. Virol. 75: 1551-6, 1994 a Chazenbalk and Rapoport, J. Biol. Chem. 270: 1543-9, 1995. Kromě toho mohou transferové vektory obsahovat také „in-frame“ (zachovávající správný čtecí rámec) fúzi s DNA kódující na C- nebo N- konci exprimovaného zsig37 polypeptidu nějaký rozpoznatelný epitop, například Glu-Glu (Grussenmeyer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952-4, 1985). Pomocí v oboru známých technik jsou buňky *E. coli* transformovány transferovým vektorem obsahujícím zsig37 a poté jsou testovány na přítomnost bacmidu s přerušným lacZ genem, indikátorem rekombinantního bakuloviru. Bacmidová DNA, obsahující rekombinantní bakulovirový genom je běžným způsobem izolována a použita pro transfekci buněk *Sodoptera frugiperda*, například buněčné linie Sf9. Výsledkem je produkce rekombinantního viru exprimujícího zsig37. Zásobní rekombinantní virus je připraven v oboru běžně známými metodami.

Rekombinantní virus je použit pro infekci hostitelských buněk, typicky buněčné linie odvozené od *Sodoptera frugiperda*. Pro obecné informace viz. Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant

DNA, ASM Press, Washington D.C., 1994. Další vhodnou buněčnou linií je High FiveOTM (Invitrogen), odvozená od *Trichoplusia ni* (U.S. patent #5,300,435). Pro pěstování a udržování buněčných linií jsou používána komerčně dostupná bezsérová média. Vhodnými médii jsou Sf900 IITM (Life Technologies) nebo ESF 921TM (Expression Systems) pro Sf9 buňky a Ex-cell0405TM (JRH Biosciences, Lenexa, KS) nebo Express FiveOTM (Life Technologies) pro *T. ni* buňky. Buňky jsou inokulovány v konečné koncentraci přibližně $2-5 \times 10^5$ a jsou pěstovány až do denzity $1-2 \times 10^6$ buněk. V tomto okamžiku je přidán zásobní roztok rekombinantního viru při multiplicitě infekce (MOI) 0,1 až 10, typicky okolo 3. Použité postupy jsou obecně vysvětleny v běžně dostupných laboratorních příručkách (King and Possee, *ibid.*; O'Reilly *et al.*, *ibid.*; Richardson, *ibid.*). Následná purifikace polypeptidu zsig37 ze supernatantu může být provedena metodami, které jsou popsány zde.

Buňky hub, včetně buněk kvasinek, mohou být také použity podle navrhovaného vynálezu. Zvláště vhodnými kvasinkami pro tento účel jsou *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* a *Pichia methanolica*. Metody transformace buněk *Saccharomyces cerevisiae* exogenní DNA a produkce rekombinantních polypeptidů v těchto kvasinkách popisují například 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 selektovány na základě fenotypu, určeného selekčním markerem, kterým obvykle bývá rezistence k nějakému léčivu nebo schopnost růst v nepřítomnosti některé živiny (například leucinu). Preferovaným vektorovým systémem pro použití u *Saccharomyces cerevisiae* je POT1 vektorový systém popsán v Kawasaki *et al.*, U.S. patent No. 4,931,373, který umožňuje selekci transformovaných buněk na základě růstu v médiu s obsahem glukózy. Promotory a terminátory, vhodné pro použití v kvasničných systémech jsou promotory a terminátory genů pro glykolytické enzymy (viz. například Kawasaki, U.S. patent No. 4,599,311; Kingsman *et al.*, U.S. patent No. 4,615,974 a Bitter, U.S. patent No. 4,977,092) a genů pro alkohol dehydrogenázu. Viz. také U.S. patenty 4,990,446; 5,063,154; 5,139,936 a 4,661,454. V oboru jsou známé i transformační systémy pro další kvasinky včetně *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* a *Candida maltosa*. Viz. například Gleeson *et al.*, *J. Gen. Microbiol.* 132: 3459-65, 1986 a Cregg, U.S. patent No. 4,882,279. Buňky plísně rodu *Aspergillus* mohou být využity způsobem podle McKnight *et al.*, U.S. patent No. 4,935,349. Způsoby

transformace *Acremonium chrysogenum* jsou popsány v Sumino *et al.*, U.S. patent No. 5,162,228. Způsoby transformace buněk *Neurospora* popisuje U.S. patent No. Lambowitz, U.S. patent No. 4,486,533.

Použití *Pichia methanolica* jako hostitelského organismu pro produkci rekombinantních proteinů je popsáno ve WIPO Publications WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 a WO 98/02565. DNA molekuly pro transformaci *Pichia methanolica* jsou obvykle připraveny jako dvojřetězcové cirkulární plazmidy, které jsou s výhodou před transformací linearizovány. Pro produkci polypeptidů v *Pichia methanolica* je s výhodou, jsou-li použitý promotor a terminátor transkripce na plazmidu promotorem resp. terminátorem některého z *P. methanolica* genů, například *P. methanolica* genu pro využití alkoholu („alcohol utilization gene“ *AUG1* nebo *AUG2*). Dalšími vhodnými promotory jsou promotory genů pro dihydroxyaceton syntázu (DHAS), formát dehydrogenázu (FMD) a katalázu (CAT). Pro usnadnění integrace DNA do hostitelského chromozómu je s výhodou, je-li segment DNA, určený pro expresi v plazmidu na obou koncích ohraničen sekvencemi hostitelské DNA. Selektivním markerem, vhodným pro použití v *P. methanolica* je *P. methanolica ADE2* gen, kódující fosforibosyl-5-aminoimidazol karboxylázu (AIRC; EC 4.1.1.21), umožňující *ade2* pozitivním hostitelským buňkám růst bez přítomnosti adeninu. Pro velkokapacitní průmyslové využití, kdy je žádoucí minimalizovat použití methanolu, je s výhodou používat hostitelské buňky, ve kterých byly oba dva geny pro využití methanolu (*AUG1* a *AUG2*) deletovány. Pro výrobu sekretovaných proteinů je s výhodou používat hostitelské buňky, deficientní v genech pro vakuolární proteázu (*PEP4* a *PRB1*). Pro usnadnění vstupu plazmidu, obsahujícího DNA kódující polypeptid, který je předmětem našeho zájmu, do buněk *P. methanolica* je používána metoda elektroporace. Je výhodné transformovat buňky *P. methanolica* elektroporací s použitím exponenciálně klesajícího pulzního elektrického pole o síle od 2,5 do 4,5 kV/cm, nejraději 3,75 kV/cm a s časovou konstantou (τ) od 1 do 40 milisekund, nejraději 20 milisekund.

Také prokaryotické buňky včetně buněk *E. coli*, *Bacillus* a jiných rodů jsou pro použití podle vynálezu vhodnými hostitelskými buňkami. Techniky transformace těchto hostitelských buněk a exprese cizorodé DNA v těchto buňkách jsou obecně známé a jsou popsány například v Sambrook *et al.*, *ibid.* Při expresi polypeptidu zsig37 v bakteriálních buňkách, například v *E. coli*, je obvykle polypeptid shromažďován v cytoplasmě, typicky ve formě nerozpustných granulí, nebo může být bakteriální sekreční cestou směřován do periplazmatického prostoru. V prvním případě musí být buňky lyzovány a granule jsou získávány a denaturovány

například pomocí guanidinisothiokyanátu nebo močoviny. Denaturovaný polypeptid může být poté znovu renaturován a dimerizován například dialýzou proti roztoku močoviny a směsi redukovaného a oxidovaného glutathionu a následně dialýzou proti pufrovanému roztoku soli. Ve druhém případě je protein získáván z periplazmatického prostoru v rozpustné a funkční formě po rozbití buněk (například sonikací nebo osmotickým šokem), kdy je obsah periplazmatického prostoru uvolněn do prostředí. V tomto případě je možné se vyhnout denaturaci a opětné renaturaci proteinu.

Transformované nebo transfektované hostitelské buňky jsou kultivovány obvyklým způsobem v kultivačním médiu s obsahem živin a dalších složek nezbytných pro růst vybraných hostitelských buněk. Odborníkům je jistě známa celá řada vhodných médií včetně definovaných médií a komplexních médií, která obecně obsahují zdroj uhlíku, zdroj dusíku, esenciální aminokyseliny, vitamíny a minerály. Média mohou dále v případě potřeby obsahovat takové složky jako například růstové faktory nebo sérum. Kultivační médium je obvykle selekčním médiem pro buňky obsahující exogenní DNA. Příkladem může být selekční růst v přítomnosti nějakého antibiotika nebo naopak v nepřítomnosti některé esenciální živiny, kdy je neschopnost růstu v nepřítomnosti této živiny komplementována selekčním markerem přítomným na expresním vektoru nebo kotransfektovaným do hostitelské buňky spolu s expresním vektorem.

Exprimované rekombinantní polypeptidy zsig37 (nebo chimérní zsig37 polypeptidy) mohou být purifikovány s použitím frakcionace a/nebo běžnými purifikačními metodami a s použitím běžných médií. Jako metody frakcionace vzorků mohou být použity precipitace amonium sulfátem a kyselá nebo chaotropní extrakce. Purifikace může zahrnovat například následující kroky: rozdělení podle velikosti na hydroxyapatitové koloně, FPLC a HPLC na reverzní fázi. Mezi vhodná chromatografická média patří derivatizované dextrany, agaróza, celulóza, polyakrylamid, speciální silikáty a podobně. Zvláště vhodné jsou PEI, DEAE, QAE a Q deriváty. Dalšími příklady chromatografických médií jsou média derivatizovaná fenylovými, butylovými nebo oktylovými skupinami, například Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) a podobně; nebo polyakrylátové pryskyřice jako Amberchrom CG 71 (Toso Haas) a podobně. Vhodnými pevnými nosiči jsou skleněné kuličky, pryskyřice na bázi křemičitanů či celulózy, agarózové kuličky, zesíťované agarózové kuličky, polystyrénové kuličky, zesíťované polyakrylamidové pryskyřice a podobně, tj. látky, které jsou za používaných podmínek nerozpustné. Tyto nosiče mohou být modifikovány

reaktivními skupinami, které umožňují zachycení proteinů jejich aminoskupinami, karboxylovými skupinami, sulfhydrylovými skupinami, hydroxylovými skupinami a/nebo uhlovodíkovými řetězci. Příkladem modifikace zmíněných nosičů je aktivace kyanobromidem, N-hydroxysukcinimidem, epoxidová aktivace, sulfhydrylová aktivace, hydrazidová aktivace a použití karboxy a aminoderiváty karbodiimidů. Tato a další pevná média jsou v oboru dobře známá a široce používaná a jsou dostupná od komerčních dodavatelů. Také způsoby navázání receptorových polypeptidů na pevné nosiče jsou v oboru známé. Výběr média a konkrétní způsob modifikace jsou věci rutiny a konkrétních potřeb a jsou zčásti závislé na zvoleném pevném nosiči. Viz. například Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988.

Polypeptidy podle vynálezu mohou být izolovány na základě znalostí jejich strukturních a vazebných vlastností. Například IMAC chromatografie (chromatografie adsorpcí na imobilizované kovové ionty) může být použita pro purifikaci proteinů bohatých histidinem nebo proteinů majících His-afinitní sekvenci (tzv. His-tag). Krátce, gel je nejprve nabit dvojmocnými kovovými ionty za vzniku chelátu (E. Sulkowski, Trends in Biochem. 3: 1-7, 1985). Proteiny bohaté histidinem jsou poté na tuto matici adsorbovány, a to s různou afinitou v závislosti na použitých kovových iontech, a poté jsou eluovány kompetitivní elucí, tj. snížením pH nebo pomocí silných chelatačních činidel. Mezi další způsoby purifikace patří purifikace glykosylovaných proteinů lektin-afinitní chromatografií a iontoměničovou chromatografií (Methods in Enzymol., Vol. 182, „Guide to Protein Purification“, M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp. 529-39). V dalším z výhodných provedení vynálezu je připraven fúzní polypeptid obsahující polypeptid, který je předmětem našeho zájmu, a afinitní skupinu (například. maltóza-vazebný protein, FLAG, Glu-Glu, imunoglobulinovou doménu ..). Konstrukce takového fúzního polypeptidu velmi usnadní purifikaci, což bude podrobněji diskutováno v kapitole „Příklady provedení vynálezu“.

S výhodou mohou být použity metody opětovného složení proteinu po denaturaci a případně i jeho reoxidace. Je s výhodou purifikovat protein na čistotu >80 %, ještě raději >90 %, ještě raději >95 % a vůbec nejvhodnější je získat protein ve farmaceuticky čistém stavu, tj. v čistotě větší než 99 % s ohledem na kontaminující makromolekuly, především jiné proteiny nebo nukleové kyseliny, a zcela bez přítomnosti infekčních nebo pyrogenních agens. Je s výhodou, je-li protein v podstatě bez příměsí dalších proteinů, především proteinů živočišného původu.

Polypeptidy zsig37 i jejich fragmenty mohou být připraveny také chemickou syntézou. Takové zsig37 polypeptidy mohou být monomerní nebo multimerní, glykosylované nebo neglykosylované, pegylované (t.j. modifikované polyethylenglykolem za účelem snížení jejich antigenicity, pozn. překladatele) nebo nepegylované a mohou či nemusí obsahovat iniciační methioninový zbytek.

Pro purifikaci zsig37 polypeptidu může být použita také metoda vazby ligandu polypeptidem, například zsig37 vazebným polypeptidem. Polypeptid je imobilizován na pevném nosiči, například skleněných kuličkách, agaróze, zesíťované agaróze, celulózních pryskyřicích, křemenných pryskyřicích, polystyrénu, zesíťovaném polyakrylamidu a podobných materiálech, které jsou v použitých podmínkách stabilní. Metody vazby polypeptidu na pevný nosič jsou v oboru známe a patří k nim například aktivace brómkyanem, aktivace N-hydroxysukcinimidem, epoxidem, sulfhydrylová aktivace a hydrazidová aktivace. Výsledné médium je obvykle plněno do kolony a tekutinou, obsahující ligand, je kolona jednou nebo několikrát promyta, čímž je umožněna vazba ligandu na vážící polypeptid. Ligand je poté z kolony vymýván změnou koncentrace solí, chaotropní látkou (například guanidin HCl) nebo změnou pH za účelem rozrušení vazby ligand-receptor.

S výhodou může být použit systém který využívá vazby ligand-receptor (nebo protilátky, některého z párů komplement/anti-komplement) a komerčně zařízení (BIAcoreTM, Pharmacia Biosenzor, Piscataway, dostupného biosenzorického NJ). Takový receptor, protilátka, jedna ze složek páru komplement-anti-komplement, nebo fragment je imobilizován na povrchu receptorového čipu. Použití takového přístroje je popsáno v Karlsson, *J. Immunol. Methods* 145: 229-40, 1991 a Cunningham and Wells, *J. Mol. Biol.* 234: 554-63, 1993. Takový receptor, protilátka, jedna ze složek páru komplement/anti-komplement, nebo fragment je kovalentně navázán s použitím aminové nebo sulfhydrylové vazby na dextranová vlákna která jsou přichycena na zlatý film v průtokové komoře. Testovaný vzorek prochází skrze průtokovou komoru. Je-li ligand, epitop nebo druhý člen páru komplement/anti-komplement přítomen ve vzorku, naváže se na imobilizovaný receptor, protilátku nebo první člen páru komplement/anti-komplement a způsobí změnu refrakčního indexu média, která je zachycena jako změna povrchové plazmonové rezonance zlatého filmu. Tento systém umožňuje výpočet vazebné afinity a stanovení stechiometrie vazby.

Ligand-vážící polypeptidy mohou být použity i v dalších testovacích systémech. Patří sem například Scatchardova analýza pro stanovení vazebné afinity (viz. Scatchard, *Am. NY Acad. Sci.* 51: 660-72, 1949) a kalorimetrické testy

(Cunningham *et al.*, Science 253: 545-48, 1991; Cunningham *et al.*, Science 245: 821-25, 1991).

Polypeptidy zsig37 mohou být také použity pro přípravu protilátek, které specificky váží zsig37 polypeptidy, peptidy či epitopy. Způsoby přípravy polyklonálních nebo monoklonálních protilátek jsou odborníkům dobře známé (viz. například Sambrook *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 a Hurrell, J.G.R., Ed. Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982).

Polyklonální protilátky mohou být připraveny inokulací celé řady teplokrevných živočichů jako jsou koně, krávy, kozy, ovce, psi, kuřata, králíci, myši, křečci, morčata a krysy, stejně jako transgenních zvířat jako transgenních ovcí, krav, koz nebo prasat. Protilátky mohou být exprimovány také v kultuře savčích nebo hmyzích buněk nebo v modifikované formě v kvasinkách nebo houbách. Polypeptid zsig37 nebo jeho fragment slouží jako antigen (imunogen), kterým je živočich zaočkován a který vyvolá imunitní odpověď. Vhodnými antigeny jsou polypeptid zsig37 kódovaný SEQ ID NO:2 počínaje aminokyselinou 22 a konče aminokyselinou 281, dále zsig37 kódovaný SEQ ID NO:2 počínaje aminokyselinou 26 a konče aminokyselinou 281 a nebo 9 až 281 fragment SEQ ID NO:2. imunogenicita zsig37 polypeptidu může být zvýšena použitím adjuvans, například hydroxidu hlinitého nebo kompletního nebo nekompletního Freundova adjuvans. Mezi polypeptidy, vhodné pro imunizaci patří také fúzní polypeptidy jako zsig37 polypeptid nebo jeho část fúzovaný s imunoglobulinem nebo s afinitní skupinou. Polypeptidovým imunogenem může být molekula plné délky a nebo jen její část. Je-li část polypeptidu natolik malá, že se podobá haptenu, je s výhodou navázat pro účely imunizace tento polypeptid k makromolekulárnímu nosiči jako je například KLH (hlavní klíčový hemocyanin), BSA (hovězí sérový albumin) nebo tetanový toxoid.

Termín „protilátky“ tak jak je použit zde označuje polyklonální protilátky, afinitně purifikované polyklonální protilátky, monoklonální protilátky a antigen-vážící fragmenty jako F(ab')₂ a Fab proteolytické fragmenty. Dále se termín vztahuje na intaktní protilátky připravené metodami genového inženýrství, Fv fragmenty, jednořetězcové protilátky a podobně, stejně jako na syntetické antigen-vážící peptidy a polypeptidy. Protilátky ne-lidského původu mohou být humanizovány „naroubováním“ pouze CDR částí na „kostru“ lidského původu, tj. variabilní doména je ne-lidského původu a konstantní části protilátky jsou lidské. Případně mohou být ještě exponované části variabilní oblasti zaměněny tak aby se

podobaly lidským, kdy je výsledkem tzv. „dýchovaná“ protilátka. V některých případech mohou mít humanizované protilátky některé aminokyseliny ne-lidského původu v jinak lidské variabilní doméně, což může zvýšit žádoucí vazebné charakteristiky. Díky humanizovaným protilátkám může být prodloužen biologický poločas a je snížena možnost nežádoucí imunitní reakce po podání lidskému pacientu. Dalšími technikami přípravy nebo výběru protilátek, vhodných pro použití podle vynálezu, jsou *in vitro* expozice lymfocytů proteinu nebo peptidu zsig37 a selekce protilátkových knihoven ve fágových nebo podobných vektorech (například pomocí imobilizovaných nebo značených zsig37 proteinů nebo peptidů).

Protilátky jsou definovány jako specificky vážící jestliže: 1) vykazují prahovou úroveň vazebné aktivity a/nebo 2) nevykazují signifikantní zkříženou reaktivitu s příbuznými polypeptidovými molekulami. protilátky podle vynálezu jsou specificky vážící jestliže váží zsig37 polypeptid, peptid nebo epitop s vazebnou afinitou (K_a) 10^6 mol^{-1} a větší, s výhodou pak 10^7 mol^{-1} a větší, ještě raději 10^8 mol^{-1} a větší a vůbec nejraději 10^9 mol^{-1} a větší. Vazebná afinita protilátky může být snadno stanovena některou ze známých metod, například Scatchardovou analýzou (Scatchard, Ann. Ny Acad. Sci. 51: 660-672, 1949).

Protilátky podle vynálezu jsou dále specificky vážící, pokud nevykazují statisticky významnou zkříženou reaktivitu s příbuznými polypeptidovými molekulami, například pokud při western blot analýze detekují zsig37 polypeptid, ale nikoliv příbuzné polypeptidy (Ausbel *et al.*, *ibid.*). Mezi známé příbuzné polypeptidy patří další členové této proteinové rodiny jako například Acrp30 (SEQ ID NO:3), polypeptidy zobrazené v porovnávací tabulce na obrázku 1 a podobně. V případě potřeby může skupina příbuzných polypeptidů zahrnovat také orthology a mutantní lidské zsig37 polypeptidy. Navíc mohou být protilátky „testovány proti“ známým příbuzným polypeptidům za účelem izolace populace protilátek, které specificky váží jen polypeptidy podle vynálezu. Například protilátky připravené proti lidským zsig37 polypeptidům jsou adsorbovány na příbuzné polypeptidy, navázané na nerozpustný nosič; protilátky specificky vážící lidské zsig37 polypeptidy za určitých podmínek (odpovídající pufr) protečou kolonou aniž by se na nosiči s navázaným polypeptidem zachytily. Tato metoda umožňuje izolaci polyklonálních a monoklonálních protilátek, které nevykazují zkříženou reaktivitu s blízce příbuznými polypeptidy (Antibodies: A Laboratory manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan *et al.* (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995). Metody izolace a testování specifických

protilátek jsou v oboru dobře známé (viz. Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff *et al.*, Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984). Reprezentativními příklady zmíněných metod jsou například: souběžná imuno elektroforéza, radioimmunoassay, radioimunoprecipitace, ELISA, dot blot nebo western blot, inhibiční nebo kompetiční testy a „sandwich assay“.

Geny kódující polypeptidy s potenciálními zsig37 vazebnými doménami, „vazebné proteiny“, mohou být získány náhodným nebo řízeným prohledáváním fágových („phage display“ - "display" knihovny jsou specializované knihovny kde fág protein odpovídající části cizorodé DNA, kterou nese, exprimuje na svém povrchu a například reakcí s odpovídající protilátkou lze snadno stanovit který klon nese požadovanou DNA, pozn. překladatele) nebo bakteriálních (např. *E. coli*) peptidových knihoven. Nukleotidové sekvence, kódující polypeptidy mohou být získány celou řadou způsobů, například náhodnou mutagenezí nebo syntézou náhodných polynukleotidů. Alternativně mohou být připraveny také omezené fágové knihovny ("constrained phage display library"). Tyto knihovny mohou být dále použity pro vyhledávání peptidů, které interagují se známým cílem, kterým může být protein nebo polypeptid, například ligand nebo receptor, biologická či syntetická makromolekula, nebo organická nebo anorganická látka. Techniky přípravy takových peptidových knihoven a vyhledávání v nich jsou odborníkům známé (Ladner *et. al.*, U.S. patent No. 5,223,409; Ladner *et. al.*, U.S. patent No.5,403,484; Ladner *et. al.*, U.S. patent No.4,946,778 a Ladner *et. al.*, U.S. patent No.5,571,698) a peptidové knihovny ("peptide display library"), stejně jako soupravy pro vyhledávání v takových knihovnách jsou dostupné komerčně například od firem Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) a Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Za účelem identifikace proteinů vážících zsig37 jsou peptidové knihovny prohledávány pomocí zsig37 sekvencí, popsanych zde. Tyto „vazebné proteiny“, interagující s polypeptidy zsig37 mohou být použity ve funkci protilátek, pro značení buněk; pro izolaci homologních polypeptidů metodou afinitní purifikace; mohou být přímo nebo nepřímo konjugovány s léčivy, toxiny, radionuklidy a podobně. Zmíněné vazebné proteiny mohou být použity také v analytických metodách, například pro prohledávání expresních knihoven a testování neutralizační aktivity. Zmíněné vazebné proteiny mohou být použity i v diagnostice pro stanovení hladiny cirkulujících polypeptidů; pro detekci nebo kvantifikaci rozpustných polypeptidů coby ukazatele skrytého patologického jevu

nebo onemocnění. Poločas těchto vazebných proteinů lze zvýšit konjugací. Jejich biologické vlastnosti mohou být pro použití ve funkci agonistů nebo antagonistů modifikovány dimerizací nebo multimerizací. Vazebné peptidy mohou být testovány proti známým příbuzným polypeptidům tak jak to bylo popsáno výše.

Protilátky proti zsig37 a vazebné proteiny vážící zsig37 mohou být použity pro značení buněk, které zsig37 exprimují; pro izolaci zsig37 metodou afinitní purifikace, v diagnostice pro stanovení hladiny cirkulujících zsig37 polypeptidů; pro detekci nebo kvantifikaci rozpustných zsig37 polypeptidů jako ukazatele nějaké patologie nebo onemocnění; v analytických metodách využívajících FACS; pro vyhledávání v expresních knihovnách, pro přípravu anti-idiotypových protilátek; ve funkci neutralizačních protilátek nebo antagonistů za účelem *in vitro* nebo *in vivo* blokování aktivity zsig37 polypeptidů, například modulace energetické rovnováhy. Mezi látky vhodné pro přímé značení patří radionuklidy, enzymy, substráty, kofaktory, inhibitory, fluorescenční značky, chemiluminiscenční značky, magnetické částice a podobně; Hlavními meziprodukty nepřímého značení bývají páry biotin/avidin nebo komplement/anti-komplement. Navíc mohou být protilátky proti zsig37 nebo fragmentům zsig37 použity *in vitro* k detekci denaturovaných zsig37 polypeptidů nebo jejich fragmentů a to například metodou western blot nebo dalšími testy.

Protilátky nebo vazebné polypeptidy podle vynálezu mohou být také konjugovány s různými léčivy, toxiny, radionuklidy a podobně a tyto konjugáty mohou být použity pro *in vivo* diagnostiku nebo pro terapeutické účely. Polypeptidy nebo protilátky podle vynálezu mohou být například použity pro identifikaci nebo léčbu tkání nebo orgánů, které exprimují odpovídající anti-komplementární molekuly (například receptor nebo antigen resp.). Konkrétně mohou být polypeptidy zsig37 nebo anti-zsig37 protilátky nebo jejich biologicky aktivní fragmenty spojeny se snadno stanovitelnými nebo cytotoxickými molekulami a mohou být vpraveny do těla savce, jehož buňky, tkáně nebo orgány exprimují anti-komplementární molekuly.

Vhodné stanovitelné molekuly mohou být přímo nebo nepřímo navázány k molekule polypeptidu nebo protilátky a patří mezi ně radionuklidy, enzymy, substráty, kofaktory, inhibitory, fluorescenční značky, chemiluminiscenční značky, magnetické částice a podobně. Vhodné cytotoxické molekuly mohou být přímo nebo nepřímo navázány k molekule polypeptidu nebo protilátky a patří mezi ně bakteriální nebo rostlinné toxiny (například záškrťový toxin, exotoxin bakterií rodu *Pseudomonas*, ricin, abrin a podobně), stejně jako terapeutické radionuklidy jako například jód-131, rhénium-188 nebo yttrium-90 (přímo navázané k

polypeptidu či protilátce nebo nepřímo navázané například prostřednictvím nějaké chelatační látky). Polypeptidy nebo protilátky mohou být také konjugované s cytotoxickými látkami jako je například adriamycin. Pro účely nepřímé vazby cytotoxické nebo stanovitelné molekuly může být tato molekula konjugována se členem páru komplement/anti-komplement, kde druhý člen páru je vázán s polypeptidem nebo protilátkou. Příkladem takového páru komplement/anti-komplement, který je vhodný pro tyto účely, je pár biotin/streptavidin.

V dalším z provedení vynálezu mohou být použity fúzní proteiny polypeptid-toxin nebo protilátka-toxin pro cílenou inhibici nebo odstranění buněk či tkání (například při léčbě rakoviny buněk nebo tkání). Alternativně, má-li polypeptid více funkčních domén (například aktivační doménu nebo ligand vazebnou doménu a doménu rozpoznávající cílové místo), může být fúzní protein obsahující pouze doménu rozpoznávající cílové místo vhodný pro směřování rozpoznatelné molekuly, cytotoxické molekuly nebo komplementární molekuly k buňce nebo tkáni, která je předmětem našeho zájmu. V případech kdy fúzní proteiny obsahují pouze směřující doménu a komplementární molekulu může být s anti-komplementární molekulou konjugována s nějakou snadno stanovitelnou nebo cytotoxickou molekulou. Takové fúzní proteiny, které obsahují jen směřující doménu a komplementární molekulu pak představují obecný směřovaný nosič pro tkáňově-specifické nebo buněčně-specifické směřování jakéhokoli obecného anti-komplementárního konjugátu se snadno stanovitelnou nebo cytotoxickou molekulou. Biologicky aktivní polypeptidové nebo protilátkové konjugáty, popsané zde, mohou být podávány intravenózně, intraarteriálně, intraduktálně s DMSO, intramuskulárně, subkutánně, intraperitoneálně, ale také transdermálně elektrotransferem nebo perorálně či inhalační cestou.

Polynukleotidy kódující zsig37 polypeptidy jsou vhodné také pro genovou terapii v případě kdy je žádoucí zvýšit nebo naopak inhibovat aktivitu zsig37. Pokud je u savce gen pro zsig37 mutovaný nebo úplně chybí, může být do buněk tohoto savce gen pro zsig37 uměle vnesen. V jednom z provedení vynálezu je gen kódující zsig37 polypeptid vnesen *in vivo* do virového vektoru. Takovým vektorem může být atenuovaný nebo defektní DNA virus jako například (ale nikoliv výhradně) virus herpes simplex (HSV), papillomavirus, virus Epstein Barrové (EBV), adenovirus, adeno-asociovaný virus (AAV) a podobně. S výhodou jsou používány defektní viry, které úplně nebo alespoň téměř úplně postrádají virové geny. Defektní virus není po vstupu do buňky infekční. Používání defektních virových vektorů umožňuje vnesení virového vektoru do buněk ve specifické, lokalizované oblasti bez nebezpečí, že by vektor mohl infikovat ostatní buňky. Konkrétními

příklady vektorů jsou defektní herpes virus 1 (HSV1) (Kaplitt *et al.*, Molec. Cell Neurosci. 2: 320-330, 1991), atenuovaný adenovirový vektor popsáný v Stradford-Perricaudet *et al.*, J. Clin. Invest. 90: 626-630, 1992 a defektní adeno-asociovaný virový vektor (Samulski *et al.*, J. Virol. 61: 3096-3101, 1987; Samulski *et al.*, J. Virol. 63: 3822-3828, 1989). Tento seznam příkladů však v žádném případě není konečný.

V dalším z provedení vynálezu může být gen vnesen do retrovirového vektoru, jaké jsou popsány například 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; Internatinal Patent Publication No. WO 95/07358, March 16, 1995, Dougherty *et al.* a Blood 82: 845, 1993.

Alternativně může být vektor do buněk vnesen *in vivo* lipofekcí s pomocí lipozómů. Pro přípravu lipozómů 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 pro vnášení exogenních genů do specifických orgánů *in vivo* má některé praktické výhody. Jednou z oblastí těchto výhod je molekulární cílení lipozómů do specifických buněk. Je zřejmé, že cílená transfekce do konkrétních buněk představuje jednu z oblastí výhod. Je také zřejmé, že cílená transfekce do konkrétních buněk je zvláště výhodná v případě tkání heterogenních v zastoupení buněčných druhů, jako je například pankreas, játra, ledviny či mozek. Lipidy mohou být chemicky vázány s jinými molekulami za účelem cílení. S lipidy mohou být chemicky vázány za účelem cílení peptidy, například hormony nebo neurotransmitery, proteiny jako například antibiotika a také nepeptidové molekuly.

Je také možné vyjmout cílové buňky z těla, vnést vektor ve formě nahého DNA plazmidu do buněk a poté implantovat transfektované buňky zpět do těla. Nahý DNA vektor pro genovou terapii může být vnesen do požadovaných hostitelských buněk obecně známými metodami, například transfekcí, elektroporací, mikroinjekcí, transdukcí, fúzí buněk, pomocí DEAE dextranu, kalcium fosfátové precipitace, nástřelu genu nebo transportéru DNA vektoru, viz. například Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 963-967, 1992 a Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 263: 14621-14624, 1988.

Antisense technika může být použita pro inhibici transkripce genu zsig37, jako například pro inhibici buněčné proliferace *in vivo*. Polynukleotidy, které jsou komplementární k části zsig37 kódující sekvence (například polynukleotidu

uvedeného jako SEQ ID NO:1), jsou navrženy tak, aby vázaly zsig37-kódující mRNA a inhibovaly tak translaci této mRNA. Takové antisense polynukleotidy se používají pro inhibici exprese genů kódujících zsig37 polypeptidy jak v buněčné kultuře, tak i v organismu.

Dále mohou být navrženy transgenní myši exprimující zsig37 gen, nebo takové, které vykazují úplnou absenci funkce zsig37 genu, tzv. „knockout myši“ (Snouwaert *et al.*, Science 257: 1083, 1992; Lowell *et al.*, Nature 366: 740-42, 1993). Tyto myši mohou být použity pro studium zsig37 genu a jím kódovaného proteinu v systému *in vivo*.

Pro farmaceutické účely jsou proteiny podle vynálezu navrženy pro parenterální, především intravenózní nebo subkutánní, podávání běžnými způsoby. Intravenózní podávání je prováděno Bolusovou injekcí nebo infúzí v typických časových odstupech jedné nebo několika hodin. Obecně obsahují farmaceutické přípravky zsig37 protein v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem jako je například fyziologický roztok, pufrovaný roztok soli, 5% dextróza ve vodě a podobně. Přípravky mohou dále obsahovat jednu nebo několik pomocných látek, konzervační činidla, rozpouštědla, pufrční látky, albumin pro prevenci ztráty proteinů na povrchu lékových atd. Způsoby přípravy takových farmaceutických prostředků jsou dobře známé a jsou popsány například v Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 19th ed., 1995. Terapeutické dávky jsou obvykle stanoveny lékařem v souladu s obecnými zásadami a s přihlédnutím k povaze a závažnosti stavu, který je léčen, stavu pacienta atd. Stanovení dávky je v rámci běžných odborných znalostí. Vynález je dále ilustrován následujícími příklady, které však nejsou v žádném případě limitující.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Rozšíření EST sekvence.

Nové polynukleotidy, kódující polypeptidy zsig37 podle vynálezu, byly nejprve identifikovány selekcí EST v EST databázi, na základě toho byla předpovězena sekvence proteinu a dále byly ve známých databázích proteinových sekvencí vyhledány sekretované proteiny, vykazující největší homologii s proteinovou sekvencí předpovězenou na základě EST. EST, které potenciálně kódují proteiny vykazující biologicky zajímavou homologii se známými sekretovanými proteiny byly identifikovány pro další studium. Byla nalezena jediná EST sekvence

kódující hypotetický protein homologní s proteinem specifickým pro adipocyty. Viz. například Scherer *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270(45): 26746-9, 1995. Klon, pravděpodobně obsahující odpovídající kódující sekvenci byl použit pro sekvenaci za účelem identifikace odpovídající cDNA. S použitím Invitrogen S.N.A.P.TM Miniprep kit (Invitrogen, Corp., San. Diego, CA) a podle instrukcí od výrobce bylo zpracováno 5 ml kultury pěstované přes noc v LB médiu s přidavkem 50 µg/ml ampicilinu. Templát byl sekvenován na DNA sekvenátoru ABIPRISMTM model 377 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Ct.) s použitím ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Corp.) dle instrukcí od výrobce. Jako primery pro sekvenování byly použity oligonukleotidy ZC695 (SEQ ID NO:5) a ZC694 (SEQ ID NO:6) komplementární k SP6 a T7 promotorům, obsaženým ve vektoru, který nese požadovanou DNA. K dokončení sekvenování daného klonu byly použity oligonukleotidy ZC13210 (SEQ ID NO:7), ZC13588 (SEQ ID NO:8), ZC13532 (SEQ ID NO:9), ZC13641 (SEQ ID NO:10), ZC13586 (SEQ ID NO:11), ZC13651 (SEQ ID NO:12), ZC13622 (SEQ ID NO:13), ZC13625 (SEQ ID NO:14), ZC13650 (SEQ ID NO:15), ZC13589 (SEQ ID NO:16), ZC13624 (SEQ ID NO:17), ZC13531 (SEQ ID NO:18), ZC13587 (SEQ ID NO:19) a ZC13623 (SEQ ID NO:20). Sekvenační reakce byly prováděny v Hybaid OmniGene Temperature Cycling System (National Labnet Co., Woodbridge, NY). Pro analýzu dat byl použit SEQUENCHERTM 3.0 software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Výsledná 2769 pb dlouhá sekvence je zde znázorněna jako SEQ ID NO:1. Porovnání původně odvozené EST sekvence se sekvencí SEQ ID NO:1 ukázalo, že v celé sekvenci existuje jen v jednom páru bází nejednoznačnost (neznámá „N“ aminokyselina) a nebyly nalezeny žádné inserce. Původně nejednoznačně určená aminokyselina tedy byla identifikována jako leucin. Mezi oběma odvozenými aminokyselinovými sekvencemi nebyl nalezen žádný posun čtecího rámce.

Příklad 2: Tkáňová distribuce.

S použitím Human Multiple Tissue Blots od firmy Clontech (Palo Alto, CA) byla provedena analýza metodou Northern blot. DNA sonda dlouhá 30 pb (ZC12447; SEQ ID NO:4), komplementární k 5' konci nukleotidové sekvence maturovaného proteinu, znázorněná jako SEQ ID NO:1, byla radioaktivně označena ³²P dle instrukcí od výrobce a s použitím T4 polynukleotid kinázy a „forward“ reakčního pufru (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Sonda byla purifikována na koloně NUCTRAP (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA). Pro prehybridizaci a jako

hybridizační roztok pro Northern blot byl použit roztok EXPRESSHYB Clontech (Palo Alto, CA). Hybridizace byla prováděna přes noc při 50 °C a poté byly membrány promyty v 2x SSC a 0,1% SDS při 68 °C (asi o 5 °C méně než jaká je teplota tání). Byl objeven jeden transkript o velikosti asi 2,8 kb. Intenzita signálu byla nejvyšší v srdeční tkáni a v placentě, relativně méně intenzivní signál byl pozorován v ledvinách, vaječnících, nadledvinkách a v kosterním svalu. Ostatní testované tkáně vykazovaly signál velmi slabý.

Další Northern blot analýza byla provedena s použitím Gut Northern Tissue Blot. Byla použita mRNA z lidské adenokarcinomové buněčné linie SW480 (Clontech Palo Alto, CA), z tkáně lidského tenkého střeva (Clontech), z lidské žaludeční tkáně (Clontech), z lidské buněčné linie pocházející z hladké svaloviny střeva (Hism; ATCC No. CRL-1692; American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD), z buněčné linie pocházející z normálního lidského tlustého střeva (FHC; ATCC No. CRL-1831; American Type Culture Collection) a z buněčné linie pocházející z normálního lidského zárodečného tenkého střeva (FHs74 Int.; ATCC No. CCL241; American Type Culture Collection).

Totální RNA byla z Hism, FHC a FHs74 Int. izolována kyselou guanidiovou metodou (Cheomczynski *et al.*, Anal. Biochem. 162: 156-9, 1987). PolyA⁺ RNA byly odděleny z celkové RNA na koloně, zachycující polyA⁺ RNA (Aviv *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408-12, 1972). 2 µg polyA⁺ RNA z každého vzorku byly rozděleny elektroforézou v 1,5% agarózovém gelu v 2,2 M formaldehydu a fosfátovém pufru. RNA byla poté přes noc v roztoku 20x SSC přenesena na Nytran membránu (Schleicher and Schuell, Keene, NH). Blot byl poté opracován UV Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla, CA) o energii 0,12 Joulů. Dále byla membrána tepelně opracována (1 hodina, 80 °C). Plná délka cDNA (SEQ ID NO:1) byla amplifikována metodou PCR a radioaktivně značena ³²P dCTP s použitím Redprime pellet kit (Amersham, Arlington Heights, IL) dle instrukcí od výrobce. Blot byl hybridizován přes noc v EXPRESSHYB (Clontech) při teplotě 56 °C. Blot byl promyt při pokojové teplotě 2x SSC s 0,1% SDS, poté při 65 °C 2x SSC s 0,1% SDS a konečně při 65 °C 0,1x SSC s 0,1% SDS. Výsledky prokázaly, že zsig37 hybridizuje se všemi tkáněmi s výjimkou buněčné linie HISM z hladkého svalstva lidského střeva.

Příklad 3: Chromozomální mapování genu zsig37.

Pomocí PCR s použitím NIGMS Human/Rodent Somatic Cell Hybrid Mapping Panel Number 2 (National Institute of General Medical Sciences, Coriell Institute

of medical Research) byla stanovena poloha genu *zsig37* v lidském genomu, a to v chromozómu 17, oblasti 17q25.2. Použitý panel se sestává z DNA izolované z 24 lidských/krysích hybridů somatických buněk, kde v každém z hybridů zůstává zachován jeden specifický lidský chromozóm a rodičovská DNA. Pro mapování *zsig37* genu byly v 96 jamkové mikrotitrační destičce (Stratagene, La Jola, CA) připraveny 20 μ l reakce a byl použit termální cyklovač „RoboCycler Gradient 96“ (Stratagene). Každá z 27 PCR reakcí obsahovala 2 μ l 10x KlenTaq PCR reactin buffer (Clontech Laboratorie, Inc., Palo Alto, CA), 1,6 μ l dNTP směsi (2,5 mM každý, PERKIN-ELMER, Foster City, CA), 1 μ l primeru po smyslu čtení (SEQ ID NO:21), 1 μ l primeru proti smyslu čtení (SEQ ID NO:22), 2 μ l *RediLoad* (research Genetics, Inc.), 0,4 μ l 50x Advantage KlenTaq Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Inc.), 25 ng DNA vždy z jednoho hybridního klonu nebo kontrolní DNA a ddH₂O do 20 μ l. Reakční směsi byly převrstveny stejným množstvím minerálního oleje a uzavřeny. PCR bylo prováděno za následujících podmínek: 5 minut denaturace při 95 °C, dále 35 cyklů zahrnujících 1 minutu denaturace při 95 °C, 1 minutu annealing (zchlazení při kterém dochází k nasednutí primeru na templátovou DNA, pozn. překl.) při 60 °C a 1,5 minuty dlouhou syntetickou fází při 72 °C; celá PCR byla ukončena 1 cyklem 7 minut při 72 °C. Každá reakce byla rozdělena elektroforézou v 3% NuSieve GTG agarózovém gelu (FMC Bioproducts, Rockland, ME).

Příklad 4: Příprava savčích expresních vektorů *zsig37NEE/pZP9* a *zsig37CEE/pZP9*.

Pro expresi polypeptidu *zsig37* byly připraveny dva expresní vektory, *zsig37NEE/pZP9* a *zsig37CEE/pZP9*, kde oba konstrukty byly navrženy tak aby exprimovaly *zsig37* polypeptid mající na C-konci nebo N-konci sekvenci Glu-Glu.

zsig37NEE/pZP9

S použitím templátové DNA popsané v příkladu 1 a oligonukleotidových PCR primerů ZC15040 (SEQ ID NO:24) a ZC15033 (SEQ ID NO:25) byl připraven 800 pb dlouhý PCR fragment *zsig37* DNA. PCR reakce byla provedena za následujících podmínek: 94 °C 3 minuty, dále 5 cyklů zahrnujících 94 °C 30 sekund, 30 °C 20 sekund a 72 °C 1 minutu, poté následovalo 25 cyklů zahrnujících 94 °C 30 sekund, 64 °C 20 sekund a 72 °C 1 minutu a na závěr prodlužovací cyklus 72 °C 5 minut. Výsledný PCR produkt byl rozdělen na 0,9%

TBE agarózovém gelu v 1% TBE pufru. Proužek očekávané velikosti byl z gelu vyříznut a DNA byla dle instrukcí od výrobce vyčištěna na Qiaex II® kolonce (Qiagen). DNA byla opracována restrikčními enzymy BamHI a XbaI a následně byla extrahována přesrážena. Vyříznutý a restrikčními enzymy opracovaný zsig37 DNA fragment byl subklonován do plazmidu NEE/pZP9, který byl stejně jako DNA fragment opracován restrikčními enzymy BamHI a XbaI. Zsig37NEE/pZP9 expresní vektor zahrnuje TPA vedoucí sekvenci a k N-konci zsig37 kódující polynukleotidové sekvence připojuje Glu-Glu konec (SEQ ID NO:26). Plazmid NEE/pZP9 (uložený v American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, ATCC No. 98668) je savčí expresní vektor obsahující expresní kazetu s myším methallothionein-1 promotorem a TPA vedoucím peptidem následovaným sekvencí kódující Glu-Glu konečnou sekvenci (SEQ ID NO:26), dále sekvenci obsahující množství restrikčních míst pro vkládání kódující sekvence a terminátor lidského růstového hormonu. Plazmid dále obsahuje *E. coli* ori (počátek replikace) a expresní jednotku umožňující selekci v savčích buňkách zahrnující SV40 promotor, zesilovač a počátek replikace, DHFR gen a SV40 terminátor.

zsig37CEE/pZP9

Postupem popsaným výše a s použitím PCR primerů ZC15721 (SEQ ID NO:27) a ZC15035 (SEQ ID NO:28) byl připraven 866 pb dlouhý PCR fragment zsig37 DNA. Purifikovaný PCR fragment byl opracován restrikčními enzymy EcoRI a BamHI a vyčištěn v gelu a na Qiaex II kolonce tak jak to bylo popsáno výše. Vyříznutá a restrikčními enzymy opracovaná zsig37 DNA byla subklonována do plazmidu CEE/pZP9, který byl opracován stejnými restrikčními enzymy jako DNA fragment. V zsig37CEE/pZP9 expresním vektoru je použit nativní zsig37 signální peptid a pro snazší purifikaci je na C-konci navázán Glu-Glu epitop (SEQ ID NO:26). Plazmid CEE/pZP9 (uložený v American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, ATCC No. 98668) je savčí expresní vektor obsahující expresní kazetu s myším methallothionein-1 promotorem a sekvencí kódující Glu-Glu konečnou sekvenci (SEQ ID NO:26), dále sekvenci obsahující množství restrikčních míst pro vkládání kódující sekvence a stop kodon a terminátor lidského růstového hormonu. Plazmid dále obsahuje *E. coli* ori (počátek replikace) a expresní jednotku umožňující selekci v savčích buňkách zahrnující SV40 promotor, zesilovač a počátek replikace, DHFR gen a SV40 terminátor.

Pro přípravu konstruktů s Glu-Glu sekvencí na N-konci nebo C-konci kódující sekvence bylo ligováno při pokojové teplotě po dobu 4 hodin asi 30 ng restrikními enzymy opracovaného inzertu a 50 ng odpovídajícího vektoru. Jeden mikrolitr každé ligační směsi byl okamžitě elektroporací vnesen dle instrukcí od výrobce do DH10B kompetentních buněk (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) a buňky byly vysety na LB plotny s obsahem 50 mg/ml ampicilinu a byly inkubovány přes noc.

Kolonie byly testovány metodou PCR tak jak to bylo popsáno výše. Pro testování kolonií zsig37NEE/pZP9 a zsig37CEE/pZP9 byly použity PCR primery ZC13006 (SEQ ID NO:29) a ZC13007 (SEQ ID NO:20). PCR reakce byla prováděna za následujících podmínek: 94 °C 2,5 minuty, dále 25 cyklů zahrnujících 94 °C 10 sekund, 58 °C 20 sekund a 72 °C 1 minutu. Na závěr byla reakce zahřáta na 5 minut na 72 °C. Vložená sekvence byla v pozitivních klonech, tj. 1013 pb pro zsig37NEE a 950 pb pro zsig37CEE, ověřena sekvenční analýzou. Izolace plazmidů byly v případě, kdy byl žádoucí velký výtěžek, prováděny s použitím QIAGEN® Maxi prep kit (Qiagen) a dle instrukcí od výrobce.

Příklad 5: Transfekce a exprese zsig37NEE a zsig37CEE polypeptidů.

Buňky BHK 570 (ATCC No. CRL-10314) byly vysety na destičky pro tkáňové kultury o průměru 10 cm a byly přes noc pěstovány do 50% až 70% nárůstu při teplotě 37 °C, 5% CO₂ v DMEM/FBS médiu (DMEM, Gibco/BRL High Glucose, (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) s 5% fetálním hovězím sérem (Hyclone, Logan, UT), 2 μM L-glutaminu (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 1 μM pyruvátu sodného (Gibco BRL)). Poté byly buňky transfektovány plazmidem zsig37NEE/pZP9 (N-koncová Glu-Glu sekvence) nebo zsig37CEE/pZP9 (C-koncová Glu-Glu sekvence). Pro transfekci byl použit LipofectaminTM (Gibco BRL) v bezsérovém médiu (SF) DMEM, Gibco/BRL High Glucose (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) s 2 mM L-glutaminem, 2 mM pyruvátem sodným, 10 μg/ml transferinu, 5 μg/ml inzulinu, 10 μg/ml fetuinu a 2 ng/ml selenu. Šestnáct mikrogramů zsig37NEE/pZP9 a 16 μg zsig37CEE/pZP9 bylo odděleně naředěno SF médiem v 15 ml zkumavkách na celkový konečný objem 640 μl. V oddělených zkumavkách bylo smíšeno 35 μl LipofectaminuTM (Gibco BRL) s 605 μl SF média. Směs s LipofectaminemTM byla přidána ke směsi DNA a roztok byl inkubován asi 30 minut při pokojové teplotě. Ke směsi LipofectaminTM:DNA bylo přidáno 5 ml SF média. Buňky byly 1x promyty 5 ml SF média, médium bylo odsáto a k buňkám byla přidána směs

DNA:LipofectaminTM. Buňky byly inkubovány 5 hodin při teplotě 37 °C a poté bylo na misku přidáno 6,4 ml DMEM/10% FBS, 1% PSN média. Buňky byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C a následující den byla směs DNA:LipofectaminTM nahrazena čerstvým FBS/DMEM médiem. Druhý den po transfekci byly buňky rozděleny do selekčního média (ESTEP #1 s 1 µM MTX) do 150 mm kultivačních misek v koncentracích 1:50, 1:100 a 1:200. Pátý den po transfekci bylo do misek doplněno čerstvé selekční médium.

Testování kolonií.

Asi 10. až 12. den po transfekci byla pro každou transfekci zvolena jedna 150 mm kultivační miska s koloniemi rezistentními na methotrexát, médium bylo odsáto a misky byly promyty 10 ml bezsérového ESTEP 2 média (668,7 g / 50 L DMEM (Gibco), 5,5 g / 50 L kyseliny pyrohroznové, sodná sůl 96% (Mallinkrodt), 185,0 g / 50 L NaHCO₃ (Mallinkrodt), 5,0 mg/ml, 25 ml / 50 L inzulinu, 10 mg/ml a 25 ml / 50 L transferrinu). Po promytí bylo médium odsáto a nahrazeno 5 ml bezsérového ESTEP 2 média. Na buňky byla poté umístěna sterilní teflonová síť (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA), předem navlhčená v bezsérovém ESTEP 2 médiu. Na síto byl dále umístěn sterilní nitrocelulózový filtr předem navlhčený v bezsérovém ESTEP 2 médiu. Orientační značky na nitrocelulóze byly přeneseny na kultivační misku. Buňky byly poté 5 až 6 hodin inkubovány v 5% CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C. Po inkubaci byl filtr odstraněn a médium bylo odsáto a nahrazeno DMEM/5% FBS, 1x PSN médiem (Gibco BRL). Filtr byl poté uzavřen do uzavíratelného sáčku s 50 ml pufru (25 mM Tris, 25 mM glycin, 5 mM β-merkaptioethanol) a byl 10 minut inkubován ve vodní lázni při 65 °C. Filtry byly 15 minut blokovány při pokojové teplotě v pufru Western A s 10 % odtučněným sušeným mlékem (Western A: 50 mM Tris pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,05% NP-40, 150 mM NaCl a 0,25% želatina). Blokování bylo prováděno na rotační třepačce. Poté byly filtry inkubovány s anti-Glu-Glu protilátkou konjugovanou s HRP, ředěnou 1:1000 v pufru Western A (Western A: 50 mM Tris pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,05% NP-40, 150 mM NaCl a 0,25% želatina) s 2,5% odtučněným sušeným mlékem. Inkubace s protilátkou byla prováděna na rotační třepačce přes noc při teplotě 4 °C. Poté byly filtry při pokojové teplotě 3x promyty v PBS s přídavkem 0,1 % Tween 20. Každé promytí trvalo 5 až 15 minut. Dále byl filtr zpracován metodou ECL dle instrukcí od výrobce (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) a signál byl zachycen na film (Hyperfilm ECL, Amersham). Film byl exponován přibližně 5 minut.

Film byl porovnán s kultivační miskou s koloniemi a na základě pozitivního signálu byly vybrány vhodné kolonie. Sterilní 3 mm klonovací disky (PGC Scientific. Corp., Frederick, MD) byly navlhčeny trypsinem a umístěny na povrch zvolené kolonie. Pro každý konstrukt bylo vybráno 12 kolonií, které byly přeneseny každá do 200 µl selekčního média na 96 jamkovou destičku. Pro každou kolonii byla připravena série sedmi dvojnásobných ředění. Buňky byly kultivovány po dobu 1 týdne při 37 °C. Byly vybrány jamky s nejnižším ředěním vykazujícím optimální denzitu, buňky byly opračovány trypsinem a přeneseny na 12 jamkovou destičku se selekčním médiem. 150 mm kultivační misky byly také opračovány trypsinem a zbylé buňky byly spojeny a podrobeny western analýze a testu na mykoplasmy. Vzorek buněk byl zamražen a uložen.

Klony byly převedeny přímo z 12 jamkové destičky do dvou kultivačních lahví T-75. Jedna z lahví byla uchována pro další kultivaci, ve druhé byly buňky pěstovány v bezsérovém ESTEP 2 médiu, které bylo shromažďováno pro western blot analýzu. Na základě western blot analýzy byly pro každý expresní konstrukt vybrány pozitivní klony a buňky byly použity pro kultivaci ve velkém objemu.

Příklad 6: Expres zsig37CEE v savčích hostitelských buňkách ve velkém objemu.

Jedna kultivační lahev T-162 obsahující spojené buňky exprimující zsig37CEE a jedna, obsahující zsig37 NEE, získaný expresí výše popsáním postupem, byly každá rozděleny do čtyř T-162 kultivačních lahví. Vždy jedna ze čtyř zmíněných lahví byla zamražena a ostatní tři byly použity pro přípravu „Nunc cell factory“. Buňky ze tří T-162 lahví s zsig37NEE a zsig37CEE byly použity pro okamžité zaočkování dvou „Nunc cell factories“ (10 vrstev, komerčně dostupné od VWR). Krátce, buňky z T-162 lahví, popsanych výše, byly rozděleny pomocí trypsinu, sklizeny a přidány k 1,5 l ESTEP 1 média (668,7 g / 50 L DMEM (Gibco), 5,5 g / 50 L kyseliny pyrohroznové, sodná sůl 96% (Mallinkrodt), 185,0 g / 50 L NaHCO₃ (Mallinkrodt), 5,0 mg/ml, 25 ml / 50 L inzulinu (JRH Biosciences), 10 mg/ml a 25 ml / 50 L transferrinu (JRH Biosciences), 2,5 L / 50 L fetálního hovězího séra (charakterizovaného) (Hyclone), 1 µM MTX, pH 7,05 +/- 0,05), předeřátého na 37 °C. Médium obsahující buňky bylo poté nálevkami naplněno do „Nunc cell factories“, které byly dále umístěny do 5% CO₂ inkubátoru a kultivovány při teplotě 37 °C. Při 80 až 100% nárůstu byl u obsahu „Nunc cell factories“ proveden vizuální test kontaminace (fenolem; posouzením změny červené barvy). Pokud nebyla žádná kontaminace zjištěna, byl supernatant z buněčných továren

odčerpán do malého sběrného kontejneru, otestován a odstraněn. Adherované buňky byly 1x promyty 400 ml PBS. Pro uvolnění adherovaných buněk byla každá z kultivačních nádob promyta 100 ml trypsinu a ve zbytkovém trypsinu byly buňky inkubovány 5 až 10 minut. Buňky byly sklizeny promytím 2x 200 ml ESTEP1 média. Bylo připraveno 10 lahví, každá s obsahem 1,5 l ESTEP1 média, předehřátého na 37 °C. Do každé lahve bylo přidáno 40 ml sklizených buněk. Každá z lahví byla použita pro naplnění jedné „Nunc factory“ a každá tato továrna na buňky byla umístěna v 5% CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C.

Při 80 až 90% nárůstu byl u obsahu „Nunc cell factories“ proveden vizuální test kontaminace (fenolem; posouzením změny červené barvy). Pokud nebyla žádná kontaminace zjištěna, byl supernatant z buněčných továren odčerpán do malého sběrného kontejneru, otestován a odstraněn. Adherované buňky byly 1x promyty 400 ml PBS. Do každé „Nunc cell factory“ bylo přidáno 1,5 l média ESTEP 2 (668,7 g / 50 L DMEM (Gibco), 5,5 g / 50 L kyseliny pyrohroznové, sodná sůl 96% (Mallinkrodt), 185,0 g / 50 L NaHCO₃ (Mallinkrodt), 5,0 mg/ml, 25 ml / 50 L inzulinu, 10 mg/ml a 25 ml / 50 L transferrinu) a tyto továrny na buňky byly inkubovány v 5% CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C.

Asi po 48 hodinách byl u obsahu „Nunc cell factories“ proveden vizuální test kontaminace (fenolem; posouzením změny červené barvy). Supernatant byl z každé z buněčných továren odčerpán do malého sběrného kontejneru a do každé z „Nunc cell factories“ bylo přidáno 1,5 litru čerstvého bezsérového média. Buňky byly inkubovány v 5% CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C. Vždy 1 ml supernatantu byl odebrán pro každý konstrukt, přenesen na podložní sklíčko a podroben mikroskopické analýze za účelem zjištění případné kontaminace. Obsahy malých sběrných kontejnerů byly pro každý konstrukt spojeny a okamžitě přefiltrovány. Buňky byly poté znovu sklizeny stejným způsobem, jaký byl popsán výše pro sklizeň po 48 hodinách. Pro aseptickou filtraci sklizeného supernatantu bylo použito asepticky sestavené filtrační zařízení. Filtrační zařízení bylo sestaveno následujícím způsobem: k Opti-Cap filtru (Millipore Corp., Bedford, MA) a Gelman Supercap 50 filtru (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) byly drátem připevněny hadičky. Supercap 50 filtr byl dále připevněn ke sterilně uzavřenému kontejneru, umístěnému v digestoři; na hadičku umístěnou před Millipore Opti-Cap fitrem byla napojena peristaltická pumpa a volný konec hadičky byl vložen do velkého sběrného kontejneru. Peristaltická pumpa byla nastavena na 200 až 300 rpm a všechno médium bylo přefiltrováno přes 0,22 µm filtr do sterilního sběrného kontejneru. Filtrát byl umístěn až do okamžiku purifikace v chladné místnosti při teplotě 4 °C. Médium bylo 10x zkoncentrováno dle instrukcí od

výrobce pomocí Millipore 5 kDa cut off concentrator (tj. filtrovací zařízení, které nepropustí molekuly větší než 5 kDa, pozn. překl.) (MilliporeCorp., Bedford, MA) a bylo otestováno metodou western blot s použitím anti-FLAG tag protilátky (Kodak).

Zsig37CEE:

5 T-162 kultivačních lahví	= 0,12 mg/L, 38 kDa;
1 „Nunc cell factory“, FBS	= 0,12 mg/L; 38 kDa;
10 „Nunc cell factories“, FBS	= 0,12 mg/L, 38 kDa;
10 „Nunc cell factories“ (#1), SF	= 1,20 mg/L, 38 kDa;
10 „Nunc cell factories“ (#2), SF	= 3,56 mg/L, 38 kDa

Zsig37NEE:

5 T-162 kultivačních lahví	= 0,137 mg/L, 35 kDa;
1 „Nunc cell factory“, FBS	= 0,137 mg/L; 35 kDa;
10 „Nunc cell factories“, FBS	= 0,137 mg/L, 35 kDa;
10 „Nunc cell factories“ (#1), SF	= 1,37 mg/L, 35 kDa;
10 „Nunc cell factories“ (#2), SF	= 4,11 mg/L, 35 kDa

Příklad 7: Purifikace zsig37NEE a zsig37CEE.

Pokud není řečeno jinak, všechny operace byly prováděny při teplotě 4 °C. Pro purifikaci zsig37 s N-koncovou nebo C-koncovou Glu-Glu (EE) sekvencí byl použit následující postup. Celkem 25 litrů média z BHK buněk („baby hamster kidney cell“) bylo postupně sterilně přefiltrováno přes čtyřpalcový, 0,2 mM Millipore (Bedford, MA) Opticap filtr a 0,2 mM Gelman (Ann Arbor, MI) Supercap 50 filtr. Materiál byl poté zkoncentrován na objem asi 1,3 l pomocí tangenciálního koncentračního zařízení Millipore ProFlux A30 doplněného membránou S10Y3 (Amicon, Bedford, MA) (3000 kDa). Zakoncentrovaný materiál byl znovu sterilně přefiltrován přes Gelmanův filtr tak, jak to bylo popsáno výše. K takto upravenému zakoncentrovanému médiu byla přidána směs inhibitorů proteáz v následujících výsledných koncentracích: 2,5 mM ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 0,001 mM leupeptin (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), 0,001 mM pepstatin (Boehringer-Mannheim) a 0,4 mM Pefabloc (Boehringer-Mannheim). Ke směsi bylo přidáno 25 ml anti-EE Sepharose, připravené tak jak je to popsáno níže

a směs byla jemně míchána po dobu 18 hodin při teplotě 4 °C (Wheaton, Millville, NJ).

Směs byla poté nanášena do 5,0 x 20,0 cm Econo-Column (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a gel byl promyt třiceti objemy kolony fosfátového pufru (PBS). Pufir proteklý kolonou byl odstraněn. V okamžiku kdy absorbance pufru po průtoku kolonou dosáhla při vlnové délce 280 nm hodnot menších než 0,05 byl průtok kolonou snížen na nulu a anti-EE sepharózový gel byl promyt dvěma objemy PBS s obsahem 0,4 mg/ml EE peptidu (AnaSpec, San Jose, CA). Použitý peptid má sekvenci Glu-Tyr-Met-Pro-Val-Asp, SEQ ID NO:31. Po jedné hodině při 4 °C byl průtok kolonou obnoven a protein byl z kolony eluován. Tato frakce byla považována za frakci eluovaného peptidu. Anti-EE sepharóza byla poté promyta dvěma objemy 0,1 M glycinu pH 2,5 a tato frakce byla shromažďována odděleně. pH glycinem eluované frakce bylo upraveno na 7,0 přidáním malého množství 10x PBS a frakce byla uložena při teplotě 4 °C pro případnou další analýzu.

Frakce eluovaného peptidu byla pomocí 15 000 Da membránového filtru (Millipore, Bedford, MA) dle instrukcí od výrobce zakoncentrována na objem asi 5 ml. Z této koncentrované peptidové frakce byl volný peptid oddělen chromatografií na 1,5 x 50 cm koloně, naplněné Sephadexem G-50 (Pharmacia, Piscataway, NJ) a ekvilibrované v PBS, při průtoku 1 ml/min s použitím BioCad Sprint HPLC (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). Byly sbírány frakce po 2 ml a byla sledována absorbance při 280 nm. První vrchol eluční křivky při 280 nm byl eluován brzy za tzv. mrtvým objemem kolony a materiál odpovídající tomuto vrcholu byl zachycen, neboť právě tato frakce představuje čistý zsig37NEE nebo zsig37CEE peptid. Frakce čistého proteinu byla znovu zkoncentrována, tak jak to bylo popsáno výše, analyzována SDS-PAGE a Western blotem s použitím protilátek anti-EE a byly odebrány vzorky pro aminokyselinovou analýzu a N-terminální sekvenování. Zbylý vzorek byl rozdělen na aliquoty a standardím způsobem zmražen -80 °C.

Elektroforéza zsig37NEE proteinu v SDS-PAGE gelech bez použití redukčních činidel prokázala při barvení Comassie Blue výrazný pruh o zdánlivé molekulové hmotnosti 39 000 a dále několik minoritních pruhů zdánlivých velikostí 60 000 až 116 000. Všechny tyto pruhy vykazovaly na western blotu s anti-EE protilátkami zkříženou reaktivitu s hlavním 39 kDa produktem. V přítomnosti redukčního činidla byl po obarvení Comassie Blue pozorován jen jediný, nyní intenzivnější, pruh o velikosti 39 000. Tento pruh opět vykazoval při western blot analýze zkříženou reaktivitu s anti-EE protilátkami.

Elektroforéza zsig37CEE proteinu v SDS-PAGE gelech bez použití redukčních činidel prokázala při barvení Comassie Blue výrazný pruh o zdánlivé molekulové hmotnosti 39 000 a dále několik minoritních pruhů zdánlivých velikostí 60 000 až 116 000. Při western blot analýze vykazovaly zkříženou reaktivitu s anti-EE protilátkami jen pruhy o zdánlivé molekulové hmotnosti 150 000, 116 000 a 60 000. V přítomnosti redukčního činidla byl po obarvení Comassie Blue pozorován jen jediný pruh o velikosti 39 000. Tento pruh opět vykazoval při western blot analýze zkříženou reaktivitu s anti-EE protilátkami. Za těchto podmínek bylo pozorováno také malé množství zkříženě reagujícího proteinu o velikosti 150 000.

Příprava anti-EE sepharózy.

Základní objem 100 ml protein G-sepharózy (Pharmacia, Piscataway, NJ) byl s použitím 500 ml filtrační jednotky Nalgen 0,45 mikronu promyt 3 x 100 ml PBS s 0,02% azidem sodným. Gel byl dále promyt šesti objemy 200 mM triethanolaminu pH 8,2 (TEA, Sigma, St. Louis, MO) a dále byl přidán jeden objem roztoku EE protilátky, obsahující celkem 900 mg protilátky. Sepharóza byla s protilátkou inkubována přes noc při teplotě 4 °C a nenavázaná protilátka byla poté odstraněna promytím pěti objemy 200 mM TEA (viz. výše). Dále byla sepharóza resuspendována ve dvou objemech TEA a převedena do vhodné nádoby. Ke směsi byl přidán dimethylpimilimidát-2HCl (Pierce, Rockford, IL), rozpuštěný v TEA, v konečné koncentraci 36 mg/ml gelu. Po 45 minutách při pokojové teplotě byla z gelu pomocí filtrační jednotky, jaká byla popsána výše, odstraněna tekutina. Nespecifická místa v gelu byla poté blokována inkubací 10 minut při pokojové teplotě s 5 objemy 20 mM ethanolaminu v 200 mM TEA. Gel byl promyt 5 objemy PBS s 0,02% azidem sodným a v tomto roztoku uložen při teplotě 4 °C.

Příklad 8: Testování buněčné adheze a proliferace.

Schopnost zsig37 polypeptidu stimulovat adhezi, tj. přilnutí TF-1 buněk k povrchu byla testována následujícím způsobem. Byla připravena ředící řada zsig37 polypeptidu s C-koncovou Glu-glu sekvencí v rozmezí od 10 do 0,0625 µg/ml v PBS nebo ELISA povlékacím pufru (0,1 M NaCO₃) a vzorky byly nanесeny na 96 jamkovou mikrotitrační destičku (Costar, Pleasanton, CA) v množství 100 µl/jamku. Destičky byly inkubovány 2 hodiny při 37 °C, 5% CO₂. Dále byly destičky 3 x promyty RPMI/10% FBS (RPMI 1640, 2 mM L-glutamin, 110 µg/ml

pyruvátu sodného, PSN a 10% tepelně inaktivované fetální hovězí sérum) a ponechány 15 minut za účelem blokace nespecifických míst.

TF-1 buňky (odvozené od buněk akutní myeloidní leukemie) byly resuspendovány v RPMI/10% FBS a vysety do jamek potažených zsig37CEE proteinem v množství 10 000 buněk na jamku a v celkovém objemu 120 μ l na jamku. Destičky byly inkubovány 2 hodiny při 37 °C, 5% CO₂. Dále byly destičky 3 x promyty PBS a do každé jamky bylo přidáno 200 μ l růstového média (RPMI/10% FBS, 5 ng/ml GM-CSF). Před a po promytí byla provedena mikroskopická kontrola buněk.

Pro kvantitativní stanovení počtu adherovaných buněk byla také použita metoda založená na inkorporaci barvy buňkami a následném stanovení kolorimetrických změn a vzrůstu fluorescenčního signálu. Do Jamek 96 jamkové mikrotitrační destičky byla přidána Alamar BlueTM (AccuMed, Chicago, IL) a buňky byly přes noc inkubovány při 37 °C, 5% CO₂. Barevná reakce byla poté změřena fluorometrem při excitační vlnové délce 544 nm a emisní vlnové délce 590 nm. V porovnání s destičkami s jamkami potaženými zsig37CEE-0,1 M NaCO₃ vykazovaly buňky v destičkách s jamkami potaženými zsig37CEE-PBS vyšší adhezivitu. Přidání rozpustného zsig37 proteinu adhezi buněk k vázanému zsig37 neblokovalo.

Další test byl proveden s použitím TF-1, DA-1 (IL-3 závislá buněčná linie odvozená od buněk z lymfatických uzlin myši, trpících lymfomem B-buněk, pěstováním v IL-3 médiu (tuto linii poskytl Dr. Kenneth Kaushansky, University of Washington, Seattle, WA)), pre-B (p53^{-/-} buňky z myši kostní dřeně, IL-7 dependentní, B220⁺, Thy1^{low}, Sca-1⁺) a A7BaF-3 buněčných linií dle výše popsaného postupu. Tentokrát bylo použito 5000 buněk na jamku. BHK buňky byly použity také, a to v množství 500 buněk na jamku. Zsig37 stimulační vliv na růst A7-BaF-3 buněk a mírně inhibiční vliv na růst DA-1 buněčné linie.

Příklad 9: Myši orthologní sekvence.

Nové lidské polynukleotidy kódující polypeptidy zsig37 podle navrhovaného vynálezu byly použity pro vyhledávání myších homologických sekvencí v myši EST databázi. Byla nalezena jediná EST sekvence odpovídající lidské zsig37 sekvenci. Klon, pravděpodobně obsahující odpovídající kódující sekvenci byl použit pro sekvenaci za účelem identifikace odpovídající cDNA. S použitím Invitrogen S.N.A.P.TM Miniprep kit (Invitrogen, Corp., San. Diego, CA) a podle instrukcí od výrobce bylo zpracováno 5 ml kultury pěstované přes noc v LB médiu s přidavkem 50 μ g/ml ampicilinu. Templát byl sekvenován na DNA sekvenátoru

ABIPRISMTM model 377 (Perkin-Elmer Cetus, orwalk, Ct.) s použitím ABI PRISMTM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Corp.) dle instrukcí od výrobce. Jako primery pro sekvenování byly použity oligonukleotidy ZC694 (SEQ ID NO:6), ZC6768 (SEQ ID NO:32), ZC18297 (SEQ ID NO:33), ZC18298 (SEQ ID NO:34), ZC18402 (SEQ ID NO:35), ZC18403 (SEQ ID NO:36), ZC18456 (SEQ ID NO:37), ZC18457 (SEQ ID NO:38), ZC18560 (SEQ ID NO:39), ZC18561 (SEQ ID NO:40), ZC18687 (SEQ ID NO:41) A ZC18688 (SEQ ID NO:42). Sekvenační reakce byly prováděny v Hybaid OmniGene Temperature Cycling System (National Labnet Co., Woodbridge, NY). Pro analýzu dat byl použit SEQUENCHERTM 3.0 software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Výsledná 2559 pb dlouhá sekvence je zde znázorněna jako SEQ ID NO:43 a odvozená aminokyselinová sekvence je uvedena pod číslem SEQ ID NO:44. Při porovnání s lidskou zsig37 nukleotidovou sekvencí (SEQ ID NO:1) vykazuje SEQ ID NO:43 77% identitu. Také předpokládané aminokyselinové sekvence myšího a lidského proteinu (SEQ ID NO:44 a SEQ ID NO:2 resp.) vykazují 77% identitu.

Příklad 10: Tesování buněk.

Polypeptidy zsig37 byly testovány *in vitro* za účelem identifikace látek, které selektivně aktivují buněčnou odpověď v buňkách nesmrtelných osteoblastových buněčných linií. V testu byla použita maturovaná osteoblastová buněčná linie odvozená od p53-/- (deficientních) myší, CCC4, která byla transfekována plazmidem nesoucím inducibilní SRE (serum response element) element, řídící expresi luciferázy. Tyto buňky dále exprimují endogenní PTH, PDGF nebo bFGF receptory. Stimulace SRE a následná exprese luciferázy v CCC4 buňkách indikuje, že chemická látka pravděpodobně v osteoblastech stimuluje mitogenezi.

Buňky CCC4 linie byly opracovány trypsinem a byly naředěny médiem pro výsev buněk (alpha-MEM, 1% teplotně inaktivované hovězí fetální sérum, 1 mM pyruvát sodný a 2 mM L-glutamát) na koncentraci 5×10^4 buněk/ml. Buňky byly vysety do jamek matně bílé mikrotitrační destičky Dynatech Microlite (Dynatech, Chantilly, VA) v množství 200 μ l/jamku a inkubovány přes noc při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Poté bylo růstové médium odsáto a nahrazeno 50 μ l/jamku testovacího média (F-12 HAM, 0,5% hovězí sérový albumin, 20 mM HEPES, 1 mM pyruvát sodný a 2 mM L-glutamát). Byla připravena ředící řada zsig37 proteinu v testovacím médiu (konečná koncentrace zsig37 0,29 až 1000 ng/ml) a vzorky zsig37 byly přidány do jednotlivých jamek. Vzorky zsig37 byly testovány v tripletech. Dále bylo použito

sérum jako negativní kontrola a bFGF jako pozitivní kontrola. Finální koncentrace bFGF byla 3 ng/ml. Kontroly byly testovány ve čtyřech opakováních. Destičky se vzorky byly inkubovány 4 hodiny při 37 °C a 5% CO₂. Testovací médium bylo poté odsáto a destičky byly promyty PBS. Do každé jamky bylo poté přidáno 25 µl lyzujícího pufru (Luciferase Assay Reagent, E1501, Promega Corp., Madison, WI). Destičky byly inkubovány 15 minut při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 50 µl/jamku substrátu pro luciferázu (Luciferase Assay Reagent, E1501, Promega Corp., Madison, WI) a aktivita luciferázy byla detekována pomocí Labsystems LUMINOSCAN® (2 sekundy/jamku, 1 sekunda prodleva). Průměrný bazální (neindukovaný) signál byl odečten od všech hodnot, které jsou znázorněny v tabulce 5 jako procento maximální indukce způsobené 3 ng/ml bFGF.

V tomto testu bylo zjištěno, že zsig37 indukuje expresi luciferázy, což naznačuje, že je stimulatorem osteoblastů. Zsig37 v koncentraci 1000 ng/ml vykazuje 73 až 75 % maximální indukce.

Dále byl proveden doplňující test zjišťující, zda zsig37 působí jako mimetikum růstového faktoru, především ligandů tyrozinkinázových receptorů PDGF, bFGF a EGF (inzulín-R negativní). V tomto pokusu byla použita klonální buněčná linie Swiss 3T3, odvozená od Swiss 3T3 myši, transfektovaná plazmidem nesoucím inducibilní SRE (serum response element) element, řídící expresi luciferázy. Tyto buňky dále exprimují endogenní PMA, EGF nebo bFGF receptory. Stimulace SRE a následná exprese luciferázy v Swiss 3T3 buňkách indikuje, že chemická látka pravděpodobně napodobuje aktivitu růstových faktorů PDGF, bFGF a EGF.

Buňky Swiss 3T3 byly opracovány trypsinem, byly naředěny médiem pro výsev buněk na koncentraci 5×10^4 buněk/ml a byly vysety a inkubovány tak jako v předchozím případě. Poté bylo růstové médium odsáto a nahrazeno 50 µl/jamku testovacího média (F-12 HAM, 0,5% hovězí sérový albumin, 20 mM HEPES). Byla připravena ředící řada zsig37 proteinu v testovacím médiu (konečná koncentrace zsig37 0,29 až 1000 ng/ml) a vzorky zsig37 byly přidány do jednotlivých jamek. Vzorky zsig37 byly testovány v tripletech. Dále bylo použito sérum jako negativní kontrola a bFGF jako pozitivní kontrola podněcující buněčnou proliferaci. Finální koncentrace bFGF byla 3 ng/ml. Kontroly byly testovány ve čtyřech opakováních. Destičky se vzorky byly inkubovány 5 hodin při 37 °C a 5% CO₂. Testovací médium bylo poté odsáto a destičky byly 1 x promyty PBS. Do každé jamky bylo poté přidáno 25 µl lyzujícího pufru (Luciferase Assay Reagent, E1501, Promega Corp., Madison, WI). Destičky byly inkubovány 15 minut při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 40 µl/jamku substrátu pro luciferázu (Luciferase Assay

Reagent, E1501, Promega Corp., Madison, WI) a aktivita luciferázy byla detekována pomocí Labsystems LUMINOSCAN® (2 sekundy/jamku, 1 sekunda prodleva). Průměrný bazální (neindukovaný) signál byl odečten od všech hodnot, které jsou vyjádřeny jako procento maximální indukce vyvolané 3 ng/ml bFGF. Pět hodin působení bFGF, PDGF, EGF nebo PMA na tuto buněčnou linii vede ke 25 až 50 násobné indukci exprese SRE-luciferázy.

V tomto testu bylo zjištěno, že zsig37 není stimulatorem exprese luciferázy. Zsig37 v koncentraci 1000 ng/ml vykazuje 0,2 až 0,1 % maximální indukce.

Příklad 11: *In vivo* podání zsig37 pomocí adenovirového vektoru.

V tomto testu bylo použito 24 samců a 24 samic asi 12 týdnů starých myší kmene C57B16/J (Jackson Labs, Bar Harbor, ME). Po dobu čtyř dnů před injekcí byla zvířata každý den vážena, byla měřena jejich tělesná teplota a byl sledován příjem potravy (dny -4 až -1). V den 0 byla zvířata rozdělena do tří skupin. V jedné skupině obdržela zvířata 0,1 ml AdV-empty (prázdného) viru ($1,8 \times 10^{11}$ virových částic /0,1 ml) intravenózně do ocasní žíly. Ve druhé skupině obdržela zvířata stejným způsobem 0,1 ml AdV-zsig37-CEE viru (5×10^{11} virových částic/0,1 ml). Třetí skupina injekci nedostala. Injekce by měla způsobit u hostitele infekci jater a exprese virových genů by se měla projevit během 24 hodin a měla by pokračovat 1 až 4 týdny. Byly testovány tři skupiny myší, v každé 8 samic a 8 samců. Skupina 1 neobdržela žádnou injekci, skupina 2 obdržela AdV-Empty (prázdný virus) a skupina 3 obdržela injekci AdV-zsig37-CEE.

Po dobu třech týdnů byla monitorována tělesná teplota a hmotnost zvířat a hmotnost přijaté potravy. Mezi třemi skupinami nebyly zjištěny žádné rozdíly. Dvacátý první den byly samičky myší uspány a usmrceny dekapitací. Stejným způsobem byly usmrceni 22. den také samci. Zvířata byla vykrváčena a byly odebrány tkáně pro nekropsii.

V okamžiku usmrcení byly provedeny standardní testy séra. Játra, ledviny i všechny metabolické parametry dosahovaly normálních hodnot, ovšem byly zjištěny rozdíly mezi skupinou ošetřenou zsig37 a skupinou která obdržela prázdný virus. Zvířata ošetřená zsig37 vykazovala vyšší průměrný lipemický index než kontroly, které obdržely jen prázdný virus. Rozdíl nebyl významný, ovšem další testy ho potvrdily. Ve zbylém séru byly u každého zvířete satnoveny celkové volné mastné kyseliny. Mezi samci ošetřenými zsig37 a kontrolními (prázdný virus) byl zjištěn statisticky významný rozdíl v hladině volných mastných kyselin v séru ($p = 0,0379$); myši ošetřené zsig37 vykazovaly vyšší

hladiny. Také u samic bylo zjištěn rozdíl, ovšem nikoliv statisticky významný ($p = 0,3357$). Po vyjmutí z těla byly tkáně (játra, slezina, ledviny, srdce, štítná žláza a mozek) zváženy. V hmotnosti odebraných tkání nebyly mezi skupinami zjištěny žádné rozdíly. Ani histopatologická analýza odebraných tkání a kostní dřeně neprokázala rozdíly mezi skupinami.

Pro potvrzení získaných výsledků bylo provedeno další testování s následujícími modifikacemi oproti prvnímu testu. Byly sledovány tři skupiny vždy po 20 myších C57B16/J (10 samců, 10 samic): a) neošetřené, na lačno; b) AdV-null (ošetřené prázdňím virovým vektorem) a na lačno a c) AdV-zsig37-CEE a na lačno. Myši hladověly přes noc a poté bylo odebráno 100 μ l séra pro stanovení bazálních hodnot následujících parametrů: glukóza na lačno, TP, alkalická fosfatáza, cholesterol, triglyceridy, volné mastné kyseliny a inzulin. Tělesná hmotnost byla určována 3 x týdně. V den 0 obdržela zvířata injekci 0,1 ml odpovídajícího roztoku viru do laterální ocasní žíly. Sedmnáctý den byla myšim na lačno (celonoční půst) odebrána krev. Po třech týdnech byly myši usmrceny a byla jim odebrána krev. Část krve byla smíšena s EDTA pro pozorování v CBC's a se zbylou krví byly opět provedeny testy tak jak to bylo popsáno výše. Stejně jako v předchozím případě byly odebrány orgány a byla provedena histopatologická analýza.

Z předchozího textu je jistě zřejmé, že ačkoliv byly pro lepší pochopení popsány některé konkrétní aspekty navrhovaného vynálezu, může být provedena celá řada modifikací, aniž bychom se odchýlili od myšlenky vynálezu. V souladu s tím je navrhovaný vynález limitován pouze následujícími patentovými nároky.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

PVR000-105 19082

1. Izolovaný polypeptid obsahující sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2, kde zmíněná sekvence obsahuje:
Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repeticce tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina a
karboxy-koncovou globulární doménu.
2. Izolovaný polypeptid podle nároku 1, kde aminokyselinová sekvence zmíněného polypeptidu je nejméně z 90 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 22 až 281 SEQ ID NO:2.
3. Izolovaný polypeptid podle nároku 2, kde zmíněný polypeptid obsahuje aminokyselinové zbytky 1 až 281 SEQ ID NO:2 nebo 1 až 281 SEQ ID NO:44.
4. Izolovaný polypeptid podle nároku 1, mající na N-konci nebo C-konci kovalentně vázanou část, vybranou ze skupiny obsahující afinitní skupiny, toxiny, radionukleotidy, enzymy a fluorofory.
5. Izolovaný polypeptid podle nároku 4, který dále obsahuje mezi zmíněnou aminokyselinovou sekvencí a zmíněnou afinitní skupinou místo pro proteolytické štěpení.
6. Izolovaný polypeptid vybraný ze skupiny obsahující:
 - a) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 99 až 140 SEQ ID NO:2;
 - b) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 140 nebo 141 až 281 SEQ ID NO:2 a
 - c) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 99 až 281 SEQ ID NO:2.
7. Fúzní protein, který se v podstatě skládá ze dvou částí, spojených peptidovou vazbou, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zmíněná první část obsahuje polypeptid vybraný ze skupiny obsahující:
 - a) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2;

- b) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků tak jak ji ukazuje SEQ ID NO:2 od aminokyseliny 1, 22 nebo 26 do aminokyseliny 281;
- c) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků tak jak ji ukazuje SEQ ID NO:44 od aminokyseliny 1, 22 nebo 26 do aminokyseliny 281;
- d) část zsig37 polypeptidu tak, jak ho ukazuje SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, která obsahuje kolagenu podobnou doménu nebo část kolagenu podobné domény, schopnou dimerizace nebo oligomerizace;
- e) část zsig37 polypeptidu tak, jak ho ukazuje SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, která obsahuje doménu podobnou globulární, nebo aktivní část domény podobné globulární doméně; nebo
- f) část zsig37 polypeptidu tak, jak ho ukazuje SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, která obsahuje kolagenu podobnou doménu a globulární doménu a

zmíněná druhá část zahrnuje jiný polypeptid.

8. Fúzní protein podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zmíněná první část je vybrána ze skupiny obsahující:
- a) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků tak jak ji ukazuje SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44 od aminokyseliny 99 do aminokyseliny 140;
 - b) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků tak jak ji ukazuje SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44 od aminokyseliny 140 nebo 141 do aminokyseliny 281;
 - c) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků tak jak ji ukazuje SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44 od aminokyseliny 99 do aminokyseliny 281.
9. Fúzní protein v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje sekreční signální sekvenci mající aminokyselinovou sekvenci shodnou se sekvencí aminokyselinových zbytků 1 až 21 nebo 1 až 25 SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, kde je zmíněná sekreční signální sekvence operativně spojena s dalším polypeptidem.
10. Expresní vektor v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje následující operativně spojené elementy:
- promotor transkripce;
 - DNA segment kódující polypeptid obsahující sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2, kde zmíněná sekvence obsahuje:

Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina a karboxy-koncovou globulární doménu; terminátor transkripce.

11. Expresní vektor podle nároku 10, vyznačující se tím, že zmíněný DNA segment kóduje polypeptid jehož aminokyselinová sekvence je nejméně z 90 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2.
12. Expresní vektor podle nároku 11, vyznačující se tím, že zmíněný DNA segment kóduje polypeptid jehož aminokyselinová sekvence je nejméně z 90 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 22 až 281 SEQ ID NO:2.
13. Expresní vektor podle nároku 11, vyznačující se tím, že zmíněný DNA segment kóduje polypeptid zahrnující sekvenci aminokyselinových zbytků 1 až 281 SEQ ID NO:2 nebo 1 až 281 SEQ ID NO:44.
14. Expresní vektor podle nároku 11, vyznačující se tím, že zmíněný DNA segment kóduje polypeptid, který je na N-konci nebo C-konci kovalentně vázaný s afinitní skupinou.
15. Expresní vektor podle nároku 11, vyznačující se tím, že zmíněný DNA segment dále kóduje sekreční signální sekvenci, operativně spojenou se zmíněným polypeptidem.
16. Expresní vektor podle nároku 15, vyznačující se tím, že zmíněná sekreční signální sekvence obsahuje aminokyselinovou sekvenci shodnou se sekvencí aminokyselinových zbytků 1 až 21 nebo 1 až 25 SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44.
17. Kultivovaná buňka vyznačující se tím, že byl do této buňky vnesen expresní vektor, obsahující následující operativně spojené elementy:
 promotor transkripce;
 DNA segment kódující polypeptid obsahující sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2, kde zmíněná sekvence obsahuje:
 Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina a
 karboxy-koncovou globulární doménu;
 terminátor transkripce, a kde zmíněná buňka exprimuje zmíněný polypeptid, kódovaný zmíněným DNA segmentem.

18. Způsob přípravy polypeptidu v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zahrnuje:
kultivaci buněk do kterých byl vnesen expresní vektor, obsahující následující operativně spojené elementy:
promotor transkripce;
DNA segment kódující polypeptid obsahující sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2, kde zmíněná sekvence obsahuje:
Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina a
karboxy-koncovou globulární doménu;
terminátor transkripce, a kde zmíněné buňky exprimují zmíněný polypeptid kódovaný zmíněným DNA segmentem a
izolaci zmíněného exprimovaného polypeptidu.
19. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje polypeptid, kde zmíněný polypeptid obsahuje sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2, kde zmíněná sekvence obsahuje:
Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina a
karboxy-koncovou globulární doménu
v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.
20. Protilátka, která specificky váže epitop polypeptidu, který obsahuje sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2, kde zmíněná sekvence obsahuje:
Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina a
karboxy-koncovou globulární doménu.
21. Vazebný protein, který specificky váže epitop polypeptidu, který obsahuje sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2, kde zmíněná sekvence obsahuje:
Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina a
karboxy-koncovou globulární doménu.
22. Izolovaný polynukleotid kódující polypeptid, kde sekvence aminokyselinových zbytků zmíněného polypeptidu je nejméně ze 75 %

identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2, kde zmíněná sekvence obsahuje:

Gly-Xaa-Xaa nebo Gly-Xaa-Pro repetice tvořící kolagenovou doménu, kde Xaa je kterákoliv aminokyselina a karboxy-koncovou globulární doménu.

23. Izolovaný polynukleotid podle nároku 22, kde sekvence aminokyselinových zbytků zmíněného polypeptidu je nejméně z 90 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2.
24. Izolovaný polynukleotid podle nároku 23, kde sekvence aminokyselinových zbytků zmíněného polypeptidu je nejméně z 90 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 22 až 281 SEQ ID NO:2.
25. Izolovaný polynukleotid podle nároku 23, který obsahuje aminokyselinové zbytky 1 až 281 SEQ ID NO:2 nebo aminokyselinové zbytky 1 až 281 SEQ ID NO:44.
26. Izolovaný polynukleotid podle nároku 22, kde zmíněný polynukleotid je DNA.
27. Izolovaný polynukleotid vybraný ze skupiny obsahující:
 - a) nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:1 od nukleotidu 465 do nukleotidu 688;
 - b) nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:1 od nukleotidu 688 do nukleotidu 1016;
 - c) nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:1 od nukleotidu 691 do nukleotidu 1016;
 - d) nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:1 od nukleotidu 465 do nukleotidu 1016;
 - e) nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:43 od nukleotidu 364 do nukleotidu 490;
 - f) nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:43 od nukleotidu 490 do nukleotidu 912;
 - g) nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:43 od nukleotidu 364 do nukleotidu 912;
 - h) nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:43 od nukleotidu 364 do nukleotidu 490;
 - i) polynukleotid kódující polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 99, 140 nebo 141 až 281 SEQ ID NO:2;

- j) polynukleotid kódující polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 99 až 140 SEQ ID NO:2;
 - k) nukleotidové sekvence komplementární k sekvencím a), b), c), d), e), f), g), h), i) nebo j) a
 - l) degenerované nukleotidové sekvence a), b), c), d), e), f), g), h), i), j) nebo k).
28. Izolovaný polynukleotid kódující fúzní protein který se v podstatě skládá ze dvou částí, spojených peptidovou vazbou, kde zmíněná první část fúzního proteinu obsahuje polypeptid vybraný ze skupiny obsahující:
- a) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků, která je nejméně ze 75 % identická se sekvencí aminokyselinových zbytků 26 až 281 SEQ ID NO:2;
 - b) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků tak jak ji ukazuje SEQ ID NO:2 od aminokyseliny 1, 22 nebo 26 do aminokyseliny 281;
 - c) polypeptid mající sekvenci aminokyselinových zbytků tak jak ji ukazuje SEQ ID NO:44 od aminokyseliny 1, 22 nebo 26 do aminokyseliny 281;
 - d) část zsig37 polypeptidu tak, jak ho ukazuje SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, která obsahuje kolagenu podobnou doménu nebo část kolagenu podobné domény, schopnou dimerizace nebo oligomerizace;
 - e) část zsig37 polypeptidu tak, jak ho ukazuje SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, která obsahuje doménu podobnou globulární, nebo aktivní část domény podobné globulární doméně; nebo
 - f) část zsig37 polypeptidu tak, jak ho ukazuje SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, která obsahuje kolagenu podobnou doménu a globulární doménu a
- zmíněná druhá část fúzního proteinu zahrnuje jiný polypeptid.
29. Izolovaný polynukleotid kódující fúzní protein, kde zmíněný fúzní protein obsahuje sekreční signální sekvenci mající aminokyselinovou sekvenci shodnou se sekvencí aminokyselinových zbytků 1 až 21 nebo 1 až 25 SEQ ID NO:2 nebo SEQ ID NO:44, kde je zmíněná sekreční signální sekvence operativně spojena s dalším polypeptidem.
30. Izolovaný polynukleotid obsahující sekvenci nukleotidů SEQ ID NO:23 od nukleotidu 1 do nukleotidu 843.
31. Oligonukleotidová sonda nebo primer obsahující nejméně 14 po sobě jdoucích nukleotidů polynukleotidové sekvence SEQ ID NO:23 nebo sekvence komplementární k SEQ ID NO:23.

SEZNAM SEKVENCÍ

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> Homology proteinů specifických pro adipocyty.

<130> 97-30 PC

<150> 60/053,154

<151> 1997-07-18

<160> 44

<170> FastSeq for Windows, verze 3.0

<210> 1

<211> 2769

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (171) ... (1013)

<400> 1

```

gaattcgaat tcctttgttt ccactgggac ggaatcggag ctctggaggc tgggctggcc      60
aagcgccccg aaggcccgat gcctgacggc tcatgcggcc tccttgtttg cagggcctgg      120
gcaaaaattt acactgagtc ccactcttcg ctccagggcc cggcaggaag atg ggc      176
                                     Met Gly
                                     1

```

```

tcc cgt gga cag gga ctc ttg ctg gcg tac tgc ctg ctc ctt gcc ttt      224
Ser Arg Gly Gln Gly Leu Leu Leu Ala Tyr Cys Leu Leu Leu Ala Phe
      5              10      15

```

```

gcc tct ggc ctg gtc ctg agt cgc gtg ccc cat gtc cag ggg gaa cag      272
Ala Ser Gly Leu Val Leu Ser Arg Val Pro His Val Gln Gly Glu Gln
      20              25              30

```

```

cag gag tgg gag ggg act gag gag ctg ccg tcc cct ccg gac cat gcc      320
Gln Glu Trp Glu Gly Thr Glu Glu Leu Pro Ser Pro Pro Asp His Ala
      35              40              45              50

```

gag agg gct gaa gaa caa cat gaa aaa tac agg ccc agt cag gac cag Glu Arg Ala Glu Glu Gln His Glu Lys Tyr Arg Pro Ser Gln Asp Gln 55 60 65	368
ggg ctc cct gct tcc cgg tgc ttg cgc tgc tgt gac cct ggt acc tcc Gly Leu Pro Ala Ser Arg Cys Leu Arg Cys Cys Asp Pro Gly Thr Ser 70 75 80	416
atg tac ccg gcg acc gcc gtg ccc cag atc aac atc act atc ttg aaa Met Tyr Pro Ala Thr Ala Val Pro Gln Ile Asn Ile Thr Ile Leu Lys 85 90 95	464
ggg gag aag ggt gac cgc gga gat cga ggc ctc caa ggg aaa tat ggc Gly Glu Lys Gly Asp Arg Gly Asp Arg Gly Leu Gln Gly Lys Tyr Gly 100 105 110	512
aaa aca ggc tca gca ggg gcc agg ggc cac act gga ccc aaa ggg cag Lys Thr Gly Ser Ala Gly Ala Arg Gly His Thr Gly Pro Lys Gly Gln 115 120 125 130	560
aag ggc tcc atg ggg gcc cct ggg gag cgg tgc aag agc cac tac gcc Lys Gly Ser Met Gly Ala Pro Gly Glu Arg Cys Lys Ser His Tyr Ala 135 140 145	608
gcc ttt tcg gtg ggc cgg aag aag ccc atg cac agc aac cac tac tac Ala Phe Ser Val Gly Arg Lys Lys Pro Met His Ser Asn His Tyr Tyr 150 155 160	656
cag acg gtg atc ttc gac acg gag ttc gtg aac ctc tac gac cac ttc Gln Thr Val Ile Phe Asp Thr Glu Phe Val Asn Leu Tyr Asp His Phe 165 170 175	704
aac atg ttc acc ggc aag ttc tac tgc tac gtg ccc ggc ctc tac ttc Asn Met Phe Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Tyr Val Pro Gly Leu Tyr Phe 180 185 190	752
ttc agc ctc aac gtg cac acc tgg aac cag aag gag acc tac ctg cac Phe Ser Leu Asn Val His Thr Trp Asn Gln Lys Glu Thr Tyr Leu His 195 200 205 210	800
atc atg aag aac gag gag gag gtg gtg atc ttg ttc gcg cag gtg ggc Ile Met Lys Asn Glu Glu Glu Val Val Ile Leu Phe Ala Gln Val Gly 215 220 225	848

gac cgc agc atc atg caa agc cag agc ctg atg ctg gag ctg cga gag	896
Asp Arg Ser Ile Met Gln Ser Gln Ser Leu Met Leu Glu Leu Arg Glu	
230 235 240	
cag gac cag gtg tgg gta cgc ctc tac aag ggc gaa cgt gag aac gcc	944
Gln Asp Gln Val Trp Val Arg Leu Tyr Lys Gly Glu Arg Glu Asn Ala	
245 250 255	
atc ttc agc gag gag ctg gac acc tac atc acc ttc agt ggc tac ctg	992
Ile Phe Ser Glu Glu Leu Asp Thr Tyr Ile Thr Phe Ser Gly Tyr Leu	
260 265 270	
gtc aag cac gcc acc gag ccc tagctggccg gccacctcct ttcctctcgc	1043
Val Lys His Ala Thr Glu Pro	
275 280	
caccttccac ccctgcgctg tgctgacccc agggctcagc accaggctga cccaccgcc	1103
tcttccccga tccctggact ccgactccct ggctttggca ttcagtgaga cgccctgcac	1163
acacagaaag ccaaagcgat cgggtgctccc agatcccgcga gcctctggag agagctgacg	1223
gcagatgaaa tcaccagggc ggggcacccg cgagaacctt ctgggacctt ccgcggccct	1283
ctctgcacac atcctcaagt gaccccgcac ggcgagacgc ggggtggcggc agggcgtccc	1343
aggggtgcggc accgcggctc cagtccttgg aaataattag gcaaattcta aaggtctcaa	1403
aaggagcaaa gtaaaccgtg gaggacaaag aaaaggggtg ttatTTTTgt ctttccagcc	1463
agcctgctgg ctcccaagag agaggccttt tcagttgaga ctctgcttaa gagaagatcc	1523
aaagttaaag ctctggggtc aggggagggg ccgggggcag gaaactacct ctggcttaat	1583
tcttttaagc cacgtaggaa ctttcttgag ggataggtgg accctgacat ccctgtggcc	1643
ttgcccagg gctctgctgg tctttctgag tcacagctgc gaggtgatgg gggctggggc	1703
cccaggcgtc agcctcccag agggacagct gagccccctg ccttggtctc aggttggtag	1763
aagcagccga agggctcctg acagtggcca gggaccctg ggtccccag gcctgcagat	1823
gtttctatga ggggcagagc tcctggtaca tccatgtgtg gctctgctcc acccctgtgc	1883
cacccagag ccctgggggg tggctccat gcctgccacc ctggcatcgg ctttctgtgc	1943
cgctccac acaaatcagc ccagaaggc cccggggctt tggcttctgt tttttataaa	2003
acacctcaag cagcactgca gtctccatc tcctcgtggg ctaagcatca ccgcttccac	2063
gtgtgttggtg ttggttgga gcaaggctga tccagacccc ttctgcccc actgccctca	2123
tccaggcctc tgaccagtag cctgagagg gctttttcta ggcttcagag caggggagag	2183
ctggaagggg ctagaaagct cccgcttgtc tgtttctcag gctcctgtga gcctcagtcc	2243
tgagaccaga gtcaagagga agtacacatc ccaatcacc gtgtcaggat tcaactctcag	2303
gagctgggtg gcaggagagg caatagcccc tgttgcaatt gcaggaccag ctggagcagg	2363
gttgcggtgt ctccgcgggtg ctctcgccct gccatggcc accccagact ctgatctcca	2423
ggaaccccat agccctctc cacctcacc catgttgatg cccagggtca ctcttgctac	2483
ccgctgggcc cccaaacccc cgctgcctct ctctctccc cccatcccc acctggtttt	2543
gactaatcct gcttccctct ctgggcctgg ctgccgggat ctgggggtccc taagtccctc	2603
tctttaaaga acttctgcgg gtcagactct gaagccgagt tgctgtgggc gtgcccggaa	2663
gcagagcgcc acactcgctg cttaagctcc cccagctctt tccagaaaac attaaactca	2723
gaattgtgtt ttcagcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagggc ggccgc	2769

<210> 2
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Gly Ser Arg Gly Gln Gly Leu Leu Leu Ala Tyr Cys Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Phe Ala Ser Gly Leu Val Leu Ser Arg Val Pro His Val Gln Gly
 20 25 30
 Glu Gln Gln Glu Trp Glu Gly Thr Glu Glu Leu Pro Ser Pro Pro Asp
 35 40 45
 His Ala Glu Arg Ala Glu Glu Gln His Glu Lys Tyr Arg Pro Ser Gln
 50 55 60
 Asp Gln Gly Leu Pro Ala Ser Arg Cys Leu Arg Cys Cys Asp Pro Gly
 65 70 75 80
 Thr Ser Met Tyr Pro Ala Thr Ala Val Pro Gln Ile Asn Ile Thr Ile
 85 90 95
 Leu Lys Gly Glu Lys Gly Asp Arg Gly Asp Arg Gly Leu Gln Gly Lys
 100 105 110
 Tyr Gly Lys Thr Gly Ser Ala Gly Ala Arg Gly His Thr Gly Pro Lys
 115 120 125
 Gly Gln Lys Gly Ser Met Gly Ala Pro Gly Glu Arg Cys Lys Ser His
 130 135 140
 Tyr Ala Ala Phe Ser Val Gly Arg Lys Lys Pro Met His Ser Asn His
 145 150 155 160
 Tyr Tyr Gln Thr Val Ile Phe Asp Thr Glu Phe Val Asn Leu Tyr Asp
 165 170 175
 His Phe Asn Met Phe Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Tyr Val Pro Gly Leu
 180 185 190
 Tyr Phe Phe Ser Leu Asn Val His Thr Trp Asn Gln Lys Glu Thr Tyr
 195 200 205
 Leu His Ile Met Lys Asn Glu Glu Glu Val Val Ile Leu Phe Ala Gln
 210 215 220
 Val Gly Asp Arg Ser Ile Met Gln Ser Gln Ser Leu Met Leu Glu Leu
 225 230 235 240
 Arg Glu Gln Asp Gln Val Trp Val Arg Leu Tyr Lys Gly Glu Arg Glu
 245 250 255
 Asn Ala Ile Phe Ser Glu Glu Leu Asp Thr Tyr Ile Thr Phe Ser Gly
 260 265 270
 Tyr Leu Val Lys His Ala Thr Glu Pro
 275 280

<210> 3

15.03.00

<211> 247

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Leu Leu Leu Gln Ala Leu Leu Phe Leu Leu Ile Leu Pro Ser His
 1           5           10           15
Ala Glu Asp Asp Val Thr Thr Thr Glu Glu Leu Ala Pro Ala Leu Val
          20           25           30
Pro Pro Pro Lys Gly Thr Cys Ala Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly
      35           40           45
His Pro Gly His Asn Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr
      50           55           60
Pro Gly Glu Lys Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Leu Leu Gly Pro Lys
65           70           75           80
Gly Glu Thr Gly Asp Val Gly Met Thr Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly
          85           90           95
Phe Pro Gln Thr Pro Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ala Ala Tyr
          100          105          110
Met Tyr Arg Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Arg Val Thr Val
          115          120          125
Pro Asn Val Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn
          130          135          140
His Tyr Asp Gly Ser Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Asn Ile Pro Gly Leu
145          150          155          160
Tyr Tyr Phe Ser Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val
          165          170          175
Ser Leu Phe Lys Lys Asp Lys Ala Val Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr
          180          185          190
Gln Glu Lys Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu
          195          200          205
Glu Val Gly Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Asp Gly Asp His
          210          215          220
Asn Gly Leu Tyr Ala Asp Asn Val Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe
225          230          235          240
Leu Leu Tyr His Asp Thr Asn
          245

```

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Oligonukleotid ZC12447

<400> 4	
atggggcacg cgactcagga ccaggccaga	30
<210> 5	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Umělá sekvence	
<220>	
<223> Oligonukleotid ZC695	
<400> 5	
gatttaggtg acactatag	19
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Umělá sekvence	
<220>	
<223> Oligonukleotid ZC694	
<400> 6	
taatacgact cactataggg	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Umělá sekvence	
<220>	
<223> Oligonukleotid ZC13210	
<400> 7	
aagcaccggg aagcagggag	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Umělá sekvence	
<220>	
<223> Oligonukleotid ZC13588	

<400> 8
cgggcacgta gcagtagaac 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC13532

<400> 9
gagagggctg aagaacaaca 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC13641

<400> 10
aagtgggcga gaggaaagga 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC13586

<400> 11
tggtcaccgg caagttctac 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid: ZC13651

<400> 12

ctttgtcctc cacggtttac

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Oligonukleotid: ZC13622

<400> 13

tttcctctcg ccaccttcca

20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Oligonukleotid ZC13625

<400> 14

cttcggctgc ttctaaccaa c

21

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Oligonukleotid ZC13650

<400> 15

gtaaaccgtg gaggacaaag

20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Oligonukleotid ZC13859

<400> 16

gctgccaacc aacacaacca c

21

<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC13624

<400> 17
gcaggattag tcaaaacc 18

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Umělá sekvence :

<220>
<223> Oligonukleotid ZC13531

<400> 18
aacatgggggt gaggtggaga 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Umělá sekvence :

<220>
<223> Oligonukleotid ZC13587

<400> 19
tcctcgtggg ctaagcatca 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC13623

<400> 20
atctccagga accccatagc 20

<210> 21
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Oligonukleotid ZC14444

<400> 21
 tctccaggaa ccccatag 18

<210> 22
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Oligonukleotid ZC14445

<400> 22
 gcaggattag tcaaaacc 18

<210> 23
 <211> 843
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Degenerovaná nukleotidová sekvence kódující zsig37
 polypeptid

<400> 23
 atgggnwsnm gnggncargg nytnytnytn gcntaytgyy tnytnytngc nttygcwnsn 60
 ggnytngtny tnwsnmngnt nccncaygtn carggngarc arcargartg ggarggnacn 120
 gargarytnc cnwsnccncc ngaycaygcr. garmgngcng argarcarca ygaraartay 180
 mgncnwsnc argaycargg nytnccngcn wsnmgntgyy tnmgtgytg ygayccnggn 240
 acnwsnatgt ayccngcnac ngcngtnccn carathaaya thacnathyt naarggngar 300
 aarggngaym gnggngaymg nggnytnicar ggnaartayg gnaaracngg nwsngcnggn 360
 gcnmgnggnc ayacnggncc naarggncar aarggnwsna tggngncnc ngngarmgn 420
 tgyaarwsnc aytaygcngc nttywsngtn ggnmgnaara arccnatgca ywsnaaycay 480
 taytaycara cngtnathtt ygayacngar ttygtnaayy tntaygayca yttyaayatg 540
 ttyacnggna arttytaytg ytagtncncc ggnytnatyt tyttywsnyt naaygtncay 600
 acntggaayc araargarac ntayytncay athatgaara aygargarga rgtngtnath 660
 ytnttygcnc argtnggnga ymgnwsnath atgcarwsnc arwsnytnat gytngarytn 720
 mgngarcarg aycargtntg ggtnmgnytn tayaarggng armngararaa ygcnathtty 780

wsngargary tngayacnta yathacntty wsnggntayy tngtnaarca ygcnaacngar
ccn

840
843

<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC15040

<400> 24
actcattcta gactagggct cggt

24

<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC15033

<400> 25
atgaatggat ccctggtcct gagt

24

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Glu-Glu affinity tag peptid

<400> 26
Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC15721

<400> 27	
ctgtaggaat tcatgggctc ccgt	24
<210> 28	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Umělá sekvence	
<220>	
<223> Oligonukleotid ZC15035	
<400> 28	
attcatggat ccgggctcgg tggc	24
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Umělá sekvence	
<220>	
<223> Oligonukleotid ZC13006	
<400> 29	
ggctgtcctc taagcgtcac	20
<210> 30	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Umělá sekvence	
<220>	
<223> Oligonukleotid ZC13007	
<400> 30	
aggggtcaca gggatgcca	19
<210> 31	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> Umělá sekvence	
<220>	
<223> Glu-Glu peptid	
<400> 31	

Gly Tyr Met Pro Val Asp
1 5

<210> 32
<211> 25
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC6768

<400> 32
gcaattaacc ctactaaag ggaac 25

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC18297

<400> 33
tcctgaaagg cgagaaaggt g 21

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC18298

<400> 34
ttccctgagt ctgagctagg 20

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC18402

<400> 35

tccagagtga ctggggaagt g	21
<210> 36	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Umělá sekvence	
<220>	
<223> Oligonukleotid ZC18403	
<400> 36	
agtgacgagt tcgacaccta c	21
<210> 37	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Umělá sekvence	
<220>	
<223> Oligonukleotid ZC18456	
<400> 37	
tgtgttccca ttcttgaca c	21
<210> 38	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Umělá sekvence	
<220>	
<223> Oligonukleotid ZC18457	
<400> 38	
tccttcagc tggctggaaa g	21
<210> 39	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Umělá sekvence	
<220>	
<223> Oligonukleotid ZC18560	
<400> 39	
agaatgcagg gataggtcag	20

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC18561

<400> 40
tcagaggatc ctgacagcag 20

<210> 41
<211> 21
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC18687

<400> 41
tggacacgtg agagggactt c 21

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid ZC18688

<400> 42
agcagtagaa cttcccagtg 20

<210> 43
<211> 2559
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (70)...(912)
<223> Myši ortholog

<400> 43

15.03.00

gaattcggat cctggaagag atgggattgt tataggcgga aagagagaaa cccagagaag	60
tccaggaag atg ggc tcc tgt gca cag gga ttc atg ctg gga tgc tgc ctg	111
Met Gly Ser Cys Ala Gln Gly Phe Met Leu Gly Cys Cys Leu	
1 5 10	
ctg ctg gcc atc acc tgg ggc ccc atc ctg agc ctt gtg cca cgc gtt	159
Leu Leu Ala Ile Thr Trp Gly Pro Ile Leu Ser Leu Val Pro Arg Val	
15 20 25 30	
cag gag gaa caa cag gag tgg gaa gag aca gag gag ctg cca tct cct	207
Gln Glu Glu Gln Gln Glu Trp Glu Glu Thr Glu Glu Leu Pro Ser Pro	
35 40 45	
ctg gat cct gtg aca agg cct gaa gaa aca cga gag aag tat agc cct	255
Leu Asp Pro Val Thr Arg Pro Glu Glu Thr Arg Glu Lys Tyr Ser Pro	
50 55 60	
cgc cag ggt gag gac ctc ccc act tct cgg tgc tac cga tgc tgt gac	303
Arg Gln Gly Glu Asp Leu Pro Thr Ser Arg Cys Tyr Arg Cys Cys Asp	
65 70 75	
ccc agc aca cct gta tac cag aca att cct cca ccc cag atc aac atc	351
Pro Ser Thr Pro Val Tyr Gln Thr Ile Pro Pro Pro Gln Ile Asn Ile	
80 85 90	
acc atc ctg aaa ggc gag aaa ggt gac cga ggg gat cga ggc ctc cag	399
Thr Ile Leu Lys Gly Glu Lys Gly Asp Arg Gly Asp Arg Gly Leu Gln	
95 100 105 110	
ggg aag tac ggc aaa ata ggt tct aca ggt ccc agg ggc cat gtt ggc	447
Gly Lys Tyr Gly Lys Ile Gly Ser Thr Gly Pro Arg Gly His Val Gly	
115 120 125	
ccc aaa ggg cag aag gga tcc att gga gcc cct ggg aac cac tgc aag	495
Pro Lys Gly Gln Lys Gly Ser Ile Gly Ala Pro Gly Asn His Cys Lys	
130 135 140	
agc cag tac gca gcc ttc tcc gtg ggc cgg aag aag gct ttg cac agc	543
Ser Gln Tyr Ala Ala Phe Ser Val Gly Arg Lys Lys Ala Leu His Ser	
145 150 155	
aac gac tac ttc cag ccc gtg gtc ttc gac acg gag ttt gtg aac ctc	591
Asn Asp Tyr Phe Gln Pro Val Val Phe Asp Thr Glu Phe Val Asn Leu	
160 165 170	

tac aaa cac ttc aat atg ttc act ggg aag ttc tac tgc tat gtg ccg	639
Tyr Lys His Phe Asn Met Phe Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Tyr Val Pro	
175 180 185 190	
ggc atc tac ttc ttc agc ctc aac gtg cac act tgg aac cag aag gag	687
Gly Ile Tyr Phe Phe Ser Leu Asn Val His Thr Trp Asn Gln Lys Glu	
195 200 205	
acg tac ctg cac atc atg aag aac gag gag gag gtg gtg atc ctg tat	735
Thr Tyr Leu His Ile Met Lys Asn Glu Glu Glu Val Val Ile Leu Tyr	
210 215 220	
gcg cag gtg agc gac cgc agc atc atg cag agt cag agc ctg atg atg	783
Ala Gln Val Ser Asp Arg Ser Ile Met Gln Ser Gln Ser Leu Met Met	
225 230 235	
gag ctg cgg gag gag gat gag gtc tgg gtg cgt ctc ttc aag ggc gag	831
Glu Leu Arg Glu Glu Asp Glu Val Trp Val Arg Leu Phe Lys Gly Glu	
240 245 250	
cgt gag aac gcc att ttc agt gac gag ttc gac acc tac atc acc ttc	879
Arg Glu Asn Ala Ile Phe Ser Asp Glu Phe Asp Thr Tyr Ile Thr Phe	
255 260 265 270	
agt ggc tac ctg gtc aag cca gcc tct gag ccc tagtggacac tcctgtggag	932
Ser Gly Tyr Leu Val Lys Pro Ala Ser Glu Pro	
275 280	
cttttgtgga ctgctgacct ccttgccctgg caccctgacc tatecctgca ttctacagac	992
actggagtcc tgccccgggc tgacccatt ttctctctgc tccatcctgg cttecttggc	1052
cttggcttcc aaagttttgg cttttgacaa gatgcccttg gccactggga atcccaaagg	1112
atggtgcatg cccagatctg gctgctactc taagcagaga gctgccggca gatgaaatca	1172
ttgggcgggg agcctgtgag gatattgggg ggcctccagc tccttctgtg tacacagcct	1232
tagacgacct tgtgctgtgt tgtcccgctg ccacagggtg ttccagagca cagcccctgt	1292
gtgttcccat tcctggacac aagtaagcaa atatcatggg tttcttagga acgaagtcaa	1352
gcagaaaaga gaaagaaagg tgggttagt tttggctttc cagccagctg gaaggaggga	1412
tggggagaga gagagagaga gagctatttg tattggggaa actgaggcat aggaaaaaca	1472
tgaatggcaa cagagtagct gcagtttgtg ggtttgaaa ccacatctga cttactcta	1532
gatcacatat gagctttcct ggggacagca ggactgacct ccgagctctg ttgacatgct	1592
atagccttgc ccaggggctg gtcaatcttt ctgagccaca ctagtaaaag ggttggagga	1652
gaacagcaag tgccccctgt ggttggctct gggctggtgg cagcatcctg cttgccccaa	1712
ctcacaggat cctgacagca gctgggaacc tcagggactc ctgcagcttt ctctgtaaga	1772
aataaagctc ctactatgtc ccagtacctc tctgctctgc tccacttccc cagtcactct	1832
ggaccccagg gtgggagggc tctcttgctt gttgggacat cagttcccct tcctccttct	1892
tggtgaatta accatggaag gaccagggct cggatttggg ttcccaaact gcccttcacc	1952

atccctagtg	tcctgcttcc	ttcccagttc	agcatcctgt	ctgggaactt	gatactttaa	2012
cctgctagag	cggatgagtc	tgatagacct	gcccagccct	gacacagccc	tagtcagctt	2072
atggacacgt	gagagggact	tcctttgaga	cccagagctg	gggtagagct	ataaaaatct	2132
acctattccc	gggtcaaccc	caagtggtag	aagaggacac	aggctatccc	gccctagctc	2192
agactcaggg	aaggcctcag	gcctgattgt	ctgactgcag	agagcctgtg	ttctttcccc	2252
atctcacccc	gtgttgatcc	ccagggcctg	ggccactgga	tatctgcttt	gtgccaacta	2312
ggccttgctt	gctgcttctt	ggtggccctt	ggtaggatac	cctctctttt	ccttctggag	2372
ctcaatgtac	gtatatgcca	cctccgaagg	ggcttctgct	ggtcagactc	tccaagccac	2432
ttccatgggt	gtgcctacag	cagaggctgc	tgccctcctgt	gctctaccct	gctctttcca	2492
gaaaacatta	aacttgccat	ggcgattcac	agcaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaag	2552
gcggccg						2559

<210> 44

<211> 281

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Met	Gly	Ser	Cys	Ala	Gln	Gly	Phe	Met	Leu	Gly	Cys	Cys	Leu	Leu	Leu	
1				5				10					15			
Ala	Ile	Thr	Trp	Gly	Pro	Ile	Leu	Ser	Leu	Val	Pro	Arg	Val	Gln	Glu	
			20				25						30			
Glu	Gln	Gln	Glu	Trp	Glu	Glu	Thr	Glu	Glu	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Asp	
			35				40					45				
Pro	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	Glu	Thr	Arg	Glu	Lys	Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln	
			50				55				60					
Gly	Glu	Asp	Leu	Pro	Thr	Ser	Arg	Cys	Tyr	Arg	Cys	Cys	Asp	Pro	Ser	
65				70					75					80		
Thr	Pro	Val	Tyr	Gln	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Asn	Ile	Thr	Ile	
				85					90					95		
Leu	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Asp	Arg	Gly	Leu	Gln	Gly	Lys	
			100					105					110			
Tyr	Gly	Lys	Ile	Gly	Ser	Thr	Gly	Pro	Arg	Gly	His	Val	Gly	Pro	Lys	
			115				120					125				
Gly	Gln	Lys	Gly	Ser	Ile	Gly	Ala	Pro	Gly	Asn	His	Cys	Lys	Ser	Gln	
			130				135				140					
Tyr	Ala	Ala	Phe	Ser	Val	Gly	Arg	Lys	Lys	Ala	Leu	His	Ser	Asn	Asp	
145				150					155					160		
Tyr	Phe	Gln	Pro	Val	Val	Phe	Asp	Thr	Glu	Phe	Val	Asn	Leu	Tyr	Lys	
				165					170					175		
His	Phe	Asn	Met	Phe	Thr	Gly	Lys	Phe	Tyr	Cys	Tyr	Val	Pro	Gly	Ile	
			180					185					190			
Tyr	Phe	Phe	Ser	Leu	Asn	Val	His	Thr	Trp	Asn	Gln	Lys	Glu	Thr	Tyr	
			195				200					205				
Leu	His	Ile	Met	Lys	Asn	Glu	Glu	Glu	Val	Val	Ile	Leu	Tyr	Ala	Gln	

	210					215					220					
Val	Ser	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Gln	Ser	Gln	Ser	Leu	Met	Met	Glu	Leu	
225						230				235					240	
Arg	Glu	Glu	Asp	Glu	Val	Trp	Val	Arg	Leu	Phe	Lys	Gly	Glu	Arg	Glu	
				245					250					255		
Asn	Ala	Ile	Phe	Ser	Asp	Glu	Phe	Asp	Thr	Tyr	Ile	Thr	Phe	Ser	Gly	
			260					265					270			
Tyr	Leu	Val	Lys	Pro	Ala	Ser	Glu	Pro								
		275					280									

zsig37_3_z MGSRGQGLLLAYCLLLAFASG----- ; 21
 HUMUPST2_1 MLLLGAVLLLLALP----- ; 14
 C1QA_HUMAN MEGPRGWL VLCVLAISLA----- ; 18
 HP25_TAMAS MPAQRGGALSMGAAGFWILVLSITSALA----- ; 28
 HP27_TAMAS MYEAGKRASFMGGAGIWLALSVMHVCS----- ; 30
 CERL_RAT MPAPGRGPRGPLLSMPGRRGALREPADFGSSLGAALALLLLLLPACC ; 47

 zsig37_3_z -----LVLSRVPHVQGEQQEWEGTEELPSPPDHAERAEQHEKYRPS ; 63
 HUMUPST2_1 -----GHDQ-----ETTTQGP-----GVLLPL ; 31
 C1QA_HUMAN -----SMVT-----EDLCRAPD-----GK ; 32
 HP25_TAMAS -----DSNNQGNSEPC----- ; 39
 HP27_TAMAS -----ETQGNPESC----- ; 39
 CERL_RAT PVKA-QNDTEPIVLEGKC----LVVCDSSPSGDGAVTSSL----- ; 82

 zsig37_3_z QDQGLPASRCLRCCDPGTSMYPATAVPQINITILKGEKGDRGDRGLQ ; 110
 HUMUPST2_1 PKGACTGWMAGIPGHPGHNGAPGRDG-RDGTPEGKGEKGDPLIGPK ; 77
 C1QA_HUMAN KGEAGRPGRRRGPLKGEQGEPEGAPGIRTGIQGLKGDQGEPPSGNP ; 79
 HP25_TAMAS -----GPPGPPGPPGIP ; 51
 HP27_TAMAS -----NVPGPQGP GMR ; 51
 CERL_RAT ----- ; 82

 zsig37_3_z GKYGKTGSAGARGHTGPKGQKGSMAPE--RCK-SHYAAFSVGRKK ; 154
 HUMUPST2_1 GDIGETGVPGAEGPRGFPGIQGRKGEPGE--GAY-VYRSAFSVGLET ; 121
 C1QA_HUMAN GKVGYPGPSGPLGARGIPGIKGTGSGPN--IKD-QPRPAFSAIRRN ; 123
 HP25_TAMAS GFPGAPGALGPPGPPGVPVGPVGPQGPVGDVEKCSSRPKSAFAVKLSE ; 98
 HP27_TAMAS GPPGTPGKPGPPGWNGFPLPGPPGPPGMTVNCHSKGTSFAVKANE ; 98
 CERL_RAT -----GISVRSG---SAKVAFSATRSTNHE ; 104

 zsig37_3_z PMHSNHYYQTVIFDTEFVNLYDHFNMTGKFYCYVPGLYFFSLNV-H ; 200
 HUMUPST2_1 YVTI--PNMPIRFTKIFYNQNHYDGTGKFHCNIPGLYYFAYHI-T ; 165
 C1QA_HUMAN PPMG---GNVVIFDVTITNQEEPYQNHSGRFVCTVPGYYYFTFQV-L ; 166
 HP25_TAMAS RPPE--PFQPIVFKEALYNQEGHFNMATGEFSCVLPGVYNFGFDIRL ; 143
 HP27_TAMAS LPPA--PSQPVIFKEALHDAQGHFDLATGVFTCPVPGLYQFGFHIEA ; 143
 CERL_RAT PSEMSNRTMTIYFDQVLVNIGNHFDLASSIFVAPRKGISFSFHVVK ; 151

 zsig37_3_z T---WNQKETYLHIMKNEEEVVILFAQVGDRSIMQSQS--LMLELRE ; 242
 HUMUPST2_1 V----YMKDVKVSFLFKKDKAMLFYDQYQENNVDAQSG-SVLLHLEV ; 207
 C1QA_HUMAN SQ--WEICLSIVSSSRGQVRRSLGFCDDTNKGLFQVVSGGMVLQLQQ ; 211
 HP25_TAMAS FQ--SSVKIRLMRDGI-QVREK----EAQANDSYKHAMGVSIMALGK ; 183
 HP27_TAMAS VQ--RAVKVSLMRNGT-QVMER----EAEAQDGYEHISGTAILQLGM ; 183
 CERL_RAT VYNRQTIQVSLMQNGY-PVISA----FAGDQDVTREAASNGVLLL-M ; 192

zsig37_3_z QDQVWRLYKG-ERENAI FSEELDTYITFSGYLVKHATEP ; 281
HUMUPST2_1 GDQVWLQVYGEGERNGLYADNDNDS--TFTGFLLYHDTN- ; 244
C1QA_HUMAN GDQVWVEKDP--KKGHIYQGSEADS--VFSGFLIFPSA-- ; 245
HP25_TAMAS GDKVWLESKL--KGTESEKGI-THI--VFFGYLLYGK--- ; 215
HP27_TAMAS EDRVLENKL--SQTDLERGT-VQA--VFSGFLIHEN--- ; 215
CERL_RAT EREDKVHLKL--ERGNLMGGW-KYS--TFSGFLVFPL--- ; 224

	zsig37	HUMUPST2 1	C1QA HUMAN	HP25 TAMAS	HP27 TAMAS	CERL-RAT
zsig37	100					
HUMUPST2 1	32	100				
C1QA HUMAN	30	33	100			
HP25 TAMAS	31	31	32	100		
HP27 TAMAS	28	29	32	53	100	
CERL-RAT	21	25	24	27	33	100

Obrázek 2