

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 63639 B1



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

7(51) C 12 N 15/19

C 07 K 14/52

C 07 K 16/24

A 61 K 38/19

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 100693
(22) Заявено на 02.07.96
(24) Начало на действие
на патента от: 28.12.94

Приоритетни данни

(31) 176553	(32) 03.01.94	(33) US
185607	21.01.94	US
196689	15.02.94	US
223263	04.04.94	US
249376	25.05.94	US
348657	02.12.94	US
348658	02.12.94	US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 1 на 30.01.98
(45) Отпечатано на 31.07.2002
(46) Публикувано в бюлетин № 7
на 31.07.2002
(56) Информационни източници:
(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприетел(и):
GENENTECH INC., SOUTH SAN
FRANCISCO, CA (US)

(72) Изобретател(и):
Dan L. Eaton, San Rafael, CA
Frederic J. De Sauvage, Foster City, CA (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Румяна Стефанова Слабова, 1124 София,
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/US94/14553, 28.12.94

(87) № и дата на PCT публикация:
WO95/18858, 13.07.95

(54) ТРОМБОПОЕТИН-МРІ-ЛИГАНДЕН ПОЛИПЕПТИД

(57) Изобретението се отнася до изолиран тромбопоетин (ТРО), изолирана DNK, кодираща ТРО, и до рекомбинантни или синтетични методи за получаване и пречистване на ТРО. Установено е, че различните форми на ТРО влияят върху репликацията, диференциацията или зреенето на кръвните клетки, по-специално на мегакариоцитите и на мегакариоцитните родителски клетки, поради което посочените съединения могат да се използват за лечение на тромбоцитопения.

36 претенции, 42 фигури

BG 63639 B1

(54) ТРОМБОПОЕТИН - МРІ - ЛИГАНДЕН ПОЛИПЕПТИД

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Изобретението се отнася за изолирането, пречистването и екомбинантния или химичен синтез на белтъци, които влияят върху преживяемостта, пролиферацията, диференциацията или узряване на хематопоеичните клетки и по-специално на тромбоцитните родителски клетки. По-конкретно това изобретение се отнася за клонирането и експресията на нуклеинови киселини, кодиращи белтъчен лиганд, способен да свързва и активира *mpl* - член на цитокиновата рецепторна суперфамилия. Това изобретение се отнася още и за използването на тези белтъци поотделно или в комбинация с други цитокини за лечение на имунни или хематопоеични заболявания, включващи тромбоцитопенията.

ПРЕДШЕСТВУВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

I. Хематопоетична система

Хематопоетичната система продуцира зрелите високоспециализирани кръвни клетки, за които е известно, че са необходими за преживяемостта на всички бозайници. Тези зрели клетки включват: еритроцити, специализирани да пренасят кислород и въглеродендиоксид, Т- и В-лимфоцити, които са отговорни за клетъчно- и антитяло-медираните имунни отговори, кръвни плочици или тромбоцити, специализирани да образуват кръвни съсиреци и гранулоцити и макрофаги, специализирани като фагоцитиращи и като помощни клетки за борба с инфекциите. Гранулоцитите допълнително се подразделят на: неутрофили, еозинофили, базофили и мастни клетки - специализирани клетъчни типове, които имат дискретни функции. Забележителното е, че всички тези специализирани зрели кръвни клетки произхождат от един общ примитивен клетъчен тип, означаван като плурипотентна (или тотипотентна) стволова клетка, открита най-напред в костния мозък (Dexter et al., *Ann Rev. Cell Biol.*, 3:423-441 [1987]).

Зрелите високоспециализирани кръвни клетки трябва да се продуцират в големи количества непрекъснато през целия живот на бозайника. Голямата част от тези специализирани кръвни клетки са предопределени да остават функционално активни само от няколко часа до седмици (Cronkite et al., *Blood Cells*, 2:263-248 [1976]). По този начин, за да се обслужат нуждите от нормален статус на кръвните клетки в бозайника, е необходимо непрекъснатото обновяване на зрелите кръвни клетки, на самите примитивни стволови клетки, както и на всяка междинна или родословно-обвързана родителска клетъчна линия, лежаща между примитивните и зрелите клетки.

В центъра на хематопоетичната система лежи плурипотентната стволова клетка(и). Тези клетки са относително малко на брой и преминават през самообновяване чрез пролиферация, за да образуват дъщерните стволови клетки или се трансформират чрез серия диференциращи стъпки във все по-зрели родословно-ограничени родителки клетки, които задължително формират

високоспециализираната зряла кръвна клетка(и). Например, определени мултипотентни родителски клетки, означавани като CFC-Mix, които са произлезли от стволови клетки, претърпяват пролиферация (самообновяване) и развитие, за да образуват колонии, които съдържат всичките различни миелоидни клетки: еритроцити, неутрофили, мегакариоцити (предшественици на тромбоцитите), макрофаги, базофили, еозинофили и мастни клетки. Други родителски клетки от лимфоидния ред претърпяват пролиферация и развитие в Т-клетки и В-клетки.

Освен това между CFC-Mix-родителските клетки и миелоидните клетки лежи друга категория родителски клетки, които имат междинна обвързаност със своето потомство. Тези родословно-ограничени родителски клетки се класифицират на основата на потомството, което дават. Така известните междинни предшественици на миелоидните клетки са: единици, формиращи еритроидната колония (CFU-E) за еритроцити; клетки, формиращи колонията от гранулоцити и макрофаги (GM-CFC) за неутрофили и макрофаги; клетки, формиращи мегакариоцитната колония (Meg-CFC) за мегакариоцити; клетки, формиращи еозинофилната колония (Eos-CFC) за еозинофили и клетки, формиращи базофилната колония (Bas-CFC) за мастни клетки. Известни са (виж по-долу) или по всяка вероятност ще бъдат открити и други междинни клетки-предшественици между плурипотентните стволови клетки и зрелите кръвни клетки, имащи различни степени на родословна ограниченост и на капацитет за самообновяване.

В основата на нормалната хематопоетична система изглежда лежи принципът на понижен капацитет за самообновяване, доколкото мултипотентността се загубва и се придобиват родословна ограниченост и зрялост. И така, от едната страна на хематопоетичния клетъчен спектър лежи плурипотентната стволова клетка, притежаваща капацитета за самообновяване и диференциация във всичките различни родителски клетки, обвързани с родословна специфичност. Този капацитет представлява основата на терапията чрез костномозъчна трансплантация, при която примитивните стволови клетки

възстановяват цялата хематопоеична клетъчна система. От другата страна на спектъра лежат силно родословно-ограничените предшественици и тяхното потомство, които са загубили способността за самообновяване, но са придобили зряла функционална активност.

Пролиферацията и развитието на стволовите клетки и на родословно-ограничените родителски клетки се контролира прецизно от разнообразни хематопоеични растежни фактори или цитокини. Ролята на тези растежни фактори *in vivo* е сложна и ненапълно изяснена. Някои растежни фактори, такива като интерлевкин-3 (IL-3), са в състояние да стимулират както мултипотентните стволови клетки, така и родителски клетки, даващи началото на някои родословни линии, включващи например, мегакариоцитите. За други фактори, такива като фактора, стимулиращ колонията от гранулоцити/макрофаги (GM-CSF) първоначално се смяташе, че действието им се ограничава само до GM-CFC. По-късно обаче се откри, че GM-CSF влияе също и върху пролиферацията и развитието на мегакариоцитите. По този начин беше намерено, че IL-3 и GM-CSF имат припокриващи се билогични активности, макар и с различен потенциал. От по-скоро е известно, че интерлевкин-6 (IL-6) и интерлевкин-11 (IL-11), макар и поотделно да нямат видимо влияние върху формирането на тег-колонията, действуват синергично с IL-3 и стимулират зрееенето на мегакариоцитите (Yonemura et al., *Exp. Hematol.*, **20**:1011-1016 [1992]).

И така, хематопоеичните растежни фактори могат да влияят върху растежа и диференцирането на една или повече родословни линии, могат частично да съвпадат в действието си върху единична родителска клетъчна линия или могат да действуват синергично с други фактори.

Изглежда също така, че хематопоеичните растежни фактори могат да осъществят своя ефект на различни етапи от развитието на клетката - от тотипотентната стволова клетка през различно ангажираните родословно-ограничени предшественици до зрялата кръвна клетка. Например, изглежда, че еритропоетинът (еро) съдействува за пролиферацията само на зрите еритроидни родителски клетки. IL-3 изглежда, че осъществява своя ефект по-

рано, повлиявайки примитивните стволови клетки и междинните родословно-ограничени родителски клетки. Други растежни фактори, такива като стволовият клетъчен фактор (SCF), могат да въздействуват дори върху по-примитивното клетъчно развитие.

От гореизложеното може да се прецени, че специално за подпомагане възстановяването на отслабнала хематопоеична система в резултат на заболяване или след лъче- или химиотерапия от полза биха били полезни хематопоеични растежни фактори, които влияят върху преживяемостта, пролиферацията, диференциацията или зреенето на всяка от кръвните клетки или на техните предшественици.

II. Мегакариоцитопоеза - образуване на тромбоцити

Обзор върху регулацията на мегакариоцитопоезата и образуването на тромбоцитите е направен от: Mazur, *Exp. Hematol.*, 15:248 [1987] и Hoffman, *Blood*, 74:1196-1212 [1989]. Накратко, плурипотентни стволови клетки на костния мозък се диференцират в мегакариоцитни, еритроцитни и миелоцитни клетъчни линии. Смята се, че между стволовите клетки и мегакариоцитите съществува йерархия от родословно ангажирани мегакариоцитни родителски клетки. Идентифицирани са били най-малко три класа мегакариоцитни родителски клетки, а именно: единица мегакариоцити (BFU-MK), формираща огнище, единица мегакариоцити, формираща колония (CFU-MK) и мегакариоцитни родителски клетки с ниска плътност (LD-CFU-MK). Самото зреење на мегакариоцитите представлява непрекъснато развитие, което е разделено на етапи, основаващи се на стандартни морфологични критерии. Най-рано разпознаващият се член на мегакариоцитната (МК или meg) фамилия са мегакариобластите. Тези клетки първоначално са с диаметър 20 до 30 мкм, имат базофилна цитоплазма и леко неправилно ядро с рехав, до известна степен мрежовиден хроматин и няколко ядърца. По-късно мегакариоцитите могат да съдържат до 32 ядра (полиплоид), но цитоплазмата остава неструктурирана и незряла. При протичане на зреенето

ядрото става по-заоблено и пикнотично, цитоплазмата нараства по количество и става по-ацидофилна и грануларна. Най-зрелите клетки от това семейство могат да изглеждат като особобждаващи тромбоцити по своята периферия. Нормално по-малко от 10% от мегакариоцитите са в бластен стадий и повече от 50% са зрели. Произволните морфологични класификации, които обикновено се прилагат за мегакариоцитната серия са: мегакариобласт за най-ранната форма; промегакариоцит или базофилен мегакариоцит за междинната форма; и зрял (ацидофилен, грануларен или тромбоцит-образуващ) мегакариоцит за най-късните форми. Зрелят мегакариоцит излъчва филаменти (нишки) от цитоплазма в синусоидалните пространства, където те се отделят и фрагментират в индивидуални тромбоцити (Williams et al., *Hematology*, 1972).

Смята се, че мегакариоцитопоезата включва няколко регулаторни фактора (Williams et al., *Br. J. Haematol.*, **52**:173 [1982] и Williams et al., *J. Cell Physiol.*, **110**:101 [[1982])). Ранното ниво на мегакариоцитопоезата се определя като митотично, съпроводено с клетъчна пролиферация и колонийна инициация от CFU-MK, но което не се влияе от броя на тромбоцитите (Burstain et al., *J. Cell Physiol.*, **109**:333 [1981] и Kimura et al., *Exp. Hematol.*, **13**:1048 [1985])). По-късният стадий на зреене е не-митотичен, започва с ядрена полиплоидизация и цитоплазмено зреене и вероятно се регулира по механизма на обратната връзка чрез периферния брой на тромбоцитите (Odell et al., *Blood*, **48**:765 [1976] и Ebbe et al., *Blood*, **32**:787 [1968])).

Съществуването на различен и специфичен фактор за стимулиране на мегакариоцитната колония (MK-CSF) е бил диспутиран (Mazur, *Exp. Hematol.*, **15**:340-350 [1987])). Повечето автори обаче смятат, че толкова витален процес на преживяемост, какъвто е образуването на тромбоцитите, би трябвало да се регулира от цитокин(и), които са отговорни изключително за този процес. Хипотезата, че съществува(т) цитокин(и), специфични за мегакариоцитите/тромбоцитите, обезпечи базата за търсене в продължение на повече от 30 години, но досега подобен цитокин не беше пречистен, секвениран и доказан чрез тест като уникален MK-CSF (TPO).

Въпреки съобщенията, че МК-CSF's са били частично пречистени от експериментално предизвикана тромбоцитопения (Hill et al., *Exp. Hematol.*, **14**:752 [1986], от културална среда на човешки ембрионален бъбрек [CM] (McDonald et al., *J. Lab. Clin. Med.*, **85**:59 [1975]), от човек с пластична анемия и от пурпурни уринарни екстракти в случаи на идиопатична тромбоцитопения (Kawakita et al., *Blood*, **6**:556 [1983]) и от плазма (Hoffman et al., *J. Clin. Invest.*, **75**:1174 [1985]), тяхната физиологична функция, както и досега в повечето случаи остава неизвестна.

Културалната среда от далачни клетки, активирани с митоген, изолиран от растението лаконос (PWM-SpCM) и мишата миеломоноцитна клетъчна линия WEHI-3 (WEHI-3CM) са били изпозувани като мегакариоцитни стимулатори. PWM-SpCM съдържа фактори, усилващи растежа на CFU-MK (Metcalf et al., *Pro. Natl. Acad. Sci., USA*, **72**:1744-1748 [1975]; Quesenberry et al., *Blood*, **65**:214 [1985]; и Iscove, N.N., in *Hematopoietic Cell Differentiation, ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, Vol. 10, Golde et al., eds. [New York, Academy Press] pp 37-52 [1987], един от които е интерлевкин-3 (IL-3) - фактор, стимулиращ колонии на много родсловни линии (multi-CSF [Burstein, *Blood Cells*, **11**:469 [1986]. Другите фактори в тази среда досега не са били идентифицирани и изолирани. WEHI-3 е миша миеломоноцитна клетъчна линия, която секретира относително големи количества IL-3 и по-малки количества GM-CSF. За IL-3 е намерено, че стимулира растежа на широк набор от хематопоеични клетки (Ihle et al., *J. Immunol.*, **13**:282 [1983]). За IL-3 е намерено също, че взаимодействува с много от известните хематопоеични хормони или растежни фактори (Bartelmez et al., *J. Cell Physiol.*, **122**:362-369 [1985] и Warren et al., *Cell*, **46**:667-674 [1988]), включващи еритропоетин (EPO) и интерлевкин-1 (IL-1), в индукцията на много ранните мултипотенциални предшественици и във формирането на много големи смесени хематопоеични колонии.

Други източници на мегакариоцитни стимулатори са намерени в културалната среда на миши бял дроб, кост, макрофагови клетъчни линии, перитонеално излъчени клетки и човешки ембрионални бъбречни клетки.

Независимо от някои противоречиви данни (Mazur, *Exp. Hematol.*, 15:340-350 [1987]), е налице известно доказателство (Geissler et al., *Br. J. Haematol.*, 60:233-238 [1985]), че по-скоро активирани Т-лимфоцити, отколкото моноцити играят стимулираща роля в мегакариоцитопоезата. Тези открития навеждат на мисълта, че секрети на активираните Т-лимфоцити, такива като интерлевкините, могат да бъдат регулаторни фактори в развитието на МК (Geissler et al., *Exp. Hematol.*, 15:845-853 [1987]). Редица изследвания върху мегакариоцитопоезата с пречистен еритропоетин ЕРО (Vainchenker et al., *Blood*, 54:940 [1979]; McLeod et al., *Nature*, 261:492-4 [1976]; и Williams et al., *Exp. Hematol.*, 12:734 [1984]) показват, че този хормон има усилващ ефект върху формирането на МК-колонията. Това е било също така демонстрирано и в двата случая на среди, несъдържащи и съдържащи серум в отсъствието на допълнителни клетки (Williams et al., *Exp. Hematol.*, 12:734 [1984]). За ЕРО беше постулирано, че участвува повече в аспектите на едно- и двуклетъчните стадии на мегакариоцитопоезата за разлика от ефекта на PWM-SpCM, който беше включен в четириклетъчния стадий на мегакариоцитното развитие. Остава да се изясни взаимодействието на всички тези фактори и в ранните и в късните фази от развитието на мегакариоцитите.

Данните, получени от няколко лаборатории, навеждат на мисълта, че единствените мултиродословни фактори, които индивидуално притежават активност, стимулираща МК-колонията, са GM-CSF и IL-3 и в по-малка степен факторът, стимулиращ В-клетките IL-6 (Ikebuchi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:9035 [1987]). Неотдавна някои автори съобщиха, че IL-11 и факторът, инхибиращ левкемията (LIF) действуват синергично с IL-3 за увеличаване на мегакариоцитната големина и плоидност (Yonemura et al., *J. Cell. Physiol.*, 153:305-312 [1992]; Metcalf et al., *Blood*, 76:50-56 [1990]; Metcalf et al., *Blood*, 77:2150-2153 [1991]; Bruno et al., *Exp. Hematol.*, 19:378-381 [1991]; и Yonemura et al., *Exp. Hematol.*, 20:1011-1016 [1992]).

Други документи, представляващи интерес, са: Eppstein et al., патент на САЩ No. 4 962 091; Chong, патент на САЩ No. 4 879 111; Fernandes et al., патент на САЩ No. 4 604 377; Wissler et al., патент на САЩ No. 4 512 971; Gottlieb, патент

на САЩ No. 4 468 379; Bennett *et al.*, патент на САЩ No. 5 215 895; Kogan *et al.*, патент на САЩ No. 5 250 732; Kimura *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, **20**(9):1927-1931 [1990]; Secor *et al.*, *J. of Immunol.*, **144**(4):1484-1489 [1990]; Warren *et al.*, *J. of Immunol.*, **140**(1):94-99 [1988]; Warren *et al.*, *Exp. Hematol.*, **17**(11):1095-1099 [1989]; Bruno *et al.*, *Exp. Hematol.*, **17**(10):1038-1043 [1989]; Tanikawa *et al.*, *Exp. Hematol.*, **17**(8):883-888 [1989]; Koike *et al.*, *Blood*, **75**(12):2286-2291 [1990]; Lotem, *Blood*, **75**(5):1545-1551 [1989]; Rennick *et al.*, *Blood*, **73**(7):1828-1835 [1989]; и Clutterbuck *et al.*, *Blood*, **73**(6):1504-1512 [1989].

III. Тромбоцитопения

Тромбоцитите са критични елементи на кръвосъсирващия механизъм. Намаляването на циркулиращото ниво от тромбоцити, наречено тромбоцитопения, се появява при различни клинични условия и заболявания. Тромбоцитопенията обикновено се дефинира като брой на тромбоцитите под 150×10^9 на литър. Главните случаи на тромбоцитопения могат в най-широк план да се разделят на три категории на базата на времето на живот на тромбоцитите, а именно; (1) увредено образуване на тромбоцити от костния мозък, (2) секвестриране на тромбоцитите в далака (спленомегалия), или (3) засилено разграждане на тромбоцитите в периферната циркулация (напр., автоимунна тромбоцитопения или химио- и лъчетерапия). Освен това при пациенти, в които бързо се въвеждат големи обеми, бедни на тромбоцити кръвни продукти, тромбоцитопенията може да се развие вследствие на разреждането.

Клиничните изяви на кървене при тромбоцитопения зависят от тежестта на тромбоцитопенията, нейния причинител и възможни съпътсващи дефекти на коагулацията. Най-общо, пациенти с тромбоцитни числа между 20 и 100×10^9 на литър са с риск от обилно посттравматично кървене, докато тези с тромбоцитни числа под 20×10^9 на литър могат да кървят спонтанно. Тези последните пациенти са кандидати за тромбоцитна трансфузия със съпровождащ имунен и вирусен риск. За всяка дадена степен на тромбоцитопения кървенето показва тенденция към по-тежко, когато случаят е:

по-скоро понижено образуване, отколкото засилено разграждане на тромбоцитите. В последната ситуация ускорената обмяна на тромбоцитите води до циркулацията на по-млади, по-големи и хемостатично по-ефективни тромбоцити. Тромбоцитопенията може да бъде резултат от различни заболявания, описани накратко по-долу. По-подробно описание може да бъде намерено в Schafner, A.I., "Thrombocytopenia and Disorders of Platelet Function," *Internal Medicine*, 3rd Ed., John J. Hutton *et al.*, Eds., Little Brown and Co., Boston/Toronto/London [1990].

(а) Тромбоцитопения вследствие на увредено образуване на тромбоцити

Случаите на конгенитална тромбоцитопения включват конституционална апластична анемия (синдром на Фанкони) и конгенитална амегакариоцитна тромбоцитопения, които могат да бъдат съпроводени със скелетни малформации. Придобитите заболявания на образуването на тромбоцитите се причиняват или от хипоплазия на мегакариоцитите или от неефективна тромбопоеза. Мегакариоцитната хипоплазия може да бъде резултат от разнообразни условия, включващи мозъчна аплазия (включваща идиопатични форми или миелосупресия при химиотерапевтични агенти или лъчева терапия), миелофиброза, левкемия и инвазия на костния мозък от туморни метастази или грануломи. В някои ситуации токсини, инфекциозни агенти или медикаменти могат да интерферират с тромбопоезата относително селективно; примерите включват временни тромбоцитопении, причинени от алкохол или някои вирусни инфекции, както и лека форма на тромбоцитопения, свързана с приемането на тиазидни диуретици. И накрая, тромбоцитопения, обикновено със съпътстваща анемия и левкопения, може да се причини също и от неефективна тромбопоеза, която се развива вторично след мегалобластни процеси (фолат- или В₁₂-недостатъчност).

Съвременното лечение на тромбоцитопениите, следствие от пониженото образуване на тромбоцити, зависи от идентификацията и обратимостта на лежащата в основата причина за костномозъчна

недостатъчност. Тромбоцитните трансфузии обикновено са предназначени за пациенти със сериозни усложнения на кървене или за покриване повреме на хирургични процедури, тъй като изоимунизацията може да доведе до устойчивост спрямо следващи тромбоцитни трансфузии. Мукозално кървене, резултат от тежка тромбоцитопения, може да се облекчи чрез орално или интравенозно въвеждане на антифибринолитичен агент. Могат обаче да се развият тромботични усложнения ако антифибринолитичният агент се използва при пациенти с дисеминирана интравазална коагулопатия (DIC).

(b) Тромбоцитопения вследствие на далачно секвестриране

Спленомегалия от всякакъв произход може да бъде съпроводена със слаба до умерена тромбоцитопения. Това е изключително пасивен процес (хиперспленизъм) на далачно секвестриране на тромбоцити за разлика от активното разграждане на тромбоцити в далака при случаите на имуноопосредствувана тромбоцитопения, която се дискутира по-долу. Въпреки че най-разпространеният случай на хиперспленизъм е застойната спленомегалия от портална хипертония вследствие на алкохолна цироза, други форми на застойна, инфилтративна или лимфопролиферативна спленомегалия, също се съпровождат с тромбоцитопения. Като резултат от самия хиперспленизъм тромбоцитното число обикновено не пада под 50×10^9 за литър.

(c) Тромбоцитопения вследствие неимунно-опосредствувано разграждане на тромбоцитите

Тромбоцитопенията може да бъде резултат от ускорена деструкция на тромбоцитите при различни неимунологични процеси. Заболяванията от този тип включват дисеминирана интравазална коагулопатия, изкуствени интраваскуларни приспособления, екстракорпорална циркулация на кръвта и тромботични микроангиопатии, такива като тромботична тромбоцитоза пурпура. Във всички тези ситуации циркулиращите тромбоцити, които срещат изкуствени повърхности или абнормална васкуларна интима, или се унищожават на тези места или се увреждат и след това се отстраняват преждевременно от ретикулоендотелната система. Болестни състояния или заболявания, при които

може да се развие дисеминирана интравасална коагулопатия (DIC) са поместени в по-големи детайли в Braunwald et al. (eds), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 11th Ed., p.1478, McGraw Hill [1987]. Интраваскуларните изкуствени приспособления, включващи сърдечни клапи и интрааортни катетри, могат да причинят слаба до умерена деструктивна тромбоцитопения и временна тромбоцитопения в пациенти, претърпели кардиопулмонарен байпас, а от от изчерпването и увреждането на тромбоцитите в екстракорпоралната циркулация може да се получи хемодиализа.

(d) Иmunна тромбоцитопения, индуцирана от медикаменти

Повече от 100 медикамента са включени в имунологично-опосредствуваната тромбоцитопения. Добре охарактеризирани са били обаче само хинидин, хинин, злато, сулфонамиди, цефалотин и хепарин. Индуцираната от медикаменти тромбоцитопения често е много тежка и обикновено възниква спорадично в дните, докато пациентите приемат сенсibiliзиращото лекарство.

(e) Иmunна (автоимунна) thrombocitopenic purpura (тромбоцитопения пурпура) (ITP)

ITP във възрастни представлява хронично заболяване, характеризиращо се с автоимунна тромбоцитна деструкция. Автоантитялото обикновено е IgG, въпреки че има съобщения също и за други имуноглобулини. Въпреки че за автоантитялото на ITP е било намерено, че е асоциирано с тромбоцитната мембрана GPIIb/IIIa, в повечето случаи специфичността на тромбоцитния антиген не е била идентифицирана. Екстраваскуларната деструкция на сензитирани тромбоцити става в ретикулоендотелната система на далака и черния дроб. Въпреки че над половината от всички случаи на ITP са идиопатични, в основата им при много пациенти лежат ревматични или автоимунни заболявания (напр. системна вълчанка (lupus erythematosus)) или лимфопролиферативни заболявания (напр. хронична лимфоцитна левкемия).

(f) HIV-индуцирана ITP

ITP е все по-често срещано усложнение при инфекция с HIV (Morris et al., *Ann. Intern. Med.*, 96:714-717 [1982] и може да се появи на всеки етап от

развитието на болестта при пациенти с диагноза Синдром на Придобита Имуна Недостатъчност (СПИН), при тези със СПИН-родствен комплекс и при тези с HIV-инфекция, но без синдроми на СПИН. HIV-инфекцията е преносимо заболяване, което задължително се характеризира с изразена недостатъчност на клетъчна и имунна функция, както и с появата на опортюнистична инфекция и малигненост. Първичната имунологична абнормалност, която произтича от инфекцията с HIV е прогресиращо изчерпване и функционално увреждане на Т-лимфоцитите, експресиращи клетъчния повърхностен гликопротеин CD4 (Lane *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 3:477 [1985]). Загубата на CD4 помощна/индукторна Т-клетъчна функция вероятно е в основата на изразените дефекти в клетъчния и хуморален имунитет, водещи до опортюнистични инфекции и малигнености, характерни за СПИН-а (Н. Lane, по-горе).

Въпреки че механизмът на асоциираната с HIV ITP е неизвестен, смята се, че той е различен от механизма на ITP, неасоциирана с HIV-инфекция. (Walash *et al.*, *N. Eng. J. Med.*, 311:635-639 [1984]; and Ratner, *Am. J. Med.*, 86:194-198 [1989]).

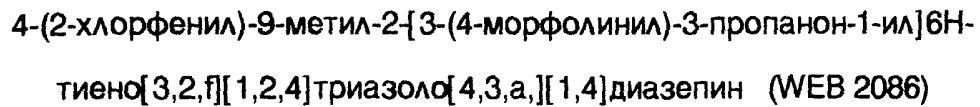
IV. Съвременна терапия на тромбоцитопенията

Терапевтичният подход за лечението на пациенти с тромбоцитопения се определя от тежестта и неотложността (спешността) на клиничната ситуация. Лечението е сходно за HIV-асоциираната и неродствената с HIV тромбоцитопения и въпреки че са били използвани различни терапевтични подходи, терапията си остава спорна.

Броят на тромбоцитите при пациенти с поставена диагноза тромбоцитопения е бил успешно увеличен чрез глюкокортикоидна (напр. с предисолон) терапия, но в повечето пациенти отговорът е напълнен или заболяването рецидивира, когато глюкокортикоидната доза се редуцира или се прекъсне нейното приложение. Като се основават на изследвания с пациенти, имащи HIV-асоциирана ITP, някои изследователи са предположили, че глюкокортикоидната терапия може да доведе до предразположеност към СПИН.

Глюкокортикостероидите обикновено се прилагат, ако тромбоцитното число падне под 20×10^9 /литър или когато се появи спонтанно кървене.

При пациенти, невъзприемчиви за глюкокортикостероиди, успешно е било използвано съединението:



за лечение на тежък случай на неасоциирана с HIV ИТР. Пациент с тромбоцитно число 37 000 - 58 000/мкл е лекуван с WEB 2086 и след 1-2 седмици лечение тромбоцитното число се увеличило до 140 000 - 190 000/мкл. (EP 361 077 и Lohman *et al.*, *Lancet*, 1147 [1988]).

Макар че оптималното лечение на придобита амегакариоцитна тромбоцитопения пурпура (ААТР) е неопределено, беше показано, че антитимуцитният глобулин (ATG), конски антисерум срещу човешка тимусна тъкан, предизвиква продължителна пълна ремисия (Trimble *et al.*, *Am. J. Hematol.*, 37:126-127 [1991]). Неотдавнашно съобщение обаче посочва, че хематопоеитичният ефект на ATG се дължи на тимерозала, при което по всяка вероятност белтъкът действа като живачен преносител (Panella *et al.*, *Cancer Research*, 50:4429-4435 [1990]).

Бяха съобщени добри резултати за спленектомия. Спленектомията отстранява главните места на тромбоцитна деструкция и главния източник на образуването на автоантитела в много пациенти. Тази процедура води до продължителни ремисии без медикаментозно лечение при голям брой пациенти. Тъй като обаче хирургичните процедури като цяло трябва да се избягват при имунопроблемни пациенти, спленектомията се препоръчва само при тежки случаи на тромбоцитопения (напр. тежка HIV-асоциирана ИТР), при пациенти, които до 2-3 седмици не реагират на глюкокортикоидно лечение или при които не се постига поддържащ отговор след прекъсване на глюкокортикоидната интервенция. На основата на съвременното научно познание не е ясно, дали спленектомията предразполага пациентите към СПИН.

Като допълнение към лечението с преднисолон и спленектомия, определени цитотоксични средства, напр. винкристин и азидотимидин (AZT, зидовудин) също са обещаващи за лечението на HIV-индуцирана ИТР; резултатите обаче са предварителни.

От гореизложеното може да се направи извода, че един от пътищата за лечение на тромбоцитопения би бил получаването на средство, способно да ускорява диференциацията и зреенето на мегакариоцитите или на техните предшественици в тромбоцит-образуващи форми. Бяха положени значителни усилия за идентифицирането на подобен средство, означаван обикновено като "тромбопоетин" (ТРО). Други имена за ТРО, често срещани в литературата, включват: фактор, стимулиращ тромбоцитопоезата (TSF), фактор, стимулиращ мегакариоцитната колония (МК-CSF), мегакариоцит-стимулиращ фактор и мегакариоцитен стимулатор. ТРО-активност е била наблюдавана още през 1959 (Rak *et al.*, *Med. Exp.*, 1:125), а опитите за характеризиране и пречистване на този агент продължават до наши дни. Макар че съществуват съобщения за частичното пречистване на ТРО-активни полипептиди (виж например, Tayrien *et al.*, *J. Bio. Chem.*, 262:3262 [1987] и Hoffman *et al.*, *J. Clin. Invest.* 75:1174 [1985]), други постулираха, че по своята същност ТРО не е дискретна единица, а по-скоро представлява просто полифункционално извявяване на известен хормон (IL-3, Sparrow *et al.*, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 215:123 [1986]). Молекула, притежаваща тромбопоетична активност, независимо от своята форма или произход, би имала значителна терапевтична стойност. Макар че белтък не е бил идентифициран еднозначно като ТРО, съществува значителен интерес около откритието, че *mpl*, предполагаем цитокинов рецептор, може да предава тромбопоетичен сигнал.

V. *Mpl* е мегакариоцитопоетичен цитокинов рецептор

Смята се, че пролиферацията и зреенето на хематopoетичните клетки се регулират тясно от фактори, които моделират положително или отрицателно пролиферацията и мултиродословната диференциация на плурипотентанта стволова клетка. Тези ефекти се осъществяват чрез високоафинитетното

свързване на извънклетъчни белтъчни фактори със специфични клетъчни повърхностни рецептори. Тези клетъчни повърхностни рецептори имат значителна хомология и се класифицират главно като членове на цитокиновата рецепторна суперфамилия. Членовете на суперфамилията включват рецептори за: IL-2 (бета и гама вериги) (Hatakeyama *et al.*, *Science*, **244**:551-556 [1989]; Takeshita *et al.*, *Science*, **257**:379382 [1991], IL-3 (Itoh *et al.*, *Science*, **247**:324-328 [1990]; Gorman *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:5459-5463 [1990]; Kitamura *et al.*, *Cell*, **66**:1165-1174 [1991a]; Kitamura *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:5082-50-86 [1991b], IL-4 (Mosley *et al.*, *Cell*, **59**:335-348 [1989]), IL-5 (Takaki *et al.*, *EMBO J.*, **9**:4367-4374 [1990]; Tavernier *et al.*, *Cell*, **66**:1175-1184 [1991], IL-6 (Yamasaki *et al.*, *Science*, **241**:825-828 [1988]; Hibi *et al.*, *Cell*, **63**:1149-1157 [1990]), IL-7 (Goodwin *et al.*, *Cell*, **60**:941-951 [1990]), IL-9 (Renault *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:5690-5694 [1992]), фактор, стимулиращ колонията от гранулоцити-макрофаги (GM-CSF) (Gearing *et al.*, *EMBO J.*, **8**:3667-3676 [1991]; Hayashida *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **244**:9655-9659 [1990]), фактор, стимулиращ гранулоцитната колония (G-CSF) (Fukunaga *et al.*, *Cell*, **61**:341-350 [1990a]; Fukunaga *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:8702-8706 [1990b]; Larsen *et al.*, *J. Exp. Med.*, **172**:1559-1570 [1990]), EPO (D'Andrea *et al.*, *Cell*, **57**:277-285 [1989]; Jones *et al.*, *Blood*, **76**:31-35 [1990]), фактор, инхибиращ левкемия (LIF) (Gearing *et al.*, *EMBO J.*, **10**:2839-2848 [1991]), онкостатин М (OSM) (Rose *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:8641-8645 [1991]), а също и рецептори за пролактин (Boutin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:7744-7748 [1988]; Edery *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:2112-2116 [1989]), растежен хормон (GH) (Leung *et al.*, *Nature*, **330**:537-543 [1987]) и цилиарен невротропичен фактор (CNTF) (Davis *et al.*, *Science*, **253**:59-63 [1991]).

Членовете на цитокиновата рецепторна суперфамилия могат да се групират в три функционални категории (виж обзора на Nicola *et al.*, *Cell*, **67**:1-4 [1981]). Първият клас обхваща едноверижни рецептори, такива като еритропоетиновия рецептор (EPO-R) или рецептора на фактора, стимулиращ гранулоцитната колония (G-CSF-R), който свързва лиганда с висок афинитет посредством извънклетъчен домен и освен това генерира вътреклетъчен сигнал.

Вторият клас рецептори, така наречените α -субединици, включва рецептора за интерлевкин-6, рецептора за фактора, стимулиращ колонията гранулоцити-макрофаги (GM-CSF-R), рецептора за интерлевкин-3 (IL3-R α) и други членове на цитокиновата рецепторна суперфамилия. Високоафинитетен рецептор, способен да предава сигнал, се получава от хетеродимер между α -субединица и член на трети клас цитокинови рецептори, наречени β -субединици, напр. β_c - общата субединица за трите α -субединици IL3-R α и GM-CSF-R.

Доказателството, че *mpl* е член на цитокиновата рецепторна суперфамилия, произтича от хомология в последователностите (Gearing, EMBO J., 8:3667-3676 [1988]; Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6834-6938 [1990]; Davis *et al.*, Science, 253:59-63 [1991] и Vigon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5640-5644 [1992]) и от неговата способност да предава пролиферативни сигнали.

Белтъчната последователност, изведена от молекулярното клониране на миши *c-mpl*, показва че този белтък е хомоложен на други цитокинови рецептори. Екстрацелуларният домен съдържа 465 аминокиселинни остатъци и е съставен от два субдомена, всеки с четири висококонсервативни цистеини и определен мотив в N-крайния субдомен и в C-крайния субдомен. Предполага се, че лиганд-свързващите екстрацелуларни домени имат сходни структурни геометрии, нагънати под формата на двойни β -барели. Този дублициран екстрацелуларен домен е високохомоложен на веригата, предаваща сигнал и обща за рецепторите IL-3, IL-5 и GM-CSF, както и на нискоафинитетния свързващ домен на LIF (Vigon *et al.*, Oncogene, 8:2607-2615 [1993]). Ето защо *mpl* вероятно принадлежи към нискоафинитетния лиганд-свързващ клас на цитокиновите рецептори.

Сравняването на мишия *mpl* и на зрелия човешки *mpl P* показва, че тези два белтъка имат 81% идентичност в последователностите. По-конкретно, N-крайният и C-крайният екстрацелуларни домени са съответно със 75% и 80% идентичност в последователностите. Най-консервативната *mpl*-област е цитоплазменият домен, който показва 91% аминокиселинна идентичност, като последователността от 37 остатъци близо до трансмембрания домен е идентична в двата вида. В съгласие с това за *mpl* се съобщава като за един от

най-консервативните членове на цитокиновата рецепторна суперфамилия (Vigon, по-горе).

Доказателството, че *mpl* е функционален рецептор, който може да пренася пролиферативен сигнал, произтича от конструирането на химерни рецептори, съдържащи екстрацелуларен домен от цитокинов рецептор с висок афинитет към известен цитокин, и *mpl*-цитоплазмения домен. Тъй като е липсвало съобщение за известен лиганд на *mpl*, е било необходимо химерният високоафинитетен лиганд-свързващ екстрацелуларен домен да се конструира от клас едно цитокинови рецептори, такива като IL-4R или G-CSFR. Vigon *et al.*, по-горе сливат екстрацелуларния домен на G-CSFR с трансмембрания и цитоплазмения домен на *c-mpl*. IL-3-зависимата клетъчна линия, BAF/BO3 (Ba/F3), е била трансфектирана с химерата G-CSFR/*mpl* усопредно с пълноразмерна G-CSFR-контрола. Клетки, трансфектирани с химерата, растяха еднакво добре в присъствието на цитокин IL-3 или G-CSF. По подобен начин клетки, трансфектирани с G-CSFR, също растяха добре в IL-3 или G-CSF. Всички клетки умирали в отсъствието на растежни фактори. Подобен експеримент е бил проведен от Skoda *et al.*, *EMBO J.*, 12(7):2645-2653 [1993], в който и екстрацелуларният и трансмембраният домен на човешкия рецептор IL-4 (hIL-4-R) са били сляти с цитоплазмения домен на мишия *mpl* и трансфектирани в мишата IL-3-зависима Ba/F3-клетъчна линия. Ba/F3-клетки, трансфектирани с дивия тип hIL-4-R, пролиферирали нормално в присъствието на всеки от видово специфичните IL-4 или IL-3. Ba/F3-клетки, трансфектирани с hIL-4R/*mpl* пролиферирали нормално в присъствието на hIL-4 (в присъствието или в отсъствието на IL-3), което показва, че в Ba/F3-клетки *mpl*-цитоплазменият домен съдържа всичките елементи, необходими за предаване на пролиферативен сигнал.

Тези експерименти с химери демонстрират способността за пролиферативна сигнализация на *mpl*-цитоплазмения домен, но не дават отговор на въпроса дали екстрацелуларният домен на *mpl* може да свързва лиганд. Тези резултати се съгласуват с най-малко две възможности, а именно, *mpl* е

едноверижен (клас едно) рецептор подобно EPO-R или G-CSFR или той е α -субединица (клас три), предаваща сигнал и изискваща α -субединица подобно IL-3 (Skoda *et al.*, по-горе).

VI. Лигандът на *mpl* е тромбопоетин (TPO)

Както е описано по-горе, допуснато беше, че серумът съдържа уникален фактор, понякога означаван като тромбопоетин (TPO), който действа синергично с различни други цитокини и отключва растежа и зреенето на мегакариоцитите. Въпреки значителните усилия, положени от редица групи, такъв природен фактор никога не е бил изолиран от серума или от някакъв друг източник. Макар че не се знае, дали *mpl* може да свързва директно мегакариоцитен стимулиращ фактор, съвременните изследвания показват, че *mpl* участва в предаването на пролиферативен сигнал от фактор или фактори, намерени в серума на пациенти с апластичен костен мозък (Methia *et al.*, *Blood*, 82(5):1395-1401 [1993]).

Доказателството за предаване на пролиферативен сигнал посредством *mpl* от уникален серумен колония-стимулиращ фактор, различен от IL-1 α , IL-3, IL-4, IL-6, IL-11, SCF, EPO, G-CSF и GM-CSF, идва от изследване разпределението на *c-mpl*-експресията в примитивни и ангажирани хематопоеични клетъчни линии и от *mpl*-антисенс изследвания с една от тези клетъчни линии.

Като провеждат полимеразна верижна реакция с обратна транскриптаза (RT-PCR) в имунопречистени човешки хематопоеични клетки, Methia *et al.*, по-горе, показват, че силни сигнали от мРНК на *mpl* се откриват само в CD34+ пречистени клетки, мегакариоцити и тромбоцити. CD34+ клетки, пречистени от костен мозък (BM), представляват около 1% от всички BM-клетки и са набогатени в примитивните и ангажирани предшественици на всички родословни редове (напр. еритроиден, грануломакрофагов и мегакариоцитен).

Показано беше, че *mpl*-антисенс олигодезоксинуклеотиди потискат формирането на мегакариоцитна колония от плурипотентните CD35+ клетки, култивирани в серум от пациенти с апластичен мозък (богат източник на

активност, стимулираща мегакариоцитната колония [МК-CSA]). Същите антисенс олигодезоксинуклеотиди нямат ефект върху формирането на еритроидната или грануломакрофаговата колонии.

Дали *mpl* директно свързва лиганд и дали серумният фактор, за който беше показано, че причинява мегакариоцитопоеза, действа посредством *mpl*, беше все още неизвестно. Беше предположено обаче, че ако *mpl* директно свързва лиганд, то неговата аминокиселинна последователност вероятно е силно консервативна и има видова крос-реактивност, която се дължи на значителната идентичност в последователностите на екстрацелуларните домени на човешки и миши *mpl* (Vigon et al., по-горе [1993]).

VII. Цели

Като се има предвид гореказаното, става ясно, че е налице неотложна и постоянна необходимост от изолирането и идентифицирането на молекули, способни да стимулират пролиферацията, диференциацията и зрееенето на хематопоетичните клетки и по-специално на мегакариоцитите или на техните предшественици с цел използване в терапията за лечението на тромбоцитопения. Смята се, че такава молекула представлява лиганд за *mpl*. Поради това съществува допълнителна необходимост от изолирането на такъв лиганд(и) за изясняване на неговата роля(и) в клетъчния растеж и диференциация.

В съответствие с това изобретението има за цел получаването на фармацевтично чиста молекула, способна да стимулира пролиферацията, диференциацията и/или зрееенето на мегакариоцитите в зрели тромбоцит-образуващи форми.

Друга цел представлява обезпечаването на молекулата в терапевтично приложима форма за лечение на хематопоетични заболявания и по-специално на тромбоцитопения.

По-нататъшна цел на настоящото изобретение представлява изолирането, пречистването и специфичното определяне на белтъчни лиганди,

способни да свързват *in vivo* рецептор от цитокиновата суперфамилия, известен като *mpl*, да предават пролиферативен сигнал.

Още една цел представлява обезпечаването на молекули нуклеинови киселини, кодиращи такива белтъчни лиганди с цел използването на тези молекули нуклеинови киселини за получаване на *mpl*-свързващи лиганди с диагностично и терапевтично приложение в рекомбинантна клетъчна култура.

Друга една цел представлява обезпечаването на производни и модифицирани форми на белтъчните лиганди, включващи варианти в аминокиселинната последователност, различни форми гликопротеини и техни ковалентни производни.

Допълнителна цел представлява обезпечаването на слъти полипептидни форми, които комбинират *mpl*-лиганд с хетероложен белтък, както и на техните ковалентни производни.

Още една допълнителна цел представлява обезпечаването на разнообразни полипептидни форми, като се комбинират *mpl*-лиганд с ЕРО-последователност, в която са добавени или заместени аминокиселини, за да се получи белтък, способен да регулира пролиферацията и растежа както на тромбоцитите, така и на родоначалниците на червените кръвни клетки.

Още една допълнителна цел представлява получаването на имуногени с цел образуването на антитела срещу *mpl*-лигандите и техните слъти форми, както и получаването на антитела, способни да свързват такива лиганди.

Тези и други цели ще станат очевидни за професионалиста след разглеждане на спецификацията като цяло.

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

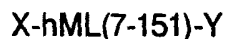
Целите на изобретението се постигат чрез обезпечаване на белтък от бозайници, който отключва мегакариоцитопоетичната пролиферация и зреене, означаван "*mpl*-лиганд" (ML) или "тромбопоетин" (ТРО), способен да стимулира пролиферацията, зреенето и/или диференциацията на мегакариоцитите в зрели тромбоцит-образуващи форми.

Този значително хомогенен белтък може да се пречисти от природен източник чрез метод, включващ; (1) създаване на контакт между източника на плазма, който съдържа *mpl*-лигандните молекули, които трябва да се пречистят, с имобилизиран полипептиден рецептор, по-конкретно *mpl* или *mpl*-слят полипептид, имобилизиран върху подложка при условия, при които *mpl*-лигандните молекули, които трябва да се пречистят, се имобилизират селективно върху имобилизирания рецепторен полипептид, (2) промиване на имобилизирания рецепторен полипептид и на неговата подложка за отстраняване на неадсорбирания материал, и (3) елуиране с елуиращ бърфер на *mpl*-лигандните молекули от имобилизирания рецепторен полипептид, към който те са адсорбирани. Предпочита се природният източник да бъде плазма на бозайник или урина, съдържаща *mpl*-лиганда. Бозайникът може да бъде с аплазия, а имобилизираният рецептор - слят *mpl*IgG.

Предпочитаният белтък, който инициира мигакариоцитопоетичната пролиферация и зрееене, може да представлява значително хомогенен *mpl*-лиганден полипептид, получен чрез синтетични или рекомбинантни способности.

Предпочита се "*mpl*-лигандният" полипептид или "ТРО" да има най-малко 70% пълна идентичност в последователността с аминокиселинната последователност на високопречистения и значително хомогенен свински *mpl*-лиганден полипептид и най-малко 80% идентичност в последователността с "ЕРО-домена" на свинския *mpl*-лиганден полипептид. *Mpl*-лигандът на това изобретение може да бъде зрял човешки *mpl*-лиганд, имащ зрялата аминокиселинна последователност, дадена във **Фиг. 1** (SEQ ID NO: 1), негов вариант, негова посттранслационно модифицирана форма или белтък, който има около 80% идентичност в последователността със зрелия човешки *mpl*-лиганд. Възможно е вариантът на *mpl*-лиганда да бъде фрагмент и по-специално аминотерминален фрагмент или фрагмент от "ЕРО-домена" на човешкия *mpl*-лиганд (hML). Предпочита се аминотерминалният фрагмент да запази почти цялата последователност на човешкия ML между първия и четвъртия цистеинов остатък, като може да съдържа значителни инсерции, делеции или субституции извън тази

област. Съгласно това приложение полипептидният фрагмент може да бъде представен чрез формулата:



Където hML(7-151) представлява последователността на човешкия TPO (hML) от Cys⁷ до Cys¹⁵¹ включително; X представлява аминокиселинната група на Cys⁷, един или повече от аминокиселинните остатъци на зрелия hML, негови аминокиселинни удължения, такива като Met, Tyr или лидерни последователности, съдържащи например места за протеолитично скъсване (напр. Фактор Ха или тромбин); и Y представлява крайната карбоксилна група на Cys¹⁵¹, един или повече карбокситерминални аминокиселинни остатъка(ци) на зрелия hML или негови удължения.

Възможно е *mpl*-лигандният полипептид или негов фрагмент да се слее с хетероложен полипептид (химера). Предпочитан хетероложен полипептид е цитокин, колония-стимулиращ фактор, интерлевкин или негов фрагмент и по-специално търговски лиганд (KL), IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, EPO, GM-CSF или LIF. Условно предпочитан хетероложен полипептид е имуноглобулинова верига, по-конкретно човешки IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgD, IgM или техни фрагменти, които по-специално включват константния домен на IgG-тежка верига.

Друг аспект на това изобретение обезпечава препарат, включващ *mpl*-антагонист, който е биологично активен и за който се предпочита да е в състояние да стимулира включването на белязани нуклеотиди (напр., ³H-тимидин) в ДНК на IL-3 зависими Ba/F3-клетки, трансфектирани с човешки *mpl*. Възможно е *mpl*-антагонистът да бъде биологично активен *mpl*-лиганд, като се предпочита той да може да стимулира включването на ³⁵S в циркулиращи тромбоцити в теста по рикошет на миши тромбоцити. Подходящите *mpl*-антагонисти включват hML153, hML(R153A), hML2, hML3, hML4, mML, mML2, mML3, pML и pML2 или техни фрагменти.

Друг вариант за изпълнение на изобретението се отнася до изолирано антитяло, способно да свързва *mpl*-лиганда. Изолираното антитяло, способно да се свързва с *mpl*-лиганда, условно може да се слее с втори полипептид, като антитялото или

неговата слята форма могат да се използват за изолиране и пречистване на *mpl*-лиганд от източник, както е описано по-горе за имобилизиран *mpl*. В следващ аспект на това приложение изобретението обезпечава метод за детектиране на *mpl*-лиганда *in vitro* или *in vivo*, включващ контакт между анти тялото и проба, по-конкретно серумна проба, за която се предполага, че съдържа лиганда и установяване дали свързването е протекло.

В други варианти на изпълнение изобретението се отнася до изолирана молекула на нуклеинова киселина, кодираща *mpl*-лиганда или негови фрагменти, която молекула нуклеинова киселина е възможно да бъде белязана с детектируема съставка; и молекула на нуклеинова киселина, имаща последователност, която е комплементарна на (или хибридизира при умерени или много строги условия с) молекула нуклеинова киселина, която има последователност, кодираща *mpl*-лиганд. Предпочитани молекули нуклеинови киселини са тези, кодиращи човешки, свински и миши *mpl*-лиганд и включват РНК и ДНК - както геномна, така и кДНК. В следващ аспект на това приложение молекулата нуклеинова киселина е ДНК, кодираща *mpl*-лиганда, която включва още вектор, който може да се реплицира и в който ДНК е оперативно свързана с контролни последователности, които се разпознават от гостоприемник, трансфектиран с вектора. ДНК е възможно да бъде кДНК, която има последователността, дадена на Фиг. 1 5'-3' (SEQ ID NO:2), 3'-5' или техни фрагменти. Този аспект включва още клетки-гостоприемници, за предпочитане СНО-клетки, трансформирани с вектора, както и метод за използване на ДНК за реализиране продукцията на *mpl*-лиганд. Предпочита се методът да включва експресия на кДНК, кодираща *mpl*-лиганда, в култура от трансформираните гостоприемни клетки и изолиране на *mpl*-лиганда от гостоприемните клетки или от културалната среда на гостоприемните клетки. Предпочитаният *mpl*-лиганд, получен по този начин, е човешки *mpl*-лиганд.

По-нататък изобретението включва метод за лечение на бозайник с хематопоеично заболяване и по-специално с тромбоцитопения, който метод включва въвеждане на терапевтично ефективно количество от *mpl*-лиганда в

бозайника. Възможно е *trp*-лигандът да се прилага в комбинация с цитокин, по-конкретно колония-стимулиращ фактор или интерлевкин. Предпочитаните колония-стимулиращи фактори или интерлевкини включват: търговски лиганд (KL), LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, IL-1, IL-3, IL-6 и IL-11.

Изобретението включва още метод за изолиране и пречистване на TPO (ML) от TPO-продуциращ микроорганизъм, включващ:

- (1) разрушаване или лизиране на клетките, съдържащи TPO,
- (2) незадължително отделяне на разтворимия материал от неразтворимия материал, съдържащ TPO,
- (3) разтваряне на TPO от неразтворимия материал с разтварящ брфер,
- (4) отделяне на разтворения TPO от останалия разтворим и неразтворим материал,
- (5) пренагъване на TPO в редокс-буфер, и
- (6) разделяне на правилно нагънатия TPO от неправилно нагънатия TPO.

За разтваряне на неразтворимия материал, съдържащ TPO, методът предлага хаотропно средство, където хаотропното средство се избира от: сол на гуанидина, натриев тиоцианат или урея. По-нататък методът предлага разтвореният TPO да се отдели от останалия разтворим и неразтворим материал чрез един или повече етапи, като се избира между центрофугиране, гел-филтрация и обратнофазова хроматография. За етапа на пренагъване в метода се предлага редокс-буфер, съдържащ както окисляващ така и редуциращо средство. Окисляващото средство е главно кислород или съединение, съдържащо най-малко една дисулфидна връзка, редуциращото средство е съединение, съдържащо най-малко един сулфхидрил. Предпочита се окисляващото средство да се избере от окислен глутатион(GSSG) и цистин, а редуциращото средство да се избере от редуциран глутатион(GSH) или цистеин. Най-предпочитаният окисляващ агент е окислен глутатион(GSSG), а най-предпочитаният редуциращ агент е редуциран глутатион(GSH). Предпочита се също моларното отношение на окисляващото средство да бъде равно или по-голямо, отколкото това на редуциращото средство

Редокс-буферът съдържа допълнително детергент, избран с предпочитание измежду CHAPS и CHAPSO, присъстващи в концентрация най-малко 1%. Редокс-буферът съдържа още NaCl, като се предпочита концентрация в границите на около 0,1-0,5M, и глицерол с предпочитана концентрация, по-голяма от 15%. Предпочита се рН на редокс-буфера да бъде приблизително в границите от рН 7,5 до рН 9,0, като стъпката на пренагъване се извършва на 4 градуса в продължение на 12-48 часа. Стъпката на пренагъване продуцира биологично активен тромбопоетин, в който се образува дисулфидна връзка между най-близкия до аминокрая на ЕРО-домена цистеинов остатък (Cys) и най-близкия до неговия карбоксилен край цистеинов остатък (Cys).

Изобретението включва още метод за пречистване на биологично активен ТРО от микроорганизъм, включващ:

- (1) лизиране поне на извънклетъчната мембрана на микроорганизма,
- (2) третиране на лизата, съдържащ ТРО, с хаотропно средство
- (3) пренагъване на ТРО, и
- (4) отделяне на онечистванията и на неправилно нагънатия ТРО от правилно нагънатия ТРО.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

Фиг. 1 показва изведената от кДНК аминокиселинна последователност (SEQ ID NO:1) на човешкия *mpf*-лиганд (hML) и кодиращата нуклеотидна последователност (SEQ ID NO:2). Нуклеотидите са номерирани при започването на всеки ред. 5'- и 3'-нетранслиращите се области са означени с по-малки букви. Аминокиселинните остатъци са номерирани над последователността, като се започва при Ser 1 от белтъчната последователност на зрелия *mpf*-лиганд (ML). Границите на предполагаемия екзон 3 са означени със стрелки, а потенциалните места за N-гликозилиране са заградени. Цистеиновите остатъци са означени с точка над последователността. Подчертаната последователност съответствува на N-крайната последователност, определена на базата на *mpf*-лиганд, пречистен от свинска плазма.

Фиг. 2 показва процедурата, използвана в теста по включване на ^3H -тимидин, опосредствувано от *mpl*-лиганда. За определяне наличието на *mpl*-лиганд от различни източници, *mpl* Р Ва/F3-клетките се подлагат на гладуване за IL-3 в продължение на 24 часа в инкубатор с поддържана влага на 37°C в 5% CO₂ и въздух. След гладуването за IL-3 клетките се посяват в 96-ямкови културални платета като разредени или неразредени проби и се култивират 24 часа в инкубатор за клетъчни култури. Във всяка ямка за последните 6-8 часа се прибавят 20 мкл RPMI-среда без серум, съдържаща 1 мкКи ^3H -тимидин. След това клетките се събират върху 96-ямкови филтърни платета и се промиват с вода. След това филтрите се броят.

Фиг. 3 показва ефекта на проназа, DTT и нагряване върху способността на APP да стимулира Ва/F3-*mpl* клетъчната пролиферация. За смилането на APP с проназа, проназа (Boehringer Mannheim) или говежди серумен албумин се свързват с Affi-gel10 (Biorad) и се инкубират индивидуално с APP за 18 часа на 37°C. Впоследствие смолите се отстраняват чрез центрофугиране и надстоящите течности се тестват. APP също така се нагрява до 80°C за 4 мин или се довежда до 100 мкМ DTT, след което се извършва диализа срещу PBS.

Фиг. 4 показва елуирането на *mpl*-лигандна активност от колони Phenyl-Toyopearl, Blue-Sepharose и Ultralink-*mpl*. Фракции 4-8 от *mpl*-афинитетната колона са фракциите с най-висока активност, елуирани от колоната.

Фиг. 5 показва SDS-PAGE (натриевододецилсулфатна полиакриламидна гел-електрофореза) на фракциите, елуирани от Ultralink-*mpl*. Към 200 мкл от всяка фракция 2-8 се прибавя 1 мл ацетон, съдържащ 1 мМ HCl при -20°C. След 3 часа на -20°C пробите се центрофугират и получените утайки се промиват 2X с ацетон на -20°C. Ацетоновите утайки последователно се разтварят в 30 мкл SDS-разтварящ буфер, довеждат се до 100 мкМ DTT и се нагряват на 90°C за 5 мин.

След това пробите се разделят на 4-20% SDS-полиакриламиден гел и белтъците се визуализират чрез сребърно оцветяване.

Фиг. 6 показва елуирането на *mpl*-лигандна активност от SDS-PAGE. Фракция 6 от *mpl*-афинитетната колона се разделя на 4-20% SDS-полиакриламиден гел при нередуциращи условия. След електрофорезата гелът се нарязва на 12 еднакви области и се електроелуира, както е описано в примерите. Електроелуираните проби се диализират в PBS и се тестват при разреждане 1/20. Стандартите за молекулна маса (Mr), използвани за калибриране на гела, са Novex Mark 12-стандарти.

Фиг. 7 показва ефекта на APP, изчерпана за *mpl*-лиганд, върху мегакариоцитопоезата. Изчерпаната за *mpl*-лиганд APP се получава като 1 мл се пропуска през 1 мл *mpl*-афинитетна колона (700 мкг *mpl*-IgG/мл NHS-superose, Pharmacia). Култури от човешки периферни стволови клетки се довеждат до 10% APP или до 10% изчерпана за *mpl*-лиганд APP и се култивират за 12 дни. Мегакариоцитопоезата се измерва, както е описано в примерите.

Фиг. 8 показва ефекта на *mpl*-IgG върху стимулирането на човешката мегакариоцитопоеза чрез APP. Култури от човешки периферни стволови клетки се довеждат до 10% с APP и се култивират 12 дни. В дни 0, 2 и 4 се прибавят *mpl*-IgG (0,5 мкг) или ANP-R-IgG (0,5 мкг). След 12 дни мегакариоцитопоезата се околичествява, както е описано в примерите. На графиката са представени средните стойности от две повторения на пробите, като действителните данни за всяко от повторенията са в скоби.

Фиг. 9 показва двете вериги на фрагмент от 390 нд от човешка геномна ДНК, кодираща *mpl*-лиганда. Показани са изведената аминокиселинна последователност на "екзон 3" (SEQ ID NO:3), кодиращата последователност (SEQ ID NO:4) и нейната комплементарна (SEQ ID NO:5).

Фиг. 10 показва изведената аминокиселинна последователност на зрелия човешки *mpl*-лиганд (hML) (SEQ ID NO:6) и на зрелия човешки еритропоетин (hEPO) (SEQ ID NO: 7). Предсказаната аминокиселинна последователност за човешкия *mpl*-лиганд е сравнена с последователността на човешкия еритропоетин. Идентичните аминокиселини са заградени, а с тирета са означени празнините, въведени за оптимално налагане на последователностите. Потенциалните места за N-гликозилиране са подчертани с плавна линия за hML и с прекъсната линия за hEPO. Двата цистеина, важни за еритропоетиновата активност, са означени с голяма точка.

Фиг. 11 показва изведената аминокиселинна последователност на изоформи на зрелия човешки *mpl*-лиганд: hML (SEQ ID NO:6), hML2 (SEQ ID NO:8), hML3 (SEQ ID NO:9) и hML4 (SEQ ID NO: 10). Идентичните аминокиселини са заградени, а празнините, въведени за оптимално налагане, са означени с тирета.

Фиг. 12 показва ефекта на човешки *mpl*-лиганд върху Ba/F3-*mpl* клетъчната пролиферация (A), *in vitro* човешка мегакариоцитопоеза, околичествена чрез използване на радиоактивно белязано мише IgG-моноклонално антитяло, специфично за мегакариоцитния гликопротеин GPIIbIIIa (B) и миша тромбоцитопоеза, измерена в теста по рикошет на тромбоцитите (C).

Клетки **двеста деветдесет и три** (293-клетки) се трансфектират чрез CaPO₄-метода (Gorman, C. в *DNA Cloning: A New Approach* 2:143-190 [1985]) само с вектора pRK5, с pRK5-hML или с pRK5-ML₁₅₃ през нощта (pRK5-ML₁₅₃ е получен чрез въвеждане на стоп-кодон след остатъка 153 на hML чрез ПВР). След това средата се култивира 36 часа и се тестира за стимулация на клетъчната пролиферация на Ba/F3-*mpl*, както е описано в **Пример 1 (A)** или за *in vitro* човешка мегакариоцитопоеза (B). Мегакариоцитопоезата се околичествява, като се използва ¹²⁵I радиоактивно белязано мише IgG-моноклонално антитяло (HP1-1D) срещу специфичния за мегакариоцитите гликопротеин GPIIbIIIa, както е

описано (Grant *et al.*, *Bolld* 69:1334-1339 [1987]). Ефектът на частично пречистен рекомбинантен ML (rML) върху образуването на тромбоцити *in vivo* (C) се определя чрез използване на теста по експериментално предизвикана (рикошираща) тромбоцитоза, описан от McDonald, T.P. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* 144:1006-10012 (1973). Частично пречистен rML се получава от 200 мл културална среда, съдържаща рекомбинантния ML. Средата се пропуска през 2 мл-колони с Blue-Sepharose, уравновесена с PBS, колоната се промива с PBS и се елуира с PBS, съдържащ 2M урея и 2M NaCl. Активната фракция се диализира в PBS и се довежда до 1 мг/мл с BSA, несъдържащ ендотоксин. Пробата съдържа по-малко от една единица ендотоксин/мл. Мишки се инжектират с 64 000, 32 0900, или 16 000 единици rML или само с пълнежа. Всяка група се състои от шест мишки. Показани са средните стойности и стандартното отклонение за всяка група. Р-стойностите се определят чрез двустранен Т-тест, като се сравняват медианите.

Фиг. 13 сравнява ефекта на изоформите и вариантите на човешки *mpl*-лиганд в теста по Ba/F3-*mpl* клетъчна пролиферация. hML, контрола, hML2, hML3, hML(R153A, R154A) и hML₁₅₃ се определят при различни разреждания, както е описано в **Пример 1**.

Фигури 14А, 14В и 14С показват изведената аминокиселинна последователност (SEQ ID NO:1) на човешкия *mpl*-лиганд (hML) или човешкия TPO (hTPO) и човешката геномна ДНК-кодираща последователност (SEQ ID NO: 11). Нуклеотидите и аминокиселинните остатъци са номерирани в началото на всеки ред.

Фиг. 15 показва SDS-PAGE на пречистен 293-rhML₃₃₂ и на пречистен 293-rhML₁₅₃.

Фиг. 16 показва нуклеотидната последователност: кДНК кодиращата (SEQ ID NO:12) и изведената от нея аминокиселинна последователност (SEQ ID NO: 13) на

отворената рамка за четене на миша ML-изоформа. Тази изоформа на зрял миши *mpt*-лиганд съдържа 331 аминокиселинни остатъци, с четири по-малко от предполагаемия пълноразмерен mML и поради това се означава mML2. Нуклеотидите са номерирани в началото на всеки ред. Аминокиселинните остатъци са номерирани над последователността, като започват със Ser 1. Потенциалните места за N-гликозилиране са подчертани. Цистеиновите остатъци са означени с точка над последователността.

Фиг. 17 показва последователността на кДНК (SEQ ID NO:14) и предсказаната белтъчна последователност (SEQ ID NO: 15) на тази миша ML-изоформа (mML). Нуклеотидите са номерирани в началото на всеки ред. Аминокиселинните остатъци са номерирани над последователността и започват със Ser 1. Тази изоформа на зрелия миши *mpt*-лиганд се състои от 335 аминокиселинни остатъци и се смята, че е пълноразмерният *mpt*-лиганд, означен mML. Сигналната последователност е показана чрез подчертаване с прекъсната линия, а вероятното място на срязване е отбелязано със стрелка. 5'- и 3'-нетранслиращите се области са посочени с малки букви. Двете делеции, намерени като резултат от алтернативен сплайсинг (mML2 и mML3), са подчертани. Четирите цистеинови остатъци са отбелязани с точка. Седемте потенциални места за N-гликозилиране са заградени.

Фиг. 18 сравнява изведената от кДНК аминокиселинна последователност на човешката ML-изоформа hML3 (SEQ ID NO: 9) и мишата ML-изоформа, означена mML3 (SEQ ID NO: 16). Предсказаната аминокиселинна последователност за човешкия *mpt*-лиганд е наложена успоредно с мишата *mpt*-лигандна последователност. Идентичните аминокиселини са заградени като за оптимално налагане са въведени празнини, отбелязани с тирета. Аминокиселините са номерирани в началото на всеки ред.

Фиг. 19 сравнява предсказаните аминокиселинни последователности на зрите ML-изоформи от миши-ML (SEQ ID NO: 17), свински-ML (SEQ ID NO: 18) и човешки

ML (SEQ ID NO: 6). Аминокиселинните последователности са наложени успоредно с празнини, означени с тирета, въведени за оптимално сравняване. Аминокиселините са номерирани в началото на всеки ред като идентичните остатъци са заградени. Потенциалните места за N-гликозилиране са означени чрез зацриховани правоъгълници, а цистеиновите остатъци са означени с точка. Консервативният дибазичен аминокиселинен мотив, който представлява потенциално място за протеазно скъсване, е подчертан. Делецията от четири аминокиселини, открита и в трите вида (ML2) е заградена с удебелена линия.

Фиг. 20 показва последователността на кДНК (SEQ ID NO: 19) и предсказаната последователност на зрелия белтък (SEQ ID NO: 18) на свинска ML-изоформа (pML). Тази изоформа на свинския *mpL*-лиганд съдържа 332 аминокиселинни остатъци и се смята, че е пълноразмерният свински *mpL*-лиганд, означен pML. Нуклеотидите са номерирани в началото на всеки ред. Аминокиселинните остатъци са номерирани над последователността и започват със Ser 1.

Фиг. 21 показва последователността на кДНК (SEQ ID NO: 20) и предсказаната последователност за зрелия белтък (SEQ ID NO: 21) на свинска ML-изоформа (pML2). Тази изоформа на свинския *mpL*-лиганд съдържа 328 аминокиселинни остатъци и представлява форма на пълноразмерния свински *mpL*-лиганд с делеция на четири остатъци, означена pML2. Нуклеотидите са номерирани в началото на всеки ред. Аминокиселинните остатъци са номерирани над последователността и започват със Ser 1.

Фиг. 22 сравнява изведената аминокиселинна последователност на пълноразмерната свинска ML-изоформа pML (SEQ ID NO: 18) и свинската ML-изоформа, означена pML2 (SEQ ID NO: 21). Предсказаната аминокиселинна последователност за pML е наложена успоредно с pML2-последователността. Идентичните аминокиселини са заградени и са въведени празнини за оптимално

сравнение, означени с тирета. Аминокиселините са номерирани в началото на всеки ред.

Фиг. 23 показва съществените особености на плазмида pSV15.ID.LL.MLORF ("пълноразмерен" или TPO₃₃₂, използван за трансфекция на клетки-гостоприемници CHO-DP12 с цел получаване на CHO-rhTPO₃₃₂.

Фиг. 24 показва съществените особености на плазмида pSV15.ID.LL.MLORF-D("скъсен" или TPO₁₅₃, използван за трансфекция на клетки-гостоприемници CHO-DP12 с цел получаване на CHO-rhTPO₁₅₃.

Фигури 25А, 25В и 25С показват ефекта на *E. coli*-rhTPO(Met-1, 153) върху тромбоцити (А), червени кръвни клетки (В) и (С) бели кръвни клетки в нормални мишки. Две групи от по 6 женски C57 B6-мишки се инжектират ежедневно с PBS-буфер или с 0,3 мкг *E. coli*-rhTPO(Met-1, 153)(100 мкл подкожно). В нулевия ден и в дните 3-7 от орбиталния синус се вземат 40 мкл кръв. Тази кръв веднага се разрежда в 10 мл търговски разредител и пълните кръвни числа се получават чрез анализатор Serrono Baker Hematology 9018. Данните се представят като средни стойности $\pm$ стандартна грешка на средната стойност.

Фигури 26А, 26В и 26С показват ефекта на *E. coli*-rhTPO(Met-1, 153) върху тромбоцити (А), червени кръвни клетки (В) и (С) бели кръвни клетки в сублетално облъчени мишки. Две групи от по 10 женски C57 B6-мишки се облъчват сублетално със 750 сГи гама лъчение от източник на ¹³⁷Cs и се инжектират ежедневно с PBS-буфер или с 0,3 мкг *E. coli*-rhTPO(Met-1, 153)(100 мкл подкожно). В нулевия ден и на последователни междинни интервали от време от орбиталния синус се вземат 40 мкл кръв. Тази кръв веднага се разрежда в 10 мл търговски разредител и пълните кръвни числа се получават чрез анализатор Serrono Baker Hematology 9018. Данните се представят като средни стойности $\pm$ стандартна грешка на средната стойност.

Фигури 27А, 27В и 27С показват ефекта на CHO-rhTPO₃₃₂ върху (А) кръвни плочици (тромбоцити), (В) червени кръвни клетки (еритроцити) и (С) бели кръвни клетки (левкоцити) в нормални мишки. Две групи от по 6 женски C57 B6-мишки се инжектират ежедневно с PBS-буфер или с 0,3 мкг CHO-rhTPO₃₃₂(100 мкл подкожно). В нулевия ден и в дните 3-7 от орбиталния синус се вземат 40 мкл кръв. Тази кръв веднага се разрежда в 10 мл търговски разредител и пълните кръвни числа се получават чрез анализатор Serrono Baker Hematology 9018. Данните се представят като средни стойности $\pm$ стандартна грешка на средната стойност.

Фиг. 28 показва кривите доза/отговор за различни форми на rhTPO, получени от различни клетъчни линии. Кривите доза/отговор се построяват за rhTPO от следните клетъчни линии: hTPO₃₃₂ от CHO (пълноразмерен, от яйчни клетки на Китайски хамстер); hTPO_{Met-1 153} (получена в *E. coli* скъсена форма с N-краен метионин); hTPO₃₃₂ (пълноразмерен TPO от човешки 293-клетки); несъдържащ метионин 155 *E-Coli* (скъсената форма на [rhTPO₁₅₅] без крайния метионин от *E. coli*). Групи от 6 женски C57B6-мишки се инжектират ежедневно в продължение на 7 дни с rhTPO в зависимост от групата. Всеки ден от орбиталния синус се вземат 40 мкл кръв за пълни кръвни числа. Данните представени отгоре представляват максималните ефекти, наблюдавани при различните третираня и с изключение на (met 153 *E-Coli*) това става на седмия ден на третиране. В по-горе споменатата "met 153 *E-Coli*"-група максималният ефект се наблюдава на петия ден. Данните са представени като средни стойности $\pm$ стандартна грешка на средната стойност.

Фиг. 29 представя кривите доза/отговор, които сравняват активността на пълноразмерните и "кратките" форми на rhTPO, получени в CHO-клетки със скъсената форма от *E. coli*. Групи от 6 женски C57B6-мишки се инжектират дневно с 0,3 мкг различни типове rhTPO. В дни 2-7 от орбиталния синус се вземат

40 мкл кръв за пълни кръвни числа. Групите на третиране са: TPO₁₅₃ - скъсената форма на TPO от *E. coli*; TPO₃₃₂ (смесена фракция) - Пълноразмерен TPO, съдържащ приблизително 80-90% пълноразмерни и 10-20% "къси" форми; TPO₃₃₂(30K-фракция)-пречистена фракция на "късите" форми от изходния "смесен"-препарат; TPO₃₃₂(70K фракция)-пречистена пълноразмерна фракция от изходния "смесен"-препарат. Данните са представени като средни стойности $\pm$ стандартна грешка на средната стойност.

Фиг. 30 представлява схема, показваща KIRA ELISA-теста за измерване на TPO. Фигурата показва химерата MPL/Rse.gD и съответните части от родителските рецептори, както и крайната конструкция (дясната част от фигурата) и разгъната диаграма (лявата част на фигурата), показваща съответните стъпки в теста.

Фиг. 31 представлява разгъната диаграма на KIRA ELISA-теста, показваща всяка стъпка в процедурата.

Фигури 32A-32L представят нуклеотидната последователност (SEQ ID NO:22) на експресионния вектор pSV117.ID.LL, използван за експресия на Rse.gD в **Пример 17**.

Фиг. 33 представя схематично получаването на плазмид pMP1.

Фиг. 34 представя схематично получаването на плазмид pMP21.

Фиг. 35 представя схематично получаването на плазмид pMP151.

Фиг. 36 представя схематично получаването на плазмид pMP202.

Фиг. 37 представя схематично получаването на плазмид pMP172.

Фиг. 38 представя схематично получаването на плазмид pMP210.

Фиг. 39 представлява таблица на петте клона от pMP210-плазмидната банка, които най-добре експресират ТРО.

Фиг. 40 представя схематично получаването на плазмид pMP41.

Фиг. 41 представя схематично получаването на плазмид pMP57.

Фиг. 42 представя схематично получаването на плазмид pMP251

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

I. Дефиниции

Следните думи и фрази имат предимно посочената дефиниция, когато се използват в описанието, примерите и претенциите.

"Хаотропен агент" се отнася за съединение, което във воден разтвор и при подходящи концентрации може да причини изменение в пространствената конфигурация или конформация на белтък чрез най-мако частично разкъсване на силите, отговорни за запазване на нормалната вторична и третична структура на белтъка. Такива съединения включват, например, урея, гуанидин-HCl и натриев тиоцианат. Като правило, за да осъществи конформационният ефект върху белтъците, от тези съединения се изискват високи концентрации, обикновено 4-9 М.

"Цитокин" е родов термин за белтъци, които се освобождават от една клетъчна популация и действуват върху друга клетка като вътреклетъчни медиатори. Примери за такива цитокини са лимфокините, монокините и традиционните полипептидни хормони. В цитокините се включват растежния фактор, инсулиноподобни растежни фактори, човешкия растежен хормон, N-метионил човешкия растежен хормон, говежди растежен хормон, паратиroidен хормон, тироксин, инсулин, проинсулин, релаксин, прорелаксин, гликопротеинови

хормони, такива като фоликул-стимулиращия хормон (FSH), тироид-стимулиращия хормон (TSH) и лутеинизиращия хормон (LH), хематопоеичния растежен фактор, чернодробния растежен фактор, фибробластния растежен фактор, пролактин, плацентарен лактоген, тумор некрозис фактор- α (TNF- α) и TNF- β), субстанция ихибираща гломерулите, миши гонадотропин-асоцииран пептид, инхибин, активин, васкуларно ендотелен растежен фактор, интегрин, нервни растежни фактори, такива като NGF- β , тромбоцитен растежен фактор, трансформиращи растежни фактори (TGFs), такива като TGF- α и TGF- β , инсулиноподобен расрежен фактор-I и -II, еритропоетин (EPO), остеоиндуктовни фактори, интерферони, такива като интерферон- α , - β и -гама, колония-стимулиращи фактори (CSFs), такива като макрофагов CSF (M-CSF), гранулоцит-макрофагов CSF (GM-CSF) и гранулоцитен CSF (G-CSF), интерлевкини (IL's), такива като IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12 и други полипептидни фактори, включващи LIF, SCF и търговски лиганди. Така, както са използвани тук горните термини са предназначени да включват белтъци от природни източници или от рекомбинантна клетъчна култура. По подобен начин се цели термините да включват и биологично активни еквиваленти; напр. различаващи се в аминокиселинната последователност по една или повече аминокиселини или по типа и степента на гликозилиране.

"*Mpl*-лиганд", "*mpl*-лиганден полипептид", "ML", "тромбопоетин" или "TPO" тук се използват взаимозаменяемо и включват всеки полипептид, който притежава свойството да се свързва с *mpl* - член на цитокиновата рецепторна суперфамилия, и който има биологично свойство на ML, както е дефинирано по-долу. Примерно биологично свойство е способността за стимулиране включването на белязани нуклеотиди (напр., ³H-тимидин) в ДНК на IL-3-зависими Ba/F3-клетки, трансфектирани с човешки *mpl* Р. Друго примерно биологично свойство е способността за стимулиране включването на ³⁵S в циркулиращи тромбоцити в теста по рикошет на миши тромбоцити. Тази дефиниция обхваща полипептидът, изолиран от *mpl*-лиганден източник, такъв като апластична свинска плазма, описана тук, или от друг източник, такъв като друг животински

вид, включително хора, или получен чрез рекомбинантни или синтетични методи. Полипептидът включва различни форми като функционални производни, фрагменти, алели, изоформи и техни аналози.

"*Mrp*-лиганден фрагмент" или "TPO-фрагмент" представлява част от природно срещащ се зрял пълноразмерен *mrp*-лиганд или TPO-последователност с делеция на една или повече единици от аминокиселинни остатъци или въглехидрати. Делеция на аминокиселинен остатък(ци) може да стане на всяко място в пептида, което включва на N-терминалния или на C-терминалния край или вътрешно. Фрагментът ще носи най-малко едно общо биологично свойство с *mrp*-лиганда. *Mrp*-лигандните фрагменти обикновено имат непрекъсната последователност от най-малко 10, 15, 20, 25, 30 или 40 аминокиселинни остатъци, които са идентични с последователностите на *mrp*-лиганда, изолиран от бозайник, включващ лиганда, изолиран от апластична свинска плазма, човешки или миши лиганд и по-специално техния EPO-домейн. Представителни примери за N-терминални фрагменти са hML153 или TPO(Met-1-153).

"*Mrp*-лигандни варианти" или "варианти на *mrp*-лигандната последователност" така, както са дефинирани тук, означават биологично активен *mrp*-лиганд, който както е дефинирано по-долу, има по-малко от 100% идентичност в последователността с *mrp*-лиганда, изолиран от рекомбинантна клетъчна култура или от апластична свинска плазма, или с човешкия лиганд, имащ изведената (от кДНК) последователност, описана във **Fig.1** (SEQ ID NO: 1). Обикновено Биологично активният вариант на *mrp*-лиганда обикновено е с аминокиселинна последователност, имаща най-малко около 70% идентичност в аминокиселинната последователност с *mrp*-лиганда, изолиран от апластична свинска плазма или със зрелия миши или човешки лиганд или с техни фрагменти (виж Фиг. 1 [SEQ ID NO:1]), като се предпочитат най-малко около 75%, повече се предпочитат най-малко около 80%, още повече се предпочитат най-малко около 85% и по-предпочитани от тях са най-малко около 90%, като най-предпочитани са най-малко около 95%.

"Химерен *mpl*-лиганд" е полипептид, включващ пълноразмерен *mpl*-лиганд или един или повече негови фрагменти, сляти или свързани с втори хетероложен полипептид или с един или повече негови фрагменти. Химерата разделя поне едно общо биологично свойство с *mpl*-лиганда. Вторият полипептид обикновено е цитокин, имуноглобулин или фрагменти от тях.

"Изолиран *mpl*-лиганд", "високо пречистен *mpl*-лиганд" и "значително хомогенен *mpl*-лиганд" се използват взаимозаменяемо и означават *mpl*-лиганд, който е бил пречистен от *mpl*-лиганден източник или е бил получен чрез рекомбинантни или синтетични методи. Той не съдържа други пептиди или белтъци, което е достатъчно (1), за да се секвенират най-малко 15 и с предпочитание 20 аминокиселинни остатъци от N-терминалната или от вътрешна аминокиселинна последователност като се използва секвенатор (spinning cup) или най-добрият на пазара търговски достъпен аминокиселинен секвенатор или като се модифицират методи, пчбликувани до датата на подаване на тази заявка, или (2) за хомогенност, оценена чрез SDS-PAGE при нередуциращи или редуциращи условия, използвайки оцветяване с Coomassie blue или по-предпочитаното оцветяване със сребро. Хомогенност тук означава по-малко от около 5% замърсяване с белтъци от друг произход.

Терминът "биологично свойство", когато се използва във връзка с "*mpl*-лиганд" или "изолиран *mpl*-лиганд", означава притежаването на тромбопоетична активност, на ефекторна или антигенна функция *in vivo* или на активност, която пряко или непряко се причинява или осъществява от *mpl*-лиганд (в неговата нативна или денатурирана конформация) или от негов фрагмент. Ефекторните функции включват свързване с *mpl* и всяка активност за свързване с носител, агонизъм или антагонизъм на *mpl*, по-специално предаване на пролиферативен сигнал, което включва репликация, ДНК-регулаторни функции, модулиране биологичната активност на други цитокини, рецепторно (по-специално цитокиново) активиране, инактивиране, инициране и потискане, клетъчен растеж или диференциация и подобни на тях. Антигенна функция означава притежаването на епитоп или антигенно място, което е в състояние да реагира

кръстосано с антитела, получени срещу нативния *mpf*-лиганд. Принципната антигенна функция на *mpf*-лигандния полипептид е в това, че той свързва с афинитет най-малко около 10^6 l/мол антитела, получени срещу *mpf*-лиганда, изолиран от апластична свинска плазма. Обикновено полипептидът се свързва с афинитет най-малко около 10^7 l/мол. Най-много се предпочита антигенно активния *mpf*-лиганден полипептид да бъде полипептид, който се свързва с антитяло, получено срещу *mpf*-лиганд, имащ една от по-горе описаните ефекторни функции. Антителата, използвани за определяне на "биологична активност", са заешки поликлонални антитела, получени чрез приготвяне на препарат от *mpf*-лиганда, изолиран от рекомбинантна клетъчна култура или от апластична свинска плазма, в пълен адювант на Фройнд, подкожно инжектиране на препарата и усилване на имунния отговор чрез интраперитонеално инжектиране на препарата докато титърът на антитялото срещу *mpf*-лиганда достигне плато.

Терминът "биологично активен", когато се използва във връзка с "*mpf*-лиганд" или "изолиран *mpf*-лиганд", означава *mpf*-лиганд или полипептид, който показва тромбопоетична активност или носи ефекторната функция на *mpf*-лиганда, изолиран от апластична свинска плазма или експресиран в рекомбинантна клетъчна култура, описана тук. Известната по принцип ефекторна функция на *mpf*-лиганда или полипептида е свързването с *mpf* и стимулиране включването на белязани нуклеотиди (^3H -тимидин) в ДНК на IL-3 зависими Ba/F3-клетки, трансфектирани с човешки *mpf* Р. Друга известна ефекторна функция на *mpf*-лиганда или полипептида е способността за стимулиране включването на ^{35}S в циркулиращи тромбоцити в теста по рикошет на миши тромбоцити. Още една друга известна функция на *mpf*-лиганда е способността да стимулира човешка мегакариоцитопоеза *in vitro*, която може да се околичества чрез използване на радиоактивно белязано моноклонално антитяло, специфично за мегакариоцитния гликопротеин GPIIb/IIIa.

"Процент идентичност в аминокиселинната последователност" по отношение на *mpf*-лигандната последователност се дефинира тук като процент от

аминокиселинните остатъци в последователността-кандидат, които са идентични с остатъците в последователността на *mpt*-лиганда, изолиран от апластична свинска плазма, или с тези в миши или човешки лиганд, имащ изведената (от кДНК) аминокиселинна последователност, описана във **Фиг. 1** (SEQ ID NO: 1). Сравняването се извършва след успоредно налагане на последователността и въвеждане на празнини, ако е необходимо, за постигане на максимален процент секвенционна идентичност, при което нито една от консервативните субституции не се разглежда като част от секвенционната идентичност. Като засягащи секвенционната идентичност или хомология не се тълкуват нито N-крайните, C-крайните или вътрешни удължения, нито делециите или инсерциите в *mpt*-лигандната последователност. Така примерните биологично активни *mpt*-лигандни полипептиди, за които се смята че имат идентични последователности, включват: препро-*mpt*-лиганд, про-*mpt*-лиганд и зрял *mpt*-лиганд.

"Микросеквениране на *mpt*-лиганд" може да се извърши чрез всяка подходяща стандартна процедура при условие, че процедурата е достатъчно чувствителна. В един такъв метод високо пречистен полипептид, получен от SDS-гелове или от последна HPLC-стъпка, се секвенира директно чрез автоматизирано Едманово (фенилизотиоцианатно) разграждане, като се използва газ-фазов секвенатор, модел 470A Applied Biosystems, екипиран с фенилхидантионов (PTH) аминокиселинен анализатор 120A. Освен това по подобен начин могат да бъдат секвенирани *mpt*-лигандни фрагменти, получени чрез химично (напр., CNBr, хидроксиламин, 2-нитро-5-тиоцианобензоат) или ензимно (напр. трипсин, клострипен, стафилококова протеаза) смилане, последвано от пречистване на фрагмента (напр., HPLC). PTH-аминокиселините се анализират като се използва системата данни ChromPerfect (Justice Innovations, Palo Alto, CA). Интерпретацията на резултатите се извършва компютърно с VAX 11/785 Digital Equipment Co., както е описано от Henzel *et al.*, *J. Chromatography*, **404**:41-52 [1987]. Възможно е също аликвоти от HPLC-фракциите да се разделят чрез електрофореза на 5-20% SDS-PAGE, да се пренесат чрез електроблотинг на PVDF-мембрана (ProBlott, ABI, Foster City, CA) и да се оцветят с Coomassie Brilliant

Blue (Matsurdiara, *J. Biol. Chem.*, **262**:10035-10038 [1987]. Специфичният белтък, идентифициран при оцветяването, се изрязва от блота и се извършва N-крайно секвениране с газ-фазовия секвенатор, описан по-горе. За вътрешни белтъчни последователности HPLC-фракциите се изсушават под вакуум (SpeedVac), ресуспендират се в съответни буфери и се разграждат се с бромциан, с Lys-специфичния ензим Lys-C (Wako Chemicals, Richmond, VA), или с Asp-N (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). След разграждането получените пептиди се секвенират като смес или след HPLC-разделяне на C4-колона, елуирана преди газ-фазовото секвениране чрез разгръщане на пропанолов градиент в 0,1% TFA.

"Тромбоцитопенията" се определя като тромбоцитно число под 150×10^9 на литър кръв.

"Тромбопоетичната активност" се определя като биологична активност, която се изразява в усилване на пролиферацията, диференциацията и/или зрееенето на мегакариоцитите или на мегакариоцитните предшественици в тромбоцит-образуващите форми на тези клетки. Тази активност може да бъде измерена в различни тестове, включващи *in vivo* тест по рикошираща тромбоцитна синтеза, тест за индукция на тромбоцитен клетъчно-повърхностен антиген, както това е намерено измерено за човешка левкемична мегакариобластна клетъчна линия (CMK) чрез антитромбоцитен имунотест (анти-GPIIb/IIIa), и индукция на полиплоидизация в мегакариобластна клетъчна линия (DAMI).

"Тромбопоетинът" (TPO) се определя като съединение, имащо тромбопоетична активност или способно да повишава броя на тромбоцитите в серума на бозайник. Предпочита се TPO да може да покачва ендегенния брой на тромбоцитите с най-малко 10%, повече се предпочита с 50% и най-много се предпочита TPO да е в състояние да повиши броя на тромбоцитите в човек до повече от 150×10^9 за литър кръв.

"Изолирана *mpl*-лигандна нуклеинова киселина" е РНК или ДНК, съдържаща повече от 16, за предпочитане 20 или повече последователни нуклеотидни бази, които кодират биологично активен *mpl*-лиганд или негов

фрагмент, комплементарни са на РНК или ДНК, или хибрилизират с РНК или ДНК и остават здраво свързани при умерени до строги условия. Тази РНК или ДНК не съдържа най-малко една нуклеинова киселина от друг произход, с която тя нормално е асоциирана в природния източник, като се предпочита тя да е значително свободна от всякаква друга бозайнишка РНК или ДНК. Фразата "несъдържаща най-малко една нуклеинова киселина от друг произход, с която тя нормално е асоциирана" включва случая, при който нуклеиновата киселина присъства в източника или природната клетка, но има различна хромозомна локализация или е фланкирана с други нуклеотидни поседователности, които нормално не се срещат в изходната клетка. Пример за изолирана *mpl*-лигандна нуклеинова киселина е РНК или ДНК, която кодира биологично активен *mpl*-лиганд, който има най-малко 75% идентичност в последователността, по-предпочитани са най-малко 80%, още по-предпочитани са най-малко 85% и по-предпочитани от тях са 90%, като най-много се предпочитат 95% идентичност в последователността с човешкия, мишия или свинския *mpl*-лиганд.

Терминът "контролни последователности", когато се отнася до експресията, означава ДНК-последователности, необходими за експресията на оперативно свързана кодираща последователност в определен организъм-гостоприемник. Контролните последователности, които са подходящи за прокариоти, например, включват промотор, незадължително операторна последователност, място за свързване с рибозомите, а възможно е и други, слабо изучени досега последователности. За еукариотните клетки се знае, че използват промотори, сигнали за полиаденилиране и инхансъри.

Терминът "оперативно свързан", когато се отнася за нуклеинови киселини, означава че нуклеиновите киселини се намират във функционална връзка с друга последователност от нуклеинова киселина. Например, ДНК за пре-последователност или за секреторен лидер е оперативно свързана с ДНК за полипептид, в случай че той се експресира като пребелтък, който участва в секрецията на полипептида; промоторът или инхансърът са оперативно свързани с кодиращата последователност, ако те влияят върху транскрипцията на

последователността; или мястото за свързване с рибозомите се свързва оперативно с кодиращата последователност, ако то е така разположено, че улеснява транслацията. "Оперативно свързан" означава преди всичко, че ДНК-последователността, която е свързана, е непрекъсната, а в случай на секреторен лидер, непрекъсната и в рамка за четене. Инхансърите обаче не е необходимо да бъдат непрекъснати. Свързването се осъществява чрез лигиране в удобни рестриктазни места. Ако такива не съществуват се използват синтетични олигонуклеотидни адаптори или линкери съгласно традиционната практика.

Терминът "екзогенен", когато се отнася за елемент, означава последователност от нуклеинова киселина, която е чужда за клетката или е хомоложна за клетката, но е разположена в нуклеиновата киселина на клетката-гостоприемник на място, в което елементът обикновено не се открива.

Термините "клетка", "клетъчна линия" и "клетъчна култура" тук се използват взаимозаменяемо и тези означения включват цялото потомство на дадена клетка или клетъчна линия. Така например термини, подобни на "трансформанти" или "трансформирани клетки" включват първичната трансформирана клетка и културите, получени от нея, без отношение към броя на преносите. Знае се също така, че цялото потомство вследствие на целенасочени и случайни мутации не може да бъде идентично до прецизност по отношение съдържанието на ДНК. Термините включват и мутантното потомство, което има същата функция и биологична активност, както скринираните в първоначално трансформираната клетка. Ако се имат предвид други значения, това ще стане ясно от контекста.

"Плазмидите" са автономно реплициращи се кръгови ДНК-молекули, които притежават независими начала на репликация и тук са означени с малка буква "р", която се предшества или следва от главни букви и/или числа. Изходните плазмиди тук са или търговски достъпни, общодостъпни без ограничения или могат да се конструират от такива плазмиди, които са на разположение, в съгласие с публикувани процедури. Освен това в тази област са

известни и други еквивалентни плазмиди, което е очевидно за обикновения специалист.

"Смилане с рестрикционни ензими", когато се отнася за ДНК, означава каталитично разкъсване на вътрешните фосфодиестерни връзки в ДНК с ензим, който действа само в определени локализации или места на ДНК-последователността. Такива ензими се наричат "рестрикционни ендонуклеази (рестриктази)". Всяка рестрикционна ендонуклеаза разпознава специфична ДНК-последователност, наречена "рестрикционно (рестриктазно) място", имащо двулъчева симетрия. Различните рестрикционни ензими, използвани тук, са търговски достъпни, като се използват техните реакционни условия, кофактори и други изисквания, съгласно препоръките на ензимните производители. Рестрикционните ензими е прието да се означават чрез съкращения, съставени от главна буква, следвана от други букви, които представят микроорганизма, от който първоначално е бил получен всеки ензим и след това число, обозначаващо конкретния ензим. Използват се предимно около 1 мкг плазмид или ДНК-фрагмент с около 1-2 единици ензим в около 20 мкл буферен разтвор. Обикновено се провежда инкубация около 1 час на 37°C, но тя може да варира в съгласие с инструкциите на производителя. След инкубацията белтъкът или полипептидът се отстраняват чрез екстракция с фенол и хлороформ, а разградената нуклеинова киселина се отделя от водната фракция чрез утаяване с етанол. Смилането с рестрикционен ензим може да бъде последвано от хидролиза с бактериална алкална фосфатаза на 5'-крайните фосфати, за да се попречи на двата отрязани с рестриктаза краища на ДНК-фрагмента да "циркуларизират" или да формират затворени бримки, което би възпрепятствувало инсерцията на друг ДНК-фрагмент в рестрикционното място. Ако специално не е отбелязано, смилането на плазмидите не се следва от 5'-крайно дефосфориране. Процедурите и реагентите за дефосфориране са конвенционални, както е описано в Раздели 1.56-1.61 на Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989].

Термините "получаване" или "изолиране" на даден ДНК-фрагмент от реакционната смес след рестриктазното смятане означава разделяне на реакционната смес на полиакриламиден или агарозен гел чрез електрофореза, идентифициране на въпросния фрагмент чрез сравняване на неговата подвижност с тази на маркерни ДНК-фрагменти с известно молекулно тегло, отстраняване на отрязъка от гела, съдържащ желанния фрагмент и отделяне на гела от ДНК. Тази процедура е широко известна. Виж например Lawn *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 9:6103-6114 [1981] и Goeddel *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 [1980].

"Southern-анализ" или "Southern-блотинг (пренос)" е метод, при който присъствието на ДНК-последователности в рестриктазната реакционна смес, в която ДНК или ДНК-съдържащ препарат е смлян с рестрикционна ендонуклеаза, се потвърждава чрез хибридизация с известен, белязан олигонуклеотид или ДНК-фрагмент. Southern-анализа обикновено включва електрофоретично разделяне на ДНК-рестриктазната реакционна смес на агарозен гел, денатуриране на ДНК след електрофоретичното разделяне и пренос на ДНК върху нитроцелулозна, найлонова или друга подходяща мембранна подложка за анализ с радиоактивно белязана, биотинилирана или ензимно белязана сонда, както е описано в Раздели 9.37-9.52 на Sambrook *et al.*, по-горе.

"Northern-анализ" или "Northern блотинг (пренос)" е метод, който се използва за идентифициране на РНК-последователности, които хибрилизират с известна сонда, такава като олигонуклеотид, ДНК-фрагмент, кДНК или фрагмент от нея или РНК-фрагмент. Сондата се бележи с радиоактивен изотоп, такъв като ^{32}P , чрез биотинилиране или с ензим. РНК, която трябва да се анализира, обикновено се разделя електрофоретично на агарозен или полиакриламиден гел, пренася се върху нитроцелулозна, найлонова или друга подходяща мембрана и се хибридузира със сондата като се използват стандартни техники, добре известни в специалността, такива като тези, описани в Раздели 7.39-7.52 на Sambrook *et al.*, по-горе.

"Лигиране" е процес на формиране на фосфодиестерни връзки между два нуклеотидни фрагмента. За лигиране на двата фрагмента краищата на фрагментите трябва да бъдат съвместими едни с друг. В някои случаи краищата са директно съвместими след ендонуклеазното смилане. Може, обаче, да се окаже необходимо най-напред "стърчащите" крайща, които обикновено се образуват след ендонуклеазно смилане, да се превърнат в подравнени, за да станат съвместими за лигиране. За подравняване на краищата ДНК се третира в подходящ буфер най-малко 15 минути на 15°C с около 10 единици Klenow-фрагмент на ДНК-полимераза I или с T4 ДНК-полимераза в присъствието на четирите дезоксирибонуклеотидтрифосфати. След това ДНК се пречиства чрез фенол-хлороформена екстракция и утаяване с етанол. ДНК-фрагментите, които ще се лигират заедно, се поставят в разтвор в приблизително еквимоларни количества. Разтворът трябва да съдържа още АТР, лигазен буфер и лигаза, такава като T4 ДНК-лигазата - около 10 единици на 0,5 мкг ДНК. Ако ДНК ще се лигира във вектор, векторът най-напред се линеаризира чрез смилане със съответна рестрикционна ендонуклеаза(и). Линеаризираният фрагмент след това се обработва с бактериална алкална фосфатаза или телешка чревна фосфатаза за предотвратяване на самолигирането повреме на стъпката на лигиране.

"Получаване" на ДНК от клетки означава изолиране на плазмидна ДНК от култура на клетки-гостоприемници. Широко използвани методи за получаване на ДНК са методите за изолиране на големи и малки количества плазмид, описани в Раздели 1.25-1.33 на Sambrook *et al.*, по-горе. След получаването на ДНК тя може да бъде пречистена чрез добре известни методи, като тези, описани в Раздел 1.40 на Sambrook *et al.*, по-горе.

"Олигонуклеотидите" са къси едно- или двуверижни полидезоксинуклеотиди, които се синтезират химично чрез известни методи (такива като фосфодиестерен, фосфитен, фосфороамидитна химия, като се използват твърдофазови техники, както е описано в Европейски патент 266 032, публикуван на 4 май 1988, или чрез дезоксинуклеозид Н-фосфонатни междинни съединения, както е описано от Froehler *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 14:5399-5407

[1986]). Другите методи включват полимеразната верижна реакция, дефинирана по-долу, методи чрез автопраймери, както и олигонуклеотидна синтеза върху твърди подложки. Всички тези методи са описани в Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**:716-734 (1989). Тези методи се използват ако е известна цялата нуклеотидна последователност на гена или ако се разполага с нуклеотидната последователност, комплементарна на кодиращата верига. Алтернативно, ако е известна прицелната аминокиселинна последователност, може да се изведе потенциалната нуклеотидна последователност, като се използват известните и предпочетени кодиращи остатъци за всеки аминокиселинен остътък. След това олигонуклеотидите се пречистват на полиакриламидни гелове.

"Полимеразна верижна реакция" или "ПВР" се отнася за процедура или техника, при която нищожни количества от специфични късчета нуклеинова киселина, РНК и/или ДНК, се амплифицират, както е описано в патент на САЩ No. 4 683 195, издаден на 28 юли 1987. Най-общо, необходимо е да се разполага с информация за последователностите в краищата (или около тях) на областта, която представлява интерес, така че да могат да се проектират олигонуклеотидни праймери; тези праймери ще са идентични или сходни по последователност със срещуположните вериги на матрицата, която ще се амплифицира. 5'-крайните нуклеотиди на двата праймера могат да съответствуват на краищата на амплифицирания материал. ПВР може да се използва за амплификация на специфични РНК-последователности, специфични ДНК-последователности от тотална геномна ДНК и кДНК, транскрибирана от тотална клетъчна РНК, бактериофагови или плазмидни последователности, *etc.* Виж основно Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **51**:263 [1987]; Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989). Така, както е използвана тук, ПВР се разглежда като един, но не като единствения пример за метод на полимеразна реакция на нуклеинова киселина с цел амплификация на тест-проба от нуклеинова киселина, който метод включва използването на известна нуклеинова киселина като праймер и полимераза за нуклеинова киселина, за да се амплифицира или получи специфично парче нуклеинова киселина.

"Строги условия" са тези, които (1) използват ниска йонна сила и висока температура за миене, например, 0,015 M NaCl/0,0015 M натриев цитрат/0,1% NaDodSO₄ (SDS) на 50°C, или (2) използват повреме на хибридизацията денатуриращ агент, такъв като формамид, например 50% (обем/обем) формамид в 0,1% говежди серумен албумин/0,1% Фикол/0,1% поливинилпиролон/50 mM натриево-фосфатен буфер с pH 6,5 със 750 mM NaCl, 75 mM натриев цитрат на 42°C. Друг пример е използването на 50% формамид, 5 X SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M натриев цитрат), 50 mM натриев фосфат (pH 6,8), 0,1% натриев пиродифосфат, 5 X разтвор на Денхард, озвучена ДНК от сперма на съомга (50 мкг/мл), 0,1% SDS и 10% декстрансулфат на 42°C с миения при 42°C в 0,2 X SSC и 0,1% SDS.

"Умерено строги условия" са описани в Sambrook *et al.*, по-горе, и включват използването на миеш разтвор и условия на хибридизация (напр., температура, йонна сила и % SDS) по-малко строги, отколкото описаните по-горе. Пример за умерено строги условия са условия, такива като инкубиране през нощта на 37°C в разтвор, съдържащ: 20% формамид, 5 X SSC (150 mM NaCl, 15 mM тринатриев цитрат), 50 mM натриев фосфат (pH 7,6), 5 X разтвор на Денхард, 10% декстрансулфат и 20 мкл/мл денатурирана озвучена ДНК от сперма на съомга, последвано от миене на филтрите в 1 X SSC на около 37-50°C. Опитният специалист ще се ориентира как да подбере температурата, йонната сила *etc.*, което е необходимо за съгласуване с факторите, такива като дължина на сондата и други подобни.

"Антителата" (Abs) и "имуноглобулините" (Igs) са гликопротеини, които имат еднакви структурни характеристики. Докато антителата показват специфичност на свързване със специфичен антиген, имуноглобулините включват както антитела, така и други антиялоподобни молекули, които не притежават антигенна специфичност. Полипептиди от последния вид се образуват например в малки количества от лимфната система и в повишени количества от миеломите.

"Нативните антитела и имуноглобулини" са обикновено хетеродимерни гликопротеини от около 150 000 далтона, съставени от две идентични леки (L)

вериги и две идентични тежки (H) вериги. Всяка лека верига е свързана с тежка верига чрез една ковалентна дисулфидна връзка, докато броят на дисулфидните свързвания между тежките вериги при различните имуноглобулинови изотипове варира. Всяка тежка и лека верига имат също така равномерно разположени вътреверижни дисулфидни мостове. Всяка тежка верига има на единия край вариабилен домен (V_H), следван от няколко константни домена. Всяка лека верига има вариабилен домен на единия край (V_L) и константен домен на другия си край; константният домен на леката верига е разположен успоредно с първия константен домен на тежката верига, а вариабилният домен на леката верига е разположен успоредно с вариабилния домен на тежката верига. Смята се, че определени аминокиселинни остатъци формират вътрешно пространство между вариабилните домени на леката и тежката верига (Clothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **186**:651-663 [1985]; Novotny and Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:4592-4596 [1985]).

Терминът "вариабилен" има отношение към факта, че определени части от вариабилните домени в антителата силно се различават по последователност и се използват за специфично свързване на всяко определено анти тяло с неговия конкретен антиген. Вариабилността обаче не е равномерно разпределена по протежение на вариабилните домени на антителата. Тя е концентрирана в три сегмента, наречени области, определящи комплементарността (CDRs) или хипервариабилни области, както във вариабилния домен на леката, така и в този на тежката верига. По-силно консервативните участъци от вариабилните домени са наречени "арматурни (скелетни)" (FR). Всеки от вариабилните домени на нативните тежки и леки вериги включва четири FR-области, до голяма степен приемащи конфигурация Я-слой и свързани с три CDR, които образуват бримки, свързващи, а в някои случаи формират част от структурата Я-слой. CDR-областите във всяка верига се поддържат в непосредствена близост от FR-областите и заедно със CDR-областите от другата верига допринасят за образуването на антигенсвързващото място на антителата (виж Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institute of Health, Bethesda,

MD [1987]). Константните области не са въввлечени директно в свързването на антитялото с антигена, но изиявяват различни ефекторни функции, такива като участие на антитялото в антитяло-зависимата цитотоксичност.

Смилането на антителата с папаин води до образуването на два идентични антигенсвързващи фрагмента, наречени "Fab"-фрагменти, всеки с единично антигенсвързващо място, и остатъчен "Fc"-фрагмент, чието име отразява неговата способност бързо да кристализира. Обработката с пепсин дава $F(ab')_2$ -фрагмент, който има две антигенсвързващи места и все още може кръстосано да свързва антигена.

"Fv" е минималният фрагмент от антитялото, който съдържа цялото антигенразпознаващо и свързващо място. Тази област се състои от димер от един вариабилен домен на лека и един вариабилен домен на тежка верига в тясна, нековалентна асоциация. В тази конфигурация трите CDR-области на всеки вариабилен домен взаимодействуват и образуват антигенсвързващо място върху повърхността на V_H - V_L -димера. Шестте CDR-области заедно придават антигенсвързваща специфичност на антитялото. Дори единичен вариабилен домен обаче (или половината от Fv, съдържаща само три CDR-области, специфични за антигена) има способността да разпознава и свързва антиген, макар и с по-нисък афинитет, отколкото цялото свързващо място.

Fab-фрагментът съдържа още константния домен на леката верига и първия константен домен (CH1) на тежката верига. Fab'-фрагментите се различават от Fab-фрагментите по това, че към карбоксилния край на CH1-домена на тежката верига се прибавят няколко остатъци, включващи един или повече цистеина от областта на извивката в антитялото. Fab'-SH е означението за Fab', в който цистеиновия(ите) остатък(ци) на константните домени носят свободна тиолова група. $F(ab')_2$ -фрагментите от антителата първоначално бяха получени като двойки от Fab'-фрагменти, който имат помежду си цистеини от областта на извивката. Известни са и други, химични свързвания на фрагментите от антителата.

"Леките вериги" на антителата (имуноглобулините) от всеки вид гръбначно животно могат да бъдат отнесени към един от два ясно различни типа, наречени капа и ламбда, на основата на аминокиселинните последователности на техните константни домени.

В зависимост от аминокиселинната последователност на константните домени на техните тежки вериги, имуноглобулините могат да бъдат отнесени към различни класове. Съществуват пет основни класове имуноглобулини: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и някои от тях могат допълнително да бъдат разделени на субкласове (изотипове), напр. IgG-1, IgG-2, IgG-3 и IgG-4; IgA-1 и IgA-2. Константните домени на тежките вериги, които съответствуват на различните класове имуноглобулини, са наречени алфа, делта, епсилон, гама и мю, респективно. Структурите на субединиците и пространствените конфигурации на различните класове имуноглобулини са добре известни.

Терминът "антитяло" се използва в най-широк смисъл и по-конкретно за отделни моноклонални антитела (включващи антитела агонисти и антагонисти), за препарати от антитела с полиепитопна специфичност, както и за фрагменти от антитела (напр. Fab, F(ab')₂ и Fv), дотолкова, доколкото те проявяват желаната биологична активност.

Терминът "моноклонално антитяло" така, както се използва тук, се отнася за антитяло, получено от популация значително хомогенни антитела, т.е. индивидуалните антитела, съставляващи популацията, са идентични с изключение на възможни естествено възникващи мутации, които могат да присъствуват в малки количества. Насочени срещу единично антигенно място, моноклоналните антитела са високоспецифични. Освен това, за разлика от препаратите на конвенционалните (поликлонални) антитела, които обикновено включват различни антитела, насочени срещу различни детерминанти (епитопи), всяко моноклонално антитяло е насочено срещу единична детерминанта или антиген. Като допълнение към тяхната специфичност антителата имат това предимство, че те се синтезират от хибридомна култура, несъдържаща други имуноглобулини. Определението "моноклонален" посочва характера на антитялото като получено

от значително хомогенна популация антителя и не трябва да се тълкува като изискващо получаване на анти тялото по някакъв определен метод. Например, моноклоналните антители, които ще се използват в съгласие с настоящото изобретение, могат да бъдат направени по хибридомния метод, описан най-напред от Kohler & Milstein. *Nature*, 256:495 (1975) или могат да се направят чрез рекомбинантни ДНК-методи (виж, напр., патент на САЩ No. 4 816 567 [Cabilly *et al.*]).

Моноклоналните антители тук включват конкретно "химерни" антители (имуноглобулини), в които част от тежката и/или леката верига е идентична със, или хомоложна на съответни последователности в антителата, получени от определен вид или принадлежащи към определен клас или субклас антителя, докато останалата част от веригата(ите) е идентична със, или хомоложна на съответни последователности от антителата, получени от друг вид или принадлежащи към друг клас или субклас антителя, както и фрагменти от такива антители, дотолкова, доколкото те проявяват желаната биологична активност (патент на САЩ No. 4 816 567 (Cabilly *et al.*): и Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 [1984]).

"Хуманизираните" форми на не-човешки (напр. миши) антители са химерни имуноглобулини, имуноглобулинови вериги или техни фрагменти (такива като Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или други антигенсвързващи последователности от антителата), които съдържат минимална последователност, получена от не-човешки имуноглобулин. В по-голямата си част хуманизираните антители представляват човешки имуноглобулини (акцепторно анти тяло), в които последователностите от областта, детерминираща комплементарността (CDR) на акцептора са заменени с остатъци от CDR-областта на не-човешки вид (донорно анти тяло), такъв като мишка, плъх или заек, имаща желаната специфичност, афинитет и капацитет. В някои примери Fv-арматурните (FR) остатъци на човешкия имуноглобулин са заменени със съответни не-човешки остатъци. Нещо повече, хуманизираните антители могат да съдържат остатъци, които не се откриват нито в акцепторното анти тяло, нито във внесените CDR- или FR-

последователности. Тези модификации се правят за допълнително усъвършенствуване и оптимизиране ефективността на антителата. Хуманизираното антитяло включва най-общо почти всички от най-малко един, обикновено два, вариабилни домена, в които всички или почти всички от CDR-областите съответствуват на тези от не-човешки имуноглобулин и всички или почти всички от FR-областите са тези от консенсусна последователност на човешки имуноглобулин. Хуманизираното антитяло ще включва по оптимален начин най-малко част от имуноглобулинова константна област (Fc), обикновено тази на човешки имуноглобулин. За допълнителни подробности виж: Jones *et al.*, *Nature*, **321**:522-525 [1986]; Reichmann *et al.*, *Nature*, **332**:323-329 [1988]; и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, **2**:593-596 [1992]).

"Неимуногенен за хората" означава, че след създаване на контакт между съответната човешка тъкан и полипептида в терапевтично ефективно количество и във фармацевтично приемлив носител, второто въвеждане на полипептида след съответен латентен период (напр. 8 до 14 дни) не води до състояние на чувствителност или устойчивост към полипептида.

II. ПРЕДПОЧИТАНИ ВАРИАНТИ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Предпочетените полипептиди на това изобретение са значително хомогенни полипептид(и), означавани като *mpl*-лиганд(и) или тромбопоетин (TPO), които притежават свойството да се свързват с *mpl*, член от цитокиновата рецепторна суперфамилия, който има биологичното свойство да стимулира включването на белязани нуклеотиди (³H-тимидин) в ДНК на IL-3-зависими Ba/F3-клетки, трансфектирани с човешки *mpl* Р. По-предпочетените *mpl*-лиганд(и) са белтъци, изолирани от бозайници, имащи хематopoетична, по-специално мегакариопоетична или тромбоцитопоетична активност - а именно, да са способни да стимулират пролиферацията, зрееенето и/или диференциацията на незрели мегакариоцити или техни предшественици в зрели тромбоцит-образуващи форми. Най-предпочетените полипептиди на това изобретение са човешки *mpl*-лиганди, включително и техни фрагменти, имащи хематopoетична,

мегакариоцитопоетична или тромбопоетична активност. Възможно е тези човешки *mpl*-лиганди да не са гликозилирани. Други предпочетени човешки *mpl*-лиганди са "ЕРО-домена" на hML, означаван като hML₁₅₃ или hTPO₁₅₃, скъсената форма на hML, означавана като hML₂₄₅ или hTPO₂₄₅, зрелият пълноразмерен полипептид, имащ аминокиселинната последователност, показана на **Фиг. 1** (SEQ ID NO: 1), означаван като hML, hML₃₃₂ или hTPO₃₃₂ и биологично активният субституционен вариант hML(R153A, R154A).

Условно предпочетени полипептиди на това изобретение са биологично или имунологично активните варианти на *mpl*-лигандите, избрани от hML2, hML3, hML4, mML, mML2, mML3, pML и pML2.

Условно предпочетени полипептиди на това изобретение са биологично активните вариант(и) на *mpl*-лиганда, които имат аминокиселинна последователност, най-малко 70% идентична с аминокиселинната последователност на човешкия *mpl*-лиганд (виж **Fig. 1** [SEQ ID NO: 1]), на мишия *mpl*-лиганд (виж **Фиг. 16** SEQ ID NOS:12 & 13]), на рекомбинантния свински *mpl*-лиганд (виж **Фиг. 19** [SEQ ID NO: 18]) или на свинския *mpl*-лиганд, изолиран от апластична свинска плазма. Предпочита се идентичността да е най-малко 75%, повече се предпочитат най-малко 80%, още повече се предпочитат най-малко 85%, като по-предпочитани от тях са най-малко 90% и най-предпочитани са най-малко 95%.

Mpl-лигандът, изолиран от апластична свинска плазма, има следните характеристики:

(1) Частично пречистеният лиганд се елуира от гел-филтрационна колона с PBS, с PBS, съдържащ 0,1% SDS или с PBS, съдържащ 4M MgCl₂ с Mr 60 000 - 70 000.

(2) Активността на лиганда се разрушава от проназа;

(3) Лигандът е стабилен при ниско pH (2,5), SDS до 1% и 2 M урея;

(4) Лигандът е гликопротеин, което се доказва от свързването му с различни лектинови колони;

(5) Високопречистеният лиганд се елуира от нередуцираща SDS-PAGE с Mr 25 000 - 35 000. Елуират се също по-малки количества активност с Mr приблизително 18 000 - 22 000 и 60 000.

(6) Високопречистеният лиганд се разделя на редуцираща SDS-PAGE като дублет с Mr 28 000 и 31 000.;

(7) Аминотерминалната последователност на ивиците 18 000 - 22 000, 28 000 и 31 000 е една и съща - SPAPPACDPRLLNKLLRDDHVLHGR (SEQ ID NO: 29); и

(8) Лигандът се свързва и елуира от следните афинитетни колони:

Blue-Sepharose

CM Blue-Sepharose

MONO-Q

MONO-S

Lentil lectin-Sepharose,

WGA-Sepharose,

Con A-Sepharose,

Ether 650m Toyopearl,

Butyl 650m Toyopearl,

Phenyl 650m Toyopearl,

Phenyl-Sepharose

Най-предпочетените *trp*-лигандни полипептиди са тези, кодирани от човешка геномна или кДНК с аминокиселинна последователност, описана във **Фиг. 1** (SEQ ID NO: 1).

Други предпочетени биологично активни *trp*-лигандни полипептиди на това изобретение, които се срещат в природата, включват препро-*trp*-лиганд, про-*trp*-лиганд, зрял *trp*-лиганд, *trp*-лигандни фрагменти и техните гликозилирани варианти.

Освен тях други предпочетени полипептиди на това изобретение включват варианти на *trp*-лигандната последователност и химери. Предпочетените варианти на *trp*-лигандната последователност и химерите обикновено са биологично активни варианти на *trp*-лиганда, които имат

аминокиселинна последователност най-малко 70% идентичност с аминокиселинната последователност на човешкия *mpl*-лиганд или с *mpl*-лиганда, изолиран от апластична свинска плазма, за предпочитане е най-малко 75%, повече се предпочитат най-малко 80%, още повече предпочитани са най-малко 85%, като по-предпочитани от тях са най-малко 90% и най-предпочитани са 95%. Пример за предпочетен *mpl*-лиганден вариант е вариант на N-крайния домен на hML (означаван като "EPO-домен" поради хомологията на неговата последователност с еритропоетина). Предпочетеният EPO-домен на hML включва около 153 аминокиселинни остатъци от началото на зрелия hML и се означава като hML₁₅₃. Условно предпочетен вариант на hML-последователността включва такъв, в който един или повече от базичните и дибазични аминокиселинни остатък(ци) в C-крайния домен е заместен с небазичен аминокиселинен остатък(ци) (напр. хидрофобен, неутрален, кисел, ароматен, Gly, Pro и подобни на тях). Предпочетен вариант в последователността на C-крайния домен на hML включва такъв, в който Arg-остатъците 153 и 154 са заменени с Ala-остатъци. Този вариант е означен като hML₃₃₂(R153A, R154A). Алтернативен предпочетен вариант на hML включва hML₃₃₂ или hML₁₅₃, в които аминокиселинните остатъци 111-114 (QLPP или LPPQ) са делетирани или заменени с друга тетрапептидна последователност (напр AGAG или подобна на нея). Споменатите делеционни мутанти се означават като делта4hML₃₃₂ или делта4hML₁₅₃.

Предпочетена химера е сливането между *mpl*-лиганда или негов фрагмент (дефиниран по-долу) с хетероложен полипептид или негов фрагмент. Например, hML₁₅₃ може да бъде слят с IgG-фрагмент, за да се удължи времето на полуживот в серума или с IL-3, G-CSF или EPO, за да се получи молекула със по-силна тромбопоетична или химерна хематopoетична активност.

Алтернативна предпочетена химера на човешкия *mpl*-лиганд е "химерата ML-EPO-домен", в която N-крайните остатъци на hML, от 153 до 157, са заменени с една или повече, но не с всички от остатъците на човешкия EPO, приблизително напаснати, както е показано във **Фиг. 10** (SEQ ID NO:6). Примерни инсерции на блокове от последователности в N-крайната част на hML

биха включвали едно или повече от местата за гликозилиране в позиции (ЕРО) 24-27, 38-40 и 83-85; един или повече от предсказаните четири α -спирални възли в позиции (ЕРО) 9-22, 59-76, 90-107 и 132-152; и други високо консервативни области, включващи N-крайните и C-крайните области, както и остатъците в позиции (ЕРО) 44-52 (виж напр., Wen *et al.*, *Blood*, **82**:1507-1516 [1993] и Boissel *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **268**(21):15983-15993 [1993]). Допуска се, че тази "химера ML-ЕРО-домен" ще има смесена тромбопетична-еритропоетична (ТЕРО) биологична активност.

Други предпочетени полипептиди на това изобретение включват *mpl*-лигандни фрагменти с непрекъсната последователност от най-малко 10, 15, 20, 25, 30 или 40 аминокиселинни остатъци, които са идентични с последователностите на *mpl*-лиганда, изолиран от апластична свинска плазма или с тези на човешкия *mpl*-лиганд, описан тук (виж напр., Таблица 14, Пример 24). Предпочетен *mpl*-лиганден фрагмент е човешкият ML[1-X], където X е 153, 164, 191, 205, 207, 217, 229 или 245 (виж Фиг. 1 [SEQ ID NO: 1] за последователността от остатъци 1-X) Други предпочетени фрагменти на *mpl*-лиганда включват тези, получени като резултат от химична или ензимна хидролиза или смилане на пречистения лиганд.

Друг предпочетен аспект на това изобретение е метод за пречистване на *mpl*-лигандни молекули. Методът включва създаване на контакт между източник на *mpl*-лиганд, съдържащ молекулите на *mpl*-лиганда, и имобилизиран рецепторен полипептид, по-конкретно *mpl* или *mpl*-слят полипептид. Това се извършва при условия, при които *mpl*-лигандните молекули, които ще се пречистват, се адсорбират селективно върху имобилизирания рецепторен полипептид, имобилизираната подложка се промива за отстраняване на неадсорбирания материал и молекулите, които трябва да се пречистят, се елуират от имобилизирания рецепторен полипептид с елуиращ буфер. Източникът, съдържащ *mpl*-лиганда може да бъде плазма, в който случай се предпочита имобилизираният рецептор да бъде *mpl*-IgG-сливане.

Като алтернатива източникът, съдържащ *mpl*-лиганда, представлява рекомбинантна клетъчна култура, където концентрацията на *mpl*-лиганда, както в

културалната среда, така и в клетъчните лизати като правило е по-висока, отколкото в плазмата или в други природни източници. В този случай по-горе описаният *mpt*-IgG-имуноафинитетен метод, макар и да може да се използва, обикновено не е необходим и могат да се приложат по-традиционни, известни в практиката методи за пречистване на белтъци. Накратко, предпочетените пречиствателни методи за получаване на значително хомогенен *mpt*-лиганд, включва: отстраняване на отломките от гостоприемни клетки или лизирани фрагменти, например чрез центрофугиране или ултрафилтрация; възможно е белтъкът да се концентрира с търговски достъпен филтър за белтъчно концентриране; следва отделяне на лиганда от други онечиствания чрез една или повече стъпки, избрани от: имуноафинитет, йонообмен (напр., DEAE или пълнежи, съдържащи карбоксиметилни или сулфопропилови групи), Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-C, lentil lectin-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Ether Toypearl, Butyl Toypearl, Phenyl Toypearl, protein A Sepharose, SDS-PAGE, обратнофазова високоефективна течна хроматография (HPLC) (напр., силикагел с прикачени алифатни групи), сефадексово молекулно сито, гел-филтрация и утаяване с етанол или амониев сулфат. Във всяка от гореспоменатите стъпки може да бъде включен протеазен инхибитор, такъв като метилсулфонилфлуорид (PMSF), за инхибиране на протеолизата.

В друг предпочитан вариант това изобретение обезпечава изолирано антитяло, способно да се свързва с *mpt*-лиганд. Предпочетеното изолирано антитяло срещу *mpt*-лиганд е моноклонално (Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497 [1975]; Campbell, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Burdon *et al.*, Eds, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam [1985]; and Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1281 [1989]). Предпочетено изолирано антитяло срещу *mpt*-лиганд е такова, което свързва *mpt*-лиганда с афинитет най-малко 10^6 л/мол. Повече се предпочита антитялото да се свързва с афинитет най-малко около 10^7 л/мол. Най-много се предпочита антитялото да бъде получено срещу *mpt*-лиганда, имащ една от по-горе описаните ефекторни функции. Изолираното антитяло, способно да се свързва с *mpt*-лиганда може да бъде слято

с втори полипептид като антитялото или неговата слята форма могат да се използват за изолиране и пречистване на *mpl*-лиганд от източник, както е описано по-горе за имобилизирания *mpl*-полипептид. В следващ предпочетен аспект на това приложение, изобретението осигурява метод за детектиране на *mpl*-лиганд *in vitro* или *in vivo*, който включва създаване на контакт между антитялото и пробата, по-конкретно серумна проба, за която се подозира, че съдържа лиганда и установяване дали свързването е протекло.

В следващи 1 предпочитани варианти изобретението обезпечава изолирана молекула нуклеинова киселина, кодираща *mpl*-лиганда или фрагменти от него, която молекула нуклеинова киселина може да бъде белязана или небелязана с детектируем компонент, както и молекула нуклеинова киселина, имаща последователност, която е комплементарна на, или хибридизира при строги или умерено строги условия с, молекула нуклеинова киселина, имаща последователност, кодираща *mpl*-лиганд. Предпочетена *mpl*-лигандна нуклеинова киселина е РНК или ДНК, която кодира биологично активен *mpl*-лиганд, показващ идентичност в последователността с човешкия *mpl*-лиганд най-малко 75%, повече се предпочитат най-малко 80%, още повече се предпочитат най-малко 85%, като повече от тях се предпочитат 90% и най-много се предпочитат 95%. По-предпочитаните изолирани молекули нуклеинови киселини са ДНК-последователности, кодиращи биологично активен *mpl*-лиганд, избран от: (а) ДНК на основата на кодиращата област на ген за *mpl*-лиганд от бозайник (напр., ДНК, включваща нуклеотидната последователност, дадена във **Фиг. 1** (SEQ ID NO: 2) или на фрагменти от нея); (b) ДНК, способна да хибридизира с ДНК от (а) при най-малко умерено строги условия; и (с) ДНК, която е изродена по отношение на ДНК, дефинирана в (а) и (b), което произтича от изродеността на генетичния код. Приема се, че новите *mpl*-лиганди, описани тук, могат да бъдат членове на фамилия лиганди или цитокини, които имат секвенционна идентичност, така че техните ДНКи да могат да хибридизират с ДНК от **Фиг. 1** (SEQ ID NO: 1) при условия с ниска до умерена строгост. И така, следващ аспект на това

изобретение включва ДНК, която хибридизира при ниско до умерено строги условия с ДНК, кодираща *mpl*-лигандните полипептиди.

В следващо предпочетено приложение на това изобретение молекулата нуклеинова киселина е кДНК, кодираща *mpl*-лиганда и включваща още вектор, който може да се реплицира и в който кДНК е оперативно свързана с контролни последователности, които се разпознават от гостоприемник, трансформиран с вектора. Този аспект включва още клетки-гостоприемници, трансформирани с вектора, както и метод за използване на кДНК за реализиране продукция на *mpl*-лиганд. Методът включва експресия на кДНК, кодираща *mpl*-лиганда в култура от трансформирани клетки-гостоприемници и изолиране на *mpl*-лиганда от културата на гостоприемните клетки. Предпочита се *mpl*-лигандът, получен по този начин, да бъде значително хомогенен човешки *mpl*-лиганд. Предпочетени клетки-гостоприемници за продукция на *mpl*-лиганд са яйчни клетки от Китайски хамстер (CHO).

Това изобретение включва още предпочетен метод за лечение на бозайник с имунологично или хематопоеично заобляване, по-конкретно тромбоцитопения, като методът включва въвеждане в бозайника на терапевтично ефективно количество *mpl*-лиганд. *Mpl*-лигандът може да се прилага комбинирано с цитокин, по-конкретно колония-стимулиращ фактор или интерлевкин. Предпочетените колония-стимулиращи фактори или интерлевкини включват: търговски лиганд, LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 или IL-11.

III. Методи за получаване

Дълго време се смяташе от някои автори, че образуването на тромбоцитите се контролира от множество родословно специфични хуморални фактори. Беше постулирано, че мегакариоцитопоезата и тромбоцитопоезата се регулират от две различни цитокинови активности, означавани като фактор, стимулиращ колонията от мегакариоцити (meg-CSF) и тромбопоетин (Williams *et*

al., *J. Cell Physiol.*, **110**:101-104 [1982]; Williams *et al.*, *Blood Cells*, **15**:123-133 [1989]; и Gordon *et al.*, *Blood*, **80**:302-307 [1992]). Съгласно тази хипотеза meg-CSF стимулира пролиферацията на родителските мегакариоцити, докато тромбопоетинът влияе предимно върху зреенето на по-диференцирани клетки и задължително върху освобождаването на тромбоцитите. След 1960 бяха добре документирани индукцията и появата, както на meg-CSF-активност, така и на тромбопоетинова активност в плазмата, серума и урината на животни и хора след случаи на тромбоцитопения (Odell *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **108**:428-431 [1961]; Nakeff *et al.*, *Acta Haematol.*, **54**:340-344 [1975]; Specter, *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **108**:146-149 [1961]; Schreiner *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **49**:1709-1713 [1970]; Ebbe, *Blood*, **44**:605-608 [1974]; Hoffman *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **305**:533 [1981]; Straneva *et al.*, *Exp. Hematol.*, **17**:1122-1127 [1988]; Mazur *et al.*, *Exp. Hematol.*, **13**:1164 [1985]; Mazur *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **68**:733-741 [1981]; Sheiner *et al.*, *Blood*, **56**:183-188 [1980]; Hill *et al.*, *Exp. Hematol.*, **20**:354-360 [1992]; и Hegyi *et al.*, *Int. J. Cell Cloning*, **8**:236-244 [1990]). За тези активности се съобщаваше, че са родословно специфични и различни от известните цитокини (Hill R.J. *et al.*, *Blood* **80**:346 (1992); Erickson-Miller C.L. *et al.*, *Brit. J. Haematol.*, **84**:197-203 (1993); Straneva J.E. *et al.*, *Exp. Hematol.* **20**:4750 (1992); и Tsukada J. *et al.*, *Blood* **81**:866-867 [1993]).

В съгласие с горните наблюдения, описващи тромбоцитопенична плазма, ние намерихме, че апластична свинска плазма (APP), получена от облъчени прасета, стимулира човешката мегакариоцитопоеза *in vitro*. Ние намерихме, че тази стимулираща активност се потиска от разтворимия извънклетъчен домен на *c-mpl*, което потвърждава, че APP е потенциален източник на предполагаемия *mpl*-лиганд (ML). Понастоящем ние успешно пречистихме *mpl*-лиганда от APP и информацията за аминокиселинната последователност беше използвана за изолиране на миша, свинска и човешка ML-кДНК. Тези ML имат хомология в последователността с еритропоетина и притежават, както meg-CSF-активност, така и тромбопоетиноподобна активност.

1. Пречистване и идентифициране на *mpl*-лиганд от плазма

Както е отбелязано по-горе, беше съобщено, че апластична плазма от различни видове съдържа активности, които стимулират хематопоеза *in vitro*, но досега няма съобщение за хематопоетичен стимулиращ фактор, изолиран от плазма. Един източник на апластична плазма е този, получен от облъчени прасета. Тази апластична свинска плазма (APP) стимулира човешка хематопоеза *in vitro*. За да се определи, дали APP съдържа *mpl*-лиганд, неговият ефект се тестира чрез измерване включването на ^3H -тимидин в Ba/F3-клетки, трансфектирани с човешки *mpl* P (Ba/F3-*mpl*) чрез процедурата, описана във **Фиг. 2**. APP стимулира включването на ^3H -тимидин в Ba/F3-*mpl*-клетки, но не и в Ba/F3-контролните клетки (т.е. нетрансфектирани с човешки *mpl* P). Освен това такава активност не се установява в нормална свинска плазма. Тези резултати показват, че APP съдържа фактор или фактори, които предават пролиферативен сигнал чрез *mpl*-рецептора и поради това биха могли да бъдат естествени лиганди за този рецептор. Това беше допълнително потвърдено от намирането, че третирането на APP с разтворим *mpl*-IgG блокира стимулиращия ефект на APP върху Ba/F3-*mpl*-клетки.

Активността в APP изглежда се носи от белтък, тъй като проназа, DTT или нагряване разрушават активността в APP (**Фиг. 3**). Активността не може също и да се диализира. Активността обаче е стабилна при ниско рН (рН 2,5 за 2 часа) и е показано, че се свързва и елуира от няколко лектин-афинитетни колони, което показва, че тя представлява гликопротеин. За да се хвърли по-нататък светлина върху структурата и идентичността на тази активност тя се пречиства афинитетно от APP като се използва *mpl*-IgG-химера.

APP се третира съгласно протокола, поместен в **Примери 1 и 2**. Накратко, *mpl*-лигандът се пречиства като се използват хроматография на хидрофобните взаимодействия (HIC), хроматография с имобилизирано багрило и *mpl*-афинитетна хроматография. Добивът на активност от всяка стъпка е показан на **Фиг. 4**, а степента на пречистване е дадена в **Таблица 1**. Общият добив на активност след *mpl*-афинитетната колона е приблизително 10%. Фракцията с

пикова активност (F6) от *mpl*-афинитетната колона има специфична активност, оценена на $9,8 \times 10^6$ единици/мг. Цялостното пречистване от 5 л АРР е 4×10^6 -пъти (от 0,8 ед./мг до $3,3 \times 10^6$ ед./мг) при 83×10^6 -пъти редукция на белтъка (от 250 г до 3 мкг). Ние пресметнахме, че специфичната активност на лиганда, елуиран от *mpl*-афинитетната колона, е около 3×10^6 ед./мг.

ТАБЛИЦА 1

Пречистване на *mpl*-лиганд

Специфична Проба	Обем мл	Белтък мг/мл	Ед./мл	Единици	активност Ед./мг	Добив %	Пъти Пречистване
АРР	5000	50	40	200 000	0,8	-	1
Фенил	4700	0,8	40	200 000	50	94	62
Blue-Sep.	640	0,93	400	256 000	430	128	538
<i>mpl</i> (мкл)							
(Ф-ции 5-7)	12	5×10^{-4}	1666	20 000	3 300 000	10	4 100 000

Белтъкът е определен по метода на Bradford. Белтъчната концентрация на *mpl*-елуираните фракции 5-7 е оценена на базата на интензивността на оцветяване на SDS-гелове, оцветени със сребро. Една единица се дефинира като такава, която предизвиква 50% от максималната стимулация на Ва/F3-*mpl*-клетъчната пролиферация.

Анализът на фракциите, елуирани от *mpl*-афинитетната колона чрез SDS-PAGE (4-20%, Novex-гел), проведена при нередуциращи условия, разкрива наличието на няколко белтъка (Фиг. 5). Белтъците, които по сребро се оцветяват с най-интензивно, се разделят с видима Mr 66 000, 55 000, 30 000, 28 000 и 18 000 - 22 000. За да се определи кой от тези белтъци стимулира пролиферацията на Ва/F3-*mpl*-клетъчни култури, белтъците се елуират от гела, както е описано в Пример 2.

Резултатите от този експеримент показват, че по-голямата част от активността се елуира от гелно късче, което включва белтъци с Mr 28 000 - 32 000 и по-малка активност се елуира от областта на гела 18 000 - 22 000 (Фиг. 6). Единствените белтъци, които се забелязват в тези области, имат Mr 30 000, 28 000 и 18 000 - 22 000. За да се идентифицира и получи белтъчната последователност на белтъците, които се разделят в тази област на гела (т.е. ивици при 30, 28 и 18-22 кДа), тези белтъци се пренасят чрез електроблотинг върху PVDF и се секвенират, както е описано в Пример 3. Получените аминотерминални последователности са дадени в Таблица 2.

ТАБЛИЦА 2

Аминотерминални последователности на *trp*-лиганда

30 кДа						
1	5	10	15	20	25	
(S)PAPPA(C)DPRLLNKLLRDD(H/S)VLH(G)RL						(SEQ ID NO: 30)
28 кДа						
1	5	10	15	20	25	
(S)PAPPA(X)DPRLLNKLLRDD(H)VL(H)GR						(SEQ ID NO: 31)
18-22 кДа						
1	5	10				
XPAPPA(X)DPRLX(N)(K)						(SEQ ID NO: 32)

Компютърният анализ показва, че тези аминокиселинни последователности са нови. Тъй като всичките три последователности са едни и същи, се смята, че белтъците от 30 кДа, 28 кДа и 18-22 кДа са родствени и биха могли да представляват различни форми на същия нов белтък. Нещо повече, този белтък(ци) е вероятно кандидат за природния *trp*-лиганд, тъй като на SDS-PAGE активността се разделя в същата област (28 000-32 000) на 4-20% гел. Освен това частично пречистеният лиганд мигрира с Mr 17 000-30 000, когато се подложи на гел-филтрационна хроматография с използване на колона Superose 12 (Pharmacia). Смята се, че различните Mr-форми на лиганда са резултат от различия в протеолизата, гликозилирането или други пост- или пре-транслационни модификации.

Както беше описано по-рано, антисенс човешка *mpI*-РНК потиска мегакариоцитопоезата в култури от човешки костен мозък, обогатени на CD 34+ родителски клетки, без да засяга диференциацията на други хематопоетични клетъчни линии (Methia *et al.*, по-горе). Този резултат предполага, че *mpI*-рецепторът би могъл да играе роля в диференциацията и пролиферацията на мегакариоцитите *in vitro*. За да се изясни по-нататък ролята на *mpI*-лиганда в мегакариоцитопоезата се сравняват ефектите на APP и на изчерпана за *mpI*-лиганд APP върху *in vitro* човешката мегакариоцитопоеза. Ефектът на APP върху човешката мегакариоцитопоеза се определя като се използва модификация на теста за мегакариоцитопоеза в течна суспензия, описан в **Пример 4**. В този тест човешки периферни стволови клетки (PSC) се третират с APP преди и след *mpI*-IgG-афинитетна хроматография. GPIIb/IIIa-стимулацията на мегакариоцитопоезата се измерва с ¹²⁵I-анти-IIb/IIIa-антитяло (**Фиг. 7**). На **Фиг. 7** е показано, че 10% APP предизвиква приблизително трикратна стимулация, докато APP, изчерпана за *mpI*-лиганд, няма ефект. Съществено е, че APP, изчерпана за *mpI*-лиганд, не индуцира пролиферацията на Ba/F3-*mpI*-клетки.

В друг експеримент разтворим човешки *mpI*-IgG, добавен в дни 0, 2 и 4 към култури, съдържащи 10% APP, неутрализира стимулиращия ефект на APP върху човешката мегакариоцитопоеза (**Фиг. 8**). Тези резултати показват, че *mpI*-лиганда играе роля в регулацията на човешката мегакариоцитопоеза и поради това може да бъде полезен за лечение на тромбоцитопения.

2. Молекулно клониране на *mpI*-лиганда

На основата на аминотерминалната аминокиселинна последователност, получена за белтъците от 30 кДа, 28 кДа и 18-22 кДа (виж **Таблица 2** по-горе) се проектират две групи от изродени олигонуклеотидни праймери и се използват за амплификация на свинска геномна ДНК чрез ПВР. Приема се за основателно, че ако аминотерминалната аминокиселинна последователност се кодира от отделен екзон, то правилният ПВР-продукт се очаква да бъде дълъг 69 нд. Открива се ДНК-фрагмент с тази големина и се

субклонира в pGEMT. Последователностите на олигонуклеотидните ПВР-праймери и на трите получени клона са показани в **Пример 5**. Аминокиселинната последователност (PRLNKLRL) [SEQ ID NO: 33] на пептида, кодиран между ПВР-праймерите, е идентична с тази, получена при секвенирането на аминотерминалния белтък на свинския лиганд (виж остатъци 9-17 от последователностите на свинските белтъци с големина 28 и 30 кДа, по-горе).

За скриниране на човешка геномна ДНК-библиотека се използва синтетичен олигонуклеотид, базиранц се на последователността на ПВР-фрагмента. На основата на последователността на ПВР-фрагмента се проектира и синтезира 45-мер олигонуклеотид, означен pR45. Този олигонуклеотид има следната последователност:

5'GCC-GTG-AAG-GAC-GTG-GTC-GTC-ACG-AAG-CAG-TTT-ATT-TAG-GAG-TCG3'
(SEQ ID NO: 34)

Този дезоксиолигонуклеотид се използва за скриниране на човешка геномна ДНК-библиотека в lambda/gem12 чрез хибридизация при ниска строгост и условия на миене, съгласно **Пример 6**. Положителните клонове се събират, пречистват се от единични плаки и се анализират чрез рестрикционно картиране и Southern-блотинг. EcoRI-XbaI-фрагмента от 390 нд, който хибридизира с 45-мера се субклонира в pBluescript SK-. ДНК-секвениране на този клон потвърждава, че е изолирана ДНК, кодираща човешкия аналог на свинския *mpl*-лиганд. Човешката ДНК-последователност и изведената от нея аминокиселинна последователност са показани на **Фиг. 9** (SEQ ID NOS:3 & 4). Със стрелки са посочени също и предполагаемите места на инtronите в геномната последователност, които ограничават предполагаемия екзон ("екзон 3").

На основата на човешкия "екзон 3" (**Пример 6**) се синтезират олигонуклеотиди, съответстващи на 3'- и 5'-краищата на екзона. Тези два праймера се употребяват в ПВР-реакции, в които като матрица се използва кДНК, получена от различни човешки тъкани. Очакваната големина на правилния ПВР-продукт е 140 нд. След анализ на ПВР-продуктите на 12% полиакриламиден гел, се открива ДНК-фрагмент с очакваната големина в кДНК библиотеки,

приготвени от човешки бъбрек на възрастен, 293-фетални бъбречни клетки и кДНК, приготвена от човешки фетален черен дроб.

След това кДНК-библиотеката от фетален черен дроб (7×10^6 -клона) в λ DR2 се скринира със същия 45-мер олигонуклеотид, използван за скриниране на човешката геномна библиотека при ниска строгост на хибридизационните условия. Положителните клонове се събират, пречистват се от единични плаки и големината на инсерта се определя чрез ПВР. Отбира се един клон с инсерт от 1,8 кн и се анализира по-нататък. Като се използват процедурите, описани в **Пример 7** се получават нуклеотидната и изведената от нея аминокиселинна последователност на човешкия *mpl*-лиганд (hML). Тези последователности са представени на Фиг. 1 (SEQ ID NOS: 1 & 2).

3. Структура на човешкия *mpl*-лиганд (hML)

Последователността на кДНК на човешкия *mpl*-лиганд (Фиг. 1 SEQ ID NO:2) включва 1774 нуклеотида, следвани от поли(A)-опашка. Тя съдържа 215 нуклеотида от 5'-нетранслиращата се последователност и 3'-нетранслираща се област от 498 нуклеотида. Предполагаемият инициаторен кодон в нуклеотидна позиция (216-218) е вътре в консенсусната последователност, която е подходяща за инициация на еукариотната транслация. Отворената рамка за четене е дълга 1059 нуклеотида и кодира полипептид от 353 аминокиселини като се започне от нуклеотидна позиция 220. N-краят на предсказаната аминокиселинна последователност е силно хидрофобен и вероятно съответствува на сигнален пептид. Компютърен анализ на предсказаната аминокиселинна последователност (von Heijne *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 133:17-21 [1983]) посочва потенциално място за скъсване от сигнална пептидаза между остатъци 21 и 22. Скъсването в тази позиция би довело до образуването на зрял полипептид от 332 аминокиселинни остатъци, започващ с аминотерминалната последователност, получена за *mpl*-лиганда, пречистен от свинска плазма. Предсказаното молекулно тегло за негликозилирания лиганд от 332 аминокиселинни остатъка е около 38 кДа.

Налице са 6 потенциални места за N-гликозилиране и четири цистеинови остатъци.

Сравняване на *mpl*-лигандната последователност с последователностите от базата данни в генната банка (Genebank) разкрива 23% идентичност между аминотерминалните 153 остатъка на зрелия човешки *mpl* и човешкия еритропоетин (Фиг. 10 [SEQ ID NOS: 6 & 7]). Ако се вземат предвид консервативните замествания (субституции) тази област на човешкия hML показва 50% сходство с човешкия еритропоетин (hEPO). Както hEPO, така и hML съдържат четири цистеина. Три от четирите цистеина са запазени (консервирани) в hML, включващи първия и последния цистеина. Експерименти по целенасочена мутагенеза показват, че първият и последният цистеини на еритропоетина формират дисулфидна връзка, която е необходима за функцията (Wang, F.F. *et al.*, *Endocrinology* 116:2286-2292 [1983]). По аналогия първият и последният цистеини на hML могат също да формират критична дисулфидна връзка. Нито едно от местата за гликозилиране в hML не е консервативно. Всички потенциални места в hML за N-свързано гликозилиране са локализирани в карбокситерминалната половина на hML-полипептида.

Подобна на EPO, mPHK на hML не съдържа консенсусната последователност за полиаденилиране AAUAAA, нито регулаторния елемент AUUUA, който присъства в 3'-нетранслиращите се области на много цитокини и се смята, че повлиява стабилността на mPHK (Shawet *et al.*, *Cell*, 46:659-667 [1986]). Northern-блот анализ разкрива ниски нива от единичен 1,8 кн hML PHK-транскрипт, както във фетален, така и в черен дроб на възрастен. След по-дълга експонация би могла да се детектира по-слаба ивица със същата големина в бъбрек от възрастен. За сравнение, човешкият еритропоетин се експресира във фетален черен дроб в отговор на хипоксия, в бъбрек и черен дроб на възрастен (Jacobs *et al.*, *Nature*, 313:804-809 [1985] и Bondurant *et al.*, *Molec. Cell. Biol.*, 6:2731-2733 [1986]).

Значението на С-крайната последователност на hML остава да се изясни. Като се има предвид наличието на шестте потенциални места за N-

свързано гликозилиране и способността на лиганда да се свързва с лектин-афинитетни колони, тази област на hML вероятно е гликозилирана. В някои експерименти по елуиране от гел, ние откриваме активност, която се разделя с Mr около 60 000, която може да представлява пълноразмерната, гликозилирана молекула. Поради това C-крайната област може да съдействува за стабилизиране и повишаване полуживота на циркулиращия hML. В случая с еритропоетина негликозилираната форма има пълна *in vitro* биологична активност, но има значително редуциран плазмен полуживот в сравнение с гликозилирания еритропоетин (Takeuchi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **265**:12127-12130 [1990]; Narhi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **266**:23022-23026 [1991] и Spivack *et al.*, *Blood*, **7**:90-99 [1989]). C-крайният домен на hML съдържа два мотива от дибазични аминокиселинни последователности [Arg-Arg-мотиви в позиции 153-154 и 245-246], които биха могли да служат като потенциални места за процесирание. Скъсване в тези места може да е отговорно за образуването на ML-формите от 30, 28 и 18-22 кДа, които се изолират от APP. Съществено е, че последователността Arg₁₅₃-Arg₁₅₄ се появява непосредствено след еритропоетиноподобния домен на ML. Тези наблюдения посочват, че пълноразмерният ML може да представлява белтък-предшественик, който претърпява ограничена протеолиза за да даде зрелия лиганд.

4. Изоформи и варианти на човешкия *trf*-лиганд

Изоформи или форми, резултат от алтернативен сплайсинг на човешкия *trf*-лиганд, се откриват чрез ПВР в черен дроб на възрастен човек. Накратко, синтезират се праймери, съответстващи на всеки край, както и на вътрешни области от кодиращата последователност на hML. Тези праймери се използват в ОТ-ПВР (RT-PCR) за амплификация на РНК от човешки черен дроб на възрастен, както е описано в **Пример 10**. Освен пълноразмерната форма, означена hML, се наблюдават или извеждат (от ДНК-последователностите) три други форми, означени hML2, hML3 и hML4. Зрелите изведени аминокиселинни последователности на всичките четири изоформи са представени на **Фиг. 11**

(SEQ ID NOS: 6, 8, 9 & 10). hML3 има 116-нуклеотидна делеция в позиция 700, която води както до делеция на аминокиселини, така и до изместване рамката на четене. КДНК в този случай кодира зрял полипептид, който е дълъг 265 аминокиселини и се различава от hML-последователността по аминокиселинния остатък 139. Накрая, hML4 има както 12-нуклеотидна делеция след нуклеотидна позиция 618 (намерена също в мишата и свинската последователности [виж по-долу]), така и 116-нд делеция, намерена в hML3. Въпреки че при човека не са изолирани клонове само с 12-нд делецията (след нуклеотид 619), означена (hML2), тази форма вероятно съществува, тъй като такава изоформа е била идентифицирана, както в мишка, така и в прасе (виж по-долу) и тъй като тя е била идентифицирана във връзка със 116-нуклеотидната делеция в hML4.

За да се определи дали пълноразмерният ML е необходим за биологичната активност, се конструират както вариант на hML със заместване, в който дибазичната Arg₁₅₃-Arg₁₅₄-последователност се замества с два аланинови остатъци, така и скъсена по отношение на "ЕРО-домена" форма на hML. Вариантът със заместване на дибазичната последователност Arg₁₅₃-Arg₁₅₄ означаван като hML(R153A, R154A) се конструира като се използва ПВР, както е описано в **Пример 10**. Скъсената за "ЕРО-домена" форма, hML₁₅₃, също се прави чрез използване на ПВР като се въвежда стоп-кодон след Arg₁₅₃.

5. Експресия на рекомбинантен човешки *mpl*-лиганд (rhML) в транзитно трансфектирани човешки ембрионални бъбречни (293) клетки

За да потвърдим, че клонираната човешка КДНК кодира лиганд за *mpl*, лигандът се експресира в бозайнишки 293-клетки под контрола на непосредствено ранния цитомегаловирусен промотор като се използват експресионните вектори pRK5-hML или pRK5-hML₁₅₃. Намира се, че надстоящите течности от транзитно трансфектирани човешки ембрионални бъбречни 293-клетки стимулират включването на ³H-тимидин в Ba/F3-*mpl*-клетки, но не и в родителските Ba/F3-клетки (**Фиг. 12А**). Среда от 293-клетки, трансфектирани

само с вектора, не съдържа такава активност. Добавянето на *mpl*-IgG в средата прекратява стимулацията (данните не са показани). Тези резултати показват, че клонираната кДНК кодира функционален човешки ML (hML).

За да се определи дали "ЕРО-доменът" сам може да свързва и активира *mpl*, скъсената форма на hML, rhML₁₅₃, се експресира в 293-клетки. Открива се, че надстоящите течности от трансфектираните клетки имат активност, подобна на тази, присъстваща в надстоящите течности от клетки, експресиращи пълноразмерния hML (Фиг. 12А), което показва, че С-крайният домен на ML не се изисква за свързване и активиране на *c-mpl*.

6. *mpl*-лигандът стимулира мегакариоцитопоезата и тромбоцитопоезата

Както пълноразмерната, така и скъсената rhML₁₅₃-форма на рекомбинантния hML стимулират човешка мегакариоцитопоеза *in vitro* (Фиг. 12В). Този ефект се наблюдава в отсъствието на други екзогенно добавени хематопоетични растежни фактори. С изключение на IL-3, ML е единственият тестиран хематопоетичен растежен фактор, който проявява тази активност. IL-11, IL-6, IL-1, еритропоетин, G-CSF, IL-9, LIF, търговски лиганд (KL), M-CSF, OSM и GM-CSF нямат ефект върху мегакариоцитопоезата, когато се тестват поотделно в нашия тест (данните не са представени). Този резултат показва, че ML има мегакариоцит-стимулираща активност и посочва роля за ML в регулацията на мегакариоцитопоезата.

Показано е, че тромбоцитопоетични активности, присъстващи в плазмата на тромбоцитопоетични животни, стимулират образуването на тромбоцити в теста по експериментално предизвикана (рикошираща) тромбоцитоза в мишки (McDonald, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 14:1006-1001 [1973] и McDonald *et al.*, *Scand. J. Haematol.*, 16:326-334 [1976]). При този модел в мишките се предизвиква акутна тромбоцитопения, като се използва специфичен антитромбоцитен серум, което води до предсказуема тромбоцитоза. Подобни имуно-тромбоцитемични мишки са по-податливи на екзогенни тромбоцитопоединоподобни активности, отколкото са

нормалните мишки (McDonald, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 14:1006-1001 [1973]), точно така, както ексхипоксичните мишки са по-чувствителни към еритропоетина, отколкото нормалните мишки (McDonald, *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.*, 77:134-143 [1971]). За да се определи дали rML стимулира образуването на тромбоцити *in vivo*, мишки с експериментално предизвикана тромбоцитоза се инжектират с частично пречистен rhML. След това се измерват тромбоцитните числа и включването на ^{35}S в тромбоцитите. Инжектирането на мишки с 64 000 или 32 000 единици rML значително усилва образуването на тромбоцити, което се вижда от приблизително 20%-то повишаване на тромбоцитните числа ($p=0,0005$ и $0,0001$, респективно) и около 40%-то повишаване включването на ^{35}S в тромбоцитите ($p=0,003$) при третираните мишки в сравнение с контролните мишки, инжектирани само с разтворител (Фиг. 12С). Това ниво на стимулация е сравнимо с това, което ние наблюдаваме с IL-6 в този модел (данните не са представени). Третиране с 16 000 единици rML не стимулира значително образуването на тромбоцити. Тези резултати показват, че ML стимулира образуването на тромбоцити по доза-зависим начин и поради това притежава тромбопоетиноподобна активност.

293-клетки се трансфектират също и с конструкциите на другите ML-изоформи, описани по-горе като надстоящите им течности се тестват, използвайки Ba/F3-*mpl*-пролиферационния тест (виж Фиг. 13). В този тест hML2 и hML3 не показват детектируема активност, но активността на hML(R153A, R154A) е сходна с тази на hML и L₁₅₃, което показва, че процесията в дибазичното място Arg₁₅₃-Arg₁₅₄ нито се изисква, нито пречи на активността.

7. Мегакариоцитопоеза и *mpl*-лиганда

Предположено беше, че мегакариоцитопоезата се регулира на множество клетъчни нива (Williams *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 110:101-104 и Williams *et al.*, *Blood Cells*, 15:123-133 [1989]). Това се основава до голяма степен на наблюдението, че определени хематопоеични растежни фактори стимулират пролиферацията на мегакариоцитните предшественици, догато други изглежда

влияят предимно върху зрееенето. Представените тук резултати навеждат на мисълта, че ML действа както като пролиферативен фактор, така и като фактор на зрееенето. Това, че ML стимулира пролиферацията на мегакариоцитните предшественици, се потвърждава от няколко линии на доказателства. Първо, APR стимулира както пролиферацията, така и зрееенето на човешки мегакариоцити *in vitro* и тази стимулация напълно се инхибира от *mpl*-IgG (Фигури 7 и 8). Освен това инхибирането на формирането на мегакариоцитната колония от *c-mpl* антисенс олигонуклеотиди (Methia *et al.*, *Blood*, 82:1395-1401 [1993] и намирането, че *c-mpl* може да предава пролиферативен сигнал в клетки, в които той е трансфектиран (Skoda *et al.*, *EMBO*, 12:2645-2653 [1993] и Vigon *et al.*, *Oncogene*, 8:2607-2615 [1993]), също показва, че ML стимулира пролиферацията. Очевидната експресия на *c-mpl* през всички стадии на мегакариоцитната диференциация (Methia *et al.*, *Blood*, 82:1395-1401 [1993]) и способността на рекомбинантния ML бързо да стимулира образуването на тромбоцити *in vivo*, показва че ML влияе също и върху зрееенето. Наличието на рекомбинантен ML прави възможно да се направи внимателна оценка на неговата роля в регулацията на мегакариоцитопоезата и тромбоцитопоезата, както и на потенциалната му способност да повлиява други хематопоетични родословни линии.

8. Изолиране на гена за човешки *mpl*-лиганд (TPO)

Човешки геномни ДНК-клонове на TPO-гена се изолират чрез скриниране на човешка геномна библиотека в lambda-Gem12 с pR45 при ниска строгост или при висока строгост на условията, с фрагмент, съответстващ на 3'-половината от човешка кДНК, кодираща *mpl*-лиганда. Изолират се два припокриващи се ламбда-клонове, обхващащи 35 кн. Двата припокриващи се фрагмента (BamHI и EcoRI), съдържащи целия TPO-ген се субклонират и секвенират (виж Фигури 14А, 14В и 14С).

Структурата на човешкия ген е съставена от 6 екзона в рамките на 7 кн геномна ДНК. Граничните области на всички връзки екзон/интрон се съгласуват с консенсусния мотив, установен за гените на бозайници (Shapiro, M. B., *et al.*, *Nucl.*

Acids Res. 15:7155 [19987]). Екзон 1 и екзон 2 съдържат 5'-нетранслираща се последователност и първите четири аминокиселини от сигналния пептид. Останалата част от секреторния сигнал и първите 26 аминокиселини на зрелия белтък се кодират от екзон 3. Целият карбоксилен домен и 3'-нетранслиращата се област, както и около 50 аминокиселини от еритропоетинopodobния домен се кодират от екзон 6. Четирите аминокиселини, участващи в делецията, наблюдавана в hML-2 (hTPO-2) се кодират от 5'-края на екзон 6.

Анализът на човешка геномна ДНК чрез Southern-блот показва, че генът за TPO е представен в единично копие. Хромозомната локализация на гена се определя чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) и се картира в хромозома 3q27-28.

9. Експресия и пречистване на TPO от 293-клетки

Получаването и пречистването на ML или TPO от 293-клетки е описано подробно в **Пример 19**. Накратко, кДНК, съответстваща на цялата отворена рамка за четене на TPO, се получава чрез ПВР, като се използва pRK5-hmp/1. ПВР-продуктът се пречиства и се клонира между рестриктазните места ClaI и XbaI на плазмидида pRK5tkneo (вектор, получен от pRK5, модифициран така че да се експресира ген за неомицинова устойчивост под контрола на тимидинкиназния промотор), при което се получава вектора pRK5tkneo.ORF (вектор, кодиращ цялата отворена рамка за четене).

По същия начин се създава втори вектор, кодиращ EPO-хомоложния домен, но като се използват други ПВР-праймери, за да се получи крайната конструкция, наречена pRK5tkneoEPO D.

Двете конструкции се трансфектират в човешки ембрионални бъбречни клетки по СаР_О₄-метода и се отбират устойчиви към неомин клонове, които се култивират до постигане на конfluентност. Експресията на ML₁₅₃ или ML₃₃₂ в културалните среди на тези клонове се тестира, като се използва Ba/F3-mpf-пролиферационният тест.

Пречиштането на rhML₃₃₂ се извършва, както е описано в **Пример 19**. Накратко, 293-rhML₃₃₂-културални среди се нанасят на колона Blue Sepharose (Pharmacia), която след това се промива с буфер, съдържащ 2М урея. Колоната се елуира с буфер, съдържащ 2М урея и 1М NaCl. Обединените проби, елуирани от Blue-Sepharose, след това се нанасят директно върху колона WGA-Sepharose, промита с 10 обема на колоната буфер, съдържащ 2М урея и 1М NaCl и се елуират със същия буфер, съдържащ 0,5М N-ацетил-D-глюкозамин. Елуата от WGA-Sepharose се нанася на C4-HPLC-колона (Synchrom, Inc.) и се елуира с прекъснат пропановов градиент. На SDS-PAGE пречиштеният 293-rhML₃₃₂ се движи като широка ивица в областта на гела от 68-80 кДа (виж **Фиг. 15**).

Пречиштането на rhML₁₅₃ също се извършва, както е описано в **Пример 19**. Накратко, 293-rhML₁₅₃-културални среди се разделят на Blue-Sepharose, както е описано за rhML₃₃₂. Елуатът от Blue-Sepharose се нанася директно на *mpl*-афинитетна колона, както е описано по-горе. Елуираният от *mpl*-афинитетната колона rhML₁₅₃ се пречиства до хомогенност, като се използва C4-HPLC-колона, елуирана при същите условия, използвани за rhML₃₃₂. На SDS-PAGE пречиштеният rhML₁₅₃ се разделя на 2 големи и 2 малки ивици с Mr около 18 000-22 000 (виж **Фиг. 15**).

10. Миши *mpl*-лиганд

ДНК-фрагмент, съответстващ на кодиращата област на човешкия *mpl*-лиганд, се получава чрез ПВР, пречиства се от гел и се бележи в присъствието на ³²P-dATP и ³²P-dCTP. Пробата се използва за скриниране на 10⁶ клона от миша чернодробна кДНК-библиотека в lambdaGT10. Изолира се и се секвенира миши клон (**Фиг. 16** [SEQ ID NOS: 12 & 13]), съдържащ инсерт от 1443 нуклеотидни двойки. Предполагаемият инициращ кодон в нуклеотидна позиция 138-141 е в рамките на консенсусната последователност, улесняваща инициацията на еукариотната транслация (Kozak, M. J. Cell Biol., 108:229-241 [1989]). Тази последователност определя отворена рамка за четене от 1056 нуклеотида, която предсказва първичен транслационен продукт от 352

аминокиселини. Тази отворена рамка за четене се фланкира от 137 нуклеотида 5'- и 247 нуклеотида 3'-нетранслираща се последователност. След 3'-нетранслиращата се област няма поли(А)-опашка, което показва, че този клон вероятно не е пълен. N-краят на предсказаната аминокиселинна последователност е силно хидрофобен и вероятно представлява сигнален пептид. Компютърният анализ (von Heijne, G. *Eur. J. Biochem.* 133:17-21 [1983]) посочва потенциално място за скъсване от сигнална пептидаза между остатъци 21 и 22. Скъсване в тази позиция би довело до получаването на зрял полипептид от 331 аминокиселини (35 кДа), идентифициран като mML₃₃₁ (или mML2 за целите, описани по-долу). Последователността съдържа 4 цистеина, всички съхранени (консервативни) в човешката последователност и 7 потенциални места за N-гликозилиране, 5 от които са запазени в човешката последователност. Отново, както и при hML, всички седем потенциални места за N-гликозилиране са локализирани в C-терминалната половина на белтъка.

При сравняване с човешкия ML в "ЕРО-домените" на тези ML се наблюдава значителна идентичност както в нуклеотидните, така и в изведените от тях аминокиселинни последователности. Когато обаче изведените аминокиселинни последователности на човешкия и мишия ML се наложат успоредно, изглежда че мишата последователност има тетрапептидна делеция между остатъци 111-114, съответстваща на 12-нуклеотидната делеция след нуклеотидна позиция 618, наблюдавана както в човешката (виж по-горе), така и в свинската (виж по-долу) кДНК. В съгласие с това се изследват допълнителни клонове за откриване на възможни изоформи на мишия ML. Един клон кодира полипептид с изведена последователност от 335 аминокиселини, съдържащ "липсващия" тетрапептид LPLQ. Смята се, че тази форма представлява пълноразмерен миши ML и се означава като mML или mML₃₃₅. Нуклеотидната и изведената аминокиселинна последователност на mML са дадени на **Фиг. 17** (SEQ ID NOS: 14 & 15). Този кДНК-клон се състои от 1443 нуклеотидни двойки, следвани от поли(А)-опашка. Той притежава отворена рамка за четене от 1068 нд, фланкирана от 134 бази 5'- и 241 бази 3'-нетранслиращи се последователности.

Предполагаемият инициращ кодон се намира в нуклеотидна позиция 138-140. Отворената рамка за четене кодира прогнозен белтък от 356 аминокиселини, първите 21 от които са силно консервативни и вероятно функционират като секреторен сигнал.

Накрая, изолира се трети клон, секвенира се и се намира, че той съдържа 116-нуклеотидна делеция, съответстваща на hML3. Поради това тази миша изоформа се означава mML3. Сравнението на изведените аминокиселинни последователности на тези две изоформи е показано на **Фиг. 18** (SEQ ID NOS: 9 & 16).

Сумарната идентичност в аминокиселинните последователности на човешкия и мишия ML (**Фиг. 19** [SEQ ID NOS: 6 & 17]) е 72%, но тази хомология не е разпределена равномерно. Областта, определена като "ЕРО-домен" (аминокиселини 1-153 за човешката последователност и 1-149 за мишата) са по-консервативни (86% хомология), отколкото карбокситерминалната област на белтъка (62% хомология). Това може да означава още, че само "ЕРО-доменът" е важен за биологичната активност на белтъка. Интересно е, че от двата дибазични аминокиселинни мотива, намерени в hML, в мишата последователност присъства само дибазичният мотив, следващ непосредствено след "ЕРО-домена" (позиция на остатъци 153-154) в човешката последователност. Това се съгласува с възможността, пълноразмерният ML да представлява белтъчен предшественик, който претърпява ограничена протеолиза до получаване на зрелия лиганд. Като алтернатива протеолизата между Arg₁₅₃-Arg₁₅₄ може да улеснява клирънса на hML.

Експресионен вектор, съдържащ цялата кодираща последователност на mML, се трансфектира транзитно в 293-клетки, както е описано в **Пример 1**. Културални среди от тези клетки стимулират включването на ³H-тимидин в Ba/F3-клетки, експресиращи или миши, или човешки *mpl*, но нямат ефект върху родителската (несъдържаща *mpl*) клетъчна линия. Това показва, че клонираната миша ML кДНК кодира функционален лиганд, който е способен да активира както миши, така и човешки ML-рецептор (*mpl*).

11. Свински *mpL*-лиганд

Свинска ML (pML) кДНК се изолира чрез RACE-ПВР, както е описано в

Пример 13. В бъбрека се открива ПВР-кДНК-продукт от 1342 нд е се субклонира. Секвенират се няколко клона и се намира, че те кодират свински *mpL*-лиганд от 332 аминокиселинни остатъци, означен като pML (или pML₃₃₂), имащ нуклеотидната и изведената от нея аминокиселинна последователност, показани на **Фиг. 20** (SEQ ID NOS: 18 & 19).

Отново се идентифицира втора форма, означена pML2, кодираща белтък с делеция на 4 аминокиселинни остатъци (228 аминокиселинни остатъци) (виж **Фиг. 21** [SEQ ID NO: 21]. Сравняване на аминокиселинните последователности на pML и pML2 показва, че последната форма е същата, с изключение на това, че тетрапептидът QLPP, съответстващ на остатъци 111-114 включително, е делетиран (виж **Фиг. 22** [SEQ ID NOS: 18 & 21]). Делециите на четири аминокиселини, наблюдавани в мишата и свинската ML-кДНК, се появяват точно на едно и също място в прогнозираните белтъци.

Сравняването на предсказаните аминокиселинни последователности за ML от човек, мишка и прасе (**Фиг 19** [SEQ ID NOS: 6, 17 & 18]) показва, че сумарната идентичност в последователностите е 72 процента между мишка и човек, 68 процента между мишка и прасе и 73 процента между прасе и човек. Хомологията е значително по-голяма в аминотерминалната половина на ML (ЕРО-хомоложния домен). Този домен е 80 до 84 процента идентичен между всеки два вида, докато карбокситерминалната половина (въглехидратен домен) е само 57 до 67 процента идентична. Дибазичен аминокиселинен мотив, който би могъл да представлява място за протеазно скъсване, присъства в карбоксилния край на еритропоетин-хомолжния домен. Този мотив в тази позиция е консервативен за трите вида (**Фиг. 19** [SEQ ID NOS: 6, 17 & 18]). Второ дибазично място, присъстващо в позиция 245 и 246 на човешката последователност, не присъства в мишата или свинската последователности. Мишата и свинската ML-последователност съдържат 4 цистеина, всичките консервирани в човешката последователност. В мишия лиганд има седем потенциални места за N-

гликозилиране и шест в свинския ML, 5 от които са консервирани в човешката последователност. Отново всички потенциални места за N-гликозилиране са локализирани в C-крайната половина на белтъка.

12. Експресия и пречистване на TPO от яйчни клетки (CHO) на Китайски хамстер

Експресионните вектори, използвани за трансфекция на CHO-клетки, са означени: pSV15.ID.LL.MLORF (пълноразмерен TPO) и pSV15.ID.LL.MLEPO-D (съкъсен или TPO₁₅₃). По-важните особености на тези плазмиди са представени на **Фиг. 23** и **Фиг. 24**.

Процедурите за трансфекция са описани в **Пример 20**. Накратко, кДНК, съответстваща на цялата отворена рамка за четене на TPO, се получава чрез ПВР. ПВР-продуктът се пречиства и клонира между две рестриктазни места (ClaI и SalI) на плазмидида pSV15.ID.LL, за да се получи векторът pSV15.ID.LL.MLORF. По същия начин, но като се използват други обратни праймери (EPOD.Sal), се получава втора конструкция, съответстваща на EPO-хомоложния домен. Крайната конструкция на вектора, кодиращ EPO-хомоложния домен на TPO, е наречена pSV15.ID.LL.MLEPO-D.

Тези две конструкции се линеаризират с NotI и се трансфектират в яйчни клетки от Китайски хамстер (CHO-DP12-клетки, Европейски патент 307 247, публикуван на 15 март 1989) чрез електропорация. 10⁷-клетки се електропорират в апарат за електропорация на BRL (350 Волта, 330 мкФ, ниско капацитивно съпротивление) в присъствието на 10, 25 или 50 мг ДНК, както е описано (Andreason, G.L. *J. Tissue Cult. Meth.* 15,56 [1993]). В същия ден след трансфекцията клетките се разсяват в DHFR(дихидрофолатредуктаза)-селективна среда (DMEM-F12 50:50 с високо съдържание на глюкоза и без глицин, 2мМ glutамин, 2-5% диализиран фетален телешки серум). 10 до 15 дни по-късно в 96-ямкови платета се прехвърлят индивидуални колонии и се оставят да растат до постигане на конfluентност. Експресията на ML₁₅₃ или ML₃₃₂ в културалните

среди на тези клонове се тестира, като се използва *Ba/F3-mpL* пролиферационният тест (описан в Пример I).

Процесът за пречистване и изолиране на TPO от събраната CHO-клетъчнокултурална течност е описан в **Пример 20**. Накратко, събраната клетъчнокултурална течност (HCCF) се нанася на колона Blue-Sepharose (Pharmacia) при отношение приблизително 100 л HCCF на литър смола. След това колоната се промива с 3 до 5 обема на колоната буфер, следван от 3 до 5 обема на колоната буфер, съдържащ 2,0 М урея. След това TPO се елуира с 3 до 5 обема на колоната буфер, съдържащ 2,0 М урея и 1,0 М NaCl.

Обединеният елуат след Blue-Sepharose, съдържащ TPO, след това се нанася на сефарозна колона с прикачен лектин от зародиш на пшеница (Wheat Germ Lectin Sepharose [Pharmacia]), уравновесена с буфера за елуиране на Blue-Sepharose-колоната при отношение от 8 до 16 мл елуат от Blue-Sepharose-колоната на литър смола. След това колоната се промива с 2 до 3 обема на колоната уравновесяващ буфер. TPO след това се елуира с 2 до 5 обема на колоната буфер, съдържащ 2,0 М урея и 0,5 М N-ацетил-D-глюкозамин.

Елуатът от втората колона (Wheat Germ Lectin), съдържащ TPO, след това се подкислява и се добавя $C_{12}E_8$ до крайна концентрация 0,04%. Получената проба се нанася на C4-обратнофазова колона, уравновесена с 0,1% TFA и 0,04% $C_{12}E_8$ като се натоварват на приблизително 0,2 до 0,5 мг белтък на мл смола.

Белтъкът се елуира чрез двуфазен линеен градиент на ацетонитрил, съдържащ 0,1% TFA и 0,04% $C_{12}E_8$, и елуираните проби се обединяват на базата на SDS-PAGE.

Обединената проба след C4-колоната след това се разрежда и се диафилтрува срещу приблизително 6 обема буфер върху мембрана за ултрафилтрация Amicon YM или подобна на нея с отрязък 10 до 30 Далтона молекулно тегло. Полученият диафилтрат може след това директно да се обработва или да се концентрира допълнително чрез ултрафилтрация.

Диафилтратата/концентрата обикновено се довежда до крайна концентрация 0,01% Tween-80.

Целият или част от диафилтратата/концентрата, еквивалентен на 2 до 5% от изчисления обем на колоната, след това се нанася на колона Sephacryl S-300 HR (Pharmacia), уравновесена с буфер, съдържащ 0,01% Tween 80 и се провежда хроматография. Фракциите, съдържащи ТРО, в които няма агрегати и продукти от протеолитично разграждане, след това се обединяват на базата на SDS-PAGE. Обединените проби се филтруват и се съхраняват на 2-8° C.

13. Методи за трансформация и индукция на ТРО-синтеза в микроорганизъм и изолиране, пречистване и пренагъване на така получения ТРО

Конструирането на вектори за експресия на ТРО в *E. coli* е описано подробно в **Пример 21**. Накратко, всички плазмиди рMP21, рMP151, рMP41, рMP57 и рMP202 са проектирани за експресия на първите 155 аминокиселини на ТРО след малък лидер, който варира в различните конструкции. Лидерите съдействуват предимно за високи нива на инициация на транслацията и за бързо пречистване. Плазмидите рMP210-1, -T8, -21, -22, -24, -25 са проектирани за експресия на първите 153 аминокиселини на ТРО след инициращ метионин и се различават само по използването на кодоните за първите 6 аминокиселини на ТРО, докато плазмидът рMP251 е произведен на рMP210-1, в който карбокситерминалният край на ТРО е удължен с две аминокиселини. Всички горни плазмиди ще продуцират високи нива на вътреклетъчна експресия на ТРО в *E. coli* след индукция на триптофановия промотор (Yansura, D. G. *et al.*, *Methods in Enzymology* (Goeddel, D. V., Ed.) **185:54-60**, Academic Press, San Diego [1990]). Плазмидите рMP1 и рMP172 са междинни в конструирането на горните плазмиди за вътреклетъчна експресия на ТРО.

Горните плазмиди за експресия на ТРО се използват за трансформация на *E. coli* като се използва методът с CaCl_2 и топлинен шок (Mandel, M. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 53:159-162, [1970] и други процедури, описани в

Пример 21. Накратко, трансформираните клетки се култивират първо на 37°C , докато оптичната плътност (600 nm) на културата достигне приблизително 2-3. Културата след това се разрежда и след растеж при аерация се добавя киселина. След това културата се оставя да продължи да расте при аерация още 15 часа, след което време клетките се събират чрез центрофугиране.

Процедурите за изолиране, пречистване и пренагъване, дадени по-долу за получаване на биологично активен, нативен човешки ТРО или на фрагменти от него, са описани в **Примери 22 и 23** и могат да се приложат за получаването на всякакъв вариант на ТРО, включително на N- и C-крайно удължените форми. Други процедури, подходящи за пренагъване на рекомбинантен или синтетичен ТРО, могат да се намерят в следните патенти: Builder *et al.*, патент на САЩ 4 511 502; Jones *et al.*, патент на САЩ 4 512 922; Olson, патент на САЩ 4 518 526 и Builder *et al.*, патент на САЩ 4 620 948; за основно описание на процеса за получаване и пренагъване на различни рекомбинантни белтъци, експресирани в неразтворима форма в *E. coli*.

A. Получаване на неразтворим ТРО

Микроорганизъм, такъв като *E. coli*, експресиращ ТРО, кодиран от който и да е подходящ плазмид, се ферментира при условия, при които ТРО се "складира" в неразтворими "твърди телца". Възможно е клетките най-напред да се промият с буфер за клетъчно разрушаване. Обикновено около 100 г клетки се ресуспендират в около 10 обема буфер за разрушаване на клетките (напр. 10 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8) например с хомогенизатор Polytron и клетките се центрофугират на $5000 \times g$ за 30 минути. След това клетките се лизират, като се използва която и да е конвенционална техника, като тоничен шок, озвучаване, циклиращо налягане, химични или ензимни методи. Например, промитата по-горе утайка може да се ресуспендира в други 10 обема буфер за разрушаване на клетките с хомогенизатор и клетъчната суспензия да се прекара през апарат за

клетъчно разрушаване LH Cell Disrupter (LH Incelltech, Inc) или през Microfluidizer (Microfluidics International), съгласно инструкциите на производителя. Материалът от частички, съдържащ TPO, след това се разделя от течната фаза и по желание се промива с каквато и да е подходяща течност. Например, суспензия от клетъчен лизат може да се центрофугира на 5000 x g за 30 минути, да се ресуспендира и да се центрофугира втори път, за да се получи промита утайка от твърди телца. Промитата утайка може непосредствено да се използва или по желание да се съхранява замразена (напр. на -70°C).

В. Разтваряне и пречистване на мономерен TPO

Неразтворимият TPO в утайката от твърди телца след това се разтваря с разтварящ буфер. Разтварящият буфер съдържа хаотропно средство, обикновено се буферира до базично pH и съдържа редуциращо средство, за да се повиши добивът от мономерен TPO. Представителните хаотропни агенти включват урея, гуанидин-HCl и натриев тиоцианат. Предпочитан хаотропен агент е гуанидин-HCl. Концентрацията на хаотропен агент обикновено е 4-9 M, за предпочитане 6-8 M. pH на разтварящия буфер се поддържа от всеки подходящ буфер в pH-границы от около 7,5-9,5, като се предпочитат 8,0-9,0 и най-много се предпочита 8,0. Предпочита се също разтварящият буфер да съдържа още редуциращ агент, който да подпомогне образуването на мономерната форма на TPO. Подходящите редуциращи агенти включват органични съединения, съдържащи свободна тиолова група (RSH). Представителните редуциращи средства включват дитиотреитол (DTT), дитиоеритритол (DTE), меркаптоетанол, глутатион (GSH), цистеамин и цистеин. Предпочетено редуциращо средство е дитиотреитол (DTT). Възможно е разтварящият буфер да съдържа мек окисляващо средство (напр. молекулен кислород) и сулфитна сол за формиране на мономерен TPO посредством сулфитолиза. В това приложение получаващият се TPO-S-сулфонат по-късно се пренагъва (ренатурира) в присъствието на редокс-буфер (напр., GSH/GSSG), за да се получи правилно нагънат TPO.

ТРО-белтъкът обикновено се пречиства допълнително, като се използват, например, центрофугиране, гел-филтрационна хроматография и обратнофазова колонна хроматография.

За илюстрация, следната процедура дава задоволителни добиви от мономерен ТРО. Утайката от твърдите телца се ресуспендира в около 5 обема (по отношение на нейното тегло) разтварящ буфер (20 mM Tris, pH 8, с 6-8 M гуанидин и 25 mM DTT) и се разбърква 1-3 часа или през нощта на 4° C, за да се постигне разтваряне на ТРО-белтъка. Приложими са също и високи концентрации урея (6-8M), но като цяло това води до малко по-ниски добиви в сравнение с гуанидина. След разтварянето разтворът се центрофугира на 30 000 x g за 30 мин до получаване на бистра надстояща течност, съдържаща денатуриран, мономерен ТРО-белтък. Надстоящата течност след това се подлага на хроматография върху гел-филтрационна колона Sephadex 200 (Pharmacia, 2,6 x 60 cm) при проточна скорост 2 мл/мин и белтъкът се елуира с 20 mM натриев фосфат, pH 6,0 с 10 mM DTT. Фракциите, съдържащи мономерен, денатуриран ТРО-белтък, който се елуира между 160 и 200 мл, се обединяват. ТРО-белтъкът по-нататък се пречиства на полупрепаративна C4-обратнофазова колона (2 x 20 cm VYDAC). Пробата се нанася при 5 мл/мин на колона, уравновесена с 0,1% TFA (трифлуороцетна киселина) с 30% ацетонитрил. Белтъкът се елуира с линеен градиент на ацетонитрил (30-60% за 60 мин.). Пречистеният редуциран белтък се елуира с приблизително 50% ацетонитрил. Този материал се използва за пренагъване, за да се получи биологично активен вариант на ТРО.

С. Пренагъване (ренатурация) на ТРО за получаване на биологично активна форма

След разтваряне и допълнително пречистване на ТРО биологично активната форма се получава чрез пренагъване на денатурирания мономерен ТРО в редокс-буфер. Поради високата активност на ТРО (половината от максималната стимулация в Ва/ЕЗ-теста се постига при приблизително 3 пг/мл), е възможно да се получи биологично активна форма, като се използват много

различни буферни, детергентни и редокс условия. При повечето от условията обаче се получава само малко количество правилно нагънат материал (<10%). При промишлени производствени условия е желателно да се постигне добив от пренагъването най-малко 10%, по-предпочитани са 30-50% и най-много се предпочитат >50%. Намерено е, че най-различни детергенти, включващи Triton X-100, додецил-бета-малтозид, CHAPS, CHAPSO, SDS, саркозил, Tween 20 и Tween 80, Zwittergent 3-14 и други, са подходящи за получаване на поне известно количество правилно нагънат материал. От тях обаче най-предпочитани детергенти са тези от CHAPS-семейството (CHAPS и CHAPSO), за които е намерено, че най-добре работят в реакцията по пренагъване като ограничават агрегацията и неправилното образуване на дисулфид. Най-много се предпочитат нива на CHAPS, по-големи от около 1%. За най-високите добиви се изисква натриев хлорид с оптимални нива между 0,1 М и 5,0 М. Присъствието на EDTA (1-5 mM) в редокс-буфера се предпочита, за да се ограничи количеството на метал-катализираното окисление (и агрегация), което се наблюдава при някои препарати. Оптимални условия за пренагъване създават глицеролни концентрации, по-високи от 15%. За максимални добиви е съществено да се разполага с редокс-двойки в редокс-буфера, състоящи се както от окислен, така и от редуциран тиол (RSH). Подходящите редокс-двойки включват меркаптоетанол, глутатион (GSH), цистеамин, цистин и техните съответни окислени форми. Предпочетените редокс-двойки са: глутатион(GSH):окислен глутатион(GSSG) или цистеин:цистин. Най-предпочетената редокс-двойка е глутатион(GSH):окислен глутатион (ГССГ). Като цяло по-високи нива се получават, когато молното отношение на окисления член на редокс-двойката е равно или в излишък спрямо редуцирания член на редокс-двойката. рН-стойности между 7,5 и около 9 са оптимални за пренагъване на тези ТРО-варианти. Толерират се органични разтворители (напр. етанол, ацетонитрил, метанол) в концентрации 10-15% или по-ниски. По-високи нива на органичните разтворители повишават количеството на неправилно нагънати форми. Използват се основно

Трис и фосфатни буфери. Инкубиране на 4°C също дава по-високи нива на правилно нагънат ТРО.

За препарати на ТРО, пречистени чрез първата С4-стъпка, са типични добиви от пренагъването 40-60% (на основата на редуцирания и денатуриран ТРО, използван в реакцията за пренагъване). Активен материал може да се получи и когато се използват по-малко чисти препарати (напр. директно след колона Sephadex 200 или след първоначалната екстракция на твърдите телца), въпреки че добивите са по-ниски в резултат на засилена преципитация и взаимодействие на не-ТРО-белтъците по време на процеса на пренагъване на ТРО.

Тъй като ТРО съдържа 4 цистеина, е възможно да се получат три различни дисулфидни версии на този белтък:

версия 1: дисулфиди между цистеинови остатъци 1-4 и 2-3

версия 2: дисулфиди между цистеинови остатъци 1-2 и 3-4

версия 3: дисулфиди между цистеинови остатъци 1-3 и 2-4.

По време на началното изследване за определяне условията на пренагъване, чрез С4-обратнофазова хроматография се разделят няколко различни пика, съдържащи ТРО-белтъка. Само един от тези пикове има значителна биологична активност, което се определя като се използва Ва/Е3-теста. Впоследствие условията на пренагъване се оптимизират с оглед получаването предимно на тази форма. При тези условия погрешно нагънатите версии са по-малко от 10-20% от тоталния мономерен ТРО, получен в стъпката на разтваряне.

Чрез масспектрометрия и белтъчно секвениране дисулфидният профил на биологично активния ТРО се определя като 1-4 и 2-3, където цистеините се номерират последователно от аминокрая. Този профил на кръстосано свързване на цистеините се съгласува с известния профил на дисулфидно свързване в родствената молекула еритропоетин.

D. Биологична активност на рекомбинантния, пренагънат ТРО

Пренагънатиот и пречистен ТРО показва активност в тестове, както *in vitro*, така и *in vivo*. Например, в Ba/F3-теста половината от максималната стимулация на включването на тимидин в Ba/F3-клетките за ТРО (Met¹ 1-153) се постига при 3,3 пг/мл (0,3 пМ). В ELISA на основата на *mpl*-рецептора, половината от максималната активност се получава при 1,9 нг/мл (120 пМ). В нормални и миелосупресирани животни, получени след X-облъчване, близо до леталното, пренагънатиот ТРО (Met¹ 1-153) активно (активност се наблюдава при ниски дози, равняващи се на 30 нг/мишка) стимулира образуването на нови тромбоцити. Подобна биологична активност се наблюдава и за други форми на ТРО, пренагънати в съгласие с гореописаните процедури (виж **Фигури 25, 26 и 28**).

14. Методи за измерване на тромбопоетичната активност

Тромбопоетичната активност може да се измери с различни тестове, включващи Ba/F3-*mpl*-лигандния тест, описан в **Пример 1**, *in vivo* тест на "рикошираща" синтеза в миши тромбоцити, тест за индукция на тромбоцитен повърхностен антиген, като напр. измерването, което се прави за човешката левкемична мегакариобластна клетъчна линия (СМК) чрез антитромбоцитен имунотест (анти-GPIIb/IIIa) (виж Sato *et al.*, *Brit. J. Haematol.*, **72**:184-190 [1989]) (виж също теста за мегакариоцитопоеза в течна суспензия, описан в **Пример 4**) и индуцирането на полиплоидизация в мегакариобластна клетъчна линия (DAMI) (виж Ogura *et al.*, *Blood*, **72**(1):49-60 [1988]). Зреенето на мегакариоцитите от незрели, почти несинтезиращи ДНК клетки, до морфологично различни мегакариоцити включва процес, който се изразява в появата на цитоплазмични органели, придобиването на мембранни антигени (GPIIb/IIIa), ендорепликация и освобождаване на тромбоцити, както е описано в ПРЕДШЕСТВУВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА. Очаква се, че родословно специфичен стимулатор (т.е. *mpl*-лигандът) на мегакариоцитното зреење би индуцирал поне някои от тези изменения в мегакариоцитите, водещи до освобождаването на тромбоцити и облекчение на тромбоцитопенията. Ето защо тестовете са насочени към измерване появата на тези параметри в незрели мегакариоцитни клетъчни линии,

т. е. CMK-и DAMI-клетки. CMK-тестът (Пример 4) измерва появата на специфичен тромбоцитен маркер, GPIIb/IIIa, и тромбоцитното излъчване. DAMI-тестът (Пример 15) измерва ендорепликацията, тъй като нарастванията на плоидността са маркери за зрелите мегакариоцити. Различимите мегакариоцити имат стойности за плоидността 2N, 4N, 8N, 16N, 32N и т.н. Най-накрая, *in vivo* тестът по "рикошет" на тромбоцити в мишка (Пример 16) е полезен за демонстриране на факта, че въвеждането на тестовото съединение (тук *mpl*-лиганда) води до повишаване броя на тромбоцитите).

Разработени са и два допълнителни *in vitro* теста за измерване на TPO-активността. Първият е ELISA с активиране на киназния рецептор (KIRA), при което CHO-клетки се трансфектират с химерата *mpl*-Rse и чрез ELISA се измерва тирозиновото фосфорилиране на Rse след взаимодействие на *mpl*-частта от химерата с *mpl*-лиганд (виж Пример 17). Вторият тест представлява ELISA на основата на рецептор, в който ELISA-платето с адсорбиран заешки античовешки IgG улавя човешки химерен рецептор *mpl*-IgG, който свързва *mpl*-лиганда, предмет на тестирането. За детекция на свързания *mpl*-лиганд се използва биотинилирано заешко поликлонално антитяло срещу *mpl*-лиганда (TPO₁₅₅), като измерването се извършва чрез използване на стрептавидин-пероксидаза, както е описано в Пример 18.

15. Биологичен отговор *in vivo* на нормални и сублетално облъчени мишки, третирани с TPO

Нормални и сублетално облъчени мишки се третират със скъсен и пълноразмерен TPO, изолиран от яйчни клетки на Китайски хамстер (CHO), *E. coli* и човешки клетки от ембрионален бъбрек (293). И двете форми на TPO, произведени в тези три гостоприемника, стимулират образуването на тромбоцити в мишки, но пълноразмерният TPO, изолиран от CHO, изглежда предизвиква най-силен отговор *in vivo*. Тези резултати показват, че за максимална активност *in vivo* може би е необходимо правилно гликозилиране на карбокситерминалния домен.

(a) *E. coli*-rhTPO(Met⁻¹, 153)

"Met"-формата на ЕРО-домена (Met в позиция -1 плюс първите 153 остатъци от човешкия ТРО), произведена в *E. coli* (виж **Пример 23**) се инжектира ежедневно в нормални женски C57 B6-мишки, както е описано в легендите към **Фигури 25А, 25В и 25С**. Тези фигури показват, че негликозилираната скъсена форма на ТРО, синтезирана в *E. coli* и пренагъната, както е описано по-горе, е в състояние да стимулира приблизително двукратно повишаване на образуването на тромбоцити в нормални мишки, без да засяга популацията от червени и бели кръвни клетки.

Същата молекула, инжектирана ежедневно в сублетално облъчени (¹³⁷Cs) женски C57 B6-мишки, както е описано в легендите към **Фигури 26А, 26В и 26С**, стимулира възстановяването на тромбоцитите и намалява тяхната деструкция, но няма ефект върху еритроцитите и левкоцитите.

(b) CHO-rhTPO₃₃₂

Пълноразмерната форма на ТРО, произведена в CHO и инжектирана ежедневно в нормални женски C57 B6 -мишки, както е описано в легендите към **Фигури 27А, 27В и 27С**, предизвиква около петкратно повишаване на образуването на тромбоцити в нормални мишки, без да засяга популацията от еритроцити и левкоцити.

(c) CHO-rhTPO₃₃₂; *E. coli*-rhTPO(Met⁻¹, 153); 293-rhTPO₃₃₂ и *E. coli*-rhTPO₁₅₅

Построяват се кривите на зависимостта доза/отговор за третирането на нормални мишки с rhTPO от различни клетъчни линии (CHO-rhTPO₃₃₂; *E. coli*-rhTPO(Met⁻¹, 153); 293-rhTPO₃₃₂ и *E. coli*-rhTPO₁₅₅), както е описано в легендата към **Фиг. 28**. Тази фигура показва, че всички тествани форми на молекулата стимулират тромбоцитното образуване, но пълноразмерната форма, произведена в CHO, има висока активност *in vivo*.

(d) CHO-rhTPO₁₅₃, CHO-rhTPO_{"къс"} и CHO-rhTPO₃₃₂

Криви на зависимостта доза/отговор се построяват също и за третирането на нормални мишки с различни форми на rhTPO, произведени в CHO

(CHO-rhTPO₁₅₃, CHO-rhTPO_{"къс"} и CHO-rhTPO₃₃₂), както е описано в легендата към **Фиг. 29**. Тази фигура показва, че всички тестирани CHO-форми на молекулата стимулират тромбоцитното образуване, но че пълноразмерната форма от 70 кДа има най-голяма активност *in vivo*.

16. Основи на рекомбинантното получаване на *trp*-лиганд и варианти

Предпочита се *trp*-лигандът да се получи чрез стандартните рекомбинантни процедури, които включват продукция на *trp*-лигандния полипептид чрез култивиране на клетки, трансфектирани така, че да експресират *trp*-лигандна нуклеинова киселина (обикновено чрез трансформиране на клетките с експресионен вектор) и изолиране на полипептида от клетките. Визира се обаче и възможността *trp*-лигандът да се получи чрез хомоложна рекомбинация или чрез рекомбинантни методи, ползващи контролни елементи, които се въвеждат в клетки, които вече съдържат ДНК, кодираща *trp*-лиганда. Например, в генома на целевата клетка-гостоприемник на подходящо разстояние и в подходяща ориентация, така че да повлияват транскрипцията на ДНК, кодираща желания *trp*-лиганден полипептид, могат да се включат мощен промотор/инхансърен елемент, супресор или екзогенен елемент за модулиране на транскрипцията. Контролният елемент не кодира *trp*-лиганда, по-скоро ДНК е ендегенна (собствена) за генома на клетката-гостоприемник. След това се скринира за клетки, синтезиращи рецепторния полипептид на това изобретение, за повишени или понижени нива на експресия в зависимост от желанието.

И така, изобретението предвижда метод за получаване на *trp*-лиганд, обхващащ включване в генома на клетка, съдържаща *trp*-лигандна молекула нуклеинова киселина, на транскрипционен модулаторен елемент в достатъчна близост и ориентация по отношение на молекулата нуклеинова киселина, за да въздейства върху нейната транскрипция. Възможна е и следваща стъпка, включваща култивиране на клетката, съдържаща транскрипционния модулаторен елемент и молекулата нуклеинова киселина. Изобретението предвижда също

клетка-гостоприемник, съдържаща ендегенна *trp*-лигандна молекула нуклеинова киселина, оперативно свързана с екзогенни контролни последователности, които се разпознават от клетката-гостоприемник.

А. Изолиране на ДНК, кодираща trp-лиганден полипептид

ДНК, кодираща *trp*-лиганден полипептид, може да се получи от всяка кДНК-библиотека, приготвена от тъкан, за която се смята, че притежава *trp*-лигандна мРНК и че я експресира до забележимо ниво. *Trp*-лигандният ген може също да се получи от геномна ДНК-библиотека или чрез олигонуклеотидна синтеза *in vitro* на базата на пълната нуклеотидна или аминокиселинна последователност.

Библиотеките се скринират със сонди, предназначени за идентификация на гена, представляващ интерес или на белтъка, който той кодира. Подходящите сонди за кДНК-експресионни библиотеки включват моноклонални или поликлонални антитела, които разпознават и свързват специфично *trp*-лиганда. Подходящите сонди за кДНК-библиотека включват олигонуклеотиди с дължина от около 20-80 бази, които кодират известна или предполагаема част от *trp*-лигандната кДНК от същия или друг вид; и/или комплементарна или хомоложна кДНК или фрагменти от нея, които кодират същия или подобен ген. Съответните сонда за скриниране на геномни ДНК-библиотеки включват, но не се ограничават само до, олигонуклеотиди, кДНК или фрагменти от нея, които кодират същия или друг ген и/или хомоложна геномна ДНК или фрагменти от нея. Скринирането на кДНК-библиотеката или на геномната библиотека с избраната сонда може да се проведе, като се използват стандартните процедури, както е описано в Глави 10-12 на Sambrook *et al.*, по-горе.

Алтернативен начин за изолиране на гена, кодиращ *trp*-лиганд, представлява използването на ПВР-методологията, както е описано в Раздел 14 на Sambrook *et al.*, по-горе. Този метод изисква използването на олигонуклеотидни проби, които ще хибридизират с ДНК, кодираща *trp*-лиганда. Стратегиите за избор на олигонуклеотиди са описани по-долу.

Предпочетен метод за практическо приложение на това изобретение представлява използването на внимателно подбрани олигонуклеотидни последователности за скриниране на кДНК-библиотеки от различни тъкани, за предпочитане човешки или свински бъбречни (от фетален бъбрек или бъбрек на възрастен) или чернодробни клетъчни линии. Например, кДНК библиотеки от клетъчна линия на човешки фетален черен дроб се скринират с олигонуклеотидните сонди. Като алтернатива с олигонуклеотидните сонди могат да се скринират човешки геномни библиотеки.

Олигонуклеотидните последователности, избрани като проби, би трябвало да са с достатъчна дължина и достатъчно еднозначни, така че да се сведат до минимум фалшивоположителните сигнали. Работната нуклеотидна последователност(и) обикновено се избира на основата на области на *trp*-лиганда с най-малка изроденост на кода. Олигонуклеотидите могат да са дегенерирани (изродени) в една или повече позиции. Използването на дегенерирани олигонуклеотиди е от особена важност в случая, когато се скринира библиотека от вид, за който не е известно кои кодони се използват преимуществено.

Олигонуклеотидът трябва да бъде белязан, така че да може да се установи след хибридизация с ДНК в библиотеката, която се скринира. Предпочетеният метод за бележене е използването на АТР (напр. гама³²P) и на полинуклеотидкиназа за радиоактивно бележене 5'-края на олигонуклеотида. Могат обаче да се използват и други методи за бележене на олигонуклеотида, които включват, но не се ограничават само до, биотинилиране или ензимно бележене.

Определен интерес представлява *trp*-лигандна нуклеинова киселина, която кодира пълноразмерен *trp*-лиганден полипептид. В някои предпочетени приложения нуклеотидната последователност включва сигналната последователност на нативния *trp*-лиганд. Нуклеинова киселина, която има цялата белтък-кодираща последователност, се получава чрез скриниране на

избрани кДНК- или геномни библиотеки, като се използва изведената аминокиселинна последователност.

*В. Варианти на нативния *mpt*-лиганд по аминокиселинна последователност*

Варианти на *mpt*-лиганда по аминокиселинна последователност се приготвят чрез въвеждане на съответни нуклеотидни изменения в *mpt*-лигандната ДНК или чрез *in vitro* синтеза на желания *mpt*-лиганден полипептид. Такива варианти например включват делеции, инсерции или субституции на остатъци в аминокиселинната последователност на свинския *mpt*-лиганд. Например, карбокситерминалната част на зрелия пълноразмерен *mpt*-лиганд може да бъде отстранена чрез протеолитчно скъсване *in vivo* или *in vitro*, или чрез клониране и експресия на фрагмент или на ДНК, кодираща пълноразмерния *mpt*-лиганд за получаване на биологично активен вариант. Прави се всяка комбинация от делеция, инсерция или субституция (заместване) за постигне на крайната конструкция при условие, че крайната конструкция притежава желаната биологична активност. Аминокиселинните изменения могат също така да променят посттранслационни процеси на *mpt*-лиганда, такива като промяна в броя или мястото на местата за гликозилиране. При дизайна на варианти на *mpt*-лиганда по аминокиселинна последователност локализацията на мутационното място и природата на мутацията ще зависят от *mpt*-лигандната характеристика(и), която трябва да се модифицира. Местата за мутиране могат да се модифицират индивидуално или в серия, напр. чрез (1) избор най-напред на консервативни киселини за субституция и след това по-радикални селекции в зависимост от постигнатите резултати, (2) делетиране на прицелния остатък или (3) инсерция (включване) на остатъци от същия или друг клас в съседство с локализираното място, или комбинации от опции 1-3.

Методът, който се използва за идентифициране на определени остатъци или области на *mpt*-лигандния полипептид, които са предпочетени места за мутагенеза, се нарича "мутагенеза чрез аланиново сканиране", както е описано от Cunningham and Wells, *Science*, **244**:1081-1085 [1989]. По същество,

идентифицират се остатък или група от прицелни остатъци (напр. заредени остатъци, такива като arg, asp, his, lys и glu) и се заместват с която и да е, но се предпочитат неутрална или отрицатено заредена аминокиселина (най-предпочитани са аланина или полиаланина), за да се въздействува върху взаимодействието на аминокиселините с обкръжаващата ги водна среда във или извън клетката. Тези домени, които демонстрират функционална чувствителност към субституциите, след това се усъвършенствуват чрез въвеждане на допълнителни или други варианти в местата на субституция. И така, докато мястото за въвеждане на вариация в аминокиселинната последователност е предварително детерминирано, то природата на мутацията *per se* не се налага да се определя предварително. Например, за оптимизиране въвеждането на мутация на дадено място се извършва аланиново сканиране или случайна мутагенеза на прицелния кодон или област и експресираните *mpl*-лигандни варианти се скринират за оптималната комбинация на желаната активност.

Съществуват две принципни променливи при конструирането на варианти в аминокиселинната последователност: локализацията на мутационното място и природата на мутацията. Например, варианти на *mpl*-лигандния полипептид включват варианти на *mpl*-лигандната последователност и могат да представляват природно съществуващи алели (които няма да изискват манипулация на *mpl*-лигандната ДНК) или предетерминирани мутантни форми, които се правят чрез мутиране на ДНК, за да се получи алел или несрещащ се в природата вариант. Като цяло изборът на локализация и природа на мутацията ще зависи от *mpl*-лигандната характеристика, която ще се модифицира.

Делециите в аминокиселинната последователност като правило обхващат от около 1 до 30 остатъци като повече се предпочитат около 1 до 10 остатъци, които обикновено са последователни (съседни). Като алтернатива делециите в аминокиселинната последователност на *mpl*-лиганда могат да включват част от, или целия карбокситерминален гликопротеинов домен. Делециите в аминокиселинната последователност могат също така да включват един или повече от първите 6 аминотерминални остатъци на зрелия белтък.

Възможните делеции в аминокиселинната последователност включват един или повече остатъци в една или повече от областите под формата на бримка, които съществуват между "спиралните възли". Съседните делеции обикновено се правят на четен брой остатъци, но не се изключват делециите на единични или нечетен брой остатъци. Делециите могат да се въведат в области с ниска хомология между *mpt*-лигандите, на които се дължи най-голямата секвенционна идентичност, за да се модифицира активността на *mpt*-лиганда. Или делеции могат да се въведат в области с ниска хомология между човешкия *mpt*-лиганд и други бозайнишки *mpt*-лигандни полипептиди, които области имат най-голям дял за секвенционната идентичност на човешкия *mpt*-лиганд. Делециите в бозайнишки *mpt*-лиганден полипептид на области, имащи съществена хомология с други бозайнишки *mpt*-лиганди, вероятно ще модифицира по-значително биологичната активност на *mpt*-лиганда. Броят на последователните делеции се подбира така, че да се запази третичната структура на *mpt*-лигандите в засегнатия домен, напр., бета-нагънат слой или алфа спирала.

Инсерциите в аминокиселинната последователност включват аминокиселини и/или карбокситерминални сливания, които на дължина обхващат от един остатък до полипептиди, съдържащи стотици или повече остатъци, както и инсерции на единични или множествени аминокиселинни остатъци вътре в последователността (интрасеквенционни инсерции). Интрасеквенционните инсерции (т.е. инсерции в зрялата *mpt*-лигандна последователност) могат да обхващат най-общо от около 1 до 10 остатъка, повече се предпочитат 1 до 5 и най-много се предпочитат 1 до 3. Изключително предпочитано сливане е това на *mpt*-лиганд или негов фрагмент с друг цитокин или фрагмент от него. Примерите за терминални инсерции включват зрял *mpt*-лиганд с N-краен метионинов остатък, артефакт от директната експресия на зрелия *mpt*-лиганд в рекомбинантна клетъчна култура и сливане на хетероложна N-крайна сигнална последователност с N-края на зрялата *mpt*-лигандна молекула за улесняване секрецията на зрелия *mpt*-лиганд от рекомбинантния гостоприемник. Такива сигнални последователности като правило се получават от, и затова са

хомоложни на целевия вид, от който са гостоприемните клетки. Подходящите последователности включват STII или *lpp* за *E. coli*, алфа-фактор за дрожди и вирусни сигнали, такива като херпесния gD за бозайнишки клетки.

Други инсерционни варианти на *trp*-лигандната молекула включват сливане към N- или C-края на *trp*-лиганда на имуниогенни полипептиди (т.е. неендогенни за гостоприемника, в който се въвежда сливането), напр. бактериални полипептиди, такива като бета-лактамазата или ензим, кодиран от *E. coli trp*-локуса, или дрожден белтък, както и C-терминални сливания с белтъци, имащи дълъг полуживот, такива като имуноглобулинови константни области (или други имуноглобулинови области), албумин или феритин, както е описано във WO 89/02922, публикуван на 6 април 1989.

Трета група варианти са вариантите с аминокиселинни субституции. Тези варианти имат най-малко един аминокиселинен остатък, отстранен от *trp*-лигандната молекула и друг остатък включен на негово място. Местата от най-голям интерес за субституционалната мутагенеза включват места, идентифицирани като активното място(а) на *trp*-лиганда и места, в които аминокиселините, намерени в други аналози, са съществено различни в смисъл на обем на страничните вериги, товар или хидрофобност. Но в тези места съществува също и голяма степен на секвенционна идентичност на избраното място в *trp*-лигандите от различни видове и/или в различните животински аналози на един *trp*-лиганден член.

Други места, представляващи интерес са тези, в които определени остатъци на *trp*-лиганда, получен от различни фамилни членове и/или животински видове в рамките на един член, са идентични. Тези места, по-специално тези, попадащи в последователност на най-малко три други идентично консервирани места, се заместват по относително консервативен начин. Такива консервативни субституции са показани в Таблица 3 под заглавието предпочетени субституции. Ако такива субституции имат за резултат промяна в биологичната активност, тогава се въвеждат по-съществени изменения, отбелязани като примерни

субституции в Таблица 3, или както е описано по-долу по отношение на аминокиселинните класове.

ТАБЛИЦА 3

Оригинален остатък	Примерна Субституция	Предпочетена Субституция
Ala (A)	Val; Leu Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлевцин	Leu
Leu (L)	норлевцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлевцин	Leu

Съществени модификации на функцията и имунологичната идентичност на *mH*-лиганда се осъществяват чрез селекцията на субституции, които значително се различават по своя ефект върху поддържане (а) структурата на полипептидния гръбнак в областта на субституцията, (b) заряда или хидрофобността на молекулата в прицелното място или (c) обема на страничната верига. Срещащите се в природата остатъци са разделени на групи на основата на общи свойства на страничните вериги:

- (1) хидрофобни: норлевцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) неутрални хидрофилни: Cys, Ser, Thr;
- (3) кисели: Asp, Glu;
- (4) базични (основни): Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) остатъци, които влияят върху ориентацията на веригата: Gly,

Pro; и

(6) ароматни: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативните субституции ще включват смяната на член на един от тези класове с друг. Такива заместени остатъци могат също така да се въведат в консервативните субституционни места или с по-голямо предпочитание в останалите (неконсервативни) места.

В едно приложение на изобретението е желателно да се инактивира едно или повече от местата за протезно скъсване, присъстващи в молекулата. Тези места се идентифицират, като кодираната аминокиселинна последователност се проверява в случая на трипсин например за аргининов или лизинов остатък. Когато местата за протеазно скъсване се идентифицират, те се превръщат в неактивни чрез заместване на целевия остатък с друг остатък, за предпочитане базичен остатък, такъв като глутамин или хидрофобен остатък, такъв като серин; чрез делеция на нуклеотида; или чрез инсерция на пролилов остатък непосредствено след остатъка.

В друго приложение, всеки метионилов остатък, различен от стартовия метионилов остатък на сигналната последователност, или всеки остатък, локализиран в рамките на около три остатъка N- или C-терминално на всеки такъв метионилов остатък, се замества с друг остатък (за предпочитане в съгласие с Таблица 3) или се делетира. Като алтернатива около 1-3 остатъка се включват в съседство с такива места.

Всеки цистеинов остатък, който не е въввлечен в поддържането на правилната конформация на *trp*-лиганда, също може да се замени, главно със серин, за да се подобри стабилността на молекулата към окисление и да се предотврати погрешното кръстосано свързване. Беше намерено, че първият и четвъртият цистеини в еро-домена, номерирани от аминотерминалния край, са необходими за запазване на правилна конформация, но че вторият и третият не са. В съгласие с това вторият и третият цистеини в еро-домена могат да се заместят.

Молекули нуклеинови киселини, кодиращи варианти на *trp*-лиганда в аминокиселинната последователност, могат да се получат чрез различни методи, известни в областта. Тези методи включват, но не се ограничават само до: изолиране от природен източник (в случая на природно срещащи се варианти в аминокиселинната последователност) или приготвяне чрез олигонуклеотид-опосредствувани методи (или целенасочена) мутагенеза, ПВР-мутагенеза или блокова мутагенеза на по-рано приготвен вариант или невариантна версия на *trp*-лигандния полипептид.

Мутагенезата посредством Олигонуклеотиди е предпочетен метод за получаване на субституционни, делеционни и инсерционни варианти на *trp*-лигандната ДНК. Тази техника е добре известна на специалистите, и е описана в Adelman *et al.*, *DNA*, 2:183 [1983]. Накратко, *trp*-лигандната ДНК се променя чрез хибридизация на олигонуклеотид, кодиращ желаната мутация с ДНК-матрица, където матрицата представлява едноверижна форма на плазмид или бактериофаг, съдържащ наизменената или нативна ДНК-последователност на *trp*-лиганда. След хибридизацията се използва полимеразата за синтеза на цялостна втора комплементарна верига на матрицата, която по този начин ще включи олигонуклеотидния праймер и ще кодира избраното изменение в *trp*-лигандната ДНК.

Използват се основно олигонуклеотиди с дължина най-малко 25 нуклеотида. Един оптимален олигонуклеотид ще има 12 до 15 нуклеотида, които са напълно комплементарни на матрицата от всяка страна на нуклеотида(ите), кодиращ мутацията. Това ще осигури правилната хибридизация на олигонуклеотида с молекулата на едноверижната ДНК-матрица. Олигонуклеотидите се синтезират лесно като се използват техники, известни в специалността, като тази, описана от Crea *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:5765 [1978].

ДНК-матрицата може да се приготви от тези вектори, които са получени или от векторите на основата на бактериофага M13 (търговски достъпните вектори M13mp18 и M13mp19 са подходящи) или от векторите, които

съдържат начало за репликация на едноверижен фаг, както е описано от Viera *et al*, *Meth. Enzymol.*, **153:3** [1987]. И така ДНК, която ще се променя (мутира), може да се включи в един от тези вектори за получаване на едноверижна матрица. Получаването на едноверижна матрица е описано в Раздели 4.21-4.41 на Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 1989).

Като алтернатива едноверижна матрица може да се получи чрез денатуриране на двойноверижен плазмид (или друга) ДНК, като се използват стандартни техники.

За изменение на нативната ДНК-последователност (за получаване на варианти в аминокиселинната последователност, например) олигонуклеотидът се хибридизира с едноверижната матрица при подходящи условия на хибридизация. След това се прибавя енаим за полимеризация на ДНК, обикновено Klenow-фрагмент на ДНК-полимераза I, за да се синтезира комплементарната верига на матрицата, използвайки олигонуклеотида като праймер за синтеза. По този начин се формира хетеродуплексна молекула, така че едната верига на ДНК кодира мутантната форма на *trp*-лиганда, а другата верига (оригиналната матрица) кодира нативната, непроменена последователност на *trp*-лиганда. Тази хетеродуплексна молекула след това се трансформира в подходяща клетка-гостоприемник, обикновено прокариот, такъв като *E. coli* JM101. След като клетките се култивират, те се посяват върху агарозни платета и се скринират, като се използва олигонуклеотидният праймер, белязан радиоактивно с 32-фосфат, за да се идентифицират бактериалните колонии, които съдържат мутантната ДНК. Мутиралата област след това се отстранява и се поставя в съответен вектор за белтъчна продукция, главно експресионен вектор, който обикновено се използва за трансформация на съответен гостоприемник.

Методът, току що описан по-горе, може да се модифицира така, че да се получи хетеродуплексна молекула, при което и двете вериги на плазмидата съдържат мутацията(ите). Тези модификации са, както следва: Едноверижният олигонуклеотид се (хибридизира към матрицата, както е описано по-

горе. Смес от три дезоксирибонуклеотида, дезоксирибоаденозин (dATP), дезоксирибогуанозин (dGTP) и дезоксириботимидин (dTTP), се комбинира с модифициран тио-дезоксирибоцитозин, наречен dCTP-(aS) (който може да се получи от Amersham Corporation). Тази смес се прибавя към комплекса матрица-олигонуклеотид. След добавяне на ДНК-полимераза към тази смес се синтезира верига ДНК, идентична с матрицата, с изключение на мутиралите бази. Освен това тази нова верига ДНК ще съдържа dCTP-(aS) вместо dCTP, което служи за предпазването и от смилането и с рестрикционна ендонуклеаза.

След като матричната верига на двойноверижната хетеродуплексна молекула се скъса с подходящ рестрикционен ензим, матричната верига може да се разгради с *ExoIII*-нуклеаза или друга подходяща нуклеаза след областта, която съдържа мястото(местата), което ще се мутагенизира. След това реакцията се спира, за да остане молекула, която е само частично едноверижна. След това се формира пълен двойноверижен хетеродуплекс като се използва ДНК-полимераза в присъствието на всички четири дезоксирибонуклеотидтрифосфати, АТР и ДНК-лигаза. Тази хетеродуплексна молекула след това може да се трансформира в подходяща клетка-гостоприемник, такава като *E. coli*, както е описано по-горе.

ДНК, кодираща *trp*-лигандни мутанти, в които трябва да се замени повече от една аминокиселина, могат да се получат по един от няколко начина. Ако аминокиселините са локализирани близко една до друга в полипептидната верига, те могат да се мутират едновременно като се използва олигонуклеотид, който кодира всички желани аминокиселинни субституции. Ако обаче аминокиселините са локализирани на известно разстояние една от друга (разделени от повече от десет аминокиселини) е по-трудно да се направи единичен олигонуклеотид, който кодира всички желани изменения. Вместо това може да се приложи един от следните два алтернативни метода.

В първия метод се получава отделен олигонуклеотид за всяка аминокиселина, която ще се заменя. След това олигонуклеотидите се прилепват към едноверижната ДНК-матрица едновременно и по този начин втората верига

ДНК, която се синтезира върху матрицата, ще кодира всяка от желаните аминокиселинни субституции.

Алтернативният метод включва два или повече цикъла на мутагенеза за получаване на желания мутант. Първият цикъл е като описания за единичните мутанти: за матрица се използва див тип ДНК. Олигонуклеотид, кодиращ първата желана аминокиселинна субституция(и), се прилепва към тази матрица, след което се синтезира хетеродуплексна молекула. Вторият цикъл на мутагенеза използва мутантната ДНК, получена в първия цикъл на мутагенеза като матрица. Така тази матрица вече съдържа една или повече мутации. Олигонуклеотидът, кодиращ желаната допълнителна аминокиселинна субституция(и), след това се прилепва към тази матрица като получената верига на ДНК вече кодира мутации, както от първия, така и от втория цикъл на мутагенеза. Така получената ДНК може да се използва като матрица в трети цикъл на мутагенеза и т.н.

ПВР-мутагенезата също е подходяща за създаването на аминокиселинни варианти на *trp*-лигандния полипептид. Въпреки че следващата дискусия се отнася за ДНК, се подразбира, че техниката намира приложение също и с РНК. ПВР-техниката се отнася главно за следната процедура (виж Erlich, по-горе, главата от R. Higuchi, p. 61-70): Ако като изходен материал в ПВР се използват малки количества матрична ДНК, могат да се ползват праймери, които се различават леко по последователност от съответната област в матричната ДНК. По този начин се получават сравнително големи количества специфичен ДНК-фрагмент, който се различава от матричната последователност само в местата, в които праймерите се различават от матрицата. За въвеждането на мутация в плазмидна ДНК се предвижда единият от праймерите да припокрива мястото на мутацията и да съдържа мутацията; последователността на другия праймер трябва да бъде идентична с отрязък от последователност в срещуположната верига на плазмидата, но тази последователност може да бъде локализирана където и да е по дължината на плазмидната ДНК. Предпочита се, обаче, последователността на втория праймер да бъде локализирана в границите

на 200 нуклеотида от тази на първия, така че накрая цялата амплифицирана ДНК, ограничена от праймерите, да може лесно да се секвенира. ПВР-амплификация с използване на двойка праймери, подобни на току що описаните, води до получаването на популация от ДНК-фрагменти, които се различават в мястото на мутацията, определено от праймерите, а вероятно и в други позиции, тъй като копирането на матрицата до известна степен е съпроводено с грешки.

Ако отношението на матрицата към продукта е изключително ниско, по-голямата част от получените ДНК-фрагменти съдържа желаната мутация(и). Този материал от продукта се използва за заместване на съответната област в плазмидна, която е послужила като ПВР-матрица при използване на стандартната ДНК-технология. Мутации в отделни места могат да се въведат едновременно или като се използва втори мутантен праймер, или като се провежда втора ПВР с различни мутантни праймери и лигиране на двата получени ПВР-фрагмента едновременно с векторния фрагмент чрез лигиране в три (или повече) стъпки.

В специфичен пример за ПВР-мутагенеза плазмидната матрична ДНК (1 мкг) се линеаризира чрез смилане в рестрикционна ендонуклеаза, която разпознава уникално място в плазмидната ДНК извън областта, която ще се амплифицира. 100 нг от този материал се прибавят към ПВР-смес, съдържаща ПВР-буфер, който съдържа четирите дезоксинуклеотидтрифосфати и е включен в набора реагенти GeneAmp^R (получен от Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT and Emeryville, CA) и 25 пмол от всеки олигонуклеотиден праймер, до краен обем 50 мкл. Реакционната смес се надсложва с 35 мкл минерално масло. Реакционната смес се денатурира за пет минути на 100°C, за кратко се поставя на лед и след това под слоя минерално масло се добавя 1 мкл ДНК-полимераза (5 единици/мкл, закупена от Perkin-Elmer Cetus) от *Thermus aquaticus* (Taq). След това реакционната смес се поставя в апарат за ПВР на ДНК (закупен от Perkin Elmer Cetus), програмиран както следва:

2 мин 55°C

30 сек 72°C, след това следните 19 цикъла:

30 сек 94°C

30 сек 55°C, и

30 сек 72°C.

В края на програмата епруветката с реакцията се отстранява от ПВР-апарата и водната фаза се прехвърля в нова епруветка, екстрахира се с фенол/хлороформ (50:50 об), утаява се с етанол и ДНК се получава чрез стандартни процедури. Впоследствие този материал се подлага на съответна обработка за включване във вектор.

Друг метод за приготвяне на варианти, касетъчната (блокова) мутагенеза, се основава на техниката, описана от Wells *et al.*, *Gene*, **34**:315 [19985]. Изходният материал представлява плазмид (или друг вектор), съдържащ *trp*-лигандната ДНК, която ще се мутагенизира. Идентифицира се кодонът(ите) в *trp*-лигандната ДНК, които ще се мутагенизират. Трябва да съществува уникално място за рестрикционна нуклеаза от всяка страна на идентифицираното място за мутацията(ите). Ако такива рестриктазни места не съществуват, те могат да се създадат като за въвеждането им на съответните места в *trp*-лигандната ДНК се използва по-горе описаният метод за мутагенеза посредством олигонуклеотиди. След като рестриктазните места в плазмида са въведени, плазмидът се срязва в тези места, за да се линеаризира. Като се използват стандартни процедури се синтезира двойноверижен олигонуклеотид, кодиращ последователността между рестриктазните места, но съдържащ желаната мутация(и). Двете вериги се синтезират поотделно и след това се хибридизират заедно като се използват стандартни техники. Този двойноверижен олигонуклеотид се означава като касета. Предвидено е тази касета да има 3'- и 5'-краища, които са съвместими с краищата на линеаризирания плазмид, така че касетата да може директно да се лигира с плазмида. Този плазмид сега съдържа променената ДНК последователност на *trp*-лиганда.

*С. Включване (инсерция) на нуклеинова киселина в
реплициращ се вектор*

Нуклеиновата киселина (напр. кДНК или геномна ДНК), кодираща нативен *trp*-лиганден полипептид или негов вариант, се включва в реплициращ се вектор за по-нататъшно клониране (амплификация на ДНК) или за експресия. На разположение са много вектори и изборът на съответен вектор ще зависи от (1) дали той ще се използва за амплификация на ДНК или за експресия на ДНК, (2) големината на нуклеиновата киселина, която ще се включи във вектора и (3) клетката-гостоприемник, която ще се трансформира с вектора. Всеки вектор съдържа различни компоненти в зависимост от неговата функция (амплификация на ДНК или експресия на ДНК) и от клетката-гостоприемник, с която той е съвместим. Векторните компоненти включват главно, но не са ограничени до, един или повече от следните (компоненти): сигнална последователност, начало за репликация, един или повече маркерни гени, инхансърен елемент, промотор и последователност за терминация на транскрипцията.

(i) Компонент - сигнална последователност

Trp-лигандът на това изобретение може да се експресира не само директно, но също и като сливане с хетероложен полипептид, за предпочитане сигнална последователност или друг полипептид, имащ специфично място за скъсване в N-края на зрелия белтък или полипептид. Сигналната последователност, най-общо, може да бъде компонент на вектора или може да бъде част от *trp*-лигандната ДНК, която се включва във вектора. Избраната хетероложна последователност би трябвало да бъде такава, която се разпознава и процесира (т.е. скъсва се от сигнална пептидаза) от клетката-гостоприемник. За прокариотните клетки-гостоприемници, които не разпознават и не процесират нативната сигнална последователност на *trp*-лиганда, сигналната последователност се замества с прокариотна сигнална последователност, селектирана например от групата лидери на алкалната фосфатаза, преницилаза, *Irr* или термостабилния ентеротоксин II. За секреция от дрожди нативната сигнална последователност може да се замести от напр., лидерите на дрождената инвертаза, алфа фактор или кисела фосфатаза, лидера на глкоамилазата от *C. albicans* (Европейски патент 362 179, публикуван на 4

април 1990) или от сигнала, описан във WO 90/13646, публикуван на 15 ноември 1990. Нативната сигнална последователност (т.е., *mpl*-лигандната препоследователност, която по правило направлява секрецията на *mpl*-лиганда от неговите нативни бозайнишки клетки *in vivo*), е задоволителна за експресия в клетки от бозайници. За целта обаче могат да бъдат подходящи и други бозайнишки сигнални последователности, такива като сигналните последователности от други *mpl*-лигандни полипептиди или от същия *mpl*-лиганд, но от друг животински вид, сигнални последователности от *mpl*-лиганд и сигнални последователности на белтъци, които се секретират от същия или родствен вид, както и вирусни секреторни лидери, например сигнала на *Herpes simplex gD*.

(ii) Компонент - начало за репликация

Както експресионните, така и клониращите вектори съдържат последователност от нуклеинова киселина, която прави възможна репликацията на вектора в една или повече избрани гостоприемни клетки. В клониращите вектори тази последователност е предимно такава, която позволява на вектора да се реплицира независимо от хромозомната ДНК на гостоприемника и включва начала на репликация или автономно реплициращи се последователности. Подобни последователности са добре известни за различни бактерии, дрожди и вируси. За повечето Грам-отрицателни бактерии е подходящо началото за репликация от плазмида pBR322, началото на 2μ-плазмид е подходящо за дрожди, а за клониращите вектори в бозайнишки клетки са приложими различни вирусни начала (SV40, полиома, аденовирус, VSV или BPV). Като цяло компонентът начало за репликация не е необходим за бозайнишките експресионни вектори (SV40-началото обикновено се използва само поради това, че съдържа ранния промотор).

Повечето експресионни вектори са "совалки", т.е. могат да се реплицират в най-малко един клас микроорганизми, но могат да се трансфектират в друг организъм за експресия. Например, даден вектор се клонира в *E. coli* и след това същият вектор се трансфектира в дрожди или клетки

на бозайници за експресия, макар че той не е способен да се реплицира независимо от хромозомата на клетката-гостоприемник.

ДНК може също така да се амплицира и като се включи в генома на гостоприемника. Това се извършва лесно, използвайки като гостоприемник вид *Bacillus* чрез включване във вектора на ДНК-последователност, която е комплементарна на последователност, намерена в геномната ДНК на *Bacillus*. Трансфекцията на *Bacillus* с този вектор води до хомоложна рекомбинация с генома и инсерция на *trp*-лигандната ДНК. Изолирането на геномната ДНК, която кодира *trp*-лиганда, обаче, е по-сложно, отколкото това на екзогенно реплициращ се вектор, тъй като за изрязване на *trp*-лигандната ДНК се изисква разграждане с рестрикционни ензими.

(iii) Компонент - ген за селекция

Експресионните и клониращи вектори би трябвало да съдържат ген за селекция, наречен още маркер за селекция. Този ген кодира белтък, необходим за преживяването и растежа на трансформирани клетки-гостоприемници в селективна хранителна среда. Гостоприемни клетки, нетрансформирани с вектора няма да преживяват в хранителната среда. Типичните гени за селекция кодират белтъци, които (а) придават устойчивост спрямо антибиотици или други токсини, напр. ампицилин, неомицин, метотрексат или тетрациклин, (б) допълват автотрофни дефицити или (с) доставят критични хранителни съставки, които не могат да се получат от комплексните хранителни среди, напр., генът, кодиращ D-аланин рацемаза за *Bacillus*.

Един пример за схема на селекция използва медикамент за преустановяване растежа на гостоприемната клетка. Тези клетки, които са трансформирани успешно с хетероложен ген, експресират белтък, който им придава устойчивост спрямо медикамента и по този начин те преживяват режима на селекция. Примери за такава доминантна селекция са лекарствата неомицин (Southern *et al.*, *J. Molec. Appl. Genet.*, 1:327 [1982], микофенолна киселина (Mulligan *et al.*, *Science*, 209:1422 [1980] или хигромицин (Sugden *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:410-413 [1985]. В трите примера, дадени по-горе, се използват

бактериални гени под еукариотен контрол за придаване на устойчивост спрямо съответното лекарство G418 или неомицин (генетицин), *hprt* (микофенолна киселина) или хигромицин, респективно.

Примери на други подходящи маркери за селекция в клетки на бозайници са тези, които позволяват идентификацията на клетки, компетентни да поемат *mtl*-лигандната нуклеинова киселина. Такива маркери са дихидрофолатредуктазата (DHFR) или тимидинкиназата. Трансформирани клетки от бозайници се поставят под селективен натиск, така че само трансформантите са единствено приспособени да преживеят, благодарение на това, че са поели маркера. Селективният натиск се осъществява чрез култивиране на трансформантите при условия, в които концентрацията на селективният агент в средата постепенно се променя, което води до амплификация, както на гена за селекция, така и на ДНК, кодираща *mtl*-лигандния полипептид. Амплификацията е процесът, при който гените, които в по-голяма степен са необходими за производството на белтък, критичен за растежа, се повтарят тандемно в хромозомите на последователни поколения от рекомбинантните клетки. От амплифицираната ДНК се синтезират повишени количества *mtl*-лиганд.

Например клетки, трансформирани с гена за селекция DHFR, най-напред се идентифицират чрез култивиране на всички трансформанти в хранителна среда, която съдържа метотрексат (Mtx), конкурентен антагонист на DHFR. Когато се използва дивият тип DHFR, подходящ гостоприемник представлява клетъчната линия от яйчни клетки на Китайски хамстер (CHO), дефицитна за DHFR-активност, получена и размножавана, както е описано от Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:4216 [1980]. След това трансформирани клетки се поставят в условия на покачващи се нива от Mtx. Това води до синтезата на множество копия на DHFR-гена и заедно с това на множество копия от друга ДНК, включваща експресионните вектори, такава като ДНК, кодираща *mtl*-лиганда. Тази техника на амплификация може да се използва с всеки друг подходящ гостоприемник, напр., ATCC No. CCL61 CHO-K1,

независимо от наличието на ендегенен DHFR ако, например, се използва мутантен DHFR-ген, който е високоустойчив спрямо Mtx (Европейски патент 117 060). Като алтернатива гостоприемните клетки [особено див тип гостоприемници, които съдържат ендегенен DHFR], трансформирани или котрансформирани с ДНК-последователности, кодиращи *trp*-лиганд, DHFR-белтък див тип и друг маркер за селекция, такъв като аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH) могат да се селектират чрез култивиране в среда, съдържаща селективен агент за маркера на селекция, такъв като аминокликозиден антибиотик, напр., канамицин, неомицин или G 418. Виж патент на САЩ No. 4 965 199.

Подходящ за използване в дрожди е *trp1*-генът за селекция, присъстващ в дрожения плазмид YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, **282**:39 [1979]; Kingsman *et al.*, *Gene*, **7**:141 [1979]; или Tschemper *et al.*, *Gene*, **10**:157 [1980]. *Trp1*-генът предоставя маркер за селекция на мутантен щам дрожди, който е лишен от способността да расте в триптофан, например, ATCC No. 44076 или PER4-1 (Jones, *Genetics*, **85**:12 [1977]). Наличието на *trp1*-увреждане в генома на дрожедената клетка-гостоприемник осигурява ефективна среда за детекция на трансформацията чрез култивиране в отсъствието на триптофан. По подобен начин дрожедените щамове, дефицитни за *Leu2* (ATCC No. 20 622 или 38 626) се допълват от известни плазмиди, носещи *Leu2*-гена.

(iv) Компонент - промотор

Експресионните и клониращи вектори обикновено съдържат промотор, който се разпознава от организма-гостоприемник и е оперативно свързан с *trp*-лигандната нуклеинова киселина. Промоторите са нетранслиращи се последователности, локализирани пред (5') началния кодон на структурен ген (главно в рамките на около 100 до 1000 нд), които контролират транскрипцията и транслацията на определена последователност от нуклеинова киселина, такава като *trp*-лигандната нуклеинова киселина, с която те са свързани оперативно. Такива промотори обикновено попадат в два класа, индуцируеми и

конститутивни. Индуцируемите промотори са промотори, които инициират покачващи се нива на транскрипция от ДНК под техния контрол в отговор на някаква промяна в условията на култивиране, напр., наличието или отсъствието на хранителна съставка или промяна в температурата. Понастоящем са добре познати голям брой промотори, които се разпознават от различни потенциални клетки-гостоприемници. Тези промотори се свързват оперативно с ДНК, кодираща *trp*-лиганд чрез отстраняване на промотора от източника на ДНК чрез смилане с рестрикционни ензими и включване на изолираната промоторна последователност във вектора. За направляване амплификацията и/или експресията на *trp*-лигандната ДНК могат да се използват, както промоторна последователност на нативен *trp*-лиганд, така и много хетероложни промотори. Хетероложните промотори, обаче, се предпочитат, понеже като цяло те позволяват по-силна транскрипция и по-високи добиви експресиран *trp*-лиганд в сравнение с промотора на нативния *trp*-лиганд.

Подходящите промотори за използване на прокариотни гостоприемници включват промоторните системи на Я-лактамазата и лактозата (Chang *et al.*, *Nature*, **275**:615 [1978]; и Goeddel *et al.*, *Nature*, **281**:544 [1979]), промоторните системи на алкалната фосфатаза и триптофана (*trp*) (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, **8**:4057 [1980] и Европейски патент 36 776) и хибридни промотори, такива като *tac*-промотора (deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**:21-25 [1983]). Подходящи са обаче и други известни бактериални промотори. Техните нуклеотидни последователности са публикувани, което позволява на опитния специалист да ги свърже оперативно с ДНК, кодираща *trp*-лиганд (Siebenlist *et al.*, *Cell*, **20**:269 [1981]), като използва линкери или адаптори за обезпечаване на всяко необходимо рестриктазно място. Промоторите, които се използват в бактериални системи, ще съдържат последователност на Shine-Dalgarno (S.D.), оперативно свързана с ДНК, кодираща *trp*-лигандния полипептид.

Промоторни последователности са известни за еукариотите. Фактически всички еукариотни гени имат АТ-богата област, локализирана

приблизително 25 до 30 бази пред мястото, където се иницира транскрипцията. Друга последователност, намерена 70 до 80 бази пред началото на транскрипцията на много гени е областта СХСААТ, където Х може да бъде всеки нуклеотид. В 3'-края на повечето еукариотни гени има последователност ААТААА, която може би представлява сигнал за прибавяне на поли А-опашка към 3'-края на кодиращата последователност. Всички тези последователности се включват по подходящ начин в еукариотни експресионни вектори.

Примерите за подходящи промоторни последователности, които се използват в дрождени гостоприемници, включват промоторите за 3-фосфоглицераткиназата (Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **255**:2073 [1980] или за други гликолитични ензими (Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, **7**:149 [1968]; и Holland, *Biochemistry*, **17**:4900 [1978]), такива като енолаза, глицералдехид-3-фосфатдехидрогеназа, хексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюकोкиназа.

Други дрождени последователности, които представляват индуцируеми промотори, имащи допълнителното предимство на контролирана от растежните условия транскрипция, са промоторните области на алкохолдехидрогеназа 2, изоцитохром С, кисела фосфатаза, хидролитични ензими, свързани с азотната обмяна, металотионеин, глицералдехид-3-фосфатдехидрогеназа и ензими, отговорни за усвояването на малтоза и галактоза. Подходящи вектори и промотори за експресия в дрожди са описани още от Hitzeman *et al.*, Европейски патент 73_657А. Препимущества носи също и използването на дрождени инхансъри с дрождените промотори.

Транскрипцията на *mpI*-лиганда от вектори в гостоприемни клетки на бозайници се контролира, например, от промотори, получени от геномите на вируси, такива като полиома вирус, вируса по пипките (Патент на Великобритания 2 211 504, публикуван на 5 юли 1989), аденовирус (такъв като Аденовирус 2), говежди папилома вирус, вирус на птичата саркома,

цитомегаловирус, ретровирус, вирус на хепатит В, като най-много се предпочита маймунският вирус 40 (SV40), от хетероложни промотори на бозайници, напр., актиновия промотор или имуноглобулинов промотор, от промотори на гените за топлинношокови белтъци и от промотор, нормално свързан с *trp*-лигандната последователност, при условие че тези промотори са съвместими със системата на гостоприемната клетка.

Ранният и късният промотор на вируса SV40 се получават удобно като SV40-рестрикционен фрагмент, който съдържа също и SV40-вирусното начало за репликация. Fiers *et al.*, *Nature*, **273**:113 [1978]; Mulligan and Berg, *Science*, **209**:1422-1427 [1980]; Pavlakis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**:7398-7402 [1981]. Непосредствено ранният промотор на човешкия цитомегаловирус се получава удобно като *Hind*III-рестрикционен фрагмент. Greenaway *et al.*, *Gene*, **18**:355-360 [1982]. Система за експресия на ДНК в гостоприемник бозайник чрез изглазване на говеждия папилома вирус като вектор, е публикувана в патент на САЩ No. 4 419 446. Модификация на тази система е описана в патент на САЩ No. 4 601 978. Виж също Gray *et al.*, *Nature*, **295**:503-508 [1982] за експресията на кДНК, кодираща имунен интерферон в маймунски клетки; Reyes *et al.*, *Nature*, **297**:598-601 [1982] за експресията на кДНК за човешки β -интерферон в миши клетки под контрола на тимидинкиназен промотор от вируса *Herpes simplex*; Canaan and Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**:5166-5170 [1982] за експресията на гена за човешки интерферон β 1 в култивирани миши и заешки клетки; и Gorman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**:5777-6781 [1982] за експресията на бактериални CAT-последователности в маймунски бъбречни CV-1-клетки, пилешки ембрионални фибробласти, яйчни клетки от Китайски хамстер, HeLa-клетки и миши NIH-3T3-клетки, използвайки като промотор дългия терминален повтор на Раус саркома вируса.

(v) Компонент - инхансърен елемент

Транскрипцията на ДНК, кодираща *trp*-лиганда на това изобретение във висши еукариоти често се усилва чрез включването на инхансърна последователност във вектора. Инхансърите са цис-действащи елементи от

ДНК, обикновено от около 10 до 300 нд, които действуват върху промотора за усилване на неговата транскрипция. Инхансърите са с независима относителна ориентация и място, намерени са 5' (Laimins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**:993 [1981]) и 3' (Lusky *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, **3**:1108 [1983] по отношение на транскрипционната единица, вътре в интрон (Banerji *et al.*, *Cell*, **33**:729 [1983]), както и вътре в самата кодираща последователност (Osborne *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, **4**:1293 [1984]). Сега са известни много инхансърни последователности от гени на бозайници (глобин, еластаза, албумин, α -фетопротеин и инсулин). Обикновено, обаче, се използва инхансър от еукариотен клетъчен вирус. Примерите включват инхансъра на SV40 откъм късната страна на началото за репликация (нд 100-270), инхансъра на цитомегаловирусния ранен промотор, инхансъра на папиломата откъм късната страна на началото за репликация и аденовирусни инхансъри. Виж също Yaniv, *Nature*, **297**:17-18 [1982] за усилващи (инхансърни) елементи за активиране на еукариотни промотори. Инхансърът може да бъде разположен във вектора в позиция 5' или 3' по отношение на *trp*-лигандната кодираща последователност, но преимуществено е локализиран в място по посока 5' спрямо промотора.

(vi) Компонент за терминация на транскрипцията

Експресионните вектори, използвани в еукариотни клетки-гостоприемници (дрожди, гъби, насекоми, растения, животни, хора или ядрени клетки от други многоклетъчни организми) ще съдържат също и последователности, необходими за спирането (терминацията) на транскрипцията и за стабилизиране на мРНК. Такива последователности са общодостъпни от 5'-и понякога 3'-нетранслиращите се области на еукариотни или вирусни ДНКи или РНКи. Тези области съдържат нуклеотидни сегменти, транскрибирани като полиаденилирани фрагменти в нетранслиращата се част от мРНК, кодираща *trp*-лиганда.

(vii) Конструирание и анализ на вектори

За конструирането на подходящи вектори, съдържащи един или повече от гореизброените компоненти, се използват стандартни техники на лигиране.

Изолираните плазмиди или ДНК-фрагменти се срязват, сшиват и религираат в желаната форма за получаване на изисквания плазмид.

За анализи с цел потвърждаване на коректните последователности в конструирания плазмиди, лигазните смеси се използват за трансформация на щам *E. coli* K12 294 (ATCC No. 31 446) и сполучливите трансформанти се селектират по съответната ампицилинова или тетрациклинова устойчивост. Получават се плазмиди от трансформантите, анализират се чрез смилане с рестрикционни ендонуклеази и/или се секвенират по метода на Messin *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 9:309 [1981] или по метода на Maxam *et al.*, *Methods in Enzymology*, 65:499 [1980].

(viii) Експресионни вектори за транзитна експресия

Особено полезни за практическото приложение на това изобретение са експресионни вектори, които дават възможност за транзитна експресия на ДНК, кодираща *trp*-лигандния полипептид в клетки от бозайници. Транзитната експресия най-общо включва използването на експресионен вектор, който е в състояние да се реплицира ефективно в клетка-гостоприемник, така че гостоприемната клетка да натрупа много копия от експресионния вектор и на практика да синтезира големи количества от желания полипептид, който се кодира от експресионния вектор. Sambrook *et al.*, по-горе, pp. 16.17 - 16.22. Системите за транзитна експресия, които включват подходящ експресионен вектор и клетка-гостоприемник, позволяват удобна позитивна идентификация на полипептиди, кодирани от клонираната ДНК, както и бързото скриниране на такива полипептиди за желаните биологични или физиологични свойства. Ето защо системите за транзитна експресия са особено полезни в изобретението за целите на идентификация на аналози и варианти на *trp*-лигандния полипептид, които имат биологична активност на *trp*-лиганден полипептид.

(ix) Подходящи примерни вектори за клетки на гръбначни

Други методи, вектори и клетки-гостоприемници, подходящи за адаптиране синтеза на *trp*-лиганд в рекомбинантна култура от клетки на гръбначни, са описани в Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-625 [1981]; Mantei *et al.*,

Nature, 281:40-46 [1979]; Levinson *et al.*; Европейски патент 117 060; и Европейски патент 117 058. Особено полезен плазмид за експресия на *mpL*-лиганд в култура от клетки на бозайници е pRK5 (Европейски патент 307 247, патент на САЩ No. 5 258 287) или pSV16B (PCT с публикационен No. WO 91/08291).

D. Селекция и трансформация на клетки-гостоприемници

Подходящи клетки-гостоприемници за клониране или експресия на включените тук вектори са прокариотните, дрождени или висши еукариотни клетки, описани по-горе. Подходящите прокариоти включват еубактерии, такива като Грам-положителни или Грам-отрицателни организми, например, *E. coli*, *Bacilli*, такива като *B. subtilis*, видове *Pseudomonas*, такива като *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* или *Serratia marcescans*. Един предпочетен *E. coli*-гостоприемник за клониране е *E. coli* 294 (ATCC No. 31 446), макар че са подходящи и други щамове, такива като *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC No. 31 537) и *E. coli* W3110 (ATCC No. 27 325). Тези примери са по-скоро илюстративни, отколкото ограничаващи. За предпочитане е клетката-гостоприемник да секретира минимални количества протеолитични ензими. Като алтернатива са подходящи методи за *in vitro* клониране, напр., ПВР или полимеразни реакции с нуклеинови киселини.

В допълнение към прокариотите подходящи гостоприемници за вектори, кодиращи *mpL*-лиганда, са еукариотни микроби, такива като филаментозни гъби или дрожди. *Saccharomyces cerevisiae* или най-общо хлебопекарните дрожди са най-широко използваните микроорганизми-гостоприемници измежду нисшите еукариоти. Редица други родове, видове и щамове, обаче, са общодостъпни и полезни в случая, такива като *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290:140 [1981]; Европейски патент 139 383, публикуван на 2 май 1985), гостоприемници *Kluyveromyces* (патент на САЩ No. 4 943 592), такива като напр., *K. lactis* (Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.*, 737 [1983]), *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. thermotolerans* и *K. marxianus*, *Yarrowia* [Европейски патент 402 226], *Pichia pastoris* (Европейски патент 183 070; Sreekrishna *et al.*, *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988], *Candida*, *Trichoderma reesia*

(Европейски патент 244 234), *Neurospora crassa* (Case *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**:5259-5263 [1979]) и филаментозни гъби, такива като напр., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357, публикувано на 10 януари 1991) и гостоприемници *Aspergillus*, такива като *A. nidulans* (Ballance *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**:284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, *Gene*, **26**:205-221 [1983]; Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:1470-1474 [1984]) и *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, **4**:475-479 [1985]).

Подходящите клетки-гостоприемници за експресия на гликозилиран *mpL*-лиганд се получават от многоклетъчни организми. Такива гостоприемни клетки притежават комплекс от процесиращи и гликозилиращи активности. По принцип всяка клетъчна култура от висш еукариот е работеща, независимо дали е култура от клетки на гръбначни или безгръбначни. Примерите за клетки на безгръбначни включват растителни клетки и клетки на насекоми. Идентифицирани са редица бакуловирусни щамове, техни варианти и съответните им пермисивни гостоприемни клетки от насекоми, такива като *Spodoptera frugiperda* (гъсеница), *Aedes aegypti* (комар), *Ades albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодова мушица) и *Bombyx mori*. Виж напр., Luckow *et al.*, *Bio/Technology*, **6**:47-55 [1988]; Miller *et al.*, *Genetic Engineering*, Setlow *et al.*, eds., Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), pp. 277-279; и Maeda *et al.*, *Nature*, **315**:592-594 [1985]. Публично достъпно е разнообразие от вирусни щамове за трансфекция, напр., L-1-варианта на *Autographa californica* NPV и щама Bm-5 на *Bombyx mori* NPV като такива вируси могат да се използват подобно вирусът, съгласно настоящото изобретение, в частност за трансфекция на клетки на *Spodoptera frugiperda*.

Като гостоприемници могат да се използват растителни клетъчни култури от памук, царевица, картоф, соя, петуния, домати и тютюн. Растителни клетки обикновено се трансформират чрез инкубиране с определени щамове на бактерията *Agrobacterium tumefaciens*, която предварително е манипулирана така, че да съдържа *mpL*-лигандната ДНК. По време на инкубацията на растителната клетъчна култура с *A. tumefaciens*, ДНК, кодираща *mpL*-лиганда, се

пренася в гостоприемната растителна клетка, така че тя се трансфектира и при съответни условия ще експресира *mtl*-лигандната ДНК. Освен това са на разположение регулаторни и сигнални последователности, съвместими с растителните клетки, такива като нопалинсинтазния промотор и сигнални последователности за полиаденилиране. Depicke *et al.*, *J. Mol. Appl. Gen.*, 1:561 [1982]. И още, ДНК-сегменти, изолирани от областта пред 780-гена на Т-ДНК са способни да активират или усилват нивата на транскрипция на експресирани от растенията гени в растителни тъкани, съдържащи рекомбинантна ДНК. Европейски патент 321 196, публикуван на 21 юни 1989.

Най-голям е, обаче, интересът към клетките на гръбначни и като размножаването на гръбначни клетки в култура (тъканна култура) стана рутинна процедура през последните години (Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editors [1973]). Примери за полезни гостоприемни клетъчни линии от бозайници са: маймунска бъбречна CV1-линия, трансформирана с SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); човешка ембрионална бъбречна линия (293 или 293-клетки, субклонирани за растеж в суспензионна култура, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36:59 [1977]); бъбречни клетки от новородени хамстери (BHK, ATCC CCL 10); яйчни клетки на Китайски хамстер/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 [1980]); миши сертолиевы клетки (TM4, Mather, *Bio. Reprod.*, 23:243-251 [1980]); маймунски бъбречни клетки (CV1 ATCC CCL 70); бъбречни клетки от африканска зелена маймуна (VERO-76, ATCC CRL-1587); човешки клетки от цервикален карцином (HELA, ATCC CCL 2); кучешки бъбречни клетки (MDCK, ATCC CCL 34); чернодробни клетки от плъх (buffalo rat), (BRL 3A, ATCC CRL 1442); човешки белодробни клетки (W138, ATCC CCL 75), човешки чернодробни клетки (Hep G2, HB 8065); миши тумор на млечната жлеза (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI-клетки (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 [1982]); MRC 5-клетки; FS4-клетки; и човешки хепатомни клетки (Hep G2).

Клетките-гостоприемници се трансфектират и за предпочитане се трансформират с по-горе описаните експресионни или клониращи вектори на това изобретение, модифицирани по съответен начин за включване на

промотори, селекция на трансформанти или амплифициране на гени, кодиращи желаните последователности. Клетките се култивират в конвенционални хранителни среди.

Трансфекцията се отнася за поемането на експресионен вектор от клетка-гостоприемник, независимо от това дали всяка кодираща последователност се експресира в действителност. На квалифицираните специалисти са известни редица методи за трансфекция, например, CaPO_4 -метод и електропорация. Сполучливата трансфекция се разпознава главно по появата на някоя индикация за функционирането на този вектор в клетката-гостоприемник.

Трансформацията означава въвеждане на ДНК в организъм, така че ДНК да се реплицира или като екстрахромозомен елемент или като интегрирана в хромозомата. В зависимост от клетката-гостоприемник, която се използва, трансформацията се извършва, като се използват стандартни техники, подходящи за такива клетки. Калциевото третиране, ползващо калциев хлорид, както е описано в раздел 1.82 на Sambrook *et al.*, по-горе, се използва предимно за прокариоти или други клетки, които притежават значителни клетъчностенни бариери. За трансформацията на определени растителни клетки се използва инфекция с *Agrobacterium tumefaciens*, както е описано от Shaw *et al.*, *Gene*, **23:315** [1983] и WO 89/05859, публикувано на 29 юни 1989. Освен това растенията могат да се трансфектират, като се използва ултразвуково третиране, както е описано в WO 91/00358, публикувано на 10 януари 1991. За клетките от бозайници, които не притежават такива клетъчни стени, се предпочита методът за преципитация с калциев фосфат на Graham and van der EB, *Virology*, **52:456-457** [1978]. Основните аспекти на трансформациите на системите от бозайнишки клетки-гостоприемници са описани от Axel в патент на САЩ No. 4 399 216, издаден на 16 август 1983. Трансформациите в дрожди обикновено се извършват съгласно метода на Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, **130:946** [1977] и Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **76:3892** [1979]. Могат, обаче, да се използват и други

методи за въвеждане на ДНК в клетки, такива като инжектиране в ядрото, електропорация или сливане на протопласти.

Е. Култивиране на клетките-гостоприемници

Прокариотните клетки, използвани за продукция на *trp*-лигандния полипептид на това изобретение, се култивират в подходящи среди, предимно както е описано в Sambrook *et al.*, по-горе.

Гостоприемните клетки от бозайници, използвани за продукция на *trp*-лиганда на това изобретение, могат да се култивират в разнообразни среди. За култивиране на гостоприемните клетки са подходящи търговски достъпни среди, такива като Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и Dulbecco's Modified Eagle's Medium ([DMEM], Sigma). Като културална среда за клетките-гостоприемници освен това може да се използва и всяка от средите, описани в Ham and Wallace, *Meth. Enz.*, **58**:44 [1979], Barnes and Sato, *Anal. Biochem.*, **102**:255 [1980], патенти на САЩ Nos. 4 767 704; 4 657 866; 4 927 762; или 4 560 655; WO 90/03430; WO 87/00195; патент на САЩ Re. 30 985; или висящите U.S.S.N. 07/592 107 или 07/592 141, и двете подадени на 3 октомври 1990, като данните от всички тях са включени тук чрез литературните цитати. Всяка от тези среди може да бъде допълнена, когато е необходимо, с хормони и/или други фактори (такива като инсулин, трансферин или епидермален растежен фактор), соли (такива като натриев хлорид, калций, магнезий и фосфат), буфери (такива като HEPES), нуклеозиди (такива като аденозин и тимидин), антибиотици (такива като лекарството GentamycinTM), елементи в минимални (следови) количества (дефинирани като неорганични съединения, присъстващи обикновено в крайни концентрации от микромоларния обхват) и глюкоза или еквивалентен енергиен източник. Могат да бъдат включени също и всякакви други необходими добавки в съответните концентрации, които би трябвало да са известни на квалифицираните в тази област. Условиата на култивиране, такива като температура, pH, и подобни на тях, са тези, използвани предварително с клетката-гостоприемник, избрана за експресия и ще са очевидни за рутинно квалифицирания специалист.

Клетките-гостоприемници, за които става въпрос в тази публикация, обхващат клетки в *in vitro* култура, както и клетки в животното-гостоприемник.

Г. Определяне на генната амплификация/експресия

Генната амплификация и/или експресия в дадена проба могат да се измерят директно, например, чрез конвенционален пренос на ДНК върху нитроцелулозна или найлонова мембрана (Southern-блотинг), пренос на РНК (northern-блотинг) за околичествяване транскрипцията на мРНК (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 [1980]), дот-блотинг (анализ на ДНК) или *in situ* хибридизация чрез съответно белязана сонда на основата на представените тук последователности. Могат да се използват различни белези, най-често радиоизотопи, в частност ^{32}P . Могат, обаче, да се приложат също и други техники, такива като използването на биотин-модифицирани нуклеотиди за включване в полинуклеотид. Биотинът след това служи като място за свързване с авидин или антитела, които могат да бъдат белязани с широко разнообразие от белези, такива като радионуклиди, флуоресцентни багрила, ензими и подобни на тях. Като алтернатива могат да се използват антитела, които могат да разпознават специфични дуплекси, включващи ДНК-дуплекси, РНК-дуплекси, ДНК-РНК хибридни дуплекси или ДНК-белтъчни дуплекси. Антителата на свой ред могат да бъдат белязани, като може да се извърши тест, при който дуплексът се свързва с повърхност, така че след формирането на дуплекса върху повърхността може да се детектира наличието на антитяло, свързано с дуплекса.

Генната експресия, алтернативно, може да се измери чрез имунологични методи, такива като имунохистохимично оцветяване на тъканни срези и тестиране на клетъчна култура или телесни течности за директно измерване експресията на генния продукт. При техниката на имунохистохимично оцветяване се приготвя клетъчна проба, обикновено чрез дехидратиране и фиксиране, следвани от реакция с белязани антитела, специфични за свързания генен продукт, такива като ензимни белези, флуоресцентни белези, луминесцентни белези и подобни на тях, при което белезите обикновено се детектират визуално. Особено чувствителна оцветяваща техника, подходяща за

използуване в насотящото изобретение, е описана от Hsu *et al.*, *Am. J. Clin. Path.*, **75**:734-738 [1980].

Антителата, използващи се за хистохимично оцветяване и/или тестиране на пробни течности, могат да бъдат моноклонални или поликлонални и могат да се приготвят във всеки бозайник. Антителата за удобство могат да се приготвят срещу нативен *mpr*-лиганден полипептид или срещу синтетичен пептид, основаващ се на представените тук ДНК-последователности, както е описано по-долу.

G. Пречистване на mpr-лиганден полипептид

Предпочита се *mpr*-лигандът да се изолира от културална среда като секретирани полипептид, въпреки че той може да се получи също и от лизати на гостоприемните клетки, в случай че се експресира директно без секреторен сигнал.

Когато *mpr*-лигандът се експресира в рекомбинантна клетка, с произход, различен от човешкия, *mpr*-лигандът е напълно свободен от белтъци или полипептиди с човешки произход. Обикновено, обаче, си остава необходимо *mpr*-лигандът да се пречисти от останалите белтъци или полипептиди на рекомбинантната клетка, за да се получат препарати, които са значително хомогенни по отношение на самия *mpr*-лиганд. Като първа стъпка културалната среда или лизат се центрофугират за отстраняване на частиците от клетъчните отломки. След това мембранната и разтворимата белтъчни фракции се разделят. Като алтернатива може да се използва търговски достъпен филтър за концентриране на белтъци (напр., единици за ултрафилтрация на Amicon или Millipore Pellicon). След това *mpr*-лигандът може да се пречисти от разтворимата белтъчна фракция и от мембранната фракция на клетъчния лизат в зависимост от това дали *mpr*-лигандът е мембранно свързан. *Mpr*-лигандът след това се пречиства от онечистващите разтворими белтъци или полипептиди чрез изсолване и диализа или чрез хроматографски процедури като се използват различни гелни матрикси. Тези матрикси включват: акриламид, агароза, декстран, целулоза и други общоизвестни за белтъчно пречистване. Примерните

хроматографски процедури, подходящи за белтъчно пречистване, включват: имуноафинитетна (напр. анти-*mPr*-лиганд Mab), рецепторноафинитетна (напр., *mPr*-IgG или протеин A-Sepharose), хроматография на хидрофобните взаимодействия (HIC) (напр., етер, бутил или Toyopearl), лектинова хроматография (напр., Con A-Sepharose, lentil-lectin-Sepharose), гел-филтрация (напр. Sephadex G-75 (колони за кати- и анионообмен (напр., DEAE или карбоксиметил- и сулфопропил-целулоза), обратнофазова високоефективна течна хроматография (RP-HPLC) (виж напр., Urdal *et al.*, *J. Chromatog.*, **296**:171 [1984], където се използват две последователни RP-HPLC-стъпки за пречистване на рекомбинантен човешки IL-2). Други стъпки на пречистване могат да включват: утаяване с етанол; утаяване с амониев сулфат; хроматофокусиране; препаративна SDS-PAGE и др.

mPr-лигандните варианти, в които са делетирани, включени или заместени отатъци, се получават по същия начин както нативния *mPr*-лиганд, като се държи сметка за всички съществени изменения в свойствата, настъпили в резултат на вариацията. Например сливането на *mPr*-лиганда с друг белтък или полипептид, напр., бактериален или вирусен антиген, улеснява пречистването; може да се използва имуноафинитетна колона, съдържаща антитяло срещу антигена за адсорбиране на слятия полипептид. Имуноафинитетни колони, такива като заешки поликлонален анти-*mPr*-лиганд могат да се използват за адсорбиране на *mPr*-лиганден вариант чрез свързването му с най-малко един останал имунен епитоп. Като алтернатива *mPr*-лигандът може да се пречисти чрез афинитетна хроматография, използвайки пречистен *mPr*-IgG, свързан с (за предпочитане) имобилизирана смола, такава като Affi-Gel 10 (Bio-Rad, Richmond, CA) или подобна, чрез добре известни способности. Може да бъде от полза също така и протеазен инхибитор, такъв като фенилметилсулфонилфлуорид (PMSF) за инхибиране на протеолитичното разграждане по време на пречистването или могат да се включат антибиотици за предотвратяване развитието на случайни замърсители. Квалифицираният в тази област ще прецени, че методите за пречистване, подходящи за нативния *mPr*-лиганд, могат да изискват

модификация, за да се отчетат измененията в характера на *trp*-лиганда или на неговите варианти след експресията в рекомбинантна клетъчна култура.

Н. Ковалентни модификации на trp-лигандния полипептид

Ковалентни модификации на *trp*-лигандните полипептиди са включени в обхвата на това изобретение. Ковалентно могат да бъдат модифицирани, както нативния *trp*-лиганд, така и аминокиселинните варианти на *trp*-лиганда. Един тип ковалентна модификация, включена в обхвата на това изобретение, представлява *trp*-лиганден фрагмент. Различни аминокиселинни фрагменти, имащи до около 40 аминокиселинни остатъци, могат удобно да се получат чрез химична синтеза или чрез ензимно или химично разграждане на пълноразмерния *trp*-лиганден полипептид или на негов вариант. Други типове ковалентни модификации на *trp*-лиганда или на фрагменти от него се въвеждат в молекулата чрез реакция на прицелния аминокиселинен остатък на *trp*-лиганда или на неговите фрагменти с органичен дериватизиращ агент, който е способен да взаимодействува с определени странични вериги или с N- или C-крайните остатъци.

Цистеиновите остатъци най-често се третират с α -халоацетати (и съответните амини), такива като хлороцетна киселина или хлорацетамид, за получаване на карбоксиметилови или карбоксиаминодиметилови производни. Цистеиновите остатъци се дериватизират също и чрез въздействие с бромтрифлуорацетон, α -бром- β -(5-имидозолил)пропионова киселина, хлорацетилфосфат, N-алкилмалеимида, 3-нитро-2-пиридилдисулфид, метилов 2-пиридилдисулфид, p-хлормеркурибензоат, 2-хлормеркури-4-нитрофенол или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-дiazол.

Хистидиновите остатъци се дериватизират чрез реакция с диетилпирокарбонат при pH 5,5-7,0, тъй като този агент е относително специфичен за хистидиновата странична верига. Прилага се също и парабромфенацилбромид; предпочита се реакцията да се провежда в 0,1 M натриев кокодилат при pH 6,0.

Лизиновите и аминотерминалните остатъци се третират с янтърен или други анхидриди на карбоновите киселини. Дериватизацията с тези агенти има

ефекта на обръщане заряда на лизиновите остатъци. Други подходящи реагенти за дериватизация на аminosъдържащи остатъци включват имидоестери, такива като метилов пиколонимидат; пиридоксалфосфат; пиридоксал; хлорборхидрид; тринитробензенсулфонова киселина; O-метилизурея; 2,4-пентандион; и трансминаза-катализирана реакция с глиоксилат.

Аргининовите остатъци се модифицират чрез реакция с един или няколко конвенционални реагенти, между тях фенилглиоксал, 2,3-бутандион, 1,2-циклохександион и нинхидрин. Дериватизацията на аргининовите остатъци изисква, реакцията да се провежда при алкални условия поради високата pK_a на гуанидиновите функционални групи.

Специфичната модификация на тирозиновите остатъци се прави при особен интерес от въвеждане на спектрални белези в тирозиновите остатъци чрез реакция с ароматни диазониеви съединения или с тетранитрометан. Най-често се използват N-ацетилимидизол и тетранитрометан за образуване респективно на O-ацетилови тирозинови видове и 3-нитро производни. Тирозиновите остатъци се йодират като се използват ^{125}I или ^{131}I за получаване на белязани белтъци, които се използват в радиоимунологичен тест, като описаният по-горе хлорамин Т-метод е подходящ за целта.

Карбонилните странични групи (аспартил или глутамил) се модифицират избирателно чрез реакция с карбодиимиди ($R-N=C=N-R'$), където R и R' са различни алкилни групи, такива като 1-циклохексил-3-(2-морфолинил-4-етил)карбодиимид или 1-етил-3-(4-азониа-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Освен това аспартиловите и глутамиловите остатъци се превръщат в аспарагинови и глутаминови остатъци чрез реакция с амониеви йони.

Дериватизацията с бифункционални агенти е приложима за кръстосано свързване на *mpt*-лиганд с водонеразтворим матрикс-подложка или повърхност за приложение в метода за пречистване на анти-*mpt*-лигандни антитела и обратно. Често използваните агенти за кръстосано свързване включват, напр., 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилетан, глутараледхид, N-хидроксисукцинимидни естери, например естери с 4-азидосалициловата киселина, хомобифункционални

имиоеестери, включващи дисукцинимидни естери, такива като 3,3'-дитиобис(сукцинимидпропионат) и бифункционални малеимидаи, такива като бис-N-малеимида-1,8-октан. Дериватизацията с агенти, такива като метил-3-[(р-азидофенил)дитио]пропиоимидаат дават фотоактивиращи се междинни съединения, които са способни да образуват кръстосани връзки в присъствието на светлина. Като алтернатива за имобилизирането на белтъци се използват реактивни водонеразтворими матрикси, такива като бромциан-активирани въглехидрати и реактивните субстрати, описани в патенти на САЩ, № 3 969 287; 3 691 016; 4 195 128; 4 247 642; 4 229 537; и 4 330 440.

Глутаминовите и аспарагиновите остатъци често се дезаминират до съответните глутамилови и аспартилови остатъци, респективно. Тези остатъци се дезаминират при неутрални или базични условия. Дезаминираните форми на тези остатъци попадат в обхвата на това изобретение.

Други модификации включват хидроксилране на пролин или лизин, фосфорилране на хидроксилните групи на серинови или треонинови остатъци, метилране на α -аминогрупите на лизиновите, аргининови и хистидинови странични вериги (Т.Е. Creghton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983]), ацетилране на N-краен амин и амидиране на всяка C-крайна карбоксилна група.

Друг тип ковалентна модификация на *mpt*-лигандния полипептид, включена в обхвата на това изобретение, обхваща промяната в нативния профил на гликозилиране на плипептида. Чрез промяна се означава делетирането на една или повече въглехидратни единици, срещащи се в нативния *mpt*-лиганд и/или добавяне на едно или повече места за гликозилиране, които не присъствуват в нативния *mpt*-лиганд.

Гликозилирането на полипептидите обикновено е или N-свързано или O-свързано. N-свързано се отнася за присъединяването на въглехидратна единица към страничната верига на аспарагинов остатък. Трипептидните последователности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, където X е всяка аминокиселина, с изключение на пролин, представляват разпознавателните

последователности за ензимно присъединяване на въглехидратната единица към аспарагиновата странична верига. По този начин наличието на всяка от тези трипептидни последователности в полипептид създава потенциални места за гликозилиране. О-свързано гликозилиране се отнася за присъединяване на една от захарите N-ацетилгалактозамин, галактоза или ксилоза към хидроксиаминокиселина, най-често серин или треонин, въпреки че могат да се използват също и 5-хидроксипролин или 5-хидроксилизин.

Прибавянето на места за гликозилиране към *mpt*-лигандния полипептид се извършва удобно чрез промяна в аминокиселинната последователност, така че тя да съдържа една или повече от гореописаните трипептидни последователности (за места на N-свързано гликозилиране). Изменението може също да бъде направено чрез прибавянето на, или субституцията с един или повече серинови или треонинови остатъци към нативната *mpt*-лигандна последователност (за места на О-свързано гликозилиране). За удобство се предпочита *mpt*-лигандната аминокиселинна последователност да се промени чрез изменения на ДНК-ниво, в частност, като се мутира ДНК, кодираща *mpt*-лигандния полипептид в предварително избрани бази, така че да се образуват кодони, които ще се транслират в желаните аминокиселини. ДНК-мутациите могат да се направят, като се използват методите, описани по-горе под заглавието "Варианти на *mpt*-лиганда в аминокиселинната последователност".

Други способности за повишаване броя на въглехидратните единици в *mpt*-лиганда е чрез химично или ензимно свързване на гликозиди към полипептида. Тези процедури имат предимството, че не изискват производството на полипептида в клетка-гостоприемник, която притежава гликозилиращи способности за N- или О-свързано гликозилиране. В зависимост от използвания модел за свързване, захарта(ите) може да се присъедини към (а) аргинин или хистидин, (b) свободни карбоксилни групи, (c) свободни сулфхидрилни групи, такива като тези на цистеина, (d) свободни хидроксилни групи, такива като тези на серина, треонина или хидроксипролина, (e) ароматни остатъци, такива като тези на фенилаланина, тирозина или триптофана или (f) амидната група на

глутамина. Тези методи са описани във WO 87/05330, публикувано на 11 септември 1987 и Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 [1981].

Отстраняването на въглехидратни единици, присъстващи в *mpl*-лигандния полипептид, може да се извърши химично или ензимно. Химичното дегликозилиране изисква въздействие върху полипептида със съединението трифлуорметансулфонова киселина или еквивалентно съединение. Това третиране води до разкъсването на повечето или всички захари с изключение на свързващата захар (N-ацетилглюкозамин или N-ацетилгалактозамин), докато полипептидът остава интактен. Химичното дегликозилиране е описано от Hakimuddin, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **259**:52 [1987] и от Edge *et al.*, *Anal. Biochem.*, **118**:131 [1981]. Ензимното разкъсване на въглехидратните единици върху полипептидите може да се постигне чрез използването на различни ендо- и екzogликозидази, както е описано от Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.*, **138**:350 [1987].

Гликозилирането на потенциални места за гликозилиране може да бъде предотвратено, като се използва съединението туникамицин, както е описано от Duskin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **257**:3105 [1982]. Туникамицинът блокира образуването на белтък-N-гликозидни връзки.

Друг тип ковалентна модификация на *mpl*-лиганда включва свързването на *mpl*-лигандния полипептид с един от различните небелтъчни полимери, напр., полиетиленгликол, полипропиленгликол или полиоксиалкилени по начина, поместен в патенти на САЩ, номера 4 640 835; 4 496 689; 4 301 144; 4 670 417; 4 791 192 или 4 179 337. *Mpl*-лигандните полипептиди, свързани ковалентно с горните полимери се означават като пегилирани *mpl*-лигандни полипептиди.

Ясно е, че ще бъде необходимо известно скриниране на получените *mpl*-лигандни варианти, за да се избере оптималният вариант за свързване с *mpl*, който има и имунологичната и/или биологична активност, дефинирани по-горе. Може да се скринира за стабилност в рекомбинантна клетъчна култура или в плазма (напр., срещу протеолитично смилане), висок афинитет към *mpl*-член, стабилност на окисление, способност да се секретира в повишени добиви и

подобни на тях. Например, промяната в имунологичния характер на *mPr*-лигандния полипептид, такъв като афинитет към дадено антитяло, се измерва чрез имунологичен тест от конкурентен тип. Други потенциални модификации на белтъчните или полипептидни свойства, такива като стабилност на редуциране и термостабилност, хидрофобност или чувствителност към протеолитично разграждане, се тестват чрез добре известни методи в тази област.

17. Основни методи за получаване на антитела срещу *mPr*-лиганда

Получаване на антитела

(i) Поликлонални антитела

Поликлонални антитела срещу *mPr*-лигандните полипептиди или фрагменти се получават главно в животни чрез многократни подкожни (sc) или интраперитонеални (ip) инжекции на *mPr*-лиганда и адювант. От полза може да бъде конюгирането на *mPr*-лиганда или на фрагмент, съдържащ прицелната аминокиселинна последователност, с белтък, който е имуногенен за вида, който ще се имунизира, напр., хемоцианин (изолиран от вид мида), серумен албумин, говежди тироглобулин или соев трипсонов инхибитор като се използват бифункционален или дериватизиращ агент, например малеимидобензоилов сукцинимиден естер (конюгиране чрез цистеинови остатъци), N-хидроксисукцинимид (чрез лизинови остатъци), глутаралдехид, сукцинов (янтърен) анхидрид, SOCl_2 или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, където R и R^1 са различни алкилни групи.

Животните се имунизират срещу *mPr*-лигандния полипептид или фрагмент, имуногенните конюгати или производни чрез комбиниране на 1 мг до 1 мкг от пептида или конюгата (респективно за зайци и мишки) с 3 обема пълен адювант на Фройнд и подкожно инжектиране на разтвора на множество места. Един месец по-късно се прави бустер (повторна имунизации за усилване на имунния отговор) с 1/5 до 1/10 от първоначалното количество пептид или конюгат в пълен адювант на Фройнд чрез подкожно инжектиране на множество места. Седем до 14 дни по-късно се взема кръв от животните и серумът се тества за

титър на *mpr*-лигандните антитела. На животните се прави бустер, докато титърът достигне плато. Предпочита се бустерът на животните да се направи с конюгат на същия *mpr*-лиганд, но конюгиран с друг белтък и/или чрез друг реагент за кръстосано свързване. Конюгатите могат също така да се направят в рекомбинантна клетъчна култура под формата на сляти белтъци. Използват се също и агрегиращи агенти, такива като стипца, за усилване на имунния отговор.

(ii) Моноклонални антитела

Моноклоналните антитела се получават от популация значително хомогенни антитела, т.е. индивидуалните антитела, съдържащи се в популацията, са идентични с изключение на естествено възникващи мутации, които могат да присъствуват в малки количества. Така определението "моноклонално" посочва характера на антитялото, което не е смес от дискретни антитела.

Например, *mpr*-моноклоналните антитела на това изобретение могат да се направят като се използва хибридомния метод, описан за първи път от Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495 [1975] или могат да се направят чрез рекомбинантни методи (патент на САЩ No. 4 816 567 [Cabilly *et al.*]).

В хибридомния метод, мишка или друг подходящ животински гостоприемник, такъв като хамстер, се имунизира, както е описано по-горе, за да се появят лимфоцити, които произвеждат или са в състояние да произвеждат антитела, които ще се свързват специфично с белтъка, използван за имунизация. Като алтернатива лимфоцитите могат да бъдат имунизирани *in vitro*. След това лимфоцитите се сливат с миеломни клетки, като се използва подходящ агент за сливане, такъв като полиетиленгликол, за да се образува хибридомна клетка (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 [Academic Press, 1986]).

Хибридомните клетки, получени по този начин, се посяват и култивират в подходяща хранителна среда, като се предпочита тя да съдържа една или повече субстанции, които инхибират растежа или преживяемостта на неслятите, родителски миеломни клетки. Например, ако родителските миеломни клетки не съдържат ензима хипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или

HPRT), културалната среда за хибридомите обикновено включва хипоксантин, аминоптерин и тимидин (HAT-среда), които субстанции пречат на растежа на HGPRT-дефицитните клетки.

Предпочитани миеломни клетки са тези, които се сливат ефективно, поддържат стабилно високо ниво на експресия на антиялото от отбраните антияло-продуциращи клетки и са чувствителни към среда, такава като HAT-средата. Между тези предпочитани миеломни клетъчни линии са мишите миеломни линии, такива като тези, получени от миши тумори MOPC-21 и MPC-11, които са на разположение в Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, и SP-2-клетки на разположение в American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. За образуването на човешки моноклонални антитела са описани също и човешка миеломна и мише-човешка хетерохибридомна клетъчна линия (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 [1984]; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 19897).

Хранителната среда, в която се култивират хибридомните клетки, се тестира за продукцията на моноклонални антитела, насочени срещу *mpt*-лиганд. Предпочита се свързващата специфичност на моноклоналните антитела, продуцирани от хибридомните клетки, да се определи чрез имунопреципитация или чрез тест за *in vitro* свързване, такъв като радиоимунологичен тест (RIA) или ензимносвързан имуносорбентен анализ (ELISA).

Афинитетът на свързване на антителата може, например, да се определи чрез Scatchard-анализа на Munson & Pollard, *Anal., Biochem.*, 107:220 [1980].

След като се идентифицират хибридомни клетки, които продуцират антитела с желаната специфичност, афинитет и/или активност, клоновете могат да се субклонират чрез процедурите на лимитиращите разреждания и да се култивират чрез стандартни методи (Godin, по-горе). Подходящите за тази цел културални среди включват, например, Dulbecco's Modified Eagle's Medium или

RPMI-1640 средата. Освен това хибридомните клетки могат да се култивират *in vivo* като асцити или тумори в животното.

Моноклоналните антитела, секретирани от субклоновете се разделят по подходящ начин от културалната среда. асцитната течност или серума чрез конвенционални процедури за пречистване на имуноглобулини, такива като, например. протеин A-Sepharose, хидроксиапатитна хроматография, гел-електрофореза, диализа или афинитетна хроматография.

ДНК, кодираща моноклоналните антитела на изобретението се изолира лесно и се секвенира като се използват конвенционални процедури (напр., чрез използване на олигонуклеотидни проби, които са способни да се свързват специфично с гени, кодиращи тежката и леката вериги на миши антитела). Хибридомните клетки на изобретението служат като предпочетен изотчник на такава ДНК. След като веднъж се изолира, ДНК може да бъде поставена в експресионни вектори, които след това се трансфектират в гостоприемни клетки, като маймунски COS-клетки, яйчни клетки от Китайски хамстер (CHO), миеломни клетки, които не продуцират друг имуноглобулинов белтък, за да се получи синтеза на моноклонални антитела в рекомбинантните клетки-гостоприемници. ДНК може също така да бъде модифицирана, например, чрез включване на кодиращата последователност за човешките константни домени на тежката и леката верига на мястото на хомоложните миши последователности, (Cabilly et al., по-горе; Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**:6815 [1984]) или чрез свързване към имуноглобулиновата кодираща последователност на цялата или част от кодиращата последователност на неимуноглобулинов полипептид.

Обикновено такива неимуноглобулинови полипептиди заместват константните домени на антитяло на изобретението или те заместват вариабилните домени на едно антиген-свързващо място на антитяло на изобретението, за да се получи химерно бивалентно антитяло, включващо едно антиген-свързващо място със специфичност за *mH*-лиганд и друго антиген-свързващо място със специфичност за друг антиген.

Химерните или хибридни антитела могат да се получат също *in vitro*, като се използват известни методи в синтетичната белтъчна химия, включващи тези, в които участвуват агенти за кръстосано свързване. Например, имунотоксини могат да се конструират като се използва реакция на дисулфидна обмяна или чрез формиране на тιοетерна връзка. Примерите на подходящи реагенти за тази цел включват иминотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат.

За приложения в диагностиката е типично, антителата на изобретението да се бележат с детектируема съставка. Детектируема съставка може да бъде всяка, която е способна да произведе, било то директно или косвено, детектируем сигнал. Например, детектируемата съставка може да бъде радиоизотоп, такъв като ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I , флуоресцентно или хемилуминесцентно съединение, такова като флуоресцинизотиоцианат, родамин или луциферин; радиоактивни изотопни белези, такива като, напр., ^{125}I , ^{32}P , ^{14}C или ^3H или ензим, такъв като алкална фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза от хрян.

Може да се използва всеки известен метод за поотделно конюгиране на антитялото с детектируемата съставка, включително тези методи, описани от Hunter, *et al.*, *Nature*, **144**:945 [1962]; David, *et al.*, *Biochemistry*, **13**:1014 [1974]; Pain, *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, **40**:219 [1981]; и Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, **30**:407 [1982].

Антителата на настоящото изобретение могат да се използват във всеки известен метод за тесиране, такъв като тест по конкурентно свързване, директен и индиректен сандвичев тест и имунопреципитационен тест. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Тестовите по конкурентно свързване почиват на способността на белязан стандарт (който може да бъде *mPr*-лиганд или реагираща имунологично негова част) да се конкурира с анализираната тест-проба (*mPr*-лиганд) за свързване с ограничено количество антитяло. Количеството *mPr*-лиганд в тест-пробата е обратно пропорционално на количеството на стандарта, който се свързва с антитялото. За улесняване определянето на количеството свързан

стандарт, антителата по правило се превръщат в неразтворими преди и след конкурирането, така че стандартът и анализираната проба, които са свързани с антителата, лесно могат да се отделят от стандарта и пробата, които остават несвързани.

Сандвичевите тестове включват използването на две антитела, всяко от които е способно да свързва различни имуногенни части или епитопи от белтъка (*mPr*-лиганд), който ще се детектира. Аналитичната тест-проба в сандвичев тест се свързва с първо антитяло, което е имобилизирано върху твърда подложка, след което с пробата се свързва второ антитяло, като по този начин се формира неразтворим комплекс от три части. David & Greene, патент на САЩ No. 4 376 110. Самото второ антитяло може да бъде белязано с детектируема съставка (директен сандвичев тест) или може да се измери като се използва антиимуноглобулиново антитяло, което е белязано с детектируема съставка (индиректен сандвичев тест). Например, един тип сандвичев тест е ELISA-тест, в който случай детектируемата съставка е ензим (напр., пероксидаза от хрян).

(iii) Хуманизирани и човешки антитела

Добре известни са методи за хуманизиране на не-човешки антитела. Хуманизираното антитяло, най-общо, има един или повече аминокиселинни остатъци, които са въведени в него от източник, който е не-човешки. Тези не-човешки аминокиселинни остатъци често се означават като "импорт" остатъци, които обикновено се вземат от "импортна" вариабилна област. Хуманизирането може да се извърши главно, следвайки метода на Winter и сътрудници (Jones *et al.*, *Nature*, **321**:522-525 [1986]; Riechmann *et al.*, *Nature*, **332**:323-327 [1988]; Verhoeven *et al.*, *Science*, **239**:1534-1536 [1988]) като съответните последователности на човешко антитяло се заместят със CDRs- или CDR-последователности на гризачи. В съгласие с това подобни "хуманизирани" антитела представляват химерни антитела (Cabilly *et al.*, по-горе), в които значително по-малка част, отколкото интактния човешки вариабилен домен, е заместена чрез съответната последователност от не-човешки вид. На практика хуманизираните антитела са типично човешки антитела, в които някои CDR-

остатъци, а възможно е и някои FR-остатъци, са заместени чрез остатъци от аналогични места в антителата от гризачи.

Изборът на човешки вариабилни домени, както леки, така и тежки, които да се използват за направата на хуманизирани антитела, е много важен, за да се редуцира антигенността. В съгласие с така наречения "най-добре пасващ" метод, последователността на вариабилния домен от антитяло на гризач се скринира срещу цялата библиотека от известни последователности на човешки вариабилни домени. Човешката последователност, която е най-близка до тази на гризача, след това се приема за човешка "арматурна област" (FR) на хуманизираното антитяло (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, **151**:2296 [1993]; Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, **196**:901 [1987]. Същата "арматурна област" може да се използва за няколко различни хуманизирани антитела (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:4285 [1992]; Presta *et al.*, *J. Immunol.*, **151**:2623 [1993]).

Освен това е важно антителата да се хуманизират при запазване на висок афинитет към антигена и други ценни биологични свойства. За да се постигне тази цел, съгласно предпочетен метод, антителата се приготвят чрез процес на анализ на родителските последователности и различни концептуални хуманизирани продукти като се използват пространствени модели на родителските и хуманизираните последователности. Пространствените имуноглобулинови модели са общодостъпни и са нещо обикновено за специалистите. На разположение са компютърни програми, които илюстрират и разкриват вероятните пространствени конформационни структури на избраните последователности, кандидати за имуноглобулини. Оглеждането на тези структури позволява да се анализира вероятната роля на остатъците за функционирането на имуноглобулиновата последователност - кандидат, т.е. анализ на остатъците, които повлияват способността на кандидатимуноглобулина да свързва своя антиген. По този начин могат да се изберат и комбинират FR-остатъци от консенсусна и "импртна" последователност, така че да се постигнат желаните характеристики на антитялото, такива като повишен афинитет към прицелния антиген(и). По правило

CDR-областите участвуват директно и най-осезателно в повлияването на антигенното свързване. За допълнителни подробности виж заявка на САЩ със сериен No. 07/934 373, подадена на 21 август 1992, която представлява частично продължение на заявка със сериен No. 07/715 272, подадена на 14 юни 1991.

Днес съществува алтернативната възможност за получаването на трансгенни животни (напр. мишки), които след имунизация са способни да продуцират целия репертоар от човешки антитела при отсъствието на ендегенно образуване на имуноглобулини. Например, описано е, че хомозиготната делеция на гена за свързващата област (J_H) на тежката верига на антитялото в химерни и зародишни мутантни мишки води до пълно инхибиране на ендегенната продукция на антитела. Преносът на участъка на човешките зародишни имуноглобулинови гени в такива зародишни мутанти ще доведе до продукцията на човешки антитела след заразяване с антиген. Виж, напр., Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:2551-255 [1993]; Jakobovits *et al.*, *Nature*, **362**:255-258 [1993]; Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, **7**:33 [1993]. Човешки антитела могат също така да се произведат във фагови библиотеки, в които антителата са изложени върху повърхността на фагите (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* **227**, 381 [1991]; Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* **222** 581 [191]).

(iv) Биспецифични антитела

Биспецифичните антитела са моноклонални, за предпочитане човешки или хуманизирани, антитела, които притежават специфичности на свързване с най-малко два различни антигена. В имунологията са известни методи за получаването на биспецифични антитела.

Рекомбинантното производство на антитела традиционно се основава на коекспресията на две двойки имуноглобулинова тежка верига-лека верига, където двете тежки вериги имат различни специфичности (Millstein and Cuellar, *Nature*, **305**:537-539 [1983]). Поради случайния подбор на имуноглобулиновите тежки и леки вериги, тези хибриди (квадроми) продуцират потенциална смес от 10 различни молекули антитела, от които само една има коректната биспецифична структура. Пречистването на коректната молекула, което

обикновено се извършва чрез стъпки на афинитетна хроматография, е по-скоро трудоемко, а добивите от продукта - ниски. Подобни процедури са представени в РСТ-публикация No. WO 93/08829 (публикувана на 13 май 1993) и в Traunecker *et al.*, *EMBO*, 10:3655-3659 [1991].

Съгласно друг, по-предпочитан подход, вариабилните домени на антитела с желаните специфичности на свързване (антияло-антиген свързващи места) се сливат с последователности на имуноглобулинови константни домени. Предпочита се сливането да бъде с константен домен на имуноглобулинова тежка верига, включващ поне част от шарнирната област CH2 и CH3. За предпочитане е да се разполага с първата константна област на тежката верига (CH1), съдържаща мястото, необходимо за свързване на леката верига, присъстващо в най-малко едно от сливанията. ДНКи, кодиращи сливанията на имуноглобулиновите тежки вериги и ако е желателно имуноглобулиновата лека верига се включват в отделни вектори и се котрансфектират в подходящ организъм-гостоприемник. Това осигурява голяма гъвкавост при нагласяване взаимните пропорции на трите полипептидни фрагмента в приложения, в които оптималните добиви се обезпечават от неравни отношения на трите полипептидни фрагменти, използвани в конструирането. Възможно е, обаче, кодиращите последователности за двете или всички три полипептидни вериги да се включат в един експресионен вектор, когато експресията на най-малко две полипептидни вериги в равни пропорции води до високи добиви или когато пропорциите не са от особено значение. В предпочетено приложение на този подход биспецифичните антитела са съставени от хибридна имуноглобулинова тежка верига с първа свързваща специфичност в едното рамо и хибридна имуноглобулинова двойка тежка верига-лека верига (осигуряваща втората свързваща специфичност) в другото рамо. Намерено е, че тази асиметрична структура улеснява отделянето на желаното биспецифично съединение от нежелани комбинации на имуноглобулиновите вериги, тъй като наличието на имуноглобулинова лека верига само в едната половина на биспецифичната

молекула, обезпечава лесен начин за разделяне. Този подход е представен във висящата заявка със сериен No. 07/931 811, подадена на 17 август 1992.

За допълнителни подробности върху получаването на биспецифични антитела виж, например, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 [1986].

(v) Хетероконюгирани антитела

Хетероконюгираните антитела са също в обхвата на настоящото изобретение. Хетероконюгираните антитела са съставени от две ковалентно свързани антитела. За такива антитела, например, е предположено, че се прицелват в нежелани клетки от имунната система (патент на САЩ No. 4 676 980) и за лечение на HIV-инфекция (PCT-публикации, номера WO 91/00360 и WO/92/00373; Европейски патент 03089). Хетероконюгираните антитела могат да се направят, като се използват традиционни методи за кръстосано свързване. Подходящите агенти за кръстосано свързване са добре известни и са публикувани в патент на САЩ No. 4 676 980, заедно с редица техники за кръстосано свързване.

IV. Терапевтично използване на мегакариопоетичния

белтък *mpl*-лиганд

Биологично активният *mpl*-лиганд, притежаващ хематопоетична ефекторна функция и означаван тук като мегакариопоетичен или тромбоцитопоетичен белтък (ТРО), може да се използва в стерилен фармацевтичен препарат или приготвено по рецепта лекарство за стимулиране на мегакариопоетичната или тромбопоетична активност в пациенти, страдащи от тромбоцитопения в резултат на увредено образуване, секвестриране или засилено разграждане на тромбоцитите. Асоциираната с тромбоцитопения костномозъчна хипоплазия (напр., апластична анемия след химиотерапия или костномозъчна трансплантация) може да се лекува ефективно със съединенията на това изобретение, както и болести, такива като дисеминирана интравазална коагулопатия (DIC), имунна тромбоцитопения (включваща HIV-индуцирана ИТР и не HIV-индуцирана ИТР), хронична идиопатична тромбоцитопения, вродена

тромбоцитопения, миелодизплазия и тромботична тромбоцитопения. Освен това тези мегакариоцитопоетични белтъци могат да бъдат полезни за лечение на миелопролиферативни тромбоцитотични заболявания, както и на тромбоцитоза в условия на възпаление и дефицит на желязо.

Предпочитаните приложения на мегакариоцитопоетичния или тромбоцитопоетичен (ТРО) белтък на това изобретение са в: миелотоксична химиотерапия за лечение на левкемия и солидни тумори, миелоаблативна химиотерапия при автоложна или алогенна костномозъчна трансплантация, миелодизплазия, идиопатична апластична анемия, вродена тромбоцитопения и имунна тромбоцитопения.

Други заболявания, които успешно се лекуват с мегакариоцитопоетичните белтъци на това изобретение, включват дефекти или увреждане на тромбоцитите в резултат на медикаменти, поставянето или активирането на изкуствени повърхности. В тези случаи примерните съединения могат да се използват за стимулиране "роенето" на нови "неувредени" тромбоцити. За по-пълнен списък на полезните приложения, виж "Предшестващо състояние на техниката" по-горе и по-специално раздели (a)-(f), както и цитираната в тях литература.

Мегакариоцитопоетичните белтъци на настоящото изобретение могат да се използват сами или в комбинация с други цитокини, хематopoетини, интерлевкини, растежни фактори или антитела в лечението на по-горе идентифицираните заболявания и условия. Така примерните съединения могат да се използват в комбинация с други белтъци или пептиди, имащи тромбоцитопоетична активност, включващи: G-CSF, GM-CSF, LIF, M-CSF, IL-1, IL-3, еритропоетин (EPO), търговски лиганд, IL-6 и IL-11.

Мегакариоцитопоетичните белтъци на настоящото изобретение се приготвят в смес с фармацевтично приемлив носител. Този терапевтичен препарат може да се прилага интравенозно или през носа и белия дроб. Препаратът може също така да се приложи парентерално или подкожно, по желание. Когато се прилага системно, терапевтичният препарат би трябвало да

не съдържа пирогени, а в разтвор, приемлив за парентерално приложение, трябва да се държи сметка за рН, изотоничност и стабилност. Тези условия са известни на професионалистите в тази област. Накратко, рецептурните дози от съединенията на настоящото изобретение се приготвят за съхранение или приложение чрез смесване на съединението с желаната степен на чистота с физиологично приемливи носители, ексципиенти или стабилизатори. Тези материали са нетоксични за реципиента в използваните дози и концентрации и включват буфери, такива като фоафатни, цитратни, ацетатни и соли на органични киселини; антиоксиданти, такива като аскорбинова киселина; нискомолекулни (по-малко от около десет остатъци) пептиди, такива като полиаргинин, белтъци, такива като серумен албумин, желатин или имуноглобулини; хидрофилни полимери, такива като поливинилпиролидинон; аминокиселини, такива като глицин, глутаминова киселина, аспарагинова киселина или аргинин; монозахариди, дизахариди и други въглехидрати, включително целулоза или нейни производни, глюкоза, маноза или декстрини; хелатиращи агенти, такива като EDTA; подсладящи алкохоли, такива като манитол или сорбитол; противойони, такива като натриев и/или нейонни ПАВ (повърхностно активни вещества), такива като Tween, Pluronic или полиетиленгликол.

Около 0,5 до 500 мг от съединение или от смес на мегакариоцитопоетичния белтък под формата на свободна киселина или база, или под формата на фармацевтично приемлива сол, се смесват с физиологично приемливи вехикулум, носител, ексципиент, свързващ агент, консервант, стабилизатор, оцветител и т.н., както се изисква от приетата фармацевтична практика. Количеството на активната съставка в тези препарати е такова, че се получава подходяща доза в посочения обхват.

Стерилните състави за инжектиране могат да се приготвят съгласно конвенционалната фармацевтична практика. Например, може да бъде желателно разтварянето или суспендирането на активното съединение във вехикулум, такъв като вода или природни хранителни масла като сусамено, фъстъчено, масло от памучни семена или синтетичен мастен разтворител като етилолеат или подобни.

Могат да се включат буфери, консерванти, антиоксиданти и други подобни в съгласие с приетата фармацевтична практика.

Подходящите примери за препарати с бавно отделяне на активната съставка включват полупропускливи матрикси от твърди хидрофобни полимери, съдържащи полипептида, които матрикси са под формата на оформени артикули, напр., филми или микрокапсули. Примерите за матрикси, задържащи отделянето на активната съставка, включват полиестери, хидрогелове [напр., поли(2-хидроксиетилметакрилат), както е описано от Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **15**:167-277 [1981] и Langer, *Chem. Tech.*, **12**:98-105 [1982] или поли(винилалкохол)], поликиселини (патент на САЩ No. 3 773 919, Европейски патент 58 481), кополимери от L-глутаминова киселина и гама-етил-L-глутамат (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, **22**:547-556 [1983]), неразграждащ се етиленвинилацетат (Langer *et al.*, по-горе), разграждащи се кополимери млечна киселина-гликолова киселина, такива като Lupron DepotTM (микросфери за инжектиране, съставени от кополимер млечна киселина-гликолова киселина и леупролидацетат), както и поли-D-(-)-3-хидроксibuтирова киселина (Европейски патент 133 988).

Докато полимери, такива като етиленвинилацетат и млечна киселина-гликолова киселина, правят възможно отделянето на молекули в продължение на над 100 дни, определени гелове освобждават белтъци за по-кратки периоди от време. Когато капсулираните белтъци остават в тялото дълго време, те могат да денатурират или агрегират, като резултат от излагането им на влага при 37°C, което води до загуба на биологична активност и възможни изменения на имуногенността. За стабилизиране на белтъците могат да се изобретят различни стратегии в зависимост от въвлечения механизъм. Например, ако се разкрие, че механизмът на агрегация представлява междумолекулно формиране на S-S връзки посредством дисулфиден обмен, стабилизирането може да се постигне чрез модифициране на сулфхидрилните остатъци, лиофилизиране из кисели разтвори, контрол върху съдържанието на влага, като се използват съответни добавки и чрез разработването на препарати от специфични полимерни матрикси.

Препаратите за забавено отделяне на мегакариоцитопоетичен белтък включват също мегакариоцитопоетичен белтък, включен в липозоми. Липозомите, съдържащи мегакариоцитопоетичен белтък, се приготвят чрез известни методи: DE 3 218 121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 [1985]; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034 [1980]; ЕП (Европейски патент) 52 322; ЕП 36 676; ЕП 88 046; ЕП 143 949; ЕП 142 641; Японска патентна заявка 83-118008; Патенти на САЩ, номера 4 485 045 и 4 544 545 и ЕП 102 324. Липозомите обикновено са от малък (около 200-800 Ангстрьома) униламеларен тип, в който липидното съдържание е повече от около 30 мол. % холоестерол, като избраната пропорция е нагласена с оглед оптимална терапия посредством мегакариоцитопоетичен белтък.

Дозировката ще се определя от лекуващия лекар, като се вземат под внимание различни фактори, за които е известно, че модифицират действието на дрогите, като тежест и тип на заболяването, телесно тегло, пол, диета, време и начин на приложение, други медикаменти и съответни клинични фактори. Дневният режим обикновено ще обхваща от 0,1 до 100 мгк/кг телесно тегло. Предпочита се дозировката да обхваща от 0,1 до 50 мгк/кг телесно тегло. Повече се предпочита началната доза да обхваща от 1 до 5 мгк/кг/ден. Възможно е обхватът на дозата да бъде същия, като този за други цитокини, по-конкретно G-CSF, GM-CSF и EPO. Терапевтично ефективните дозировки могат да се определят чрез методи *in vitro* или *in vivo*.

ПРИМЕРИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Смята се, че и без по-нататъшно описание, рутинно подготвеният в тази област специалист може, като използва предхождащото описание и илюстративните примери, да възпроизведе и използва в най-пълна степен настоящото изобретение. Поради това следващите работни примери наблягат конкретно върху предпочетени приложения на настоящото изобретение и не трябва да се тълкуват като ограничаващи по какъвто и да е начин останалата част от изложението.

ПРИМЕР 1

Частично пречистване на свински *mpl*-лиганд

Бедна на тромбоцити плазма се приготвя от нормални прасета или от прасета с апластична анемия. Прасетата се превръщат в апластични чрез облъчване на цялото тяло с 900 сГи лъчение като се използва 4мЕВ линеен ускорител. Облъчените прасета се поддържат 6-8 дни с интрамускулни инжекции на цефазолин. Впоследствие под пълна анестезия се отстранява целият им телесен обем, хепаринизира се и се центрофугира на 1800 x g за 30 мин, за да се получи плазма, бедна на тромбоцити. Установява се, че мегакариоцитната стимулираща активност достига пик 6 дни след облъчването.

Апластичната свинска плазма, получена от облъчените прасета, се довежда до 4М с NaCl и се разбърква 30 мин на стайна температура. Получената утайка се отстранява чрез центрофугиране на 3800 об/мин в центрофуга Sorvall RC3B и надстоящата течност се натоварва на колона Phenyl-Toyopearl (220 мл), уравновесена с 10 mM NaPO₄, съдържащ 4М NaCl. Колоната се промва с този буфер докато A₂₈₀ е <0,05 и се елуира с dH₂O. Елуираният белтъчен пик се разрежда с dH₂O до проводимост 15мС и се натоварва на колона Blue-Sepharose, уравновесена (240 мл) с PBS. Впоследствие колоната се промива с 5 обема на колоната поотделно с PBS и с 10мМ NaPO₄ (pH 7,4), съдържащ 2М урея. Белтъците се елуират от колоната с 10мМ NaPO₄ (pH 7,4), съдържащ 2М урея. Елуираният белтъчен пик се довежда до 0,01% с октилглюкозид(п-октил Я-D-глюкопиранозид) и до 1мМ поотделно с EDTA и с Pefabloc (Boehringer Mannheim) и се натоварва директно върху тандемно свързани CD4-IgG (Capon, D.J. *et al.*, *Nature* 337:525-531 [1989]) и *mpl*-IgG колони Ultrakink (Pierce) (виж по-долу). Колоната CD4-IgG (2ml) се отстранява след нанасяне на пробата, а колоната *mpl*-IgG (4 мл) се промива с 10 обема на колоната поотделно с PBS и с PBS, съдържащ 2М NaCl и се елуира с 0,1М глицин-HCl pH 2,25. Фракциите се събират в 1/10-та обем 1М Tris-HCl (pH 8,0).

Анализът на елуираните фракции от *mpl*-афинитетната колона чрез SDS-PAGE (4-20%, Novex-гел), проведена при редуциращи условия, разкрива наличието на няколко белтъка (Фиг. 5). Белтъците, които по-сребро се оцветяват с най-голяма интензивност, се разделят с видима *Mr* от 66 000, 55 000, 30 000, 28 000 и 14 000. За да се определи, кой от тези белтъци стимулира пролиферация на *Ba/F3-mpl*-клетъчни култури, тези белтъци се елуират от гела, както е описано в **Пример 2** по-долу.

Афинитетни колонии Ultralink

10-20 мг от *mpl*IgG или CD4-IgG в PBS се свързват с 0,5 грама смола Ultralink (Pierce), както е описано в инструкциите на производителя.

*Конструирание и експресия на *mpl*-IgG*

Химерна молекула, включваща целия екстрацелуларен домен на човешкия *mpl* (аминокиселини 1-149) и Fc-областта на човешка IgG1-молекула, се експресира в 293-клетки. Човешки кДНК-фрагмент, кодиращ аминокиселини 1-149 от човешкия *mpl*, се получава чрез ПВР на кДНК-библиотека от човешка мегакариоцитна СМК-клетка и се секвенира. В 5'-края се въвежда ClaI-място, а в 3'-края BstEII-място. Този фрагмент се клонира пред Fc-кодиращата последователност на IgG1 във вектор Bluescript между местата ClaI и BstEII след частично смилане на ПВР-продукта с BstEII поради наличието на две дуги BstEII-места в ДНК, кодираща екстрацелуларния домен на *mpl*. BstEII-мястото, въведено в 3'-края на *mpl*-ПВР-продукта се смилва, за да се получи Fc-област в рамка с екстрацелуларния домен на *mpl*. Конструкцията се субклонира в pRK5-tkneo между местата ClaI и XbaI и се трансфектира в човешки ембрионални бъбречни клетки 293 по калциево-фосфатния метод. Клетките се селектират в 0,4 мг/мл G418 и се изолират индивидуални клонове. Експресията на *mpl*-IgG от изолираните клонове се определя като се използва Fc-специфична ELISA. Най-добрият експресиращ клон има ниво на експресия 1-2 мг/мл *mpl*-IgG.

*Ba/F3-клетки, експресиращи *mpl* Р*

кДНК, съответстваща на цялата кодираща област на човешки *mpl* Р, се клонира в pRK5-tkneo, който впоследствие се линеаризира с NotI и се

трансфектира в IL-3-зависимата клетъчна линия Ba/F3 чрез електропорация (1×10^7 клетки, 9605Ф, 250Волта). Селекцията започва три дни по-късно в присъствието на 2 мг/мл G418. Клетките се селектират на групи или се получават индивидуални клонове чрез лимитиращо разреждане в 96-ямкови платета. Отбраните клетки се съхраняват в RPMI, съдържаща 15% FBS, 1 мг/мл G418, 20 mM glutamin, 10 mM HEPES и 100 мкг/мл Pen-Strep. Експресията на *mpl* Р в отбраните клонове се определя чрез FACS-анализ (флуоресцентно-активирано клетъчно сортиране), като се използва анти-*mpl* Р заешко поликлонално антитяло.

Тест за Ba/F3-*mpl*-лиганд

Mpl-лигандният тест се провежда, както е показано на **Фиг. 2**. За да се определи наличието на *mpl*-лиганд от различни източници, Ba/F3-*mpl*-клетките се поставят 24 часа в условия на гладуване за IL-3 при клетъчна плътност 5×10^5 клетки/мл в инкубатор с поддържана влага на 37°C в 5% CO₂ и въздух. След гладуването за IL-3 клетките се посяват в 96-ямкови културални платета при плътност 50 000 клетки в 200 мкл среда със или без разреждени проби и се култивират 24 часа в инкубатор за клетъчни култури. Последните 6-8 часа се добавят 20 мкл RPMI-среда без серум, съдържаща 1 мкКи ³H-тимидин. След това клетките се събират върху 96-ямкови GF/C-филтърни платета и се промиват 5 пъти с вода. Филтрите се преброяват в присъствието на 40 мкл сцинтилационна течност (Microscint 20) в брояч Packard Top Count.

ПРИМЕР 2

Високо пречистен свински *mpl*-лиганд

Протокол за елуиране от гел

На стайна температура без редуциращ агент се смесват равни количества от афинитетно пречистен *mpl*-лиганд (фракция 6 от колоната *mpl*-IgG) и 2X буфер на Laemmli за проби и се нанасят на Novex 4-20% полиакриламиден гел, колкото е възможно по-бързо. Пробата не се нагрява. Като контрола в съседния старт се нанася буфер за проби без лиганд. Гелът се пуска на 4-6°C при

135 волта за около 2 1/4 часа. Първоначално електрофорезният буфер е на стайна температура. След това гелът се отстранява от гелния апарат, като се отстранява и плаката от едната страна на гела.

Прави се реплика на гела върху нитроцелулоза, както следва: Късче нитроцелулоза се намокря с дестилирана вода и внимателно се поставя върху откритата повърхност на гел, така че да не се образуват въздушни мехурчета. Върху нитроцелулозата и гелната плака се поставят фиксиращи маркери, така че след оцветяването репликата да би могла да се наложи точно. След приблизително 2 минути нитроцелулозата се отстранява внимателно, гелът се завива с пластична обвивка и се поставя в хладилник. Нитроцелулозата се оцветява със златно багрило за тотален белтък на Biorad, като най-напред се тя се инкубира чрез разклащане в 3 x 10 мл 10% Tween 20 + 0,5 M NaCl + 0,1M Tris-HCl pH 7,5 в продължение на приблизително 45 минути, последвано от 3 x 10 мл пречистена вода за 5 минути. След това се прибавя златното багрило и се оставя да се проявява, докато започнат да се виждат ивиците в стандартите. След това репликата се промива с вода, поставя се върху пластичната обвивка на гела и се налага внимателно с fiducial-ните маркери. Местата на стандартите Novex се маркират върху гелната плака и се начертават линии, за да се отбележат местата на срязване. След това нитроцелулозата и пластичната обвивка се отстраняват и гелът се срязва по дължината на маркираните линии с остро ножче за бръснене. Срезите се продължават и след стартовете с пробите, така че да могат да се използват за определяне местата на късчетата след като гелът се оцвети. След отстраняване на късчетата останалият гел се оцветява по сребро и се определят местата на стандартите и на маркерите за срязване. Молекулните тегла, съответстващи на местата на срязване, се определят от Novex-стандартите.

В клетките на два апарата за електроелуиране на Biorad, модел 422, се поставят 12-те гелни късчета. В клетките се използват мембранни "шапки" с отрязък над 12-14K молекулни тегла. Буферът за елуиране представлява 50 mM амониев бикарбонат + 0,05% SDS (приблизително pH 7,8). Преди употреба един литър буфер се охлажда приблизително 1 час в 4-6°C хладилно помещение.

Гелните късчета се елуират при 10 мА/клетка (40 В първоначално) в 4-6°C хладилно помещение. Елуирането отнема приблизително 4 часа. След това клетките внимателно се отстраняват, като с пипета се отнема и течността над фритата. Камерата за елуиране се отстранява, като с пипета се премахва всякаква течност над мембранната шапка. Течността в мембранната шапка се събира с пипета и се съхранява. След това в шапката се поставят петдесет мкл пречистена вода, разклаща се и се отстранява, докато се разтворят кристалите от SDS. Тези промивки се обединяват със запазената течност по-горе. Тоталният обем на елуираната проба е 300-500 мкл на гелно късче. Пробите се поставят в 10 мм-ров диализен шлаух Spectrapor 4 с отрязък над 12-14K, който е бил накснат няколко часа в пречистена вода. Те се диализират през нощта на 4-6°C срещу 600 мл буфериран с фосфат солеви разтвор (PBS е приблизително 4 mM по калий) на 6 проби. На следващата сутрин буферът се сменя и диализата продължава 2,5 часа. Пробите след това се отстраняват от диализните шлаухи и се поставят в микроцентрофужни епруветки. Епруветките се поставят на лед за един час, центрофугират се в микроцентрофуга на 14K об/мин за 3 мин и надстоящите течности се отстраняват внимателно от преципитирания SDS. След това надстоящите течности се поставят на лед за около повече от 1 час и отново се центрофугират 4 мин. Надстоящите течности се разреждат във фосфатно буфериран солеви разтвор и се предоставят за тестиране на активност. Останалите проби се замразяват на -70°C.

ПРИМЕР 3

Микросеквениране на свински *mrl*-лиганд

Фракция 6 (2,6 мл) от *mrl*-IgG-афинитетната колона се концентрира върху Microcon-10 (Amicon). За да се предотврати абсорбирането на *mrl*-лиганда към Microcon, мембраната се промива с 1% SDS и към фракция 6 се прибавят 5 мкл 10% SDS. След концентрирането с Microcon към фракция #6 (20 мкл) се добавя 2X буфер за проби (20 мкл) и целият обем (40 мкл) се нанася в единичен старт на 4-20% градиентен акриламиден гел (Novex). Провежда се гелна

Ивиците при 30, 28 и 22 кДа се подлагат на белтъчно секвениране. Автоматизираното белтъчно секвениране се провежда със секвенатор на Applied Biosystem, модел 470 А, екипиран с включен към него РТН-анализатор. Секвенаторът се модифицира за инжектиране на 80-90% от пробата (Rodriguez, *J. Chromatogr.*, **350**:217-225 [1985]). Към разтвор А се добавя ацетон (приблизително 12 мкл/л), за да се балансира UV-поглъщането. Прехвърлените чрез електроблотинг белтъци се секвенират в блотинговата мембрана. Пиковите се интегрират с компютърната програма Justice Innovation, като се използват интерфейси Nelson Analytical 970. Интерпретацията на последователностите се извършва на VAX 5900 (Henzel et al., *J. Chromatogr.*, **404**:41-52 [1987]). N-терминалните последователности (като се използва еднобуквеният код, а несигурните остатъци са в скоби) и количеството получен материал (в средни скоби) са представени в Таблица 2'.

***Mpr*-лигандни аминокиселинни последователности**

30 кДа	[1,8 пмол]					
1	5	10	15	20	25	
(S)PAPPA(C)DPRLLNKLLRDD(H/S)VLH(G)RL						(SEQ ID NO:30)
28 кДа	[0,5 пмол]					
1	5	10	15	20	25	
(S)PAPPAXDPRLLNKLLRDD(H)VL(H)GR						(SEQ ID NO:31)
18-22 кДа	[0,5 пмол]					

ПРИМЕР 4

Тест за мегакариоцитопоеза в суспензионна течност

Човешки периферни стволови клетки (PSC) (получени със съгласието на пациентите) се разреждат 5 пъти с IMDM-среда (Gibco) и се центрофугират за 15 мин на стайна температура при 800 x g. Клетъчните утайки се ресуспендират в IMDM, надсояват се върху 60% Percoll (плътност 1,077 г/мл) (Pharmacia) и се центрофугират на 800 g за 30 мин. Мононуклеарните клетки с ниска плътност се извличат от интерфазата, промиват се 2x с IMDM и се посяват при $1-2 \times 10^6$ клетки/мл в IMDM, съдържаща 30% FBS (1 мл краен обем) в 24-ямкови платета за тъканни култури (Costar). Прибавя се APP или изтощена с *trp*-лиганд APP до 10% и културите се култивират 12-14 дни във влажен инкубатор на 37°C в 5% CO₂ и въздух. Културите се култивират също в присъствието на 10% APP като в дни 0,2 и 4 се прибавят 0,5 мкг *trp*-IgG. APP се изтощава с *trp*-лиганд чрез прекарване на APP през *trp*-IgG-афинитетна колона.

За измерване на мегакариоцитопоезата в тези течни суспензионни култури се използва модификация на Solberg *et al.* като се употребяват радиоактивно белязано мише IgG моноклонално антитяло (HP1-1D) срещу GPIIb/IIIa (предоставено от Dr. Nichols, Mayo Clinic). 100 мкг от HP1-1D (виж Grant, B. *et al.*, *Blood* 69:1334-1339 [1987] се бележат радиоактивно с 1 мКи Na¹²⁵I чрез Enzymobeads (Biorad, Richmond, CA), както е описано в инструкциите на производителя. Радиоактивно белязаното HP1-1D-антитяло се съхранява на -70°C в PBS, съдържащ 0,01% октилглюкозид. Типичните специфични активности са $1-2 \times 10^6$ cpm/мкг (>95%, утаени с 12,5% трихлороцетна киселина).

Течните суспензионни култури се залагат в три повторения за всяка експериментална точка. След 12-14 дни култивиране 1 мл култури се прехвърлят в 1,5 мл епруветки Eppendorf, центрофугират се на 800 g за 10 мин на стайна температура и получените клетъчни утайки се суспендират в 100 мкл PBS, съдържащ 0,02% EDTA и 20% говежди телешки серум. Към ресуспендираните

култури се прибавят 10 нг ^{125}I -HP1-1D в 50 мкл буфер за тестиране и се инкубира 60 мин на стайна температура (RT) с епизодично разклащане. Впоследствие клетките се събират чрез центрофугиране при 800 g за 10 мин на стайна температура и се промиват 2x с буфера за тестиране. Утайките се преброяват за 1 мин в гама-брояч (Packard). Неспецифичното свързване се определя чрез прибавяне на 1 мкг небелязано HP1-1D за 60 мин преди добавянето на белязаното HP1-1D. Специфичното свързване се определя като totalната ^{125}I -HP1-1D-свързана радиоактивност минус тази свързана в присъствието на излишък от небелязано HP1-1D.

ПРИМЕР 5

Олигонуклеотидни праймери за ПБР

Въз основа на аминотерминалната аминокиселинна последователност, получена за белтъците от 30 кДа, 28 кДа и 18-22 кДа, се проектират дегенерирали (изродени) олигонуклеотиди с цел използването им като праймери за полимеразна верижна реакция (ПБР) (виж Таблица 4). Синтезират се две групи праймери, позитивна сенс (значаща) 20-мер-група, кодираща аминокиселинни остатъци 2-8 (*mpl* 1) и антисенс 21-мер-група, комплементарна на последователности, кодиращи аминокиселини 18-24 (*mpl*-2).

ТАБЛИЦА 4

Групи от дегенерирали олигонуклеотидни праймери

<i>mpl</i> 1:5' CCN GCN CCN CCN GCN TGY GA 3' (2048-пъти дегенерирал)	(SEQ ID NO: 35)
<i>mpl</i> 2:5' NCC RTG NAR NAC RTG RTC RTC 3' (2048 пъти дегенерирал)	(SEQ ID NO: 36)

Свинска геномна ДНК, изолирана от свински лимфоцити от периферна кръв, се използва като матрица за ПБР. Реакцията от 50 мкл съдържа: 0,8 мкг свинска геноман ДНК в 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 100 мкг/мл BSA, 400 мкM dNTPs, 1 мкM от всяка група праймери и 2,5 единици *Taq*-

полимераза. Първоначалната денатурация на матрицата е на 94°C за 8 мин, следвана от 35 цикъла от по 45 секунди на 94°C, 1 мин на 55°C и 1 мин на 72°C. Крайният цикъл се оставя да продължи 10 мин на 72°C. ПВР-продуктите се разделят чрез електрофореза в 12% полиакриламиден гел и се визуализират чрез оцветяване с етидиев бромид. Приема се, че ако аминотерминалната аминокиселинна последователност се кодира от единичен екзон, то се очаква коректният ПВР-продукт да бъде 69 нд. ДНК-фрагмент с тази големина се елуира от гела и се субклонира в pGEMT (Promega). Последователностите на три клона са показани по-долу в Таблица 5.

ТАБЛИЦА 5

Свински геномни ДНК-фрагменти от 69 нд

gemT3

5'CCAGCGCCGC CAGCCTGTGA CCCCCGACTC CТАААТАААC TGCCTCGTGA
GGTCGCGGCG GTCGGACACT GGGGGCTGAG GATTATTG ACGGAGCACT

TGACCACGTT CAGCACGGC [69 нд]

(SEQ ID NO: 37)

ACTGGTGCAA GTCGTCCCG

(SEQ ID NO: 38)

gemT7

5'CCAGCACCTC CGGCATGTGA CCCCCGACTC CТАААТАААC TGCTTCGTGA
GGTCGTGGAG GCCGTACACT GGGGGCTGAG GATTATTG ACGAAGCACT

CGACCACGTC CATCACGGC [69 нд]

(SEQ ID NO: 39)

GCTGGTGCA G TAGTGCCG

(SEQ ID NO: 40)

gemT9

P R L L N K L L R (SEQ ID NO: 32)

5'CCAGCACCGCCGGCATGTGACCCCCGACTCCTAAATAAACTGCTTCGTGACGAT3
'GGTCGTGGCGGCCGTACACTGGGGGCTGAGGATTATTGACGAAGCACTGCTA

GTACAGATTACGGT 3'

(SEQ ID NO: 41)

CATGTCTAAGTGCCA 5'

(SEQ ID NO: 42)

Местата на ПВР-праймерите са означени чрез подчертаване на базите. Тези резултати потвърждават N-терминалната последователност за аминокиселини 9-17 на белтъците от 30 кДа, 28 кДа и 18-22 кДа и показват, че тази последователност се кодира от единичен екзон на свинската ДНК.

ПРИМЕР 6

Ген за човешкия *trpI*-лиганд

На основата на резултатите от **Пример 5** се проектира и синтезира 45-мер дезоксиолигонуклеотид, наречен pR45, за скриниране на геномна библиотека. 45-мера има следната последователност:

5'GCC-GTG-AAG-GAC-GTG-GTC-GTC-ACG-AAG-CAG-TTT-ATT-TGG-GAG-TCG3'

(SEQ ID NO: 28)

Този олигонуклеотид се ^{32}P -бележи с (гама ^{32}P)-АТР и Т4-киназа и се използва за скриниране на човешка геномна ДНК-библиотека в *lambdagem12* при условия на хибридизация и миене с ниска строгост (**виж Пример 7**). Положителните клонове се подбират, пречистват се от плаки и се анализират чрез рестриктазно картиране и Southern-блотинг. Клон #4 се избира за допълнителен анализ.

BamHI-XbaI-фрагмент от 2,8 кн, който хибридизира с 45-мера, се субклонира в pBluescript SK-. Извършва се частично ДНК-секвениране на този клон чрез използване като праймери на олигонуклеотиди, специфични за свинската *trpI*-лигандна ДНК-последователност. Получената последователност потвърждава, че е изолирана ДНК, кодираща човешкия хомолог на свинския *trpI*-лиганд. В последователността се открива EcoRI-рестриктазно място, което позволява от 2,8 кн BamHI-XbaI-фрагмента да се изолира EcoRI-XbaI-фрагмент от 390 нд и да се субклонира в pBluescript SK-.

Секвенират се и двете вериги на този фрагмент. Човешката ДНК-последователност и изведената аминокиселинна последователност са показани на **Фиг. 9** (SEQ ID NOS: 3 & 4). Със стрелки са показани също и предсказаните места на интроните в геномната последователност, които определят предполагаемия екзон ("екзон 3").

Изследването на предсказаната аминокиселинна последователност потвърждава, че първата аминокиселина на зрелия *trpI*-лиганд е серинов остатък, което се определя от директния анализ на аминокиселинната последователност. Непосредствено пред този кодон предсказаната аминокиселинна последователност силно напомня сигнална последователност, участваща в

секрецията на зрелия *trp*-лиганд. По всяка вероятност тази област, кодираща сигнал, е прекъсната в нуклеотидна позиция 68 от интрон.

Изглежда, че в посока 3' екзонът завършва при нуклеотид 196. Поради това този екзон кодира последователност от 42 аминокиселини, 16 от които вероятно са част от сигнална последователност и 26 от които са част от зрелия човешки *trp*-лиганд.

ПРИМЕР 7

Пълноразмерна кДНК на човешкия *trp*-лиганд

Като се изхожда от последователността на човешки "екзон 3" (Пример 6) се синтезират два недегенерирани олигонуклеотида, съответстващи на 3'- и 5'-краищата на "екзон 3" (Таблица 6).

ТАБЛИЦА 6

Човешки кДНК недегенерирани олигонуклеотидни праймери за ПВР

Прав праймер: 5'GCT AGC TCT AGA AAT TGC TCC TCG TGG TCA TGC TTC T3'
(SEQ ID NO: 43)

Обратен праймер: 5'CAG TCT GCC GTG AAG GAC ATG G3' (SEQ ID NO:44)

Тези два праймера се използват в ПВР-реакции, използвайки като матрица ДНК от различни човешки кДНК-библиотеки или 1 нг кДНК Quick Clone (Clonotech) от различни тъкани, като се използват условията, описани в **Пример 5**. Очакваната големина на коректния ПВР-продукт е 140 нд. След анализ на ПВР-продуктите в 12% полиакриламиден гел се открива ДНК-фрагмент с очакваната големина в кДНК-библиотеките, приготвени от бъбречни клетки на възрастен, от 293-фетални бъбречни клетки и в кДНК, приготвена от човешки фетален черен дроб (Clonotech кат. #7171-1).

кДНК-библиотеката от фетален черен дроб в lambda DR2 (Clonotech кат. # HL1151x) се скринира със същия 45-мер олигонуклеотид, използван за скриниране на човешката геномна библиотека. Олигонуклеотидът се бележи с (гама³²P)-АТР чрез използване на Т4-полинуклеотидкиназа. Библиотеката се

скринира при условия на хибридизация с ниска строгост. Филтрите се прехибридизират за 2 часа, след това се хибридизират със сондата през нощта на 42°C в 20% формамид, 5xSSC, 10XDenhardt-разтвор, 0,05M натриев фосфат (pH 6,5), 0,1% натриев пирофосфат, 50 мкг/мл озвучена ДНК от сперма на съомга за 16 часа. След това филтрите се изплакват в 2xSSC и после се измиват веднъж в 0,5xSSC, 0,1% SDS на 42°C. Филтрите се експонират през нощта върху рентгенов филм на Kodak. Положителните клонове се събират, пречистват се от плаки и големината на инсерта се определя чрез ПБР, като се използват олигонуклеотиди, фланкиращи BamHI-XbaI-клонирането в lambda DR2 (Clonetech кат. #6475-1). Като източник на матрица се използват 5 мкл от съхранените фаги. Първоначалната денатурация е за 7 мин на 94°C, следвана от 30 цикъла на амплификация (1 мин на 94°C, 1 мин на 52°C и 1,5 мин на 72°C). Крайното удължаване е за 15 мин на 72°C. Клон # FL2b има инсерт от 1,8 кн и се избира за по-нататъшен анализ.

Плазмидът pDR2 (Clonetech, lambda DR2 & pDR2 cloning and Expression System Library Protocol Handbook, p 42), който се съдържа във фаговите рамена на lambdaDR2, се изолира, както е описано в инструкциите на производителя (Clonetech, lambda DR2 & pDR2 cloning and Expression System Library Protocol Handbook, p 29-30). Рестриктазният анализ на плазмида pDR2-FL2b с BamHI и XbaI посочва наличието на вътрешно BamHI-рестриктазно място в инсерта приблизително в позиция 650. Смилането на плазмида с BamHI-XbaI срязва инсерта на два фрагмента, един от 0,65 кн и един от 1,15 кн. ДНК-последователността се определя с три различни класа матрица, получена от плазмида pDR2-FL2b. ДНК-секвенирането на двойноверижна плазмидна ДНК се извършва с автоматизирания флуоресцентен ДНК-секвенатор ABI317 (Applied Biosystems, Foster City, California), като се използват стандартни протоколи за белязани с багрило дидезоксинуклеозидтрифосфатни терминатори (цветни терминатори) и обичайно синтезираните праймери за напредване по веригата (Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**:5463-5467 [1977]; Smith *et al.*, *Nature*, **321**:674-679 [1986]). Директно секвениране на амплифицираните чрез

полимеразна верижна реакция фрагменти от плазмиди се провежда със секвенатора ABI373 като се използват реакции с обичайните праймери и цветни терминатори. Едноверижна матрица се получава с вектора M13 Janus (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin) (Burland *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **21**:3385-3390 [1993]). Фрагментите BamHI-XbaI (1,15 кн) и BamHI (0,65 кн) се изолират от плазмиди pDR2-FL2b, краищата се запълват с T4 ДНК-полимераза в присъствието на дезоксинуклеотиди и след това се субклонират в SmaI-мястото на M13 Janus. Секвенирането се извършва по стандартни протоколи за белязани с багрило M13 универсални и обратни праймери или чрез праймери за напредване по веригата и цветни терминатори. Ръчните реакции за секвениране се извършват върху едноверижна M13-ДНК чрез използване на праймери за напредване по веригата и стандартния протокол за терминация с дидезоксинуклеотиди ((Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**:5463-5467 [1977]), ³²P-белязан α -dATP и секвеназа (Sequenase) (United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio). Сглобяването на ДНК-последователността се извършва със Sequencher V2.1b12 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan). Нуклеотидната и изведената от нея последователност на hML са дадени на **Фиг. 1** (SEQ ID NO:1).

ПРИМЕР 8

Изолиране на гена за човешки *trpI*-лиганд (TPO)

Човешки геномни ДНК-клонове на TPO-гена се изолират чрез скриниране на човешка геномна библиотека в lambda-Gem12 с pR45 - преди това описана олигонуклеотидна сонда, при условия на ниска строгост (**виж Пример 7**) или при условия на висока строгост с фрагмент, съответстващ на 3'-половината от човешка кДНК, кодираща *trpI*-лиганда (от BamHI-мястото до 3'-края). Изолират се два припокриващи се ламбда-клонове, покриващи 35 кн. Двата припокриващи се фрагмента (BamHI и EcoRI), съдържащи целия TPO-ген се субклонират и секвенират. Структурата на човешкия ген е съставена от 6 екзона в рамките на 7 кн генома ДНК (**Фиг. 14 А, В и С**). Свързващите области на всички връзки екзон/интрон се съгласуват с консенсусния мотив, установен за гените на бозайници (Shapiro, M. B., *et al.*, *Nucl. Acids Res.* **15**:7155 [1987]). Екзон 1

и екзон 2 съдържат 5'-нетранслираща се последователност и първите четири аминокиселини от сигналния пептид. Останалата част от секреторния сигнал и първите 26 аминокиселини от зрелия белтък се кодират от екзон 3. Целият карбоксилен домен и 3'-нетранслиращата се област, както и около 50 аминокиселини от еритропоетиноподобния домен, се кодират от екзон 6. Четирите аминокиселини, включени в делецията, наблюдавана в hML-2 (hTPO-2), се кодират в 5'-края на екзон 6.

ПРИМЕР 9

Транзитна експресия на човешки *mpl*-лиганд (hML)

За да се субклонира пълноразмерният инсерт, съдържащ се в pDR2-FL2b, плазмидът се смила напълно с XbaI и след това се смила частично с BamHI. ДНК-фрагмент, съответстващ на инсерта от 1,8 кн се пречиства от гел и се субклонира в pRK5 (pRK5-*hmpl* I) (виж патент на САЩ No. 5 258 287 за конструирането на pRK5) под контрола на непосредствено ранния промотор на цитомегаловируса. ДНК от конструкцията pRK5-*hmpl* I се получава по метода с PEG (полиетиленгликол) и се трансфектира в човешки ембрионални бъбречни 293-клетки, които се култивират в модифицирана от Dulbecco среда на Eagle (DMEM), допълнена с хранителната смес F-12, 20 mM HEPES (pH 7.4) и 10% фетален говежди серум. Клетките се трансфектират чрез калциево-фосфатния метод, както е описано от (Gorman, C. [19985] в *DNA Cloning: A Practical Approach* (Glover, D. M., ed) Vol. II, pp. 143-190, IRL Press, Washington, D. C.). 36 часа след трансфекцията надстоящата течност от трансфектираните клетки се тестира за активност чрез теста за пролиферация (виж **Пример 1**). Надстоящата течност от 293-клетките, трансфектирани само с вектора pRK, не показва стимулиране на Ba/F3 или на Ba/F3-*mpl*-клетките (**Фиг. 12A**). Надстоящата течност от клетките, трансфектирани с pRK5-*hmpl* I, няма ефект върху Ba/F3-клетките, но стимулира драстично пролиферацията на Ba/F3-*mpl*-клетките (**Фиг. 12A**), което означава, че тази кДНК кодира функционално активен човешки *mpl*-лиганд.

ПРИМЕР 10

Изоформи на човешкия *trp*-лиганд *hML2*, *hML3* и *hML4*

За да се идентифицират форми на *hML*, резултат от алтернативен сплайсинг, се синтезират праймери, съответстващи на всеки край от кодиращата последователност на *hML*. Тези праймери се използват в RT-PCR за амплификация на човешка чернодробна РНК от възрастен. Допълнително се конструират вътрешни праймери, фланкиращи избрани области, представляващи интерес, (виж по-долу) и се използват по подобен начин. Директното секвениране на краищата на ПВР-продукта разкрива единствена последователност, съответстваща точно на последователността на кДНК, изолирана от човешката библиотека от фетален черен дроб (виж **Фиг. 1** [SEQ ID NO:1]). Област обаче, близо до С-края на ЕРО-домена (в средата на ПВР-продукта) показва комплексна последователност, което указва на наличието на възможни варианти за сплайсинг в тази област). За изолирането на тези сплайсингови варианти се използват праймерите, дадени в **Таблица 7**, които фланкират областта, представляваща интерес. Те се използват в ПВР като матрици за човешка кДНК от черен дроб на възрастен.

ТАБЛИЦА 7

ПВР-праймери за изоформи на човешкия *ML*

phmpilcdna.3e1:	5'TGTGGACTTTAGCTTGGGAGAATG3'	(SEQ ID NO: 45)
pbx4.f2:	5'GGTCCAGGGACCTGGAGGTTTG3'	(SEQ ID NO: 46)

ПВР-продуктите се субклонират с подравнени краища в M13. Секвенирането на индивидуални субклонове разкрива наличието на най-малко 3 *ML*-изоформи. Една от тях, *hML* (означавана също като *hML332*), е най-дългата форма и съответствува точно на последователността, изолирана от библиотеката от фетален черен дроб. Последователностите на четирите *trp*-лигандни изоформи, изредени от най-дългата (*hML*) към най-късата (*hML-4*), са дадени на (**Фиг. 11** [SEQ ID NOS: 6, 8, 9 & 10]).

ПРИМЕР 11

**Конструиране и транзитна експресия на изоформи и на
субституционни варианти на човешкия trpI-лиганд**

hML2, hML3 и hML(R153A, R154A)

Изоформите hML2 и hML3 и субституционният вариант hML(R153A, R154A) се реконструират от hML като се използва рекомбинантната ПВР-техника, описана от Russell Higuchi, в PCR Protocols, *A guide to Methods and Applications*, Acad. Press, M.A.Innis, D.H.Gelfand, J.J.Sninsky & T.J. White Editors.

Използуваните във всички конструкции "външни" праймери са показани в Таблица 8, а "припокриващите се" праймери са показани в Таблица 9.

ТАБЛИЦА 8

Външни праймери

Cla.FL.F2:	
5'ATC GAT ATC GAT AGC CAG ACA CCC CGG CCA G3'	(SEQ ID NO: 47)
HMPLL-R:	
5'GCT AGC TCT AGA CAG GGA AGG GAG CTG TAC ATG AGA3'	(SEQ ID NO:48)

ТАБЛИЦА 9

Припокриващи се праймери

hML-2:	
MLΔ4.F: 5'CTC CTT GGA ACC CAG GGC AGG ACC3'	(SEQ ID NO: 49)
MLΔ4.R: 5'GGT CCT GCC CTG GGT TCC AAG GAG3'	(SEQ ID NO: 50)
hML-3:	
hMLΔ116+: 5'CTG CTC CGA GGA AAG GAC TTC TGG ATT3'	(SEQ ID NO:51)
hMLΔ116-: 5'AAT CCA GAA GTC CTT TCC TCG GAG CAG3'	(SEQ ID NO:52)
hML(R153A, R154A):	
RR-KO-F: 5'CCC TCT GCG TCG CGG CGG CCC CAC CCA C3'	(SEQ ID NO:53)
RR-KO-R: 5'GTG GGT GGG GCC GCC GCG ACG CAG AGG G3'	(SEQ ID NO:54)

Всички ПВР-амплификации се провеждат с клонирана ДНК-полимераза Pfu (Stratagene) при използване на следните условия: Първоначалната температура на денатурация е 94°C за 7 мин, следвана от 30 цикъла от 1 мин на

94°C, 1 мин на 55°C и 1,5 мин на 72°C. Последният цикъл се оставя да продължи за 10 мин на 72°C. Крайният ПВР-продукт се смила с ClaI-XbaI, пречиства се от гел и се клонира в pRK5tkneo. 293-клетки се трансфектират с различните конструкции, както е описано по-горе, и надстоящата течност се тестира като се използва Ba/F3-*mpl* пролиферационния тест. В този тест hML-2 и hML-3 не показват детектируема активност, но активността на hML(R153A, R154A) е сходна с hML, което посочва, че процесингът в това дибазично място не е необходим за активността (виж Фиг. 13).

ПРИМЕР 12

кДНК на миши *mpl*-лиганд

mML, mML-2 и mML-3

Изолиране на mML кДНК

ДНК-фрагмент, съответстващ на цялата кодираща област на мишия *mpl*-лиганд, се получава чрез ПВР, пречиства се от гел и се бележи чрез инициране на синтеза със случайни праймери в присъствието на ³²P-dATP и ³²P-dCTP. Тази сонда се използва за скриниране на 10⁶ клона от миша чернодробна кДНК-библиотека в lambdaGT10 (Clonetech кат.# ML3001a). Филтри в по две повторения се хибридизират в 35% формамид, 5xSSC, 10xDenhardt's, 0,1% SDS, 0,05M натриев фосфат (pH 6,5), 0,1% натриев пироген, 100 мкг/мл озвучена ДНК от сперма на съомга в присъствието на сондата. Филтрите се изплакват с 2xSSC и след това се измиват веднъж в 0,5xSSC, 0,1% SDS на 42°C. Хибридиращите фаги се пречистват от плаки и кДНК-инсертите се субклонират в EcoRI-мястото на Bluescript SK- плазмид. Клон "LD" с инсерт от 1,5 кн се избира за по-нататъшен анализ и двете вериги се секвенират, както е описано по-горе за човешката ML кДНК. Нуклеотидната и изведената аминокиселинна последователности на клон LD са дадени във Фиг. 14 (SEQ ID NOS: 1 & 11). Изведената миша ML-последователност от този клон е дълга 331 аминокиселинни остатъци и се идентифицира като mML₃₃₁ (или mML-2 за целите, описани по-долу). Наблюдава се значителна идентичност, както в нуклеотидната, така и в

изведената аминокиселинна последователности в ЕРО-подобните домени на тези ML's. При успоредно налагане на изведените аминокиселини последователности на човешкия и на мишия ML, обаче, изглежда че мишата последователност има тетрапептидна делеция между човешките остатъци 111-114, съответстваща на 12-нуклеотидната делеция след нуклеотидна позиция 618, наблюдавана както в човешката (виж по-горе), така и в свинската (виж по-долу) кДНК. В съгласие с това се изследват допълнителни клонове за откриване на възможни миши ML-изоформи. Един клон, "L7", има инсерт от 1,4 кн с 335 изведена аминокиселинна последователност, съдържащ "липсващия" тетрапептид LPLQ. Смята се, че тази форма представлява пълноразмерния миши ML и се означава като mML или mML₃₃₅. Нуклеотидната и изведената аминокиселинна последователност на mML са дадени във **Фиг. 16** (SEQ ID NOS: 12 & 13). Най-накрая клон "L2" се изолира и секвенира. Този клон има 116-нуклеотидната делеция, съответстваща на hML3 и поради това се означава mML-3. Сравнение на изведените аминокиселинни последователности на тези две изоформи е дадено във **Фиг. 16**.

Експресия на рекомбинантен mML. Експресионните вектори за миши ML се приготвят главно, както е описано в **Пример 8**. Клоновете, кодиращи mML и mML-2 се субклонират в pRK5tkneo, експресионен вектор за бозайници, който обезпечава експресия под контрола на CMV-промотора и SV40-сигнал за полиаденилиране. Получените експресионни вектори, mMLpRKtkneo и mML2pRKtkneo се трансфектират транзитно в 293-клетки като се използва методът с калциев фосфат. След транзитната трансфекция средите се култивират за 5 дни. Клетките се поддържат в DMEM-среда с високо съдържание на глюкоза, допълнена с 10% фетален телешки серум.

Експресия на миши mpl (mtp1) в Ba/F3-клетки. Стабилни клетъчни линии, експресиращи c-mpl, се получават чрез трансфекция на mtp1 pRKtkneo, главно както е описано за човешкия mpl в **Пример 1**. Накратко, експресионен вектор (20 мкг; линеаризиран), съдържащ цялата кодираща последователност на мишия mpl (Skoda, R. C., et al., EMBO J. 12:2645-2653 [1993] се трансфектира в Ba/F3-клетки чрез електропорация (5 X 10⁶ клетки, 250 волта, 960 мкФ), с

последваща селекция за неомицинова устойчивост при 2 мг/мл G418. Експресията на *mpl* се тестира чрез проточен цитометричен анализ като се използват заешки антимиши *mpl*-IgG антисеруми. Ва/F3-клетките се поддържат в среди RPMI 1640 от WENI-3В-клетки като източник на IL-3. Надстоящите течности от 293-клетките, трансфектирани транзитно с mML и mML-2, се тестват в Ва/F3-клетки, трансфектирани с *tmpl* и *hmpl*, както е описано в **Пример 1**.

ПРИМЕР 13

кДНК на свински *mpl*-лиганд

pML и pML-2

кДНК на свински ML (pML) се изолира чрез RACE PCR (ПВР). Накратко, проектират се олиго dT-праймер и 2 специфични праймера на основата на последователността на екзона на свинския ML-ген, кодиращ аминокрая на ML, пречистен от апластичен свински серум. Получава се и се амплифицира кДНК от различни апластични свински тъкани. В бъбрека се открива ПВР-кДНК-продукт от 1342 и се субклонира. Секвенират се няколко клона и се намира, че те кодират зрял свински *mpl* лиганд (невключващи пълния сигнал за секреция). Намира се, че кДНК кодира зрял белтък от 332 аминокиселини (pML₃₃₂), имащ последователността, показана във **Фиг. 18** (SEQ ID NOS: 9 & 16).

Метод: Изолиране на pML-ген и кДНК. Геномни клонове на свинския ML-ген се изолират чрез скриниране на свинска геномна библиотека в EMBL3 (Clontech Inc.) с pR45. Библиотеката се скринира главно, както е описано в **Пример 7**. Изолират се няколко клона и се секвенира екзона, кодиращ аминокиселинна последователност, идентична с тази, получена от пречистения ML. Свински ML кДНКи се получават, като се използва модифициран протокол за RACE-PCR. Проектират се два специфични праймера на основата на последователността на свинския ML-ген. Полиаденилирана мРНК се изолира от бъбреците на апластични прасета в общи линии така, както е описано по-рано. кДНК се получава чрез обратна транскрипция с BamdT-праймера,

(BamdT: 5'GACTCGAGGATCCATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT3')

(SEQ ID NO: 55)

насочен срещу полиаденозиновата опашка на мРНК. Първи етап на ПБР-амплификация (28 цикъла на 95°C за 60 секунди, 58°C за 60 секунди и 72°C за деветдесет секунди) се провежда като се използва специфичния за ML праймер h-forward-1

(h-forward-1: 5'GCTAGCTCTAGAAATTGCTCCTCGTGGTCATGCTTCT3'

(SEQ ID NO: 43)

и BAMAD-праймера

(BAMAD: 5'GACTCGAGGATCCATCG3')

(SEQ ID NO: 56)

в 100 мкл реакция (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 8,0, 0,2 mM dNTPs с 0,05 E/мл полимераза Amplitaq [Perkin Elmer Inc.]). След това ПБР-продуктът се смила с ClaI, екстрахира се с фенол-хлороформ (1:1), утаява се с етанол и се лигира към 0.1 мг вектор Bluescript SK- (Stratagene Inc.), който е срязан с ClaI и KpnI. След инкубиране два часа на стайна температура една четвърт от лигазната смес се прибавя директно във втори етап на ПБР (22 цикъла, както е описано по-горе) като се използва втори специфичен за ML праймер forward-1

(forward-1: 5'GCTAGCTCTAGAAGCCCGGCTCCTCCTGCCTG3')

(SEQ ID NO: 57)

и T3-21 (олигонуклеотид, който се свързва с последователност, съседна на полилинкерната област за клониране във вектора Bluescript SK-):

(5'CGAAATTAACCCTCACTAAAG3')

(SEQ ID NO:58).

Полученият ПБР-продукт се смила с XbaI ClaI и се субклонира в Bluescript SK-.

Секвенират се няколко клона от независими ПБР-реакции.

Отново се идентифицира втора форма, означена rML-2, кодираща белтък с делеция на 4 аминокиселинни остатъци (328 аминокиселинни остатъци) (виж Фиг. 21 [SEQ ID NO: 21]). Сравняването на аминокиселинните последователности на rML и rML-2 показва, че последната форма е идентична с изключение на това, че тетрапептидът QLPP, съответстващ на остатъци 111-114 включително, е

делетиран (виж Фиг. 22 [SEQ ID NOS: 18 & 21]). Делециите на четири аминокиселини, наблюдавани в миша, човешка и свинска ML кДНК се срещат точно на едно и също място в предсказаните белтъци.

ПРИМЕР 14

СМК-тест за тромбопоетина (TPO) индукция на експресията на тромбоцитния антиген GPIIb/IIIa

СМК-клетки се култивират в среда RPMI 1640 (Sigma), допълнена с 10% фетален говежди серум и 10 mM glutamin. При приготвянето за теста клетките се събират, промиват се и се ресуспендират до 5×10^5 клетки/мл в безсерумна среда GIF, допълнена с 5 mg/l говежди инсулин, 10 mg/l апо-трансферин, 1 X следови елементи. В 96-ямкови платета с плоско дъно се прибавят TPO-стандарт или експерименталните проби в съответни разреждания в обеми от 100 мкл. Към всяка ямка се добавят по 100 мкл от СМК-клетъчната суспензия и платетата се инкубират на 37°C в 5% CO₂ инкубатор за 48 часа. След инкубацията платетата се завъртат на 1000 об/мин при 4°C за пет минути. Надстоящите течности се отстраняват и към всяка ямка се прибавят по 100 мкл от конюгираното с FITC GPIIb/IIIa моноклонално 2D2-антитяло. След инкубиране на 4°C за 1 час платетата отново се завъртат на 1000 об/мин за пет минути. Надстоящите течности, съдържащи несвързано антитяло се отстраняват и към всяка ямка се добавят по 200 мкл промивка от 0,1% BSA-PBS. Стъпката на промивка с 0,1% BSA-PBS се повтаря три пъти. Клетките след това се анализират на FASCAN като се използва стандартният анализ на един параметър, измервайки относителната интензивност на флуоресценция.

ПРИМЕР 15

DAMI-тест за тромбопоетин (TPO) чрез измерване на ендомитотичната активност на DAMI-клетки в 96-ямкови микротитърни платета

DAMI-клетки се култивират в IMDM + 10% конски серум (Gibco), допълнен с 10 mM glutamin, 100 ng/ml Penicillin G и 50 mcg/ml стрептомицин. При подготовката за теста клетките се събират, промиват се и се ресуспендират до

1×10^6 клетки/мл в IMDM + 1% конски серум. В 96-ямкови платета със заоблено дъно към DAMI-клетъчната суспензия се прибавят 100 мкл от TPO-стандарта и от експерименталните проби. След това клетките се инкубират 48 часа на 37°C в 5% CO_2 -инкубатор. След инкубирането платетата се завъртат в центрофуга Sorvall 6000B на 1000 об/мин за 5 мин на 4°C . Надстоящите течности се отстраняват и стъпката на промивка с 200 мкл PBS-0,1%BSA се повтаря два пъти. Клетките се фиксират чрез прибавяне на 200 мкл ледено-студен 70% етанол-PBS и се ресуспендират чрез аспириране. След инкубиране на 4°C за 15 мин платетата се завъртат на 2000 об/мин за пет минути и към всяка ямка се прибавят 150 мкл 1 мг/мл RNase, съдържащи 0,1 мг/мл пропидиев йодид и 0,05% Tween-20. След един час инкубация на 37°C промените в съдържанието на ДНК се измерват чрез проточна цитометрия. Полиплоидността се изчислява, както следва:

$$\text{NAR} = \frac{(\% \text{клетки в } >G2+M / \% \text{клетки в } <G2+M) \text{ с TPO}}{(\% \text{клетки в } >G2+M / \% \text{клетки в } <G2+M) \text{ в контролата,}}$$

където NAR означава "нормализирано полиплоидно отношение" (NAR)

ПРИМЕР 16

In vivo тест за тромбopoетин (TPO)

(Тест "рикошет" на миши тромбоцити)

In vivo тест за ^{35}S -детерминация на образуването на тромбоцити

C57BL6-мишки (получени от Charles River) се инжектират интраперитонеално (IP) с 1 мл кози серум срещу миши тромбоцити (6 ампули) на първия ден, за да се предизвика тромбоцитопения. На 5-тия и 6-тия ден на мишките се правят две IP-инжекции с фактора или с PBS като контрола. На 7-мия ден се инжектират интравенозно тридесет мкКи $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ в 0,1 мл физиологичен разтвор и процентът включване на ^{35}S от инжектираната доза в циркулиращите тромбоцити се измерва в кръвни проби, получени от третираните и от контролните мишки. В същото време се правят тромбоцитните числа и левкоцитните числа на кръв, получена от ретроорбиталния синус.

ПРИМЕР 17

KIRA-ELISA за тромбопоетин (TPO) чрез измерване на фосфорилирането на *mpl-Rse.gD* химерния рецептор

Човешкият *mpl*-рецептор е представен от Vigon *et al.*, *PNAS, USA* 89:5640-5644 (1992). За използване в KIRA-ELISA, описан тук, се приготвя химерен рецептор, включващ екстрацелуларния домен (ECD) на *mpl*-рецептора и трансмембранный (TM) и интрацелуларен домен (ICD) на Rse (Mark *et al.*, *J. of Biol. Chem.* 269(14):10720-10728 [1994] с карбокситерминален сигнализиращ полипептид (т.е. Rse.gD). Виж Фиг. 30 и 31 за описанието на теста чрез диаграма.

(a) Приготвяне на улавящ агент

Продуцира се моноклонално анти-gD (клон 5B6) срещу пептид от гликопротеин D на вируса *Hepres simplex* (Paborsky *et al.*, *Protein Engineering* 3(6):547-553 [1990]). Пречистеният концентриран препарат се довежда до 3,0 мг/мл във фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS), pH 7,4 и аликвоти от по 1,0 мл се съхраняват на -20°C.

(b) Приготвяне на антифосфотирозиново антитяло

Моноклонално антитирозиново (антитяло), клон 4G10, се закупува от UBI (Lake Placid, NY) и се биотинилира чрез използване на биотин-N-хидроксисукцинамид с дълго рамо (Biotin-X-NHS, Research Organics, Cleveland, OH).

(c) Лиганд

Mpl-лигандът се приготвя чрез рекомбинантните техники, описани тук. Пречистеният *mpl*-лиганд се съхранява на 4°C като концентриран-разтвор.

(d) Приготвяне на Rse.gD нуклеинова киселина

Използват се синтетични двойноверижни олигонуклеотиди за реконституиране на кодиращата последователност за С-крайните 10 аминокиселини (880-890) на човешкия Rse и за добавяне на допълнителни 21 аминокиселини, съдържащи епитоп за антитяло 5B6 и на стоп-кодон. Таблица 10 представя крайната последователност на синтетичната част от слетия ген.

ТАБЛИЦА 10

Синтетична двойноверижна част от човешкия Rse слят ген

кодираща верига:

5'-TGCAGCAAGGGCTACTGCCACACTCGAGCTGCGCAGATGCTAGCCTCAAGA
TGGCTG ATCCAAATCGATTCCGCGGCAAAGATCTTCCGGTCCTGTAGAAGCT-3'
(SEQ IDNO: 59)

некодираща (антисенс) верига:

5'-AGCTTCTACAGGACCGGAAGATCTTTGCCGCGGAATCGATTTGGATCAGCCA
TCTTGAGGCTAGCATCTGCGCAGCTCGAGTGTGGCAGTAGCCCTTGCTGCA-3'
(SEQIDNO:60)

Синтетичната ДНК се лигира с кДНК, кодираща аминокиселини 1-880 на човешкия Rse в PstI-мястото, започващо при нуклеотид 2644 от публикуваната кДНК-последователност на човешкия Rse (Mark *et al.*, *Jouranl of Bilolgical Chemistry* **269(14)**:10720-10728 [1994]) и в HindIII-местата в полилинкера на експресионния вектор pSV17.ID.LL (Виж **Фиг. 32 A-L**; SEQ ID NOL 22), за да се получи експресионният плазмид pSV.ID.Rse.gD. Накратко, експресионният плазмид включва дицистронен първичен транскрипт, който съдържа последователност, кодираща DHFR, присъединена посредством 5'-донорно и 3'-акцепторно място за интронен сплайсинг, следвана от последователност, която кодира Rse.gD. Пълноразмерният (не претърпял сплайсинг) транскрипт съдържа DHFR като първа отворена рамка за четене и поради това образува DHFR-белтък, който позволява селекция на стабилни трансформанти.

(е) Приготвяне на mpl-Rse.gD нуклеинова киселина

Експресионният плазмид pSV.ID.Rse.gD, получен, както е описано по-горе, се модифицира, за да се получи плазмида pSV.ID.M.tmRd6, който съдържа кодиращата последователност на ECD на човешкия *mpl* (аминокиселини 1-491), слята с трансмембранный домен и интрацелуларния домен на Rse.gD (аминокиселини 429-911). Използват се синтетични олигонуклеотиди, за да се свърже кодиращата последователност на част от екстрацелуларния домен на човешкия *mpl* с част от Rse-кодиращата последователност в двустъпална ПВР-

клонираща реакция, както е описано от Mark *et al.*, *J. Biol. Chem.* **267**:26166-26171 (1992). Праймерите, използвани за първата ПВР-реакция са M1

(5'-TCTCGCTACCGTTTACAG-3')

(SEQ ID NO: 61)

и M2

(5'-CAGGTACCCACCAGGCGGTCTCGGT-3,)

(SEQ ID NO: 62)

с *mpl* кДНК-матрица и R1

(5'-GGGCCATGACACTGTCAA-3')

(SEQ ID NO: 63)

и R2

(5'-GACCGCCACCGAGACCGCCTGGTGGGTACCTGTGGTCCTT-3')

(SEQ ID NO: 64)

с Rse кДНК-матрица. Частта PvuII-SmaI от тази област на сливане се използва за конструирането на пълноразмерен химерен рецептор.

(f) Клетъчна трансформация

DP12.CHO-клетки (Европейски патент 307 247, публикуван на 15 март 1989) се електропорират с pSV.ID.M.tmRd6, който се линеаризира в уникалното NotI-място в гръбнака на плазмид. След екстракция с фенол/хлороформ ДНК се утаява с етанол и се ресспендира в 20 мкл 1/10 Tris EDTA. След това 10 мкг ДНК се инкубират с 10^7 CHO DP12-клетки в 1 мл PBS на лед за 10 мин преди електропорация при 400 волта и 330 мкФ. Клетките отново се поставят на лед за 10 мин преди да се посеят в неселективна среда. След 24 часа клетките се подхранват със среда без нуклеозиди, за да се отберат стабилни DHFR⁺ клонове.

(g) Селекция на трансформирани клетки за използване в KIRA-ELISA

Клонове, експресиращи *MPL/Rse.gD*, се идентифицират чрез Western-блотинг (имуноблотинг) на тотални клетъчни лизати след разделяне на SDS-PAGE като се използва антитялото 5B6, което детектира gD-епитопния белег.

(h) Среди

Клетките се култивират в F12/DMEM 50:50 (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, NY). Средите се допълват с 10% диафилтруван FBS (HyClone, Logan, Utah), 25 mM HEPES и 2 mM L-глутамин.

(i) KIRA-ELISA

DP12.CHO-клетки, трансформирани с *mpRse.gD*, се посяват (3×10^4 на ямка) в ямките на плоскодънни 96-ямкови културални платета в 100 мкл среда и се култивират през нощта на 37°C в 5% CO₂. На следващата сутрин надстоящата течност в ямките се декантира и платетата леко се изтръскват върху филтърна хартия. След това към всяка ямка се прибавят или изследваните проби или 200, 50, 12,5, 3,12, 0,87, 0,19, 0,048 или 0 нг/мл *mp*-лиганд. Клетките се стимулират на 37°C за 30 мин, надстоящата течност в ямките се декантира и платетата отново леко се обръщат и се изтръскват върху филтърна хартия. За да се лизират клетките и да се разтворят химерните рецептори, към всяка ямка се добавят 100 мкл лизиращ буфер. Лизиращият буфер се състои от 150 mM NaCl, съдържащ 50 mM HEPES (Gibco), 0,5% Triton-X 100 (Gibco), 0,01% тимерозал, 30 KIU/мл апротинин (ICN Biochemicals, Aurora, OH), 1 mM 4-(2-аминоетил)-бензенсулфонилфлуорид хидрохлорид (AEBSF; ICN Biochemicals), 50 мкМ леупептин (ICN Biochemicals) и 2 mM натриев ортованадат (Na₂VO₄; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), pH 7,5. След това платето се клати леко на клатачка за платета (Belco Instruments, Vineland, NJ) за 60 мин на стайна температура.

Докато клетките се разтварят, микротитърното плато за ELISA, натоварено през нощта на 4°C с моноклоналното антитяло 5B6 (5,0 мкг/мл в 50 mM карбонатен буфер, pH 9,6, 100 мкг/ямка) се декантира, изтръсква се върху филтърна хартия и се блокира със 150 мкл/ямка блокиращ буфер [PBS, съдържащ 0,5% BSA (Intergen Company, Purchase, NY) и 0,01% тимерозал] за 60 мин на стайна температура при леко клатене. След 60 минути платето, натоварено с анти-gD 5B6 се промива 6 пъти с миеш буфер (PBS, съдържащ 0,05% Tween-20 и 0,01% тимерозал) като се използва автоматично миешо устройство за платета (ScanWasher 300, Skatron Instruments, Inc, Sterling, VA).

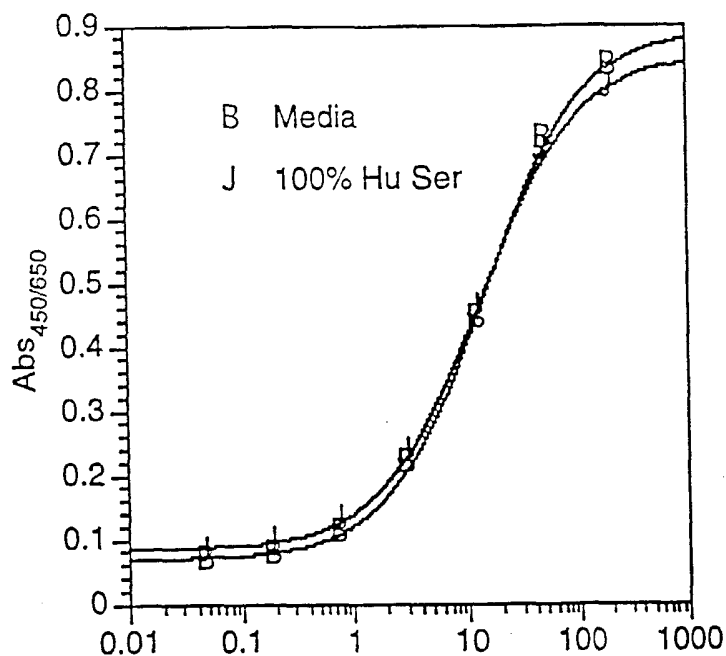
Лизатът, съдържащ разтворен MPL/Rse.gD, от клетъчнокултуралните микротитърни ямки се прехвърля (85 мкл/ямка) в ELISA-ямките, натоварени с анти-gD 5B6 и блокирани, и се инкубира 2 часа на стайна температура при леко разклащане. Несвързаният *mpl*-Rse.gD се отстранява чрез промиване с миеш буфер и към всяка ямка се добавят 100 мкл биотинилирано 4G10 (антифосфотирозиново антитяло), разредено 1:18 000 в буфер за разреждане (PBS, съдържащ 0,5% BSA, 0,05% Tween-20, 5 mM EDTA и 0,01% тимерозал), т.е. 56 нг/мл. След инкубиране 2 часа на стайна температура платето се промива и към всяка ямка се прибавят 100 мкл стрептавидин, конюгиран с пероксидаза от хрян (HRPO) (Zymed Laboratories, S. San Francisco, CA), разреден 1:60000 в буфер за разреждане. Платето се инкубира 30 минути на стайна температура при леко разклащане. Свободният авидинов конюгат се отмива и към всяка ямка се прибавят 100 мкл прясно приготвен субстратен разтвор (тетраметилбензидин [TMB]; 2-компонентен субстратен набор реагенти; Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD). Реакцията се оставя да продължи 10 минути, след което цветното проявяване се спира чрез добавяне на 100мкл/ямка 1,0 M H_3PO_4 . Поглъщането на 450 nm се прочита при референтна дължина на вълната от 650 nm ($\text{ABS}_{450/650}$) като се използва апарат за прочитане на платета Vmax (Molecular Devices, Palo Alto, CA), който се командва от Macintosh Centris 650 (Apple Computers, Cupertino, CA) и програмен продукт DeltaSoft (BioMetallics, Inc, Princeton, NJ).

Стандартната крива се получава чрез стимулиране на dp12.trkA,B- или C.gD-клетки с 200, 50, 12,5 3,12, 0,78, 0,19, 0,048 или 0 нг/мл *mpl*-лиганд и се представя като нг/мл TPO срещу средно $\text{ABS}_{450/650} \pm \text{sd}$, като се използва програмата DeltaSoft. Концентрациите на пробите се получават чрез интерполация на тяхното поглъщане върху стандартната крива и се изразяват като нг/мл TPO-активност.

Намира се, че *mpl*-лигандът е способен да активира химерния рецептор *mpl*-Rse.gD по начин, зависещ от концентрацията и от специфичността на лиганда. Освен това, намира се, че Rse.gD KIRA-ELISA толерира до 100%

човешки серум (показано е) или 100% плазма (не е показано), което позволява този тест да се използва за лесно скриниране на пациенти и рК-проби.

СТАНДАРТНА КРИВА С ТРО₃₃₂ ПОЛУЧЕН ОТ 293-КЛЕТКИ



КОНЦЕНТРАЦИЯ НА ТРО (нг/мл)

В-среда; J-100% човешки серум

Обобщение на стойностите EC50 за ТРО

ТРО от (клетки)	EC50 (тегло/обем)	EC50 (моларност)
Hu TPO 332 (293)	2,56 нг/мл	67,4 пМ
Mu TPO 332 (293)	3,69 нг/мл	97,1 пМ
Hu TPO 153 (293)	~ 41 нг/мл	~ 1,08 нМ
Hu TPO 155 (<i>E. coli</i>)	0,44 нг/мл	11,6 пМ
Hu TPO 153met (<i>E. coli</i>)	0,829 нг/мл	21,8 пМ

ELISA за тромбопоетин (TPO) на основата на рецептор

ELISA-платета се натоварват със заешко F(ab')₂ античовешко IgG (Fc) в карбонатен буфер с pH 9,6 на 4°C през нощта. Платетата се блокират с 0,5% говежди серумен албумин в PBS на стайна температура за един час. Към платетата се прибавя химерен рецептор *mp-IgG*, продукт на ферментация, и се инкубира 2 часа. Към платетата се прибавят двукратни серийни разреждания (0,39-25 нг/мл) от стандартния TPO (TPO₃₃₂, продуциран в 293-клетки с концентрация, определена чрез количествен аминокиселинен анализ) и серийно разредени проби в 0,5% говежди серумен албумин, 0,05% Tween-20 и се инкубира 2 часа. Свързаният TPO се детектира с протеин-A-пречистени биотинилирани заешки антитела срещу TPO₁₅₅, който е продуциран в *E. coli* (1 час инкубация), последвано от стрептавидин-пероксидаза (30 мин инкубация) и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин като субстрат. Поглъщането се чете на 450 нм. Между стъпките платетата се промиват. За анализ на данните стандартната крива се построява като се използва програмата на Kaleidagraph за напасване на кривата по четири параметъра.

ПРИМЕР 19

Експресия и пречистване на TPO от 293-клетки

1. Приготвяне на вектори за експресия в 293-клетки

кДНК, съответстваща на цялата отворена рамка за четене на TPO, се получава чрез ПВР като се използват следните олигонуклеотиди като праймери:

ТАБЛИЦА 11

293-ПВР-праймери

Cla.FL.F: 5'ATC GAT ATC GAT CAG CCA GAC ACC CCG GCC AG3'
(SEQ ID NO: 65)

hmpII-R: 5' GCT AGC TCT AGA CAG GGA AGG GAG CTG TAC ATG AGA3'
(SEQ ID NO: 48)

Като матрица в реакцията се използва PRK5-hmp/I (описан в **Пример 9**) в присъствието на рfu ДНК-полимераза (Stratagene). Първоначалната денатурация е за 7 мин на 94°C, следвана от 25 цикъла на амплификация (1 мин на 94°C, 1 мин на 55°C и 1 мин на 72°C). Крайното удължаване е за 15 мин на 72°C. ПВР-продуктът се пречиства и клонира между рестриктазните места ClaI и XbaI на плазмида pRK5tkneo, вектор произведен на pRK5 и модифициран за експресия на ген за неомицинова устойчивост под контрола на тимидинкиназния промотор за получаване на вектора pRK5tkneo.ORF. Втора конструкция, съответстваща на еро-хомоложния домен се получава по същия начин, но като се използва Cla.FL.F като прав праймер и следния обратен праймер:

Arg.STOP.Xba: 5'TCT AGA TCT AGA TCA CCT GAC GCA GAG GGT GGA CC3'

(SEQ ID NO: 66)

Крайната конструкция се нарича pRK5-tkneoEPO-D. Последователността на двете конструкции се потвърждава, както е описано в **Пример 7**.

2. Трансфекция на човешки ембрионални бъбречни клетки

Тези две конструкции се трансфектират в човешки ембрионални бъбречни клетки чрез CaPO₄-метода, както е описано в **Пример 9**. 24 часа след трансфекцията в присъствието на G418 започва селекцията на клонове, устойчиви на неомицин. 10 до 15 дни по-късно в 96-ямкови платета се прехвърлят индивидуални клонове и се оставят да растат до конfluентност. Експресията на ML₁₅₃ или ML₃₃₂ в културалните среди от тези клонове се тестира като се използва Ba/F3 пролиферационният тест (описан в **Пример 1**).

3. Пречистване на rhML₃₃₂

Хранителна среда от 293-rhML₃₃₂ се нанася на колона Blue-Sepharose (Pharmacia), която е уравновесена с 10 mM натриев фосфат pH 7,4 (буфер А). Колоната се промива последователно с 10 обема на колоната буфер А и буфер В, съдържащи 2 M урея. След това колоната се елуира с буфер А, съдържащ 2M урея и 1M NaCl. Обединеният елуат от колоната Blue-Sepharose след това директно се нанася на колона WGA-Sepharose, уравновесена с буфер А. След това колоната WGA-Sepharose се промива с 10 обема на колоната буфер А,

съдържащ 2М урея и 1М NaCl и се елуира със същия буфер, съдържащ 0,5М N-ацетил-D-глюкозамин. Елуатът от колоната WGA-Sepharose се нанася на колона за HPLC C4 (Synchrom, Inc.), уравновесена с 0,1% TFA. Колоната C4-HPLC се елуира с прекъснат пропанолов градиент (0-25%, 25-35%, 35-70%). Намира се, че rhML₃₃₂ се елуира в областта на градиента от 28-39% пропанол). На SDS-PAGE пречистеният rhML₃₃₂ се движи като широка ивица в областта на гела от 68-80 кДа (виж **Фигура 15**).

4. Пречистяване на rhML₁₅₃

Хранителна среда от 293-rhML₁₅₃ се разделя на Blue-Sepharose, както е описано за rhML₃₃₂. Елуатът от Blue-Sepharose се нанася директно на *trp*-афинитетна колона, както е описано по-горе. RhML₁₅₃, елуиран от *trp*-афинитетната колона, се пречиста до хомогенност, като се използва колона C4-HPLC, хроматографирана при същите условия, както е описано за rhML₃₃₂. На SDS-PAGE пречистеният rhML₁₅₃ се разделя на 2 големи и 2 малки ивици с Mr от ~18 000-21 000 (виж **Фигура 15**).

ПРИМЕР 20

Експресия и пречистяване на TPO от CHO

1. Описание на векторите за експресия в CHO

Експресионните вектори, използвани в протокола за електропорация, описан по-долу, са означени:

pSV15.ID.LL.MLOFR (пълноразмерен или hTPO₃₃₂) и

pSV15.ID.LL.MLEPO (скъсен или hTPO₁₅₃).

По-съществените черти на тези плазмиди са представени във **Фиг. 23** и **24**.

2. Приготвяне на вектори за експресия в CHO

кДНК, съответстваща на цялата отворена рамка за четене на hTPO се получава чрез ПВР като се използват олигонуклеотидните праймери в **Таблица 12**.

ТАБЛИЦА 12

ПВР-праймери за CHO-експресионни вектори

Cla.FL.F2 5'ATC GAT ATC GAT AGC CAG ACA CCC CGG CCA G3'
(SEQ ID NO: 47)

ORF.Sal 5'AGT CGA CGT CGA CGT CGG CAG TGT CTG AGA ACC3'
(SEQ ID NO: 67)

Като матрица в реакцията се използва PRK5-hmp/1 (описан в **Пример 7 и 9**) в присъствието на pfu ДНК-полимераза (Stratagene). Първоначалната денатурация е за 7 минути на 94°C, следвана от 25 цикъла на амплификация (1 мин на 94°C, 1 мин на 55°C и 1 мин на 72°C). ПБР-продуктът се пречиства и клонира между рестриктазните места ClaI и SalI на плазмиди pSV15.ID.LL. за получаване на вектора pSV15.ID.LL.MLORF. Втора конструкция, съответстваща на ЕРО-хомоложния домен, се получава по същия начин, но като Cla.FLF2 се използва като прав праймер и следния обратен праймер:

EPOD.Sal 5'AGT CGA CGT CGA CTC ACC TGA CGC AGA GGG TGG ACC3'
(SEQ ID NO: 68)

Крайната конструкция се нарича pSV15.ID.LL.MLEPO-D. Последователността на двете конструкции се потвърждава, както е описано в **Пример 7 и 9**.

По същество, кодиращите последователности на пълноразмерния и скъсения лиганд се включват в полилинкерното клониращо място на CHO-експресионния вектор pSV15.ID.LL. Този вектор съдържа областта от SV40 на ранния промотор/инхансър, модифицирана единица за сплайсинг, съдържаща миша DHFR кДНК, полилинкерно клониращо място за въвеждане на гена, представляващ интерес (в този случай описаната ТРО-последователност), сигнал за полиаденилиране от SV40, начало за репликация и бета-лактамазния ген за плазмидна селекция и амплификация в бактерии.

3. *Методология за установяване на стабилни CHO-клетъчни линии, експресиращи рекомбинантен човешки ТРО₃₃₂ и ТРО₁₅₃*

а. Описание на CHO-родителската клетъчна линия

Гостоприемната CHO (яйчни клетки от Китайски хамстер) клетъчна линия, използвана за експресията на ТРО-молекулите, описани тук, е известна като CHO-DP12 (виж Европейски патент 307 247, публикуван на 15 март 1989).

Тази бозайнишка клетъчна линия се селектира клонално от трансфекция на родителската линия (CHO-K1 DUX-B11(DHFR)-), получена от Dr. Frank Lee от Станфордския университет с разрешението на Dr. Chasin) с вектор, експресиращ препроинсулин, за да се получат клонове с редуцирани изисквания за инсулин. Тези клетки също са DHFR минус и могат да се селектират клонове за наличието на DHFR кДНК-векторни последователности чрез култивиране върху среди, лишени от нуклеозидни добавки (глицин, хипоксантин и тимидин). Тази система за селекция на стабилно експресиращи CHO-клетъчни линии се използва широко.

b. Метод за селекция (електропорация)

Клетъчни линии, експресиращи TPO₃₃₂ и TPO₁₅₃, се получават чрез трансфекция на DP12-клетки посредством електропорация (виж напр., Andreason, G.L. *J. Tiss Cult. Meth.*, 15,56 [1993] с линеаризирани плазмиди, съответно pSV15.ID.LL.MLORF или pSV15.ID.LL.MLEPO-D. Залагат се три (3) реакционни смеси с рестрикционни ензими за всяко плазмидно срязване: 10 мкг, 25 мкг и 50 мкг от вектора с ензима NOTI по стандартни молекулярнобиологични методи. Това рестриктазно място се среща само веднъж във вектора в областта на линеаризиране в посока 3' и извън транскрипционната единица за TPO-лиганда (виж **Фиг. 23**). За инкубиране през нощта на 37 градуса се залагат реакции от 100 мкл. На следващия ден смесите се екстрахират веднъж с фенол-хлороформ-изоамилов алкохол (50:49:1) и се утаяват с етанол на сух лед за приблизително един час. Линеаризираната ДНК се ресуспендира в 50 мкл среда на Ham DMEM-F12 1:1, допълнена със стандартни антибиотици и 2 mM глутамин.

Култивираните като суспензия DP12-клетки се събират, промиват се веднъж в средата, описана за ресуспендирането на ДНК и накрая се ресуспендират в същата среда до концентрация 10^7 клетки на 750 мкл. Аликвоти от клетки (750 мкл) и всяка линеаризирана плазмидна смес се инкубират заедно на стайна температура за един час и след това се прехвърлят в камера за електропорация на BRL. След това всяка реакционна смес се електропорира в стандартен апарат за електропорация на BRL при 350 волта, нагласен на 330 мкФ

и ниско капацитивно съпротивление. След електропорацията клетките се оставят да престоят в апарата за 5 минути и след това на лед за допълнителни 10 минути инкубационен период. Електропорираните клетки се прехвърлят в 60 мм матраци за клетъчни култури, съдържащи 5 мл стандартна, пълна хранителна среда за CHO-клетки (DMEM-F12 с високо съдържание на глюкоза 50:50 без глицин, допълнена с 1XGHT, 2 mM glutамин и 5% фетален телешки серум) и се култивират през нощта в 5% CO₂ в инкубатор за клетъчни култури.

с. Метод за селекция и скриниране

На следващия ден клетките се отделят чрез трипсинизиране от платетата по стандартни методи и се прехвърлят в 150 мм матраци за тъканни култури, съдържащи DHFR-селективна среда (среда на Ham DMEM-F12 1:1, описана по-горе, допълнена с 2% или 5% диализиран фетален телешки серум, несъдържащ глицин, хипоксантин и тимидин - това е стандартната DHFR-селективна среда, която ние използваме). Клетките от всеки 60 мм матрак впоследствие се препосяват в 5/150 мм матраци. След това клетките се инкубират 10 или 15 дни (с една смяна на средата) на 37 градуса/5% CO₂, докато започнат да се забелязват клонове, достигнали подходящи размери за прехвърляне в 96-ямкови матраци. За период от 4-5 дни клетъчните линии се прехвърлят в 96-ямкови матраци като се използват стерилни жълти наконечници и пипета, нагласена на 50 мкл. Клетките се оставят да пораснат до конfluентност (образуване на плътен монослой) (обикновено 3-5 дни) и след това матраците се трипсинизират като се възпроизвеждат 2 копия от оригиналния матрак. Две от тези копия се съхраняват за кратко време във фризера като клетките във всяка ямка преди това се разреждат с 50 мкл 10%FCS в DMSO. Пробите от конfluентните ямки на третия матрак, култивирани 5 дни в среда без серум, се тестват за експресия на TPO чрез теста за активност, основаващ се на Ba/F-клетки. Клоновете с най-висока експресия на основата на този тест се "съживяват" от фризера и се размножават в 2 конfluентни 150 мм Т-матрака с цел прехвърлянето им към групата по клетъчни култури за адаптация в суспензия, повторно тестване и депозиране в банката.

d. Протокол за амплификация

Няколко от клетъчните линии с най-висок титър от селекцията, описана по-горе, се поставят в режим на стандартна амплификация върху метотрексат, за да се получат клонове с по-висок титър. Клоновете от СНО-клетки се размножават и се посяват в 10 см матраци при 4 концентрации на метотрексата (т.е. 50 нМ, 100 нМ, 200 нМ и 400 нМ) и при два или три броя на клетките (10^5 , 5×10^5 и 10^6 клетки на матрак). След това тези култури се инкубират на 37 градуса/5% CO₂, докато се установят клонове, подходящи за прехвърляне в 96-ямкови матраци за по-нататъшно тестиране. Няколко клона с висок титър от тази селекция отново се подлагат на по-високи концентрации метотрексат (т.е. 600 нМ, 800 нМ, 1000 нМ и 1200 нМ) и както преди се изчаква появата на устойчиви клонове, които след това се прехвърлят в 96-ямкови матраци и се тестват.

4. Култивиране на стабилни СНО-клетъчни линии, експресирани рекомбинантен човешки TPO₃₂₂ и TPO₁₅₃

Клетките, депозирани в банката, се размразяват и клетъчната популация се размножава чрез стандартни методи за клетъчно култивиране в среда, съдържаща или несъдържаща серум. След размножаване до достатъчна клетъчна плътност клетките се промиват за отстраняване на изчерпаната хранителна среда. След това клетките се култивират по някой от стандартните методи, включващи; еднократна култура, еднократна култура с подхранваща среда или непрекъснатата култура на 25-40°C, неутрално рН при съдържание на разтворения O₂ най-малко 5%, докато се натрупа конститутивно секретираният се ТРО. Клетъчнокултуралната течност след това се отделя от клетките по механичен начин, такъв като центрофугиране.

5. Пречистване на рекомбинантен човешки ТРО от СНО-културални течности

Събрана клетъчнокултурална течност (HCCF) се нанася директно върху бързопроточна колона Blue Sepharose 6 (Pharmacia), уравновесена с 0,01 М Na фосфат рН 7,4, 0,15 М NaCl при отношение приблизително 100 л HCCF на литър смола и при линейна проточна скорост приблизително 300 мл/ч/см². Колоната след това се промива с 3 до 5 обема на колоната уравновесяващ буфер,

последвано от 3 до 5 обема на колоната 0,01 M Na фосфат pH 7,4, 2 M урея. След това TPO се елуира с 3 до 5 обема на колоната 0,01 M Na фосфат pH 7,4, 1,0 M NaCl.

След това обединеният елуат от Blue Sepharose, съдържащ TPO, се нанася на колона Sepharose 6MB с прикачен лектин от пшенични зародиши (Pharmacia), уравновесена с 0,01 M Na фосфат pH 7,4, 2,0 M урея и 1,0 M NaCl при отношение от 8 до 16 мл елуат от Blue Sepharose на мл смола при проточна скорост 50 мл/ч/см². Колоната след това се промива с 2 до 3 обема на колоната уравновесяващ буфер. След това TPO се елуира с 2 до 5 обема на колоната 0,01 M Na фосфат pH 7,4, 2,0 M урея, 0,5 M N-ацетил-D-глюкозамин.

Обединеният елуат от последната колона (Sepharose 6MB с прикачен лектин от пшенични зародиши) след това се довежда до крайна концентрация 0,04% C₁₂E₈ и 0,1% трифлуороцетна киселина (TFA). Получената проба се нанася на обратнофазова колона C4 (Vydac 214TP1022), уравновесена с 0,1% TFA, 0,04% C₁₂E₈ при натоварване приблизително 0,2 до 0,5 мг белтък на мл смола и при проточна скорост 157 мл/ч/см².

Белтъкът се елуира чрез двуфазов линейен градиент на ацетонитрил, съдържащ 0,1%TFA, 0,04% C₁₂E₈. Първата фаза се състои от линейен градиент от 0 до 30% ацетонитрил за 15 мин. Втората фаза се състои от линейен градиент от 30 до 60% ацетонитрил за 60 минути. TPO се елуира при приблизително 50% ацетонитрил. На тази основа се обединяват пробите за SDS-PAGE.

Обединените C4 проби след това се разреждат с 2 обема 0,01 M Na фосфат pH 7,4, 0,15 M NaCl и се диафилтруват срещу приблизително 6 обема 0,01 M Na фосфат pH 7,4, 0,15 M NaCl върху ултрафилтрационна мембрана Amicon YM или подобна на нея с отрязък на молекулни тегла 10 000 до 30 000 Далтона. Полученият диафилтрат може след това директно да се обработва или да се концентрира допълнително чрез ултрафилтрация. Филтратът/концентратът се довежда до крайна концентрация 0,01% Tween-80.

Целият или част от диафилтрата/концентрата, еквивалентен на 2 до 5% от изчисления обем на колоната, след това се нанася на колона Sephacryl S-300

HR (Pharmacia), уравновесена с 0,01 M Na фосфат pH 7,4, 0,15M NaCl, 0,01% Tween-80 и хроматографирана при проточна скорост приблизително 17 мл/ч/см². Съдържащите TPO фракции, в които няма агрегати и продукти от протеолитично разграждане, се обединяват на базата на SDS-PAGE. Така обединените проби се филтруват през филтър от 0,22 мкм, Millex-GV или подобен на него, и се съхраняват на 2-8°C.

ПРИМЕР 21

Трансформация и индукция на белтъчна синтеза на TPO в *E. coli*

1. Конструирание на вектори за експресия на TPO в *E. coli*

Плазмидите rMP21, rMP151, rMP41, rMP57 и rMP202 са предназначени за експресия на първите 155 аминокиселини на TPO след малък лидер, който варира при отделните конструкции. Лидерите осигуряват преди всичко високо ниво на инициация на транслацията и бързо пречистване. Плазмидите rMP210-1, -T8, -21, -22, -24, -25 са предназначени за експресия на първите 153 аминокиселини на TPO след инициращия метионин и се различават само по използването на кодоните за първите 6 аминокиселини на TPO, докато плазмидът rMP251 е произведен на rMP210-1, в който карбокситерминалният край на TPO е удължен с две аминокиселини. Всички горни плазмиди ще продуцират високи нива вътреклетъчна експресия на TPO в *E. coli* след индукция на триптофановия промотор (Yansura, D.G. *et al.*, *Methods in Enzymology* (Goeddel, D. V., Ed.) **185**:54-60, Academic Press, San Diego [1990]). Плазмидите rMP1 и rMP172 са междинни в конструирането на горните плазмиди за вътреклетъчна експресия на TPO.

(a) Плазмид rMP1

Плазмидът rMP1 представлява вектор за секречия на първите 155 аминокиселини на TPO и се конструира чрез съвместно лигиране на 5 фрагмента ДНК, както е показано във **Фиг. 33**. Първият от тях е векторът rPho21, в който е отстранен малкият MluI-BamHI-фрагмент. rPho21 е произведен на phGH1 (Chang, C. N. *et al.*, *Gene* **55**:189-196 [1987], в който генът за човешкия растежен хормон е заменен с гена на *E. coli* phoA и по генноинженерен път е въведено Mlu-

рестиктазно място в кодиращата последователност на STII-сигналната последователност при аминокиселини 20-21.

Следващите два фрагмента, 258 базови двойки HinfI-PstI-парче ДНК от pRK5-hmpI I (**Пример 9**), кодиращо аминокиселини 19-103 на TPO, и следната синтетична ДНК, кодираща аминокиселини 1-18

5'CGCGTATGCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGTGACCTCCGAGTCCTCAGTAAACT
GCTTCGTG
ATACGGTCGGGCGGAGGAGGACGAACACTGGAGGCTCAGGAGTCATTTGACGAAG
CACTGA-5'

(SEQ ID NO: 69)

(SEQ ID NO: 70)

се прелигират с T4-ДНК-лигаза и след това се срязват с PstI. Четвъртият (фрагмент) е 152 базови двойки PstI-HaeIII-фрагмент от pRK5hmpII, кодиращ аминокиселини 104-155 от TPO. Последният е 412 базови двойки StuI-BamHI-фрагмент от pdh108, съдържащ терминатор на транскрипцията на λ , както е описано по-рано (Scholtissek, S. *et al.*, *NAR* 15:3185 [1987]).

(b) Плазмид pMP21

Плазмидът pMP21 е предназначен за експресия на първите 155 аминокиселини на TPO с помощта на лидер от 13 аминокиселини, обхващащ част от сигналната последователност STII. Той се конструира чрез съвместното лигиране на три (3) ДНК-фрагмента, както е показано на **Фиг. 34**, първият от които е векторът pVEG31, от който е отстранен малкият XbaI-Sph-фрагмент. Векторът pVEG31 е произведен на pHGH207-1 (de Boer, H. A. *et al.*, *in Promoter Structure and Function* (Rodriguez, R. L. and Chamberlain, M. J., Ed), 462, Praeger, New York [1982]), в който генът за човешкия растежен хормон е заменен с гена за васкуларния ендотелен растежен фактор (този идентичен векторен фрагмент може да се получи от последния плазмид)

Втората част в лигирането представлява синтетичен ДНК-дуплекс със следната последователност:

5'-CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTAA

TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGAAGAATTGCGC-5'

(SEQ ID NO: 71)

(SEQ ID NO: 72)

Последното парче представлява 1072 базови двойки MluI-SphI-фрагмент от рMP1, кодиращ 155 аминокиселини от ТРО.

(c) Плазмид рMP151

Плазмидът рMP151 е предназначен за експресия на първите 155 аминокиселини от ТРО след лидерна последователност, включваща 7 аминокиселини от сигналната последователност STII, 8 хистидина и място за скъсване с фактор Ха. Както е показано на **Фиг. 35**, рMP151 се конструира чрез съвместното лигиране на три ДНК-фрагмента, първият от които е преди това описания вектор рVEG31, от който е отстранен малкият XbaI-Sph-фрагмент.

Вторият представлява синтетичен ДНК-дуплекс със следната последователност:

5'CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTTCATCACCATCACCATCACCATCACATC
GAAGGTCGTAGCC

TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGTAGTGGTAGTGGTAGTGGTAGTGTAGCTTC
CAGCAT-5'

(SEQ ID NO: 73)

(SEQ ID NO: 74)

Последният е 1046 базови двойки BglII-SphI-фрагмент от рMP11, кодиращ 154 аминокиселини от ТРО. Плазмидът рMP11 е идентичен с рMP1 с изключение на няколко изменения в кодоните на STII-сигналната последователност (този фрагмент може да се получи от рMP1).

(d) Плазмид рMP202

Плазмидът рMP202 прилича много на експресионния вектор рMP151 с изключение на това, че мястото за скъсване от фактор Ха в лидера е заменено с място за скъсване от тромбин. Както е показано на **Фиг. 36**, рMP202 се конструира чрез съвместното лигиране на три ДНК-фрагмента. Първият от тях е преди това описаният рVEG 31, от който е отстранен малкият XbaI-SphI-фрагмент. Вторият представлява синтетичен ДНК-дуплекс със следната последователност:

5'TAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTTCATCACCATCACCATCACCATCACATCG
 AACCACGTAGCC
 TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGTAGTGGTAGTGGTAGTGGTAGTGTAGCTT
 GGTGCAT-5,

(SEP ID NO: 75)

(SEQ ID NO: 76)

Последното парче е 1064 базови двойки BglI-SphI-фрагмент от по-рано описания плазмид рMP11.

(e) Плазмид рMP172

Плазмидът рMP172 предствавява вектор за секрция на първите 153 аминокиселини на ТРО и е междиен в конструирането на рMP210. Както е показано на **Фиг. 37**, рMP172 се приготвя чрез успоредното лигиране на три ДНК-фрагмента, първият от които е векторът рLS32lamB, от който е отстран малкият EcoRI-HindIII-отрязък. Вторият е 946 базови двойки EcoRI-HgaI-фрагмент от преди това описания плазмид рMP11. Последното парче представлява синтетичен ДНК-дуплекс със следната последователност;

5'-TCCACCCTCTGCGTCAGGT (SEQ ID NO: 77)

GGAGACGCAGTCCATCGA-5, (SEQ ID NO: 78)

(f) Плазмид рMP210

Плазмидът рMP210 е предназначен за експресия на първите 153 аминокиселини на ТРО след метионина за инициация на транслацията. Плазмидът в действителност се приготвя като банка от плазмиди, в които първите 6 кодона на ТРО са синтезирани чрез включване на случаен нуклеотид в трета позиция на всеки кодон. Плазмидът, както е показано на **Фиг. 38**, се конструира чрез лигирането на три ДНК-фрагмента. Първият от тях е преди това описаният вектор рVEG31, от който е отстранен малкият XbaI-SphI-фрагмент. Вторият представлява синтетичен ДНК-дуплекс, показан по-долу, кодиращ инициращия метионин, както и първите 6 кодона на ТРО със случаен нуклеотид в трета позиция. Той се обработва най-напред с ДНК-полимераза (Klenow), следвана от смилане с XbaI и HinfI.

5'GCAGCAGTTCTAGAATTATGTCNCCNGCNCCNCCNGCNTGTGACCTCCGA

ACACTGGAGGCT

GTTCTCAGTAAA (SEQ ID NO: 79)

CAAGAGTCATTTGACGAAGCACTGAGGGTACAGGAAG-5' (SEQ ID NO: 80)

Третият е 890 базови двойки *Hinf*I-*Sph*I-фрагмент от рMP172, кодиращ аминокиселини 19-153 на ТРО.

Плазмидната рMP210 банка от приблизително 3700 клона се ретрансформира върху LB-петрита с висока концентрация на тетрациклин (50 мкг/мл), за да се отберат клонове със силна инициация на транслацията (Yansura, D.G. *et al.*, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 4:151-158 [1992]). От осемте колонии, които растат върху петритата с висока концентрация на тетрациклин, пет от най-добрите в смисъл на експресия на ТРО се подлагат на ДНК-секвениране като резултатите са показани на **Фиг. 39** (SEQ ID NOS: 23, 24, 25, 26, 27 и 28).

(g) Плазмид рMP41

Плазмидът рMP41 е предназначен за експресия на първите 155 аминокиселини на ТРО, сляти с лидер, състоящ се от 7 аминокиселини на сигналната последователност STII, следвана от място за скъсване от фактор Ха. Плазмидът се конструира, както е показано на **Фиг. 40**, чрез успоредното лигиране на три парчета ДНК, първото от които е по-рано описаният вектор рVEG31, от който е отстранен малкият *Xba*I-*Sph*I-фрагмент. Второто (парче) представлява следния синтетичен ДНК-дуплекс:

5'CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTATCGAAGGTCGTAGCC(SEQ ID NO:81)

TTAATACTTTTCTTATAGCGTAAATAGCTTCCAGCAT-5' (SEQ ID NO: 82)

Последното парче от лигирането е 1064 базови двойки *Bgl*II-*Sph*I-фрагмент от по-рано описания плазмид рMP11.

(h) Плазмид рMP57

Плазмидът рMP57 експресира първите 155 аминокиселини на ТРО по посока след лидер, състоящ се от 9 аминокиселини на сигналната последователност STII и дибазичното място Lys-Arg. Това дибазично място

осигурява начин за отстраняване на лидера с протеазата ArgC. Плазмидът се конструира, както е показано на **Фиг. 41** чрез съвместното лигиране на три ДНК-парчета. Първото от тях е преди това описаният вектор pVEG31, от който е отстранен малкият XbaI-SphI-фрагмент. Второто представлява следният синтетичен ДНК-дуплекс:

5'-CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTAAACGTAGCC

TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGAGAGATTTGCAT-5'

Последната част от лигирането е 1064 базови двойки BglI-SphI-фрагмент от описания преди това плазмид pMP11.

(i) Плазмид pMP251

Плазмидът pMP251 е произведен на pMP210-1, в който на карбокситерминалния край са включени две допълнителни аминокиселини от ТРО. Както е показано на **Фиг. 42**, този плазмид се конструира чрез съвместно лигиране на две парчета ДНК, първото от които е по-рано описаният pMP21, от който е отстранен малкият XbaI-ApaI-фрагмент. Втората част от лигирането е 316 базови двойки XbaI-ApaI-фрагмент от pMP210-1.

2. Трансформация и индукция на E. coli с експресионни вектори за ТРО.

Горните плаزمиди, експресиращи ТРО, се използват за трансформиране на *E. coli*, щам 44C6 (w3110 tonAΔ groH_{ts} lonΔ clpPΔ galE) по метода с CaCl₂ и топлинен шок (Mandel, M. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **53**:159-162 [1970]). Трансформираните клетки се култивират най-напред на 37°C в LB-среда, съдържаща 50 мкг/мл карбеницилин, докато оптичната плътност (600 нм) на културата достигне приблизително 2-3. След това LB-културата се разрежда 20х с M9-среда, съдържаща 0,49% кезаминокиселини (тегло/обем) и 50 мкг/мл карбеницилин. След култивиране при аерация на 30°C за 1 час се прибавя индол-3-акрилова киселинина до крайна концентрация 50 мкг/мл. След това културата се оставя да продължи да расте на 30°C с аерация за още 15 часа, след което клетките се събират чрез центрофугиране.

ПРИМЕР 22

Продукция на биологично активен ТРО (Met⁻¹ 1-153) в E. coli

Дадените по-долу процедури за продукция на биологично активен, пренагънат (ренатуриран) ТРО (met⁻¹ 1-153) могат да се приложат по аналогичен начин за получаването на други варианти на ТРО, включващи N- и C-крайно удължени форми (виж **Пример 23**).

A. Получаване на неразтворим ТРО (Met⁻¹ 153)

Клетки *E. coli*, експресиращи ТРО (Met⁻¹ 153), който се кодира от плазмид рМР210-1, се ферментират, както е описано по-горе. Обикновено около 100 г клетки се ресуспендират в 1 л (10 обема) буфер за разрушаване на клетките (10 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8) с хомогенизатор Polytron и клетките се центрофугират на 5000 x g за 30 минути. Промитата клетъчна утайка отново се ресуспендира в 1 л буфер за клетъчно разрушаване с хомогенизатора Polytron и клетъчната суспензия се прекарва през LH-клетъчна преса (LH Inceltech, Inc.) или през Microfluidizer (Microfluidics International), съгласно инструкциите на производителите. Суспензията се центрофугира на 5000 g за 30 мин, ресуспендира се и се центрофугира втори път, за да се получи промита утайка от твърди телца. Промитата утайка се използва непосредствено или се замразява на -70°C.

B. Разтваряне и пречистване на мономерен ТРО (Met⁻¹ 1-153)

Утайката от по-горе се ресуспендира в 5 обема по отношение на теглото 20 mM Tris, pH8, с 6-8 M гуанидин и 25 mM DTT (дитиотреитол) и се разбърква 1-3 часа или през нощта на 4°C, за да се постигне разтваряне на ТРО-белтъка. Високи концентрации на урея (6-8M) също могат да се използват, но като правило водят до по-ниски добиви в сравнение с гуанидина. След разтварянето разтворът се центрофугира на 30 000 x g за 30 мин, за да се получи бистра надстояща течност, съдържаща денатуриран, мономерен ТРО-белтък. Надстоящата течност след това се подлага на хроматография върху гел-филтрационна колона Superdex 200 (Pharmacia, 2,6 x 60 cm) при ороточна скорост 2 мл/мин като белтъкът се елуира с 20 mM Na фосфат, pH 6,0 с 10 mM DTT. Фракциите, съдържащи мономерен, денатуриран ТРО-белтък, който се елуира

между 160 и 200 мл, се обединяват. ТРО-белтъкът се пречиства допълнително на полупрепаративна C4 обратнофазова колона (2 x 20 см VYDAC). Пробата се нанася при 5 мл/мин върху клолната, уравновесена с 0,1% TFA (трифлуороцетна киселина) с 30% ацетонитрил. Пречистеният редуциран белтък се елуира при приблизително 50% ацетонитрил. Този материал се използва за ренатурация, за да се получи биологично активен вариант на ТРО.

С. Получаване на биологично активен ТРО (Met¹ 1-153)

Приблизително 20 мг мономерен, редуциран и денатуриран ТРО-белтък в 40 мл 0,1% TFA/50% ацетонитрил, се разтваря в 360 мл буфер за ренатурация, който в оптималния си вариант съдържа следните реагенти:

50 mM Tris
0,3 M NaCl
5 mM EDTA
2% CHAPS-детергент
25% глицерол
5 mM окислен глутатион
1 mM редуциран глутатион
pH доведено до 8,3

След смесването ренатуриращият буфер се разбърква бавно на 4°C за 12-48 часа, за да се постигнат максимални добиви от ренатурацията на ТРО-форма с правилно формирани дисулфидни връзки (виж по-долу). След това разтворът се подкислява с TFA до крайна концентрация 0,2%, филтрува се през 0.45 или 0.22 микронови филтри и се прибавя 1/10 обем ацетонитрил. Този разтвор след това се изпомпва директно върху C4 обратнофазова колона като пречистеният, ренатуриран ТРО (Met¹ 1-153) се елуира със същата програма за градиента, както по-горе. При тези условия ренатурираният, биологично активен ТРО се елуира при приблизително 45% ацетонитрил. Версиите на ТРО с неправилно формирани дисулфидни връзки се елуират по-рано. Крайният пречистен ТРО (Met¹ 1-153) е с чистота повече от 95%, което се определя чрез SDS-гелове или чрез аналитична C4 обратнофазова хроматография. За

изследвания с животни материалът, пречистен на C4, се диализира във физиологично съвместими буфери. Употребяват се изотонични буфери (10 mM Na ацетат, pH 5,5, 10 mM Na сукцинат, pH 5,5 или 10 mM Na фосфат, pH 7,4), съдържащи 150 mM NaCl и 0,01% Tween-80.

Поради високата активност на TPO в Ba/F3-теста (половината от максималната стимулация се постига при приблизително 3 пг/мл), е възможно да се получи биологично активен материал, като се използват много други буфери, детергенти и редокс-условия. При повечето от условията обаче се получава само малко количество правилно нагънат материал (<10%). За промишлено производство е желателно да се постигнат добиви от ренатурацията най-малко 10%, повече предпочитани са 30-50% и най-много се предпочитат >50%. Изпитани са много различни детергенти (Triton X-100, додецил-бета-малтозид, CHAPS, CHAPSO, SDS, саркозил, Tween-20 и Tween-80, Zwittergent 3-14 и други) за ефективно съдействие в получаването на високи добиви при ренатурацията. Установява се, че от тези детергенти само CHAPS-семейството (CHAPS и CHAPSO) е като цяло приложима в реакцията по ренатурация за ограничаване на белтъчната агрегация и неточното формиране на дисулфиди. Най-ползотворни са нива на CHAPS по-големи от 1%. За най-добрите добиви се изисква натриев хлорид като оптималните нива са между 0,1 и 0,5M. Наличието на EDTA (1-5 mM) ограничава количеството на метал-катализираното окисляване (и агрегация), което се наблюдава с някои препарати. Глицеролни концентрации по-високи от 15% осигуряват оптимални условия за ренатурация. За максималните добиви е съществено да имаме окислен и редуциран глутатион или окислен и редуциран цистеин като двойка редокс-реагенти. Като цяло по-високи добиви се наблюдават, когато молното отношение на окисления реагент е равно или в излишък спрямо редуцирания член на реагента от редокс-двойката. За ренатурация на тези варианти на TPO са оптимални стойности на pH между 7,5 и 9. Толерират се органични разтворители (напр., етанол, ацетонитрил, метанол) в концентрации от 10-15% или по-ниски. Използват се основно Tris и фосфатни

буфери. Инкубацията на 4°C също продуцира високи нива от правилно нагънат ТРО.

За препарати на ТРО, които са пречистени чрез първата С4-стъпка, са типични добиви от ренатурацията 40-50% (на основата на количеството редуциран и денатуриран ТРО, използван в реакцията по ренатурация). Активен материал може да се получи и от по-малко чисти препарати (напр., директно след колоната Superdex 200 или след първоначалната екстракция на твърдите телца), макар че добивите са по-ниски като следствие от засилена преципитация и интерфериращо въздействие на не-ТРО-белтъци повреме на процеса на ренатурация на ТРО.

Тъй като ТРО (Met¹ 1-153) съдържа 4 цистеина е възможно да се образуват три различни дисулфидни версии на този белтък:

версия 1: дисулфиди между цистеинови остатъци 1-4 и 2-3

версия 2: дисулфиди между цистеинови остатъци 1-2 и 3-4

версия 3: дисулфиди между цистеинови остатъци 1-3 и 2-4.

Повреме на първоначалното изследване за определяне условията на ренатурация чрез С4-обратнофазова хроматография се разделят няколко различни пика, съдържащи ТРО-белтък. Само един от тези пикове има значителна биологична активност, което се определя чрез използване на Ва/Ф3-теста. Впоследствие условията за пренагъване се оптимизират за получаване предимно на тази версия. При тези условия неправилно нагънатите версии са по-малко от 10-20% от общия получен мономерен ТРО.

Чрез масспектрометрия и белтъчно секвениране се определя, че дисулфидният профил на биологично активния ТРО е 1-4 и 2-3 (т. е. версия 1). Аликвоти от различните пикове, разделени на С4 (5-10 нмола), се смилат с трипсин (1:25 молно отношение на трипсин към белтък). Сместа след смилането се анализира чрез масспектрометрия посредством матрикс-асистирана лазерна десорпция преди и след редукция с DTT. След редукция се определят масите, съответстващи на повечето от големите триптични пептиди на ТРО. В нередуцираните проби някои от тези маси са липсващи като се наблюдават нови

маси. Масата на новите пикове съответствува основно на сумата от индивидуалните триптични пептиди, участващи в дисулфидната двойка. По този начин е възможно еднозначно да се определи, че дисулфидният профил на ренатурирания, рекомбинантен, биологично активен TPO е 1-4 и 2-3. Това е в съгласие с известния дисулфиден профил на родствената молекула еритропоетин.

D. Биологична активност на рекомбинантния, ренатуриран TPO (met 1-153)

Ренатурирания и пречистен TPO (Met⁻¹ 1-153) има активност както в *in vitro*, така и в *in vivo* тестове. В Ba/F3-теста половината от максималното стимулиране на тимидиновата инкорпорация в Ba/F3-клетки се постига при 3,3 пг/мл (0,3 пМ). В ELISA на основата на *mpl*-рецептора половината от максималната активност се проявява при 1,9 нг/мл (120 пМ). В нормални и миелосупресирани животни, получени чрез X-облъчване, близко до леталното, TPO (Met⁻¹ 1-153) има висока потенциална способност (активност се наблюдава при толкова ниски дози като 30 нг/мишка) да стимулират образуването на нови тромбоцити.

ПРИМЕР 23

Продукция на други биологично активни варианти на TPO в *E. coli*

По-долу са представени три различни варианта на TPO, придуцирани в *E. coli*, пречистени и ренатурирани в биологично активни форми.

(1) MLF - 13 остатъци от сигналната последователност с бактериален произход STII са сляти с N-терминалния домен на TPO (остатъци 1-155). Получената последователност е

MKKNIAFLLNAYASPAPPAC.....CVRRA (SEQ ID NO: 85)

където лидерната последователност е подчертана и C.....C представлява Cys⁷ до Cys¹⁵¹. Този вариант се конструира, за да се въведе тирозин за радиоактивно йодиране на TPO с цел рецепторни и биологични изследвания.

(2) H8MLF - 7 остатъци от STII-последователността, 8 хистидинови остатъци и последователността за ензимно скъсване от Фактор Ха IEGR се сливат с N-терминалния домен (остатъци 1-155) на TPO. Последователността е

MKKNIAFH HHHHHHHHIEGRSPAPPAC.....CVRRRA (SEQ ID NO: 87)

където лидерната последователност е подчертана и C.....C представлява Cys⁷ до Cys¹⁵¹. Този вариант, когато се пречисти и ренатурира, може да се третира с ензима Фактор Ха, който ще къса след аргининовия остатък на последователността IEGR, което ще даде вариант на ТРО, дълъг 155 остатъци с природна серинова N-терминална аминокиселина.

(3) T-H8MLF - се приготвя, както е описано по-горе за вариант (2) с тази разлика, че с N-терминалния домен на TPO е слята чувствителната към тромбин последователност IEPR. Получената последователност е

MKKNIAFH HHHHHHHHIEPRSPAPPAC.....CVRRA (SEQ ID NO: 87)

където лидерната последователност е подчертана и C.....C представлява Cys⁷ до Cys¹⁵¹. Този вариант след пречистване и ренатурация може да се третира с ензима тромбин за получаване на природен N-терминален вариант на ТРО, дълъг 155 остатъка.

*А. Получаване, разтваряне и пречистване на мономерни, биологично активни
варианти на ТРО (1), (2) и (3).*

Всички варианти се експресират в *E. coli*. По-голямата част от вариантите се откриват в твърдите телца, както е наблюдавано в **Пример 22** за ТРО (Met¹ 1-153). Достига се до същите процедури за получаване, разтваряне и пречистване, както описаните в **Пример 22**. Използват се идентични условия за ренатурация като тези, използвани за ТРО (Met¹ 1-153) при общи добиви от 30-50%. След ренатурация вариантите на ТРО се пречистват чрез С4-обратнофазова хроматография в 0,1% TFA като се използва градиент на ацетонитрил, както е описано по-рано. Всички варианти на ТРО (в своята непротеолизирала форма) имат биологична активност, определена чрез Ва/Ф3-теста като половината от максималната активност се постига при 2-5 пМ.

В. Протеолитичен процесинг на варианти (2) и (3) за получаване на автентичен N-терминален ТРО (1-155)

Варианти на ТРО (2) и (3) по-горе са проектирани с ензимно разграждащ се лидерен пептид пред нормалния N-краен аминокиселинен остатък на ТРО. След ренатурация и пречистване на варианти (2) и (3), както е описано по-горе, всеки от тях се подлага на смилане със съответния ензим. За всеки вариант -ацетонитрилът от C4-обратнофазовата стъпка се отстранява чрез продухване на разтвора с лека струя азот. След това вариантите се третират или с Фактор Ха или с тромбин, както е описано по-долу.

За варианта на ТРО (2) към свободния от ацетонитрил разтвор се добавя 1 M Tris-буфер, pH 8 до крайна концентрация 50 mM и ако е необходимо pH се довежда до 8. Добавят се NaCl и CaCl₂ респективно до 0,1 и 2 mM. Прибавя се Фактор Ха (New England Biolabs), така че да се постигне около 1:25 до 1:100 молно отношение на езима към варианта. Пробата се инкубира за 1-2 часа на стайна температура за постигане на максимално разграждане, което се определя по промяната в подвижността на SDS-гелове, което отразява загубата на лидерната последователност. След това сместа се пречиства чрез C4-обратнофазова хроматография като се използват същия градиент и условия, както описаните по-горе за пречистването на правилно ренатурираните варианти. При тези условия неразграденият вариант В се разделя от разградения вариант (2). Показва се че N-крайните аминокиселини са SPAPP, което означава, че отстраняването на N-терминалната лидерна последователност е успешно. С Фактор Ха се получават също така вариабилни количества от вътрешно разграждане в ТРО-домена; разграждането се наблюдава след аргининовия остатък в позиция номер 118, при което се образува допълнителна N-терминална последователност TТАНКDP (SEQ ID NO: 88). На нередуциращи SDS-гелове се забелязва единична ивица от приблизително 17 000 далтона на варианта, разграден с фактор Ха; на редуциращи гелове се наблюдават две ивици с молекулна маса приблизително 12000 и 5000 далтона, което е в съгласие с разграждането при аргинин 118. Това наблюдение също потвърждава, че двете

части на молекулата се придържат заедно от дисулфидна връзка между 1-вия и 4-тия цистеинови остатъци, до който извод се стига чрез експериментите по триптично смилане, описани по-горе. След отстраняване на N-терминалната лидерна последователност и с вътрешното разграждане в Ba/F3-биологичния тест пречистеният TPO (1-155) вариант има половината от максималната си активност при концентрации 0,2 до 0,3 пикомоларни. Интактният вариант с лидерната последователност има половината от максималната активност при концентрации 2-4 пикомоларни.

За вариант (3) буферът за смилане се състои от 50 mM Tris, pH 8, 2% CHAPS, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA и човешки или говежди тромбин (Calbiochem) при 1:25 до 1:50 тегловно отношение на ензима към TPO-вариантния белтък. Смилането се провежда на стайна температур за 2-6 часа. Процесът на смилането се следи чрез SDS-гелове, както е описано по-горе за реакцията на смилане с Фактор Ха. За това време като цяло се постига повече от 90% разграждане на лидерната последователност. Полученият TPO се пречиства на C4-обратнофазова колона, както е описано по-горе и чрез аминокиселинно секвениране се показва че той има желания N-край. Получава се само малко количество (<5%) вътрешно разграждане на същата аргинин-треонинова връзка, както се наблюдава по-горе с Фактор Ха. Полученият TPO-вариант има висока биологична активност като половината максимални отговори в Ba/F3-теста се получават при 0,2-0,4 пикомоларен белтък. В ELISA на основата на *mpl*-рецептора този белтък показва половината максимален отговор при 2-4 нг/мл пречистен белтък (120-240 пикомоларен), докато интактният вариант, съдържащ лидерната последователност, е по-слабо активен и в двата теста около 5-10 пъти. За изследвания с животни HPLC-пречистеният разграден (със сигнална пептидаза) белтък се диализира във физиологичноа приемливи буфери със 150 mM NaCl, 0,01% Tween 80 и 10 mM натриев сукцинат, pH 5,5 или 10 mM натриев ацетат, pH 5,5 или 10 mM натриев фосфат, pH 7,4. Пречистеният белтък е стабилен до няколко седмици, когато се съхранява на 4°C, което се проверява чрез HPLC и SDS-гелове. В нормални и миелосупресирани мишки този пречистен TPO с

автентичната N-терминална последователност е високо активен, стимулирайки образуването на тромбоцити при ниски дози от 30 нг/мишка.

ПРИМЕР 24

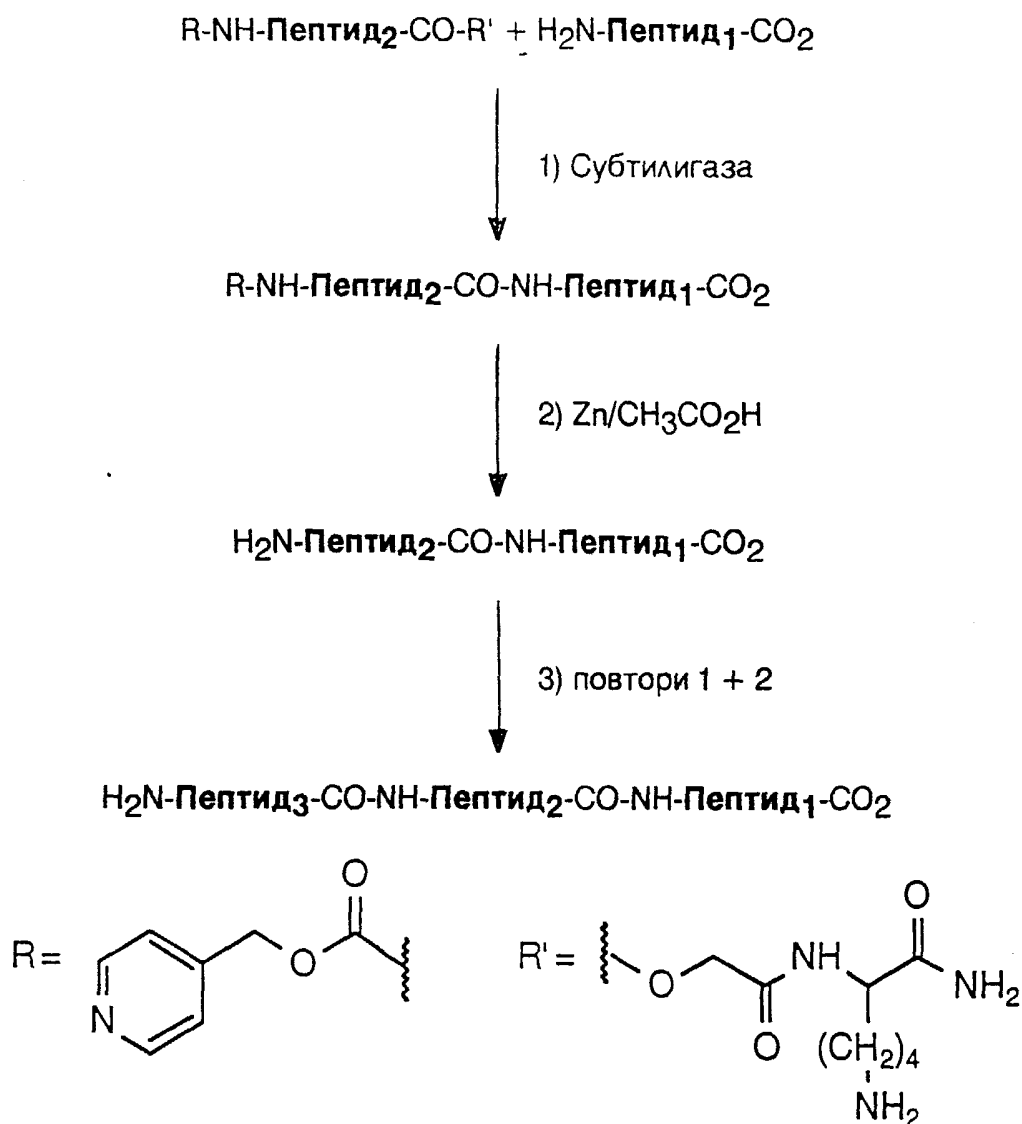
Синтетичен *mpl*-лиганд

Макар че човешкият *mpl*-лиганд (hML) обикновено се получава чрез използване на рекомбинантни методи, той може да се синтезира също така и чрез ензимно лигиране на синтетични пептидни фрагменти като се използват методите, описани по-долу. Синтетичното получаване на hML позволява включването на неприродни аминокиселини или на синтетични функционални съставки, такива като полиетиленгликол. Неотдавна по генноинженерен път беше създаден мутант на сериновата протеаза субтилизин BPN, субтилигаза (S221C/P225A) за ефективно лигиране на пептидни естери във водни разтвори (Abrahamsen *et al.*, *Biochem.*, **30**:4151-4159 [1991]). Понастоящем беше показано, че синтетичните пептиди могат да се лигират ензимно в последователен ред за получаване на ензимно активни дълги пептиди и белтъци, такива като рибонуклеаза А (Jackson *et al.*, *Science*, [1994]). Тази технология, описана по-подробно по-долу, ни даде възможност да синтезираме химично дълги белтъци, които преди това можеха да се направят само с рекомбинантната ДНК-технология.

Основната стратегия за синтеза на hML₁₅₃ чрез използване на субтилигаза е показана (Схема 1). Започва се с напълно деблокиран пептид, съответстващ на C-терминалния фрагмент от белтъка, към който се прибавя успоредно със субтилигаза N-терминално защитен, C-терминално активиран естерен пептид. След протичане на реакцията докрай продуктът се изолира чрез обратнофазова HPLC и защитната група се отстранява от N-края. Лигира се следващият пептиден фрагмент, деблокира се и процесът се повтаря, като се използват последователни пептиди, докато се получи пълноразмерният белтък. Процесът е сходен с твърдофазовата методология по това, че N-терминално защитен C-терминално активиран пептид се лигира към N-края на предхождания

пептид и белтъкът се синтезира в посока C->N. Тъй като обаче всяко свързване има за резултат прибавянето на до 50 остатъци и тъй като след всяко лигиране продуктите се изолират, могат да се синтезират при приемливи добиви много по-дълги и високопречистени белтъци.

Схема 1. Стратегия за синтеза на hML чрез използване на субтилигаза



На основата на нашите познания за специфичността на субтилигазата към определена последователност, както и на аминокиселинната последователност на биологично активния "еро-домен" на hML, ние разделихме hML₁₅₃ на седем фрагмента с дължина 18-25 остатъци. Синтезират се тетрапептиди за тестиране на лигирането с цел да се определят подходящите

точки на лигиране на 18-25-мерите. Таблица 13 показва резултатите от тези тестови лигирания.

ТАБЛИЦА 13

Тестови лигирания на hML. Донорните и нуклеофилните пептиди се разтварят до 10 mM в 100 mM трицин (pH 7.8) на 22°C. Прибавя се лигаза до крайна концентрация 10 мкМ от концентриран разтвор 1,6 мг/мл (~ 70 мкМ) и лигирането се оставя да протече през нощта. Добивите са изразени като % лигиране срещу хидролиза на донорните пептиди.

място донор (glc-K-NH ₂)		нуклеофил-NH ₂	%хидролиза	% лигиране
1	HVLH	SRLS	92	08
	(23/24) (SEQ ID NO: 89)	(SEQ ID NO: 90)		
	SHVL	HSRL	48	52
	(22/23) (SEQ ID NO: 91)	(SEQ ID NO: 92)		
2	AVDF	SLGE	22	78
	(46/47) (SEQ ID NO: 93)	(SEQ ID NO: 94)		
3	AVTL	LLEG	53	47
	(69/70) (SEQ ID NO: 95)	(SEQ ID NO: 96)		
4	LSSL	LGQL	95	05
	(89/90) (SEQ ID NO: 97)	(SEQ ID NO: 98)		
(88/89)	C(acm)LSS	LLGQ	00	00
	(SEQ ID NO: 99)	(SEQ ID NO: 100)		
(90/91)	SSLL	GQLS	45	55
	(SEQ ID NO: 101)	(SEQ ID NO: 102)		
(88/89)	CLSS	LLGQ	90	10
	(SEQ ID NO: 103)	(SEQ ID NO: 100)		
107/108	LQSL	LGTQ	99	01
	(SEQ ID NO: 104)	(SEQ ID NO: 105)		
5	ALQS	LLGT	70	30
	(SEQ ID NO: 106)	(SEQ ID NO: 107)		
128/129	NAIF	LSFQ	60	40
	(SEQ ID NO: 108)	(SEQ ID NO: 109)		
6				

Като се изхожда от тези експерименти, посочените в Таблица 14 пептиди за лигиране би трябвало да се лигират ефективно със субтилигазата. За да се предотврати самолигирането, е необходима подходяща защитна група за N-края на всеки донор-естерен пептид. Ние избрахме изоникотинова (iNOC) защитна група (Veber *et al.*, *J. Org. Chem.*, **42**:3286-3289 [1977], понеже тя е водоразтворима, може да се включи в последната стъпка на твърдофазовата пептидна синтеза и е стабилна в безводен HF, който се използва за деблокиране и откачване на пептидите от твърдофазната смола. Освен това тя може да се отстрани от пептида след лигирането при меки редуциращи условия ($\text{Zn}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$), за да се осигури свободен N-край за следващите лигирания. На основата на предишни експерименти, които показват, че гликолат-лизил-амидният (glc-K-NH_2) естер се ацилира ефективно от субтилигаза (Abrahamsen *et al.*, *Biochem.*, **30**:4151-4159 [1991]), той се използва за C-терминално активиране. iNOC-защитените активирани с glc-K-амид пептиди могат да се синтезират като се използват стандартни твърдофазови методи, както е подчертано (**Схема 2**). След това пептидите се лигират последователно, докато се получи целият белтък и крайният продукт се ренатурира *in vitro*. Като се изхожда от хомологията с EPO се смята, че дисулфидните двойки се формират между цистеинови остатъци 7 и 151 и между 28 и 85. Окисляването на дисулфидите може да се проведе просто чрез разбъркване на редуцирания материал в кислородна атмосфера за няколко часа. Ренатурираният материал след това може да се пречисти чрез HPLC и фракциите, съдържащи активен белтък да се обединят и лиофилизират. Като алтернатива дисулфидите могат да се защитят диференциално, за да се контролира последователно окисление между специфични дисулфидни двойки. Блокирането на цистеини 7 и 151 с ацетамидометилони (asm) групи ще осигури окисление на 28 и 85. Групите asm след това могат да се отстранят и да се окислят остатъци 7 и 151. Обратно, остатъци 28 и 85 биха могли да се блокират с asm и да се окислят, в случай че за правилната ренатурация се изисква последователно окисление. Възможно е цистеини 28 и 85 да се заменят с друг

природен или неприроден остатък, различен от Cys, за да се подsigури правилно окисление на цистеини 7 и 151.

ТАБЛИЦА 14

Пептидни фрагменти, използвани за тотална синтеза на h-ML чрез използване на субтилигаза

Фрагмент Последователност

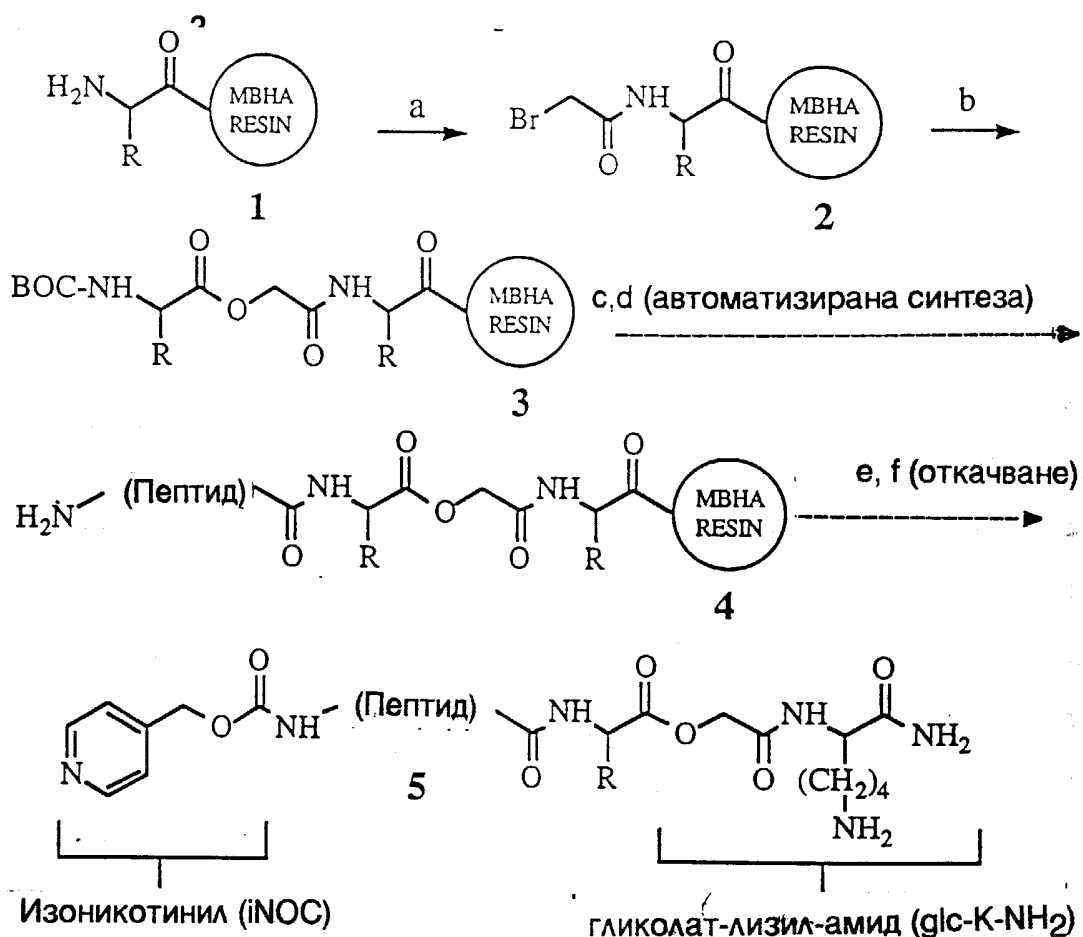
- 1 (SEQ ID NO: 110)
iNOC-HN-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVL-glc-K-NH₂ (1-22)
- 2 (SEQ ID NO: 111)
iNOC-HN-HSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDF-glc-K-NH₂ (23-46)
- 3 (SEQ ID NO: 112)
iNOC-HN-SLGEWKTQMEETKAQDILGAVTL-glc-K-NH₂ (47-69)
- 4 (SEQ ID NO: 113)
iNOC-HN-LLEGVMAARGQLGPTCLSSLL-glc-K-NH₂ (70-90)
- 5 (SEQ ID NO: 114)
iNOC-HN-GQLSGQVRLLLGALQS-glc-K-NH₂ (90-106)
- 6 (SEQ ID NO: 115)
iNOC-HN-LLGTQLPPQGRTTANKDPNAIF-glc-K-NH₂ (107-128)
- 7 (SEQ ID NO: 116)
H₂N-LSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVR-CO₂ (129-153)

Пептидните лигирания се извършват на 25°C в 100 mM трицин, pH 8 (прясно приготвен и дегазиран чрез филтруване под вакуум през филтър от 5 мкм). С-терминалният фрагмент обичайно се разтваря в буфер (2-5 mM пептид) и се прибавя 10x концентриран разтвор на субтилигаза (1 мг/мл в 100 mM трицин, pH 8) за довеждане на крайната ензимна концентрация до ~5 мкМ. След това се добавя 3-5 моларен излишък от активирания с glc-K-NH₂ донорен пептид под формата на твърдо вещество, разтваря се и сместа се оставя да престои на 25°C. Лигиранията се проследяват чрез аналитична обратнофазова C18 HPLC (CH₃CN/H₂O градиент с 0,1% TFA). Лигазните продукти се пречистват чрез

препаративна HPLC и се лиофилизират. Изоникотиновото (iNOC) деблокиране се извършва чрез разбъркване на блокирания пептид в оцетна киселина с цинков прах, активиран с HCl. Цинковият прах се отстранява чрез филтруване, а оцетната киселина се изпарява под вакуум. Полученият пептид може да се използва директно в следващото лигиране като процесът се повтаря. Синтетичен hML₁₅₃ може да се лигира чрез процедури, аналогични с тези описани по-горе, със синтетичен или рекомбинантен hML₁₅₄₋₃₃₂ за получаване на синтетичен или полусинтетичен пълноразмерен hML.

Синтетичният hML има редица предимства пред рекомбинантния. Могат да се въведат необичайни странични вериги, за да се подобрят активността или специфичността. Могат да се включат полимерни функционални съставки, такива като полиетиленгликол, за подобряване продължителността на действието. Например, към лизиновите остатъци на индивидуалните фрагменти (**Таблица 14**) може да се присъедини полиетиленгликол преди или след като са били извършени една или повече стъпки на лигиране. Могат да се отстранят или променят пептидни връзки, чувствителни на протеази, за подобряване на стабилността *in vivo*. Освен това могат да се синтезират производни с тежки атоми, което да помогне за определянето на структурата.

Схема 2. Твърдофазова синтеза на пептидни фрагменти за сегментно лигиране



а) Смолата лизил-параметилбензхидриламин (MBHA) **1** (0,63 мекв./г, Advanced ChemTech) се разбърква с бромоцетна киселина (5 екв.) и диизопропил карбодиимид (5 екв.) за 1 час на 25°C в диметилацетамид (DMA) за получаване на бромацетиловото производно **2**. Смолата се промива обилно с DMA и индивидуалните Вос-защитени аминокиселини (3 екв., Bachem) се естерифицират чрез разбъркване с натриев бикарбонат (6 екв.) в диметилформамид (DMF) за 24 часа на 50°C за получаване на съответната гликолат-фенилаланил-амид-смола **3**. Аминоацетилираната смола **3** се промива с DMF (3x) и дихлорметан (CH₂Cl₂) (3x) и може да се съхранява на стайна температура няколко месеца. Смола **3** след това може да се нанесе в автоматизиран пептиден синтезатор (Applied

Biosystems 430A) и пептидите да се удължат чрез използване на стандартни твърдофазови процедури (5). c) Групата N- α -Вос се отстранява чрез разтвор на 45% трифлуороцетна киселина в CH_2Cl_2 . d) Следващите Вос-защитени аминокиселини (5 екв.) се преактивират чрез използване на бензотриазол-1-ил-окси-трис-(диметиламино) фосфониев хексафлуорфосфат (BOP, 4 екв.) и N-метилморфолин (NMM, 10 екв.) в DMA и се купелуват 1-2 часа. e) Крайната N- α -Вос група се отстранява ($\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) за получаване на **4** и се въвежда изоникотинова (iNOC) защитна група, както е описано по-рано (4) чрез разбъркване с 4-изоникотинил-2-4-динитрофенил карбонат (3 екв.) и NMM (6 екв.) в DMA на 25°C за 24 часа. f) Откачване и деблокиране на пептида чрез третиране с безводен HF (5% анизол/5% етилметилсулфид) на 0°C за 1 час дава iNOC-защитения активиран с гликолат-лиз-амид пептид **5**, който се пречиства чрез обратнофазова C18 HPLC ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ градиент, 0,1% TFA). Идентичността на всички субстрати се потвърждава чрез маспектрометрия.

* * * * *

ДОПЪЛНИТЕЛНИ УКАЗАНИЯ

Изобретението, както се претендира, може да се изпълни в съгласие с горната спецификация, леснодостъпните цитати и изходни материали. Независимо от това Заявителите са депозирали в American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA (ATCC) изброените по-долу клетъчни линии:

Escherichia coli, DH10B-pBSK-hm ϕ l 1,8 ATCC достъпен No. CRL 69575, депозирани на 24 февруари, 1994.

Плазмид, pSV15.ID.LL.MLORF, ATCC достъпен No. CRL 75958, депозирани на 2 декември, 1994; и

CHO DP-12-клетки, ML 1/50 MCB (означен #1594), ATCC достъпен No. CRL 11770, депозирани на 6 декември, 1994.

Този депозит е направен съгласно разпоредбите на Будапещенския международен договор и съответния устав (Будапещенски договор) за международно признаване депозита на микроорганизми за целите на патентната процедура. Той гарантира съхраняването на жизнени култури в продължение на 30

години от датата на депозита. Организмите ще бъдат направени достъпни от АТСС, съгласно клаузите на Будапещенския договор и ще са предмет на споразумение между Заявителите и АТСС, което гарантира неограничен достъп до тях след публикуването на същинския патент на САЩ. Достъпът до депозирания щам не трябва да се тълкува като лиценз за практикуване на изобретението в нарушение на правата, които се предоставят от всяко упълномощено правителство съгласно неговите патентни закони.

* * * * *

Тъй като изобретението по необходимост е описано във връзка с предпочетените приложения и специфични работни експерименти, след прочитане на гореизложената спецификация, рутинният специалист ще може да направи различни изменения, еквивалентни замествания, както и промени в поместения тук предмет, без да се отдалечава от неговия дух и форма. Следователно, изобретението може да се практикува по начини, различни от тези, които са описани конкретно тук. Поради това се предвижда защитата, придобита след регистрацията на патента, да се ограничи само до приложените претенции и техните еквиваленти.

Преднамерено са включени и данните за всички литературни източници, които са цитирани тук.

Списък на последователностите

(1) ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

(i) ЗАЯВИТЕЛ: Genenech

Eaton, Dan L.

de Sauvage, Frederic J.

(ii) ЗАГЛАВИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО: ТРОМБОПОЕТИН

(iii) БРОЙ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ: 144

(iv) АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ:

(A) АДРЕСАТ: Genentech, Inc.

Corporate Patents

(B) УЛИЦА: 460 Point San Bruno Blvd

(C) ГРАД: South San Francisco

(D) Щат: California

(E) СТРАНА: САЩ

(F) КОД: 94080

(v) ФОРМА ЗА КОМПЮТЪРНО ЧЕТЕНЕ:

(A) ТИП СРЕДА: 5,25 инча, 360 КБ дискета

(B) КОМПЮТЪР: IBM PC-съвместим

(C) ОПЕРАЦИОННА СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS

(D) ПРОГРАМЕН ПРОДУКТ: patin (Genentech)

(vi) ТЕКУЩА ИНФОРМАЦИЯ ЗА ЗАЯВКАТА:

(A) НОМЕР НА ЗАЯВКАТА:

(B) ДАТА НА ПОДАВАНЕ:

(C) КЛАСИФИКАЦИЯ:

(vii) ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПРИОРИТЕТНИ ЗАЯВКИ:

(A) НОМЕР НА ЗАЯВКАТА: 08/176553

(B) ДАТА НА ПОДАВАНЕ: 03 януари 1994

(vii) ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПРИОРИТЕТНИ ЗАЯВКИ:

(A) НОМЕР НА ЗАЯВКАТА: 08/348657

(B) ДАТА НА ПОДАВАНЕ: 02 декември 1994

(vii) ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПРИОРИТЕТНИ ЗАЯВКИ:

(A) НОМЕР НА ЗАЯВКАТА: 08/185607

(B) ДАТА НА ПОДАВАНЕ: 21 януари 1994

(vii) ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПРИОРИТЕТНИ ЗАЯВКИ:

(A) НОМЕР НА ЗАЯВКАТА: 08/348658

(B) ДАТА НА ПОДАВАНЕ: 02 декември 1994

(vii) ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПРИОРИТЕТНИ ЗАЯВКИ:

(A) НОМЕР НА ЗАЯВКАТА: 08/196689

(B) ДАТА НА ПОДАВАНЕ: 15 февруари 1994

(vii) ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПРИОРИТЕТНИ ЗАЯВКИ:

(A) НОМЕР НА ЗАЯВКАТА: 08/223263

(B) ДАТА НА ПОДАВАНЕ: 04 април 1994

(vii) ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПРИОРИТЕТНИ ЗАЯВКИ:

(A) НОМЕР НА ЗАЯВКАТА: 08/249376

(B) ДАТА НА ПОДАВАНЕ: 25 май 1994

(viii) ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПЪЛНОМОЩНИКА/АГЕНТА:

(A) ИМЕ: Winter, Darly B.

(B) РЕГИСТРАЦИОНЕН НОМЕР: 32 637

(C) НОМЕР НА УКАЗАТЕЛЯ/РЕГИСТЪРА: 871P5PCT

(ix) ИНФОРМАЦИЯ ЗА ТЕЛЕКОМУНИКАЦИЯ:

(A) ТЕЛЕФОН: 415/225-1249

(B) ТЕЛЕФАКС: 415/952-9881

(C) ТЕЛЕКС: 920/371-716

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 353 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:1:

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr
 -21 -20 -15 -10

Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu
 -5 1 5

Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser
 10 15 20

Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val
 25 30 35

Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln
 40 45 50

Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu
 55 60 65

Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr
 70 75 80

Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu
 85 90 95

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

Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu
 115 120 125

Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	Leu
130					135					140				
Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr
145					150					155				
Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Glu	Leu
160					165					170				
Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Thr	Ala	Ser
175					180					185				
Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu	Leu	Lys	Trp	Gln	Gln	Gly	Phe
190					195					200				
Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser	Leu
205					210					215				
Asp	Gln	Ile	Pro	Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Ile	His	Glu	Leu	Leu	Asn
220					225					230				
Gly	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Arg	Arg	Thr	Leu	Gly
235					240					245				
Ala	Pro	Asp	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Ser	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Pro
250					255					260				
Pro	Asn	Leu	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Pro	Ser	Pro	Thr	His	Pro	Pro
265					270					275				
Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Thr
280					285					290				
Pro	Val	Val	Gln	Leu	His	Pro	Leu	Leu	Pro	Asp	Pro	Ser	Ala	Pro
295					300					305				
Thr	Pro	Thr	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Asn	Thr	Ser	Tyr	Thr	His
310					315					320				
Ser	Gln	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Gly							
325					330		332							

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 1795 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

•

TCTTCCTACC	CATCTGCTCC	CCAGAGGGCT	GCCTGCTGTG	CACTTGGGTC										50
CTGGAGCCCT	TCTCCACCCG	GATAGATTCC	TCACCCTTGG	CCCGCCTTTG										100
CCCCACCCTA	CTCTGCCCAG	AAGTGCAAGA	GCCTAAGCCG	CCTCCATGGC										150
CCCAGGAAGG	ATTCAGGGGA	GAGGCCCCAA	ACAGGGAGCC	ACGCCAGCCA										200
GACACCCCGG	CCAGA	ATG	GAG	CTG	ACT	GAA	TTG	CTC	CTC	239				
		Met	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Leu					
		-21	-20							-15				
GTG	GTC	ATG	CTT	CTC	CTA	ACT	GCA	AGG	CTA	ACG	CTG	TCC	278	
Val	Val	Met	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser		
			-10					-5						
AGC	CCG	GCT	CCT	CCT	GCT	TGT	GAC	CTC	CGA	GTC	CTC	AGT	317	
Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser		
1				5										
AAA	CTG	CTT	CGT	GAC	TCC	CAT	GTC	CTT	CAC	AGC	AGA	CTG	356	
Lys	Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu		
	15					20								
AGC	CAG	TGC	CCA	GAG	GTT	CAC	CCT	TTG	CCT	ACA	CCT	GTC	395	
Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Val	His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val		
			30					35						
CTG	CTG	CCT	GCT	GTG	GAC	TTT	AGC	TTG	GGA	GAA	TGG	AAA	434	
Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys		
40					45					50				
ACC	CAG	ATG	GAG	GAG	ACC	AAG	GCA	CAG	GAC	ATT	CTG	GGA	473	
Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu	Gly		
		55					60					65		
GCA	GTG	ACC	CTT	CTG	CTG	GAG	GGA	GTG	ATG	GCA	GCA	CGG	512	
Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg		
				70				75						
GGA	CAA	CTG	GGA	CCC	ACT	TGC	CTC	TCA	TCC	CTC	CTG	GGG	551	
Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly		
	80					85					90			
CAG	CTT	TCT	GGA	CAG	GTC	CGT	CTC	CTC	CTT	GGG	GCC	CTG	590	
Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu		
			95				100							

CAG	AGC	CTC	CTT	GGA	AGC	CAG	CTT	CCT	CCA	CAG	GGC	AGG	629
Gln	Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	
105						110					115		
ACC	ACA	GCT	CAC	AAG	GAT	CCC	AAT	GCC	ATC	TTC	CTG	AGC	668
Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	
		120					125					130	
TTC	CAA	CAC	CTG	CTC	CGA	GGA	AAG	GTG	CGT	TTC	CTG	ATG	707
Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	
			135						140				
CTT	GTA	GGA	GGG	TCC	ACC	CTC	TGC	GTC	AGG	CGG	GCC	CCA	746
Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	
145						150					155		
CCC	ACC	ACA	GCT	GTC	CCC	AGC	AGA	ACC	TCT	CTA	GTC	CTC	785
Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Val	Leu	
			160					165					
ACA	CTG	AAC	GAG	CTC	CCA	AAC	AGG	ACT	TCT	GGA	TTG	TTG	824
Thr	Leu	Asn	Glu	Leu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	
170					175					180			
GAG	ACA	AAC	TTC	ACT	GCC	TCA	GCC	AGA	ACT	ACT	GGC	TCT	863
Glu	Thr	Asn	Phe	Thr	Ala	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	
		185				190					195		
GGG	CTT	CTG	AAG	TGG	CAG	CAG	GGA	TTC	AGA	GCC	AAG	ATT	902
Gly	Leu	Leu	Lys	Trp	Gln	Gln	Gly	Phe	Arg	Ala	Lys	Ile	
			200						205				
CCT	GGT	CTG	CTG	AAC	CAA	ACC	TCC	AGG	TCC	CTG	GAC	CAA	941
Pro	Gly	Leu	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	
	210					215					220		
ATC	CCC	GGA	TAC	CTG	AAC	AGG	ATA	CAC	GAA	CTC	TTG	AAT	980
Ile	Pro	Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Ile	His	Glu	Leu	Leu	Asn	
			225				230						
GGA	ACT	CGT	GGA	CTC	TTT	CCT	GGA	CCC	TCA	CGC	AGG	ACC	1019
Gly	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Arg	Arg	Thr	
235					240					245			
CTA	GGA	GCC	CCG	GAC	ATT	TCC	TCA	GGA	ACA	TCA	GAC	ACA	1058
Leu	Gly	Ala	Pro	Asp	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Ser	Asp	Thr	
		250				255					260		

100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

F

5

A

C

 $\mathcal{A}$

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 42 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:3:

Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu
 -16 -15 -10 -5

Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys
 1 5 10

Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu
 15 20 25 26

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 390 бази

(B) ТИП: нуклеинова киселина

(C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:4:

GAATTCCTGG AATACCAGCT GACAATGATT TCCTCCTCAT CTTTCAACCT 50

CACCTCTCCT CATCTAAGAA TTG CTC CTC GTG GTC ATG CTT 91
 Leu Leu Leu Val Val Met Leu
 -16 -15 -10

CTC CTA ACT GCA AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT CCT 130
 Leu Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro
 -5 1

CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT 169
 Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg
 5 10 15

GAC TCC CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG GTGA GAACTCCCAA 210
 Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu
 20 25 26

CATTATCCCC TTTATCCGCG TAACTGGTAA GACACCCATA CTCCCAGGAA 260

GACACCATCA CTTCTCTTAA CTCCTTGACC CAATGACTAT TCTTCCCAT 310

TTGTCCCCAC CTAATGATCA CACTCTCTGA CAAGAATTAT TCTTCACAAT 360

ACAGCCCGCA TTATAAAGCT-CTCGTCTAGA 390

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:5:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 390 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: еднoверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:5:

TCTAGACGAG AGCTTTTAAA TGC GGGCTGT ATTGTGAAGA ATAATTCTTG 50
TCAGAGAGTG TGATCAGTAG GTGGGGACAA TATGGGAAGA ATAGTCATTG 100
GGTCAAGGAG TTAGAGGAAG TGATGGTGTC TTCCTGGGAG TATGGGTGTC 150
TTACCAGTTA CGCGGATAAA GGGGATAATG TTGGGAGTTC TCACCAGTCT 200
GCTGTGAAGG ACATGGGAGT CACGAAGCAG TTTACTGAGG ACTCGGAGGT 250
CACAAGCAGG AGGAGCCGGG CTGGACAGCG TTAGCCTTGC AGTTAGGAGA 300
AGCATGACCA CGAGGAGCAA TTCTTAGATG AGGAGAGGTG AGGTTGAAAG 350
ATGAGGAGGA AATCATTGTC AGCTGGTATT CCAGGAATTC 390

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:6:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 332 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:6:

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	1	5	10	15
Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	20	25	30	
Glu	Val	His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	35	40	45	
Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	50	55	60	
Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	65	70	75	
Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	80	85	90	
Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	95	100	105	
Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	110	115	120	
His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	125	130	135	
Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	140	145	150	
Cys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	155	160	165	
Ser	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Glu	Leu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	170	175	180	
Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Thr	Ala	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	185	190	195	
Gly	Leu	Leu	Lys	Trp	Gln	Gln	Gly	Phe	Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	200	205	210	
Leu	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Ile	Pro	Gly	Tyr	215	220	225	
Leu	Asn	Arg	Ile	His	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	230	235	240	
Pro	Gly	Pro	Ser	Arg	Arg	Thr	Leu	Gly	Ala	Pro	Asp	Ile	Ser	Ser	245	250	255	
Gly	Thr	Ser	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Pro	Pro	Asn	Leu	Gln	Pro	Gly	260	265	270	
Tyr	Ser	Pro	Ser	Pro	Thr	His	Pro	Pro	Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	Leu	275	280	285	

Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His
290 295 300

Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser
305 310 315

Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln
320 325 330

Glu Gly
332

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 166 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:7:

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

Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala
20 25 30

Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys
35 40 45

Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala
50 55 60

Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu
65 70 75

Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro
80 85 90

Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
95 100 105

Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
110 115 120

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala
125 130 135

Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg
140 145 150

Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
155 160 165

Arg
166

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:8:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 328 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:8:

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

Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser
 260 265 270

Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu Pro
 275 280 285

Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro
 290 295 300

Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn
 305 310 315

Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly
 320 325 328

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:9:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 265 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:9:

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu
 1 5 10 15

Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro
 20 25 30

Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp
 35 40 45

Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala
 50 55 60

Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met
 65 70 75

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu
 80 85 90

Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln
 95 100 105

Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala
 110 115 120

His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu
 125 130 135

Arg-Gly Lys Asp Phe Trp Ile Val Gly Asp Lys Leu His Cys Leu
 140 145 150

Ser Gln Asn Tyr Trp Leu Trp Ala Ser Glu Val Ala Ala Gly Ile
 155 160 165

Gln Ser Gln Asp Ser Trp Ser Ala Glu-Pro Asn Leu Gln Val Pro
 170 175 180

Gly	Pro	Asn	Pro	Arg	Ile	Pro	Glu	Gln	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Glu
				185					190					195
Trp	Asn	Ser	Trp	Thr	Leu	Ser	Trp	Thr	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Arg
				200					205					210
Ser	Pro	Gly	His	Phe	Leu	Arg	Asn	Ile	Arg	His	Arg	Leu	Pro	Ala
				215					220					225
Thr	Gln	Pro	Pro	Ala	Trp	Ile	Phe	Ser	Phe	Pro	Asn	Pro	Ser	Ser
				230					235					240
Tyr	Trp	Thr	Val	Tyr	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Thr	His	Leu	Ala	His
				245					250					255
Pro	Cys	Gly	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser					
				260					265					

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:10:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 261 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:10:

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

Ser	Trp	Ser	Ala	Glu	Pro	Asn	Leu	Gln	Val	Pro	Gly	Pro	Asn	Pro	170	175	180
Arg	Ile	Pro	Glu	Gln	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Glu	Trp	Asn	Ser	Trp	185	190	195
Thr	Leu	Ser	Trp	Thr	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Arg	Ser	Pro	Gly	His	200	205	210
Phe	Leu	Arg	Asn	Ile	Arg	His	Arg	Leu	Pro	Ala	Thr	Gln	Pro	Pro	215	220	225
Ala	Trp	Ile	Phe	Ser	Phe	Pro	Asn	Pro	Ser	Ser	Tyr	Trp	Thr	Val	230	235	240
Tyr	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Thr	His	Leu	Ala	His	Pro	Cys	Gly	Pro	245	250	255
Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser										260	261	

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:11:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 7849 нуклеотидни двойки

(B) ТИП: нуклеинова киселина

(C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:11:

CCAGCCTCC TTTCTCTGT TCCCTGGTCA TGCCTGCCTC CCTGTCTCCT 50

GTCTCTCCCT CCCACACACA CCCASTATCC TCCCAGCTAT CCCTACACCC 100

TCCTTCCTAA TCTTGGGAGA CATCTCGTCT GGCTGGACGG GAAAATTCCA 150

GGATCTAGGC CACACTTCTC AGCAGACATG CCCATCCTTG GGGAGGAGGA 200

ACAGGAGAGA GCCTGAGGAA GTTCTGGGGG ACAGGGGGAT GATGGGATCA 250

AGGTCAGGCC AGGAAGCCCC TGAGGACAGA GACTGTGGGG AGACTGGGAC 300

TGGGAAGAAA GCAAAGGAGC TAGAGCCAGG GCCAAAGGAA AAGGGGGGCC 350

AGCAGGGAGG TATTTGCGGG GGAGGTCCAG CAGCTGTCTT TCCTAAGACA 400

GGGACACATG GGCCTGGTTA TTCCTCTGT CACATGTGGA ACGGTAGGAG 450

ATGGAAGACG GAGACAGAAC AAGCAAAGGA GGGCCCTGGG CACAGAGGTC 500

TGTGTGTGTA GCCATCCAAG CCACTGGACC CCAGCAGACG AGCACCTAAG 550
CTCAGGCTTA ACCCAGTGCA CGTGTGCGCA CATACTGTG CCCCACACCT 600
GACAGTCCAC TCAACCCGTC CAAACCCTTT CCCATAACA CCAACCCATA 650
ACAGGAGATT TCTCTCATGT GGGCAATATC CGTGTCCCA CTTCGAAAGG 700
GGGAATGACA AGATAGGACT CCCTAGGGGA TTACAGAAAG AAAAGCAGGA 750
AAGCAAGCAT CCTGTTGGAT TTCAGCAGCA GGTATGATGT CCAGGGAAAA 800
GAAATTTGGA TAGCCAGGGA GTGAAAACCC CACCAATCTT AAACAAGACC 850
TCTGTGCTTC TTCCCCAGCA ACACAAATGT CCTGCCAGAT TCCTCCTGGA 900
AAAAAACTTC TGCTCCTGTC CCCCTCCAGG TCCCAGGTTG CCCATGTCCA 950
GGAAAAGATG GATCCCCCTA TCCAAATCTT CTCCGTGGTG TGTGTGGGTG 1000
GAGGAGTGGA CCCTGGTCCA GGCAGGGGCT CCAGGGAAGA GAAGGCGTCA 1050
CTTCCGGGGG CCTTCACCAG TGTCTGGTGG CTCCCTTCTC TGATTGGGCA 1100
GAAGTGCCCC AGGCAGGCGT ATGACCTGCT GCTGTGGAGG GGCTGTGCCC 1150
CACCGCCACA TGTCTTCCTA CCCATCTGCT CCCCAGAGGG CTGCCTGCTG 1200
TGCACTTGGG TCCTGGAGCC CTTCTCCACC CGGTGAGTGG CCAGCAGGGT 1250
GTGGGGTTAT GTGAGGGTAG AAAGGACAGC AAAGAGAAAT GGGCTCCCAG 1300
CTGGGGGAGG GGCAGGCAAA CTGGAACCTA CAGGCACTGA CCTTTGTCTG 1350
GAAGAGTGTA GCCTTCCCAG AATGGGAGGA GCAGGGCAGA GCAGGGGTAG 1400
GGGGTGGGGT GCTGGTTTCT GAGGGACTGA TCACTTACTT GGTGGAATAC 1450
AGCACAGCCC TGGCTGGCCC TAAGGAAAGG GGACATGAGC CCAGGGAGAA 1500

AATAAGAGAG GGAGCTGCAC TTAGGGCTTA GCAAACACAG TAGTAAGATG 1550
GACACAGCCC CAATCCCCAT TCTTAGCTGG TCATTCTCTG TTAGCTTAAG 1600
GTTCTGAATC TGGTGCTGGG GAAGCTGGGC CAGGCAAGCC AGGGCGCAAG 1650
GAGAGGGTAA TGGGAGGAGG GCCCACTCAT GTTGACAGAC CTACAGGAAA 1700
TCCAATATT GAATCAGGTG CAAGCCTCTT TGCACAACCT GTGAAAGGAG 1750
GAGGAAGCCA TGTGGGGGGT CCTGTGAAGG AACCGGAAGG GGTTC TGCCA 1800
AGGGGGCAGG GAGGCAGGTG TGAGCTATGA GACAGATATG TTAGTGGGCG 1850
CCTAAGACAA GGTAAGCCCC TAAGGTGGGC ATCACCCAGC AGGTGCCCCGT 1900
TCCTGGGCAG CTGGTCTCAG GAAGGAAGTC CCAGAACTGT TAGCCCATCT 1950
CTTGGCCTCA GATAATGGAG TATTT CAGGA CTTGGAGTCC AAAGAAAAGC 2000
TCCAGTGGCT TTATGTGTGG GGCTAGATAG GGAAAGAATA GAGGTTAATT 2050
TCTCCCATAC CGCCTTTTAA TCCTGACCTC TAGTGGTCCC AGTTACAGCT 2100
TTGTGCAGTT CCCCTCCCCA GCCCCACTCC CCACCGCAGA AGTTACCCCT 2150
CAACATATTG CGCCCGTTTG CCAGTTCCTC ACCCAGGCCC TGCATCCCAT 2200
TTTCCACTCT CTTCTCCAGG CTGAAGCCAC AATACTTTCC TTCTCTATCC 2250
CCATCCCAGA TTTTCTCTGA CCTAACAACC AAGGTTGCTC AGAATTTAAG 2300
GCTAATTAAG ATATGTGTGT ATACATATCA TGTCTGCTG CTCTCAGCAG 2350
GGGTAGGTGG CACCAAATCC GTGTCCGATT CACTGAGGAG TCCTGACAAA 2400
AAGGAGACAC CATATGCTTT CTTGCTTTCT TTCTTTCTTT CTTTCTTTTT 2450
TTTTTTTGA GACGGAGTTT CACTCTTATT GCCCAGGCTG GAGTGCAATG 2500
GTGCGATCTC GGCTCACCAC AAACCTCCGC CTCCCAGGTA CAAGCGATTC 2550

TCCTGTCTCA GCCTCCCAAG TAGCTTGGAT TACAGGCATG AGCCACCACA 2600
CCCTGCTAGT TTTTGTGTAT TTCGTAGAGC CGGGGTTTCA CCATGTTAGT 2650
GAGGCTGGTG GCGAACTCCT GACCTCAGGT GATCCACCCG CCTTGGA CTC 2700
CCAAAGTGCT GGGATTACAG GCATGAGCCA CTGCACCCGG CACACCATAT 2750
GCTTTCATCA CAAGAAAATG TGAGAGAATT CAGGGCTTTG GCAGTTCCAG 2800
GCTGGTCAGC ATCTCAAGCC CTCCCCAGCA TCTGTTTACC CTGCCAGGCA 2850
GTCTCTTCCT AGAAACTTGG TTAAATGTTC ACTCTTCTTG CTACTTTCAG 2900
GATAGATTCC TCACCCTTGG CCCGCCTTG CCCCACCCTA CTCTGCCCAG 2950
AAGTGCAAGA GCCTAAGCCG CCTCCATGGC CCCAGGAAGG ATTCAGGGGA 3000
GAGGCCCCAA ACAGGGAGCC ACGCCAGCCA GACACCCCGG CCAGAATGGA 3050
GCTGACTGGT GAGAACACAC CTGAGGGGCT AGGGCCATAT GGAAACATGA 3100
CAGAAGGGGA GAGAGAAAGG AGACACGCTG CAGGGGGCAG GAAGCTGGGG 3150
GAACCCATTC TCCCAAAAAT AAGGGGTCTG AGGGGTGGAT TCCCTGGGTT 3200
TCAGGTCTGG GTCCTGAATG GGAATTCCTG GAATACCAGC TGACAATGAT 3250
TTCCTCCTCA TCTTTCAACC TCACCTCTCC TCATCTAAGA ATTGCTCCTC 3300
GTGGTCATGC TTCTCCTAAC TGCAAGGCTA ACGCTGTCCA GCGCGGCTCC 3350
TCCTGCTTGT GACCTCCGAG TCCTCAGTAA ACTGCTTCGT GACTCCCATG 3400
TCCTTCACAG CAGACTGGTG AGAACTCCCA ACATTATCCC CTTTATCCGC 3450
GTAAGTGGTA AGACACCCAT ACTCCCAGGA AGACACCATC ACTTCCTCTA 3500
ACTCCTTGAC CCAATGACTA TTCTTCCCAT ATTGTCCCCA CCTACTGATC 3550

ACACTCTCTG ACAAGAATTA TTCTTCACAA TACAGCCCGC ATTTAAAAGC 3600

TCTCGTCTAG AGATAGTACT CATGGAGGAC TAGCCTGCTT ATTAGGCTAC 3650

CATAGCTCTC TCTATTTTCAG CTCCCTTCTC CCCCCACCAA TCTTTTTTCAA 3700

CAGAGCCAGT GCCCAGAGGT TCACCCTTTG CCTACACCTG TCCTGCTGCC 3750

TGCTGTGGAC TTTAGCTTGG GAGAATGGAA AACCCAGATG GTAAGAAAGC 3800

CATCCCTAAC CTTGGCTTCC CTAAGTCCTG TCTTCAGTTT CCCACTGCTT 3850

CCCATGGATT CTCCAACATT CTTGAGCTTT TTAAAAATAT CTCACCTTCA 3900

GCTTGCCAC CCTAACCCAA TCTACATTCA CCTATGATGA TAGCCTGTGG 3950

ATAAGATGAT GGCTTGCAGG TCCAATATGT GAATAGATTT GAAGCTGAAC 4000

ACCATGAAAA GCTGGAGAGA AATCGCTCAT GGCCATGCCT TTGACCTATT 4050

CCYGTTCAGT CTTCTTAAAT TGGCATGAAG AAGCAAGACT CATATGTCAT 4100

CCACAGATGA CACAAAGCTG GGAAGTACCA CTAAAATAAC AAAAGACTGA 4150

ATCAAGATTC AAATCACTGA AAGACTAGGT CAAAAACAAG GTGAAACAAC 4200

AGAGATATAA ACTTCTACAT GTGGGCCGGG GGCTCACGCC TGTAAATCCCA 4250

GCACTTTGGG AGGCCGAGGC AGGCAGATCA CCTGAGGGCA GGAGTTTGAG 4300

AGCAGCCTGG CCAACATGGC GAAACCCCGT CTCTACTAAG AATACAAAAT 4350

TAGCCGGGCA TGGTAGTGCA TGCCTGTAAT CCCAGCTACT TGAAGGCTG 4400

AAGCAGGAGA ATCCCTTGAA CCCAGGAGGT GGAGGTTGTA GTGAGCTGAG 4450

ATCATGCCAA TGCACTCCAG CCTGGGTGAC AAGAGCAAAA CTCCGTCTCA 4500

AAAAGAAAAA AAAATTCTAC ATGTGTAAAT TAATGAGTAA AGTCCTATTC 4550

CAGCTTTCAG GCCACAATGC CCTGCTTCCA TCATTTAAGC CTCTGGCCCT 4600

AGCACTTCCT ACGAAAAGGA TCTGAGAGAA TTAAATTGCC CCCAAACTTA 4650

CCATGTAACA TTACTGAAGC TGCTATTCTT AAAGCTAGTA ATTCTTGTCT 4700

GTTTGATGTT TAGCATCCCC ATTGTGGAAA TGCTCGTACA GAACTCTATT 4750

CCGAGTGGAC TACACTTAAA TATACTGGCC TGAACACCGG ACATCCCCCT 4800

GAAGACATAT GCTAATTTAT TAAGAGGGAC CATATTAAAC TAACATGTGT 4850

CTAGAAAGCA GCAGCCTGAA CAGAAAGAGA CTAGAAGCAT GTTTTATGGG 4900

CAATAGTTTA AAAAATAAAA ATCTATCCTC AAGAACCCTA GCGTCCCTTC 4950

TTCCTTCAGG ACTGAGTCAG GGAAGAAGGG CAGTTCCTAT GGGTCCCTTC 5000

TAGTCCTTTC TTTTCATCCT TATGATCATT ATGGTAGAGT CTCATACCTA 5050

CATTTAGTTT ATTTATTATT ATTATTTGAG ACGGAGTCTC ACTCTATCCC 5100

CCAGGCTGGA GTGCAGTGGC ATGATCTCAA CTCACTGCAA CCTCAGCCTC 5150

CCGGATTCAA GCGATTCTCC TGCCTCAGTC TCCCAAGTAG CTGGGATTAC 5200

AGGTGCCCCAC CACCATGCCC AGCTAATTTT TGTATTTTGT GTAGAGATGG 5250

GGTTTCACCA TGTGCGCCAG GCTGATCTTG AACTCCTGAC CTCAGGTGAT 5300

CCACCTGCCT CAGCCTCCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGCG TGAGCCACTG 5350

CACCCAGCCT TCATTCAGTT TAAAAATCAA ATGATCCTAA GGTTTTGCAG 5400

CAGAAAGAGT AAATTTGCAG CACTAGAACC AAGAGGTAAA AGCTGTAACA 5450

GGGCAGATTT CAGCAACGTA AGAAAAAAGG AGCTCTTCTC ACTGAAACCA 5500

AGTGTAAGAC CAGGCTGGAC TAGAGGACAC GGGAGTTTTT GAAGCAGAGG 5550

CTGATGACCA GCTGTCGGGA GACTGTGAAG GAATTCCTGC CCTGGGTGGG 5600

ACCTTGGTCC TGTCCAGTTC TCAGCCTGTA TGATTCACCTC TGCTGGCTAC 5650

TCCTAAGGCT CCCACCCGC TTTTAGTGTG CCCTTTGAGG CAGTGCGCTT 5700

CTCTCTTCCA TCTCTTTCTC AGGAGGAGAC CAAGGCACAG GACATTCTGG 5750

GAGCAGTGAC CCTTCTGCTG GAGGGAGTGA TGGCAGCACG GGGACAACCTG 5800

GGACCCACTT GCCTCTCATC CCTCCTGGGG CAGCTTTCTG GACAGGTCCG 5850

TCTCCTCCTT GGGGCCCTGC AGAGCCTCCT TGGAACCCAG GTAAGTCCCC 5900

AGTCAAGGGA TCTGTAGAAA CTGTTCTTTT CTGACTCAGT CCCACTAGAA 5950

GACCTGAGGG AAGAAGGGCT CTTCCAGGGA GCTCAAGGGC AGAAGAGCTG 6000

ATCTACTAAG AGTGCTCCCT GCCAGCCACA ATGCCTGGGT ACTGGCATCC 6050

TGTCTTTCCT ACTTAGACAA GGGAGGCCTG AGATCTGGCC CTGGTGTTTG 6100

GCCTCAGGAC CATCCTCTGC CCTCAGCTTC CTCCACAGGG CAGGACCACA 6150

GCTCACAAGG ATCCCAATGC CATCTTCCTG AGTTTCCAAC ACCTGCTCCG 6200

AGGAAAGGTG CGTTTCCTGA TGCTTGTAGG AGGGTCCACC CTCTGCGTCA 6250

GGCGGGCCCC ACCCACCACA GCTGTCCCCA GCAGAACCTC TCTAGTCCTC 6300

ACACTGAACG AGCTCCCCAA CAGGACTTCT GGATTGTTGG AGACAAACTT 6350

CACTGCCTCA GCCAGAACTA CTGGCTCTGG GCTTCTGAAG TGGCAGCAGG 6400

GATTCAGAGC CAAGATTCCT GGTCTGCTGA ACCAAACCTC CAGGTCCCTG 6450

GACCAAATCC CCGGATACCT GAACAGGATA CACGAACTCT TGAATGGAAC 6500

TCGTGGACTC TTCCTGGAC CCTCACGCAG GACCCTAGGA GCCCCGGACA 6550

TTTCCTCAGG AACATCAGAC ACAGGCTCCC TGCCACCCAA CCTCCAGCCT 6600

GGATATTCTC CTTCCCCAAC CCATCCTCCT ACTGGACAGT ATACGCTCTT 6650
CCCTCTTCCA CCCACCTTGC CCACCCCTGT GGTCCAGCTC CACCCCTGC 6700
TTCCTGACCC TTCTGCTCCA ACGCCCACCC CTACCAGCCC TCTTCTAAAC 6750
ACATCCTACA CCCACTCCCA GAATCTGTCT CAGGAAGGGT AAGGTTCTCA 6800
GACACTGCCG ACATCAGCAT TGTCTCATGT ACAGCTCCCT TCCCTGCAGG 6850
GCGCCCCTGG GAGACAACCTG GACAAGATT CTACTTTCT CCTGAAACCC 6900
AAAGCCCTGG TAAAAGGGAT ACACAGGACT GAAAAGGGAA TCATTTTTCA 6950
CTGTACATTA TAAACCTTCA GAAGCTATT TTTTAAGCTA TCAGCAATAC 7000
TCATCAGAGC AGCTAGCTCT TTGGTCTATT TTCTGCAGAA ATTTGCAACT 7050
CACTGATTCT CTACATGCTC TTTTCTGTG ATAACCTCTG AAAGGCCTGG 7100
GCTGGCCTGG CAGTTGAACA GAGGGAGAGA CTAACCTTGA GTCAGAAAAC 7150
AGAGAAAGGG TAATTTCTTT TGCTTCAAAT TCAAGGCCTT CCAACGCCCC 7200
CATCCCCTTT ACTATCATTC TCAGTGGGAC TCTGATCCCA TATTCTTAAC 7250
AGATCTTTAC TCTTGAGAAA TGAATAAGCT TTCTCTCAGA AATGCTGTCC 7300
CTATACACTA GACAAAACCTG AGCCTGTATA AGGAATAAAT GGGAGCGCCG 7350
AAAAGCTCCC TAAAAAGCAA GGGAAAGATG TTCTTCGAGG GTGGCAATAG 7400
ATCCCCCTCA CCCTGCCACC CCAAACAAA AAGCTAACAG GAAGCCTTGG 7450
AGAGCCTCAC ACCCCAGGTA AGGCTGTGTA GACAGTTCAG TAAAGACAGG 7500
ACCTGGATGT GACAGCTGAG CAAACAGCTA GAGCTTTGGC AGCTCAGCAG 7550
GAGGCTTTGC CAGGCATGGA CGCCTGCCTC CCTCCTGTGG AGGTCAGGAG 7600

GAAGTGCAGG AAGTGGCATG AGTCAGGCTC CTTGAGCTCA CACAGCAGGA 7650
 GAACAAGTAC AAGTCAAGTA CAAGTTGAAG GCTCATTTCC CAGTTCCCGC 7700
 AAATGCATCT AAAAAGCAGC TCTGTGTGAC CACCATAAAC TCTGCTAGGG 7750
 GATCTCTAAA AAGGAGTCAG GCTTATGGGG CTTTGCAAAAT AAGTGCTGCC 1800
 TTGGTGCTCA GGAAAAGGTT TGTGTTGCAC AAAACACAAA TTCCACTGC 1849

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:12:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 1443 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: еднoверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:12:

GAGTCCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCCGA CTCTGCCGAA AGAAGCACAG 50
 AAGCTCAAGC CGCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTCAGGG GAGAGGCCCC 100
 ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCCT GGCCAGA ATG GAG 143

Met Glu
 -21 -20

CTG ACT GAT TTG CTC CTG GCG GCC ATG CTT CTT GCA GTG 182
 Leu Thr Asp Leu Leu Leu Ala Ala Met Leu Leu Ala Val
 -15 -10

GCA AGA CTA ACT CTG TCC AGC CCC GTA GCT CCT GCC TGT 221
 Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Val Ala Pro Ala Cys
 -5 1 5

GAC CCC AGA CTC CTA AAT AAA CTG CTG CGT GAC TCC CAC 260
 Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg Asp Ser His
 10 15

CTC CTT CAC AGC CGA CTG AGT CAG TGT CCC GAC GTC GAC 299
 Leu Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Asp Val Asp
 25 30

CCT TTG TCT ATC CCT GTT CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT 338
 Pro Leu Ser Ile Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe
 35 40 45

AGC CTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ACG GAA CAG AGC AAG 377
 Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Thr Glu Gln Ser Lys
 50 55

GCA CAG GAC ATT CTA GGG GCA GTG TCC CTT CTA CTG GAG 416
 Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Ser Leu Leu Leu Glu
 60 65 70

GGA GTG ATG GCA GCA CGA GGA CAG TTG GAA CCC TCC TGC 455
 Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Glu Pro Ser Cys
 75 80 85

CTC TCA TCC CTC CTG GGA CAG CTT TCT GGG CAG GTT CGC 494
 Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg
 90 95

CTC CTC TTG GGG GCC CTG CAG GGC CTC CTA GGA ACC CAG 533
 Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Gly Leu Leu Gly Thr Gln
 100 105 110

GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAC CCC AAT GCC CTC TTC 572
 Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Leu Phe
 115 120

TTG AGC TTG CAA CAA CTG CTT CGG GGA AAG GTG CGC TTC 611
 Leu Ser Leu Gln Gln Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe
 125 130 135

CTG CTT CTG GTA GAA GGT CCC ACC CTC TGT GTC AGA CGG 650
 Leu Leu Leu Val Glu Gly Pro Thr Leu Cys Val Arg Arg
 140 145 150

ACC CTG CCA ACC ACA GCT GTC CCA AGC AGT ACT TCT CAA 689
 Thr Leu Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Ser Thr Ser Gln
 155 160

CTC CTC ACA CTA AAC AAG TTC CCA AAC AGG ACT TCT GGA 728
 Leu Leu Thr Leu Asn Lys Phe Pro Asn Arg Thr Ser Gly
 165 170

TTG TTG GAG ACG AAC TTC AGT GTC ACA GCC AGA ACT GCT 767
 Leu Leu Glu Thr Asn Phe Ser Val Thr Ala Arg Thr Ala
 180 185

GGC CCT GGA CTT CTG AGC AGG CTT CAG GGA TTC AGA GTC 806
 Gly Pro Gly Leu Leu Ser Arg Leu Gln Gly Phe Arg Val
 190 195 200

AAG ATT ACT CCT GGT CAG CTA AAT CAA ACC TCC AGG TCC 845
 Lys Ile Thr Pro Gly Gln Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser
 205 210 215

CCA GTC CAA ATC TCT GGA TAC CTG AAC AGG ACA CAC GGA 884
 Pro Val Gln Ile Ser Gly Tyr Leu Asn Arg Thr His Gly
 220 225

CCT GTG AAT GGA ACT CAT GGG CTC TTT GCT GGA ACC TCA 923
 Pro Val Asn Gly Thr His Gly Leu Phe Ala Gly Thr Ser
 230 235 240

CTT CAG ACC CTG GAA GCC TCA GAC ATC TCG CCC GGA GCT 962
 Leu Gln Thr Leu Glu Ala Ser Asp Ile Ser Pro Gly Ala
 245 250

TTC AAC AAA GGC TCC CTG GCA TTC AAC CTC CAG GGT GGA 1001
 Phe Asn Lys Gly Ser Leu Ala Phe Asn Leu Gln Gly Gly
 255 260 265

CTT CCT CCT TCT CCA AGC CTT GCT CCT GAT GGA CAC ACA 1040
 Leu Pro Pro Ser Pro Ser Leu Ala Pro Asp Gly His Thr
 270 275 280

CCC TTC CCT CCT TCA CCT GCC TTG CCC ACC ACC CAT GGA 1079
 Pro Phe Pro Pro Ser Pro Ala Leu Pro Thr Thr His Gly
 285 290

TCT CCA CCC CAG CTC CAC CCC CTG TTT CCT GAC CCT TCC 1118
 Ser Pro Pro Gln Leu His Pro Leu Phe Pro Asp Pro Ser
 295 300 305

ACC ACC ATG CCT AAC TCT ACC GCC CCT CAT CCA GTC ACA 1157
 Thr Thr Met Pro Asn Ser Thr Ala Pro His Pro Val Thr
 310 315

ATG TAC CCT CAT CCC AGG AAT TTG TCT CAG GAA ACA TAGCGC 1199
 Met Tyr Pro His Pro Arg Asn Leu Ser Gln Glu Thr
 320 330 331

G GGCCTGGCC CAGTGAGCGT CTGCAGCTTC TCTCGGGGAC 1240

AAGCTTCCCC AGGAAGGCTG AGAGGCAGCT GCATCTGCTC CAGATGTTCT 1290

GCTTTCACCT AAAAGGCCCT GGGGAAGGGA TACACAGCAC TGGAGATTGT 1340

AAAATTTTAG GAGCTATTTT TTTTAACT ATCAGCAATA TTCATCAGAG 1390

CAGCTAGCGA TCTTTGGTCT ATTTTCGGTA TAAATTTGAA AATCACTAAT 1440

TCT 1443

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:13:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 352 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:13:

Met Glu Leu Thr Asp Leu Leu Leu Ala Ala Met Leu Leu Ala Val
-21 -20 -15 -10

Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Val Ala Pro Ala Cys Asp Pro
1 5

Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Leu Leu His Ser
10 15 20

Arg Leu Ser Gln Cys Pro Asp Val Asp Pro Leu Ser Ile Pro Val
25 30 35

Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln
40 45 50

Thr Glu Gln Ser Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Ser Leu
55 60 65

Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Glu Pro Ser
70 75 80

Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu
85 90 95

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

Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Leu Phe Leu Ser Leu Gln Gln
115 120 125

Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Leu Leu Val Glu Gly Pro
130 135 140

Thr Leu Cys Val Arg Arg Thr Leu Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser
145 150 155

Ser	Thr	Ser	Gln	Leu	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Phe	Pro	Asn	Arg	Thr
160						165				170				
Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Ser	Val	Thr	Ala	Arg	Thr	Ala
175					180					185				
Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Gln	Gly	Phe	Arg	Val	Lys	Ile
190					195					200				
Thr	Pro	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser	Pro	Val	Gln	Ile
205					210					215				
Ser	Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Thr	His	Gly	Pro	Val	Asn	Gly	Thr	His
220					225					230				
Gly	Leu	Phe	Ala	Gly	Thr	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Glu	Ala	Ser	Asp
235					240					245				
Ile	Ser	Pro	Gly	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Asn	Leu
250					255					260				
Gln	Gly	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Asp	Gly	His
265					270					275				
Thr	Pro	Phe	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Leu	Pro	Thr	Thr	His	Gly	Ser
280					285					290				
Pro	Pro	Gln	Leu	His	Pro	Leu	Phe	Pro	Asp	Pro	Ser	Thr	Thr	Met
295					300					305				
Pro	Asn	Ser	Thr	Ala	Pro	His	Pro	Val	Thr	Met	Tyr	Pro	His	Pro
310					315					320				
Arg	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr								
325					330	331								

(2)ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:14:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 1536 базови двойки
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:14:

GAGTCCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCCGA CTCTGCCGAA AGAAGCACAG 50

AAGCTCAAGC CGCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTTCAGGG GAGAGGCCCCC 100												
ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCCT GGCCAGA											ATG GAG 143	
											Met Glu	
											-21 -20	
CTG ACT GAT TTG CTC CTG GCG GCC ATG CTT CTT GCA GTG 182												
Leu Thr Asp Leu Leu Leu Ala Ala Met Leu Leu Ala Val												
											-15 -10	
GCA AGA CTA ACT CTG TCC AGC CCC GTA GCT CCT GCC TGT 221												
Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Val Ala Pro Ala Cys												
											-5 1 5	
GAC CCC AGA CTC CTA AAT AAA CTG CTG CGT GAC TCC CAC 260												
Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg Asp Ser His												
											10 15 20	
CTC CTT CAC AGC CGA CTG AGT CAG TGT CCC GAC GTC GAC 299												
Leu Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Asp Val Asp												
											25 30	
CCT TTG TCT ATC CCT GTT CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT 338												
Pro Leu Ser Ile Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe												
											35 40 45	
AGC CTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ACG GAA CAG AGC AAG 377												
Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Thr Glu Gln Ser Lys												
											50 55	
GCA CAG GAC ATT CTA GGG GCA GTG TCC CTT CTA CTG GAG 416												
Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Ser Leu Leu Leu Glu												
											60 65 70	
GGA GTG ATG GCA GCA CGA GGA CAG TTG GAA CCC TCC TGC 455												
Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Glu Pro Ser Cys												
											75 80 85	
CTC TCA TCC CTC CTG GGA CAG CTT TCT GGG CAG GTT CGC 494												
Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg												
											90 95	
CTC CTC TTG GGG GCC CTG CAG GGC CTC CTA GGA ACC CAG 533												
Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Gly Leu Leu Gly Thr Gln												
											100 105 110	
CTT CCT CTA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAC CCC 572												
Leu Pro Leu Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro												
											115 120	

AAT	GCC	CTC	TTC	TTG	AGC	TTG	CAA	CAA	CTG	CTT	CGG	GGA	611
Asn	Lal	Leu	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Leu	Arg	Gly	
125					130					135			
AAG	GTG	CGC	TTC	CTG	CTT	CTG	GTA	GAA	GGT	CCC	ACC	CTC	650
Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Glu	Gly	Pro	Thr	Leu	
		140					145					150	
TGT	GTC	AGA	CGG	ACC	CTG	CCA	ACC	ACA	GCT	GTG	CCA	AGC	689
Cys	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	
				155					160				
AGT	ACT	TCT	CAA	CTC	CTC	ACA	CTA	AAC	AAG	TTC	CCA	AAC	728
Ser	Thr	Ser	Gln	Leu	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Phe	Pro	Asn	
	165					170					175		
AGG	ACT	TCT	GGA	TTG	TTG	GAG	ACG	AAC	TTC	AGT	GTC	ACA	767
Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Ser	Val	Thr	
			180					185					
GCC	AGA	ACT	GCT	GGC	CCT	GGA	CTT	CTG	AGC	AGG	CTT	CAG	806
Ala	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Gln	
190					195					200			
GGA	TTC	AGA	GTC	AAG	ATT	ACT	CCT	GGT	CAG	CTA	AAT	CAA	845
Gly	Phe	Arg	Val	Lys	Ile	Thr	Pro	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	
	205						210				215		
ACC	TCC	AGG	TCC	CCA	GTC	CAA	ATC	TCT	GGA	TAC	CTG	AAC	884
Thr	Ser	Arg	Ser	Pro	Val	Gln	Ile	Ser	Gly	Tyr	Leu	Asn	
				220					225				
AGG	ACA	CAC	GGA	CCT	GTG	AAT	GGA	ACT	CAT	GGG	CTC	TTT	923
Arg	Thr	His	Gly	Pro	Val	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Leu	Phe	
	230					325					240		
GCT	GGA	ACC	TCA	CTT	CAG	ACC	CTG	GAA	GCC	TCA	GAC	ATC	962
Ala	Gly	Thr	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Glu	Ala	Ser	Asp	Ile	
			245					250					
TCG	CCC	GGA	GCT	TTC	AAC	AAA	GGC	TCC	CTG	GCA	TTC	AAC	1001
Ser	Pro	Gly	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Asn	
255					260					265			
CTC	CAG	GGT	GGA	CTT	CCT	CCT	TCT	CCA	AGC	CTT	GCT	CCT	1040
Leu	Gln	Gly	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	
		270					275					280	

GAT GGA CAC ACA CCC TTC CCT CCT TCA CCT GCC TTG CCC 1079
 Asp Gly His Thr Pro Phe Pro Pro Ser Pro Ala Leu Pro
 285 290

ACC ACC CAT GGA TCT CCA CCC CAG CTC CAC CCC CTG TTT 1118
 Thr Thr His Gly Ser Pro Pro Gln Leu His Pro Leu Phe
 295 300 305

CCT GAC CCT TCC ACC ACC ATG CCT AAC TCT ACC GCC CCT 1157
 Pro Asp Pro Ser Thr Thr Met Pro Asn Ser Thr Ala Pro
 310 315

CAT CCA GTC ACA ATG TAC CCT CAT CCC AGG AAT TTG TCT 1199
 His Pro Val Thr Met Tyr Pro His Pro Arg Asn Leu Ser
 320 325 330

CAG GAA ACA TAGCG CGGGCACTGG CCCAGTGAGC GTCTGCAGCT 1240
 Gln Glu Thr
 335

TCTCTCGGGG ACAAGCTTCC CCAGGAAGGC TGAGAGGCAG CTGCATCTGC 1290

TCCAGATGTT CTGCTTTCAC CTAAAAGGCC CTGGGGAAGG GATACACAGC 1340

ACTGGAGATT GTAAAATTTT AGGAGCTATT TTTTTTTAAC CTATCAGCAA 1390

TATTCATCAG AGCAGCTAGC GATCTTTGGT CTATTTTCGG TATAAATTTG 1440

AAAATCACTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1490

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1536

(2)ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:15:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 356 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:15:

Met Glu Leu Thr Asp Leu Leu Leu Ala Ala Met Leu Leu Ala Val
 -21 -20 -15 -10

Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Val Ala Pro Ala Cys Asp Pro
 -5 1 5

Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Leu Leu His Ser
 10 15 20

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

Ala	Phe	Asn	Leu	Gln	Gly	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala
265					270					275				
Pro	Asp	Gly	His	Thr	Pro	Phe	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Leu	Pro	Thr
280					285					290				
Thr	His	Gly	Ser	Pro	Pro	Gln	Leu	His	Pro	Leu	Phe	Pro	Asp	Pro
295					300					305				
Ser	Thr	Thr	Met	Pro	Asn	Ser	Thr	Ala	Pro	His	Pro	Val	Thr	Met
310					315					320				
Tyr	Pro	His	Pro	Arg	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr				
325					330					335				

(2)ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:16:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 241 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:16:

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

Pro Ser Pro Asn Leu Trp Ile Pro Glu Gln Asp Thr Arg Thr Cys
 185 190 195

Glu Trp Asn Ser Trp Ala Leu Cys Trp Asn Leu Thr Ser Asp Pro
 200 205 210

Gly Ser Leu Arg His Leu Ala Arg Ser Phe Gln Gln Arg Leu Pro
 215 220 225

Gly Ile Gln Pro Pro Gly Trp Thr Ser Ser Phe Ser Lys Pro Cys
 230 235 240

Ser
 241

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:17:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 335 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:17:

Ser Pro Val Ala Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu
 1 5 10 15

Leu Arg Asp Ser His Leu Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro
 20 25 30

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

Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Thr Glu Gln Ser Lys Ala
 50 55 60

Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Ser Leu Leu Leu Glu Gly Val Met
 65 70 75

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Glu Pro Ser Cys Leu Ser Ser Leu Leu
 80 85 90

Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln
 95 100 105

Gly Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Leu Gln Gly Arg Thr Thr Ala
 110 115 120

His Lys Asp Pro Asn Ala Leu Phe Leu Ser Leu Gln Gln Leu Leu
 125 130 135

Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Leu Leu Val Glu Gly Pro Thr Leu
 140 145 150

Cys Val Arg Arg Thr Leu Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Ser Thr
 155 160 165

Ser Gln Leu Leu Thr Leu Asn Lys Phe Pro Asn Arg Thr Ser Gly
 170 175 180

Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Ser	Val	Thr	Ala	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro
				185					190					195
Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Gln	Gly	Phe	Arg	Val	Lys	Ile	Thr	Pro
				200					205					210
Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser	Pro	Val	Gln	Ile	Ser	Gly
				215					220					225
Tyr	Leu	Asn	Arg	Thr	His	Gly	Pro	Val	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Leu
				230					235					240
Phe	Ala	Gly	Thr	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Glu	Ala	Ser	Asp	Ile	Ser
				245					250					255
Pro	Gly	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Asn	Leu	Gln	Gly
				260					265					270
Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Asp	Gly	His	Thr	Pro
				275					280					285
Phe	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Leu	Pro	Thr	Thr	His	Gly	Ser	Pro	Pro
				290					295					300
Gln	Leu	His	Pro	Leu	Phe	Pro	Asp	Pro	Ser	Thr	Thr	Met	Pro	Asn
				305					310					315
Ser	Thr	Ala	Pro	His	Pro	Val	Thr	Met	Tyr	Pro	His	Pro	Arg	Asn
				320					325					330
Leu	Ser	Gln	Glu	Thr										
				335										

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:18:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 332 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:18:

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

Val	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	95	100	105
Asp	Leu	Leu	Gly	Met	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	110	115	120
His	Lys	Asp	Pro	Ser	Ala	Ile	Phe	Leu	Asn	Phe	Gln	Gln	Leu	Leu	125	130	135
Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Pro	Ser	Leu	140	145	150
Cys	Ala	Lys	Arg	Ala	Pro	Pro	Ala	Ile	Ala	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	155	160	165
Ser	Pro	Phe	His	Thr	Leu	Asn	Lys	Leu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	170	175	180
Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	185	190	195
Gly	Phe	Leu	Lys	Arg	Leu	Gln	Ala	Phe	Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	200	205	210
Leu	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Ile	Pro	Gly	His	215	220	225
Gln	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Pro	Leu	Ser	Gly	Ile	His	Gly	Leu	Phe	230	235	240
Pro	Gly	Pro	Gln	Pro	Gly	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Asp	Ile	Pro	Pro	245	250	255
Ala	Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Ser	Arg	Pro	Thr	Tyr	Leu	Gln	Pro	Gly	260	265	270
Glu	Ser	Pro	Ser	Pro	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Gly	Arg	Tyr	Thr	Leu	275	280	285
Phe	Ser	Pro	Ser	Pro	Thr	Ser	Pro	Ser	Pro	Thr	Val	Gln	Leu	Gln	290	295	300
Pro	Leu	Leu	Pro	Asp	Pro	Ser	Ala	Ile	Thr	Pro	Asn	Ser	Thr	Ser	305	310	315
Pro	Leu	Leu	Phe	Ala	Ala	His	Pro	His	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Gln	320	325	330
Glu	Glu														332		

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:19:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 1026 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:19:

AGC	CCG	GCT	CCT	CCT	GCC	TGT	GAC	CCC	CGA	CTC	CTA	36
Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Pro	Arg	Leu	Leu	
1				5					10			
ATT	AAA	CTG	CTT	CGT	GAC	TCC	CAT	GTC	CTT	CAC	GGC	AGA 75
Asn	Lys	Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Gly	Arg
	15					20					25	
CTG	AGC	CAG	TGC	CCA	GAC	ATT	AAC	CCT	TTG	TCC	ACA	CCT 114
Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	Asp	Ile	Asn	Pro	Leu	Ser	Thr	Pro
				30					35			
GTC	CTG	CTG	CCT	GCT	GTG	GAC	TTC	ACC	TTG	GGA	GAA	TGG 153
Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Thr	Leu	Gly	Glu	Trp
	40					45					50	
AAA	ACC	CAG	ACG	GAG	CAG	ACA	AAG	GCA	CAG	GAT	GTC	CTG 192
Lys	Thr	Gln	Thr	Glu	Gln	Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	Val	Leu
			55					60				
GGA	GCC	ACA	ACC	CTT	CTG	CTG	GAG	GCA	GTG	ATG	ACA	GCA 231
Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Val	Met	Thr	Ala
	65				70					75		
CGG	GGA	CAA	GTG	GGA	CCC	CCT	TGC	CTC	TCA	TCC	CTG	CTG 270
Arg	Gly	Gln	Val	Gly	Pro	Pro	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu
		80					85					90
GTG	CAG	CTT	TCT	GGA	CAG	GTT	CGC	CTC	CTC	CTC	GGG	GCC 309
Val	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala
				95					100			
CTG	CAG	GAC	CTC	CTT	GGA	ATG	CAG	CTT	CCT	CCA	CAG	GGA 348
Leu	Gln	Asp	Leu	Leu	Gly	Met	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly
	105					110					115	
AGG	ACC	ACA	GCT	CAC	AAG	GAT	CCC	AGT	GCC	ATC	TTC	CTG 387
Arg	Thr	Thr	Ala	Gys	Lys	Asp	Pro	Ser	Ala	Ile	Phe	Leu
			120					125				
AAC	TTC	CAA	CAA	CTG	CTC	CGA	GGA	AAG	GTG	CGT	TTC	CTG 426
Asn	Phe	Gln	Gln	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu
130					135					140		
CTC	CTT	GTA	GTG	GGG	CCC	TCC	CTC	TGT	GCC	AAG	AGG	GCC 465
Leu	Leu	Val	Val	Gly	Pro	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Arg	Ala
	145						150					155

CCA CCC GCC ATA GCT GTC CCG AGC AGC ACC TCT CCA TTC 504
 Pro Pro Ala Ile Ala Val Pro Ser Ser Thr Ser Pro Phe
 160 165

CAC ACA CTG AAC AAG CTC CCA AAC AGG ACC TCT GGA TTG 543
 His Thr Leu Asn Lys Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu
 170 175 180

TTG GAG ACA AAC TCC AGT ATC TCA GCC AGA ACT ACT GGC 582
 Leu Glu Thr Asn Ser Ser Ile Ser Ala Arg Thr Thr Gly
 185 190

TCT GGA TTT CTC AAG AGG CTG CAG GCA TTC AGA GCC AAG 621
 Ser Gly Phe Leu Lys Arg Leu Gln Ala Phe Arg Ala Lys
 195 200 205

ATT CCT GGT CTG CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTA GAC 660
 Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp
 210 215 220

CAA ATC CCT GGA CAC CAG AAT GGG ACA CAC GGA CCC TTG 699
 Gln Ile Pro Gly His Gln Asn Gly Thr His Gly Pro Leu
 225 230

AGT GGA ATT CAT GGA CTC TTT CCT GGA CCC CAA CCC GGG 738
 Ser Gly Ile His Gly Leu Phe Pro Gly Pro Gln Pro Gly
 235 240 245

GCC CTC GGA GCT CCA GAC ATT CCT CCA GCA ACT TCA GGC 777
 Ala Leu Gly Ala Pro Asp Ile Pro Pro Ala Thr Ser Gly
 250 255

ATG GGC TCC CGG CCA ACC TAC CTC CAG CCT GGA GAG TCT 816
 Met Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Leu Gln Pro Gly Glu Ser
 260 265 270

CCT TCC CCA GCT CAC CCT TCT CCT GGA CGA TAC ACT CTC 855
 Pro Ser Pro Ala His Pro Ser Pro Gly Arg Tyr Thr Leu
 275 280 285

TTC TCT CCT TCA CCC ACC TCG CCC TCC CCC ACA GTC CAG 894
 Phe Ser Pro Ser Pro Thr Ser Pro Ser Pro Thr Val Gln
 290 295

CTC CAG CCT CTG CTT CCT GAC CCC TCT GCG ATC ACA CCC 933
 Leu Gln Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Ile Thr Pro
 300 305 310

AAC TCT ACC AGT CCT CTT CTA TTT GCA GCT CAC CCT CAT 972
Asn Ser Thr Ser Pro Leu Leu Phe Ala Ala His Pro His
315 320

TTC CAG AAC CTG TCT CAG GAA GAG TAAG GTGCTCAGAC 1010
Phe Gln Asn Leu Ser Gln Glu Glu
325 310 332

CCTGCCAACT TCAGCA 1026

(2)ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:20:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 1014 базови двойки
(B) ТИП: нуклеинова киселина
(C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:20:

AGC CCG GCT CCT CCT GCC TGT GAC CCC CGA CTC CTA 36
Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu
 1 5 10

AAT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC CTT CAC GGC AGA 75
Asn Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Gly Arg
15 20 25

CTG AGC CAG TGC CCA GAC ATT AAC CCT TTG TCC ACA CCT 114
Leu Ser Gln Cys Pro Asp Ile Asn Pro Leu Ser Thr Pro
30 35

GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTC ACC TTG GGA GAA TGG 153
Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Thr Leu Gly Glu Trp
40 45 90

AAA ACC CAG ACG GAG CAG ACA AAG GCA CAG GAT GTC CTG 192
Lys Thr Gln Thr Glu Gln Thr Lys Ala Gln Asp Val Leu
55 60

GGA GCC ACA ACC CTT CTG CTG GAG GCA GTG ATG ACA GCA 231
Gly Ala Thr Thr Leu Leu Leu Glu Ala Val Met Thr Ala
65 70 -75

CGG GGA CAA GTG GGA CCC CCT TGC CTC TCA TCC CTG CTG 270
Arg Gly Gln Val Gly Pro Pro Cys Leu Ser Ser Leu Leu
80 85 90

GTG CAG CTT TCT GGA CAG GTT CGC CTC CTC CTC GGG GCC 309
 Val Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala
 95 100

CTG CAG GAC CTC CTT GGA ATG CAG GGA AGG ACC ACA GCT 348
 Leu Gln Asp Leu Leu Gly Met Gln Gly Arg Thr Thr Ala
 105 110 115

CAC AAG GAT CCC AGT GCC ATC TTC CTG AAC TTC CAA CAA 387
 His Lys Asp Pro Ser Ala Ile Phe Leu Asn Phe Gln Gln
 120 125

CTG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG CTC CTT GTA GTG 426
 Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Leu Leu Val Val
 130 135 140

GGG CCC TCC CTC TGT GCC AAG AGG GCC CCA CCC GCC ATA 465
 Gly Pro Ser Leu Cys Ala Lys Arg Ala Pro Pro Ala Ile
 145 150 155

GCT GTC CCG AGC AGC ACC TCT CCA TTC CAC ACA CTG AAC 504
 Ala Val Pro Ser Ser Thr Ser Pro Phe His Thr Leu Asn
 160 165

AAG CTC CCA AAC AGG ACC TCT GGA TTG TTG GAG ACA AAC 543
 Lys Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn
 170 175 180

TCC AGT ATC TCA GCC AGA ACT ACT GGC TCT GGA TTT CTC 582
 Ser Ser Ile Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Phe Leu
 185 190

AAG AGG CTG CAG GCA TTC AGA GCC AAG ATT CCT GGT CTG 621
 Lys Arg Leu Gln Ala Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu
 195 200 205

CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTA GAC CAA ATC CCT GGA 660
 Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly
 210 215 220

CAC CAG AAT GGG ACA CAC GGA CCC TTG AGT GGA ATT CAT 699
 His Gln Asn Gly Thr His Gly Pro Leu Ser Gly Ile His
 225 230

GGA CTC TTT CCT GGA CCC CAA CCC GGG GCC CTC GGA GCT 738
 Gly Leu Phe Pro Gly Pro Gln Pro Gly Ala Leu Gly Ala
 235 240 245

CCA GAC ATT CCT CCA GCA ACT TCA GGC ATG GGC TCC CGG 777
 Pro Asp Ile Pro Pro Ala Thr Ser Gly Met Glu Ser Arg
 250 255

CCA ACC TAC CTC CAG CCT GGA GAG TCT CCT TCC CCA GCT 816
 Pro Thr Tyr Leu Gln Pro Gly Glu Ser Pro Ser Pro Ala
 260 265 270

CAC CCT TCT CCT GGA CGA TAC ACT CTC TTC TCT CCT TCA 855
 His Pro Ser Pro Gly Arg Tyr Thr Leu Phe Ser Pro Ser
 275 280 285

CCC ACC TCG CCC TCC CCC ACA GTC CAG CTC CAG CCT CTG 894
 Pro Thr Ser Pro Ser Pro Thr Val Gln Leu Gln Pro Leu
 290 295

CTT CCT GAC CCC TCT GCG ATC ACA CCC AAC TCT ACC AGT 933
 Leu Pro Asp Pro Ser Ala Ile Thr Pro Asn Ser Thr Ser
 300 305 310

CCT CTT CTA TTT GCA GCT CAC CCT CAT TTC CAG AAC CTG 972
 Pro Leu Leu Phe Ala Ala His Pro His Phe Gln Asn Leu
 315 320

TCT CAG GAA GAG TAAGGT GCTCAGACCC TGCCAACTTC 1010
 Ser Gln Glu Glu
 325 328

AGCA 1014

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:21:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 328 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:21:

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

Thr	Leu	Asn	Lys	Leu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	170	175	180
Asn	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	Phe	Leu	Lys	185	190	195
Arg	Leu	Gln	Ala	Phe	Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Leu	Asn	Gln	200	205	210
Thr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Ile	Pro	Gly	His	Gln	Asn	Gly	Thr	215	220	225
His	Gly	Pro	Leu	Ser	Gly	Ile	His	Gly	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	230	235	240
Pro	Gly	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Asp	Ile	Pro	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	245	250	255
Met	Gly	Ser	Arg	Pro	Thr	Tyr	Leu	Gln	Pro	Gly	Glu	Ser	Pro	Ser	260	265	270
Pro	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Gly	Arg	Tyr	Thr	Leu	Phe	Ser	Pro	Ser	275	280	285
Pro	Thr	Ser	Pro	Ser	Pro	Thr	Val	Gln	Leu	Gln	Pro	Leu	Leu	Pro	290	295	300
Asp	Pro	Ser	Ala	Ile	Thr	Pro	Asn	Ser	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Phe	305	310	315
Ala	Ala	His	Pro	His	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Glu			320	325	328

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:22:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 5141 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: двойноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:22:

TTCGAGCTCG CCCGACATTG ATTATTGACT AGAGTCGATC GACAGCTGTG 50
 GAATGTGTGT CAGTTAGGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA 100
 GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAG GTGTGGAAAG 150
 TCCCCAGGCT CCCGAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA 200
 GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAACTCC GCCCATCCCG CCCCTAACTC 250
 CGCCCAGTTC CGCCCATTCT CCGCCCCATG GCTGACTAAT TTTTTTTATT 300

TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG 350

AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG CAAAAAGCTA GCTTATCCGG 400

CCGGGAACGG TGCATTGGAA CGCGGATTCC CCGTGCCAAG AGTGACGTAA 450

GTACCGCCTA TAGAGCGATA AGAGGATTTT ATCCCCGCTG CCATCATGGT 500

TCGACCATTG AACTGCATCG TCGCCGTGTC CCAAATATG GGGATTGGCA 550

AGAACGGAGA CCTACCCTGG CCTCCGCTCA GGAACGAGTT CAAGTACTTC 600

CAAAGAATGA CCACAACCTC TTCAGTGGAA GGTAACAGA ATCTGGTGAT 650

TATGGGTAGG AAAACCTGGT TCTCCATTCC TGAGAAGAAT CGACCTTTAA 700

AGGACAGAAT TAATATAGTT CTCAGTAGAG AACTCAAAGA ACCACCACGA 750

GGAGCTCATT TTCTTGCCAA AAGTTTGGAT GATGCCTTAA GACTTATTGA 800

ACAACCGGAA TTGGCAAGTA AAGTAGACAT GGTTTGGATA GTCGGAGGCA 850

GTTCTGTTTA CCAGGAAGCC ATGAATCAAC CAGGCCACCT TAGACTCTTT 900

GTGACAAGGA TCATGCAGGA ATTTGAAAGT GACACGTTTT TCCCAGAAAT 950

TGATTTGGGG AAATATAAAC CTCTCCCAGA ATACCCAGGC GTCCTCTCTG 1000

AGGTCCAGGA GGAAAAAGGC ATCAAGTATA AGTTTGAAGT CTACGAGAAG 1050

AAAGACTAAC AGGAAGATGC TTTCAAGTTC TCTGCTCCCC TCCTAAAGCT 1100

ATGCATTTTT ATAAGACCAT GGGACTTTTG CTGGCTTTAG ATCCCCTTGG 1150

CTTCGTTAGA ACGCGGCTAC AATTAATACA TAACCTTATG TATCATAAC 1200

ATACGATTTA GGTGACACTA TAGATAACAT CCACTTTGCC TTTCTCTCCA 1250

CAGGTGTCCA CTCCCAGGTC CAACTGCACC TCGGTCTTAA GCTTCTGCAG 1300

GTCGACTCTA GAGGATCCCC GGGGAATTCA ATCGATGGCC GCCATGGCCC 1350

AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC 1400

AAATTCACA AATAAAGCAT TTTTTCCTACT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT 1450

CCAAACTCAT CAATGTATCT TATCATGTCT GGATCGATCG GGAATTAATT 1500

CGGCGCAGCA CCATGGCCTG AAATAACCTC TGAAAGAGGA ACTTGGTTAG 1550

GTACCTTCTG AGGCGGAAAG AACCAGCTGT GGAATGTGTG TCAGTTAGGG 1600

TGTGGAAAGT CCCCAGGCTC CCCAGCAGGC AGAAGTATGC AAAGCATGCA 1650

TCTCAATTAG TCAGCAACCA GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG 1700

GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CATAGTCCCG 1750

CCCCTAACTC CGCCCATCCC GCCCCTAACT CCGCCCAGTT CCGCCCATTG 1800

TCCGCCCCAT GGCTGACTAA TTTTCTTTAT TTATGCAGAG GCCGAGGCCG 1850

CCTCGGCCTC TGAGCTATTC CAGAAGTAGT GAGGAGGCTT TTTTGGAGGC 1900

CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT GTTACCTCGA GCGGCCGCTT AATTAAGGCG 1950

CGCCATTAA ATCCTGCAGG TAACAGCTTG GCACTGGCCG TCGTTTTACA 2000

ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGACG 2050

CACATCCCCC CTTGCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT 2100

CGCCCTTCCC AACAGTTGCG TAGCCTGAAT GGCGAATGGC GCCTGATGCG 2150

GTATTTTCTC CTTACGCATC TGTGCGGTAT TTCACACCGC ATACGTCAAA 2200

GCAACCATAG TACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG 2250

TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT 2300

CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTCCCCCG 2350

TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC 2400

GGCACCTCGA CCCCCAAAAA CTTGATTTGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG 2450

CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT 2500

CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAACTGG AACAACTC AACCCATCT 2550

CGGGCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTC GGCCTATTGG 2600

TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT 2650

ATTAACGTTT ACAATTTTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG 2700

CCGCATAGTT AAGCCAACTC CGCTATCGCT ACGTGACTGG GTCATGGCTG 2750

CGCCCCGACA CCCGCCAACA CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGCTCTG 2800

CTCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT 2850

GTGTCAGAGG TTTTCACCGT CATCACCGAA ACGCGCGAGG CAGTATTCTT 2900

GAAGACGAAA GGGCCTCGTG ATACGCCTAT TTTTATAGGT TAATGTCATG 2950

ATAATAATGG TTTCTTAGAC GTCAGGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTGCG 3000

CGGAACCCCT ATTTGTTTAT TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC 3050

TCATGAGACA ATAACCCTGA TAAATGCTTC AATAATATTG AAAAAGGAAG 3100

AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTCGCC CTTATTCCCT TTTTTCGGC 3150

ATTTTGCCTT CCTGTTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAAG 3200

ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC 3250

AACAGCGGTA AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT 3300

GATGAGCACT TTTAAAGTTC TGCTATGTGG CGCGGTATTA TCCCGTGATG 3350

ACGCCGGGCA AGAGCAACTC GGTCGCCGCA TACACTATTC TCAGAATGAC 3400

TTGGTTGAGT ACTCACCAGT CACAGAAAAG CATCTTACGG ATGGCATGAC 3450

AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCGG 3500

CCAACTTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT 3550

TTGCACAACA TGGGGGATCA TGTAACTCGC CTTGATCGTT GGAACCGGA 3600

GCTGAATGAA GCCATACCA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCAGCAG 3650

CAATGGCAAC AACGTTGCGC AACTATTAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA 3700

GCTTCCCGGC AACAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG 3750

ACCACTTCTG CGCTCGGCCC TTCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAT 3800

CTGGAGCCCG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA 3850

GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC 3900

AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA 3950

TTAAGCATTG GTAACGTGCA GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT 4000

GATTTAAAC TTCATTTTTA ATTTAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT 4050

TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTTCG TTCCACTGAG 4100

CGTCAGACCC CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT 4150

CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT 4200

GGTTTGTTTG CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAAGT 4250

GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG 4300

TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT 4350

GCTAATCCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA 4400
CCGGGTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC 4450
TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC 4500
CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCATTG AGAAAGCGCC ACGTTTCCCG 4550
AAGGGAGAAA GCGGACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA 4600
GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGGAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC 4650
TGTCGGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTGT TGATGCTCGT 4700
CAGGGGGGCG GAGCCTATGG AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG 4750
TTCCTGGCCT TTGCTGGCC TTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC 4800
CCCTGATTCT GTGGATAACC GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATACCG 4850
CTCGCCGAG CCGAACGACC GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG 4900
GAAGAGCGCC CAATACGCAA ACCGCCTCTC CCCGCGCGTT GGCCGATTCA 4950
TTAATCCAGC TGGCACGACA GGTTTCCCGA CTGGAAGCG GGCAGTGAGC 5000
GCAACGCAAT TAATGTGAGT TACCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA 5050
CASTTTATGC TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA 5100
ATTTACACACA GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGAATTA A 5141

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:23:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 21 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:23:

ATGTCNCCNG CNCCNCCNGC N 21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:24:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 21 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:24:

ATGTCTCCAG CGCCGCCAGC G 21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:25:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 21 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:25:

ATGTCGCCTG CTCCACCTGC T 21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:26:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 21 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:26:

ATGTCGCCAG CGCCACCAGC C 21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:27:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 21 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:27:

ATGTCCCCAG CCCCACCCGC A 21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:28:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 21 бази

- (B) ТИП: нуклеинова киселина
 (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:28:

ATGTCGCCAG CGCCGCCAGC G 21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:29:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 25 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:29:

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:30:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 26 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:30:

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Pro	Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu
1			5						10					15
Leu	Arg	Asp	Asp	Xaa	Val	Leu	His	Gly	Arg	Leu				
			20						25	26				

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:31:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 25 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:31:

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:32:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 14 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:32:

Xaa Pro Ala Pro Pro Ala Xaa Asp Pro Arg Leu Xaa Asn Lys
 1 5 10 14

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:33:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 9 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:33:

Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg
 1 5 9

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:34:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 45 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:34:

GCCGTGAAGG ACGTGGTCGT CACGAAGCAG TTTATTTAGG AGTCG 45

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:35:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 20 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:35:

CCNGCNCCNC CNGCNTGYGA 20

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:36:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 21 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:36:

NCCRTGNARN ACRTGRTCRT C 21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:37:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 69 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: еднoверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:37:

CCAGCGCCGC CAGCCTGTGA CCCCCGACTC СТАААТАААС TGCCTCGTGA 50

TGACCACGTT CAGCACGGC 69

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:38:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 69 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: еднoверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:38:

GCCGTGGCTG AACGTGGTCA TCACGAGGCA GTTTATTTGA GAGTCGGGGG 50

TCACAGGCTG GCGGCGCTGG 69

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:39:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 69 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: еднoверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:39:

CCAGCACCTC CGGCATGTGA CCCCCGACTC СТАААТАААС TGCTTCGTGA 50

CGACCACGTC CATCACGGC 69

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:40:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 69 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: еднoверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:40:

GCCGTGATGG ACGTGGTCGT CACGAAGCAG TTTATTTAGG AGTCGGGGGT 50
 CACATGCCGG AGGTGCTGG 69

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:41:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 69 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:41:

CCAGCACCGC CGGCATGTGA CCCCCGACTC СТАААТАААС TGCTTCGTGA 50
 CGATCATGTC TATCACGGT 69

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:42:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 69 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:42:

ACCGTGATAG ACATGATCGT CACGAAGCAG TTTATTTAGG AGTCGGGGGT 50
 CACATGCCGG CGGTGCTGG 69

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:43:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 37 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:43:

GCTAGCTCTA GAAATTGCTC CTCGTGGTCA TGCTTCT 37

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:44:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 22 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:44:

CAGTCTGCCG TGAAGGACAT GG 22

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:45:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 24 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:45:

TGTGGACTTT AGCTTGGGAG AATG 24

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:46:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 22 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:46:

GGTCCAGGGA CCTGGAGGTT TG 22

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:47:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 31 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:47:

ATCGATATCG ATAGCCAGAC ACCCCGGCCA G 31

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:48:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 36 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:48:

GCTAGCTCTAGACAGGGAAG GGAGCTGTAC ATGAGA 36

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:49:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 24 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:49:

CTCCTTGGA CCCAGGGCAG GACC 24

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:50:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 24 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:50:

GGTCCTGCCC TGGGTTCCAA GGAG 24

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:51:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 27 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:51:

CTGCTCCGAG GAAAGGACTT CTGGATT 27

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:52:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 27 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:52:

AATCCAGAAG TCCTTTCCTC GGAGCAG 27

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:53:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 28 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:53:

CCCTCTGCGT CGCGGCGGCC CCACCCAC 28

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:54:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 28 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:54:

GTGGGTGGGG CCGCCGCGAC GCAGAGGG 28

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:55:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 35 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:55:

GACTCGAGGA TCCATCGATT TTTTTTTTTT TTTT 35

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:56:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 17 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:56:

GACTCGAGGA TCCATCG 17

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:57:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 32 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:57:

GCTAGCTCTA GAAGCCCGGC TCCTCCTGCC TG 32

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:58:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 21 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:58:

CGAAATTAAC CCTCACTAAA G 21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:59:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 103 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:59:

TGCAGCAAGG GCTACTGCCA CACTCGAGCT GCGCAGATGC TAGCCTCAAG 50
 ATGGCTGATC CAAATCGATTCCGCGGCAAA GATCTTCCGG TCCTGTAGAA 100
 GCT 103

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:60:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 103 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:60:

AGCTTCTACA GGACCGGAAG ATCTTTGCCG CGGAATCGAT TTGGATCAGC 50
 CATCTTGAGG CTAGCATCTG CGCAGCTCGA GTGTGGCAGT AGCCCTTGCT 100
 GCA 103

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:61:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 18 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:61:

TCTCGCTACC GTTTACAG 18

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:62:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 25 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:62:

CAGGTACSSA CCAGGCGGTC TCGGT 25

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:63:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 18 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:63:

GGGCCATGAC ACTGTCAA 18

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:64:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 40 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:64:

GACCGCCACC GAGACCGCCT GGTGGGTACC TGTGGTCCTT 40

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:65:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 32 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:65:

ATCGATATCG ATCAGCCAGA CACCCCGGCC AG 32

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:66:

- (A) ДЪЛЖИНА: 35 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:66:

TCTAGATCTA GATCACCTGA CGCAGAGGGT GGACC 35

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:67:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 33 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:67:

AGTCGACGTC GACGTCGGCA GTGTCTGAGA ACC 33

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:68:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 36 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:68:

AGTCGACGTC GACTCACCTG ACGCAGAGGG TGGACC 36

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:69:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 62 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:69:

CGCGTATGCC AGCCCGGCTC CTCCTGCTTG TGACCTCCGA GTCCTCAGTA 50

AAGTGTCTCG TG 62

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:70:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 61 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:70:

AGTCACGAAG CAGTTTACTG AGGACTCGGA GGTCAACAAGC AGGAGGAGCC 50
GGGCTGGCAT A 61

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:71:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

(A) ДЪЛЖИНА: 37 бази

(B) ТИП: нуклеинова киселина

(C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:71:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTT TTCTTAA 37

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:72:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

(A) ДЪЛЖИНА: 37 бази

(B) ТИП: нуклеинова киселина

(C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:72:

CGCGTTAAGA AGAAATGCGA TATTCTTTTT CATAATT 37

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:73:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

(A) ДЪЛЖИНА: 69 бази

(B) ТИП: нуклеинова киселина

(C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:73:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTT ATCACCATCA CCATCACCAT 50
CACATCGAAG GTCGTAGCC 69

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:74:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

(A) ДЪЛЖИНА: 62 бази

(B) ТИП: нуклеинова киселина

(C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:74:

ATCGACCTTC GATGTGATGG TGATGGTGAT GGTGATGAAA TGCGATATTC 50
TTTTTCATAA TT 62

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:75:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 69 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:75:

СТАГААТТАТ GAAAAAGAAT ATCGCATTTTC ATCACCATCA CCATCACCAT 50
CACATCGAAC CACGTAGCC 69

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:76:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 62 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:76:

TACGTGGTTC GATGTGATGG TGATGGTGAT GGTGATGAAA TGCGATATTC 50
TTTTTCATAA TT 62

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:77:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 19 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:77:

TCCACCCTCT GCGTCAGGT 19

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:78:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 18 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:78:
AGCTACCTGA CGCAGAGG 18

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:79:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 62 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:79:

GCAGCAGTTC TAGAATTATG TCNCCNGCNC CNCCNGCNTG TGACCTCCGA 50
GTTCTCAGTA AA 62

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:80:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 49 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:80:

GAAGGATACG GGAGTCACGA AGCAGTTTAC TGAGAACTCG GAGGTCACA 49

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:81:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 45 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:81:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTA TCGAAGGTCTG TAGCC 45

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:82:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 38 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:82:

TACGACCTTC GATAAATGCG ATATTCTTTT TCATAATT 38

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:83:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 45 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:83:

СТАГААТТАТ GAAAAAGAAT ATCGCATTTT TTCTTAAACG TAGCC 45

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:84:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 38 бази
- (B) ТИП: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: едноверижна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:84:

TACGTTTAAG AAGAAATGCG ATATTCTTTT TCATAATT 38

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:85:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

- (A) ДЪЛЖИНА: 168 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:85:

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

Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu
				110					115					120
Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys
				125					130					135
Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly
				140					145					150
Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val
				155					160					165
Arg	Arg	Ala												
				168										

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:86:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

(A) ДЪЛЖИНА: 174 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:86:

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

Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe
				140					145					150
Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	Leu	Val	Gly
				155					160					165
Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Ala						
				170				174						

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:87:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

(A) ДЪЛЖИНА: 174 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:87:

Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ala	Phe	His	His	His	His	His	His	His	His	1	5	10	15
Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	20	25	30	
Leu	Ser	Lys	Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	35	40	45	
Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Val	His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	50	55	60	
Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	65	70	75	
Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	80	85	90	
Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	95	100	105	
Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	110	115	120	
Gly	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	125	130	135	
Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe	140	145	150	
Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	Leu	Val	Gly	155	160	165	
Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Ala							170	174		

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:88:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

(A) ДЪЛЖИНА: 7 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:88:

Thr Thr Ala His Lys Asp Pro
1 5 7

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:89:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

(A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:89:

His Val Leu His
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:90:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА

(A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO:90:

Ser Arg Leu Arg
1 4

1

4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:91:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:91:

Ser His Val Leu

1

4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:92:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:92:

His Ser Arg Leu

1

4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:93:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:93:

Ala Val Asp Phe

1

4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:94:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:94:

Ser Leu Gly Glu

1

4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:95:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:95:

Ala Val Thr Leu
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:96:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:96:

Leu Leu Glu Gly
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:97:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:97:

Leu Ser Ser Leu
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:98:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:98:

Leu Gly Gln Leu
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:99:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 5 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:99:

Cys Xaa Leu Ser Ser
1 5

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:100:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:100:

Leu Leu Gly Gln
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:101:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:101:

Ser Ser Leu Leu
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:102:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:102:

Gly Gln Leu Ser
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:103:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:103:

Cys Leu Ser Ser
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:104:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:104:

Leu Gln Ser Leu
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:105:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:105:

Leu Gly Thr Gln
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:106:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:106:

Ala Leu Gln Ser
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:107:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:107:

Leu Leu Gly Thr
1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:108:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:108:

Asn Ala Ile Phe

1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:109:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:109:

Leu Ser Phe Gln

1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:110:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 22 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:110:

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu

1 5 10 15

Leu Arg Asp Ser His Val Leu

20 22

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:111:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 24 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:111:

His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr

1 5 10 15

Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe

20 24

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:112:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 23 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:112:

Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln
 1 5 10 15
 Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu
 20 23

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:113:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 21 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:113:

Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr
 1 5 10 15
 Cys Leu Ser Ser Leu Leu
 20 21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:114:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 16 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:114:

Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln
 1 5 10 15
 Ser
 16

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:115:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 22 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:115:

Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His
 1 5 10 15
 Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
 20 22

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:116:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 25 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:116:

Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg GLy Lys Val Arg Phe Leu Met
 1 5 10 15
 Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg
 20 25

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:117:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:117:

Met Pro Pro Ala
 1 4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:118:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 5 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:118:

Met Ala Pro Pro Ala
 1 5

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:119:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 6 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:119:

Met Pro Ala Pro Pro Ala
 1 5 6

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:120:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 7 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:120:

Met Ser Pro Ala Pro Pro Ala

1

5

7

274

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:121:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:121:

Ala Pro Pro Ala

1

4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:122:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 5 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:122:

Pro Ala Pro Pro Ala

1

5

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:123:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 6 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:123:

Ser Pro Ala Pro Pro Ala

1

5

6

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:124:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 4 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:124:

Val Arg Arg Ala

1

4

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:125:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 5 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:125:

Val Arg Arg Ala Pro
 1 5

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:126:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 6 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:126:

Val Arg Arg Ala Pro Pro
 1 5 6

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:127:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 7 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:127:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr
 1 5 7

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:128:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 8 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:128:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr
 1 5 8

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:129:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 9 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:129:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala
1 5 9

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:130:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 10 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:130:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val
1 5 10

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:131:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 11 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:131:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro
1 5 10 11

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:132:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 12 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:132:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser
1 5 10 12

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:133:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 13 аминокиселини
- (B) ТИП: аминокиселина
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:133:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg
1 5 10 13

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:134:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 14 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:134:

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr
1				5					10				14

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:135:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 15 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:135:

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:136:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 16 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:136:

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

Leu
16

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:137:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 17 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:137:

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

Leu Val
17

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:138:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 18 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:138:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15
 Leu Val Leu
 18

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:139:

- (i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:
 (A) ДЪЛЖИНА: 19 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:139:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Thr
 19

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:140:

- (i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:
 (A) ДЪЛЖИНА: 20 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:140:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Thr Leu
 20

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:141:

- (i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:
 (A) ДЪЛЖИНА: 21 аминокиселини
 (B) ТИП: аминокиселина
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:141:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Thr Leu Asn
 20 21

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:142:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 22 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:142:

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser
1				5					10					15
Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Glu								
				20		22								

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:143:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 23 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:143:

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser
1				5					10					15
Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Glu	Leu							
				20			23							

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO:144:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 24 аминокиселини

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА SEQ ID NO:144:

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser
1				5					10					15
Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Glu	Leu	Pro						
				20			24							

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Тромбопоедин-Mpl-лиганден полипептид, получен по метод, който включва:

i) скриниране на човешка геномна библиотека с олигонуклеотид на основата на геномната последователност, описана във фиг.9, за да се изолира геномна ДНК, която включва последователността, кодираща mpl-лигандния екзон, описан във фиг. 9 заедно с останалите екзони на гена;

ii) включване на ДНК в експресионен вектор;

iii) трансфекция на клетка от бозайник с вектора и експресия на гена; и

iv) изолиране на mpl-лигандния полипептид от клетъчнокултуралната среда.

2. Тромбопоедин-Mpl-лиганден полипептид, получен по метод, който включва:

i) изолиране на геномна библиотека на геномна ДНК, която хибридизира при ниска строгост с ДНК-последователността

5'GCCCTGAAGGACGTGGTCGTCACGAAGCAGTTTATTTAGGAGTCG3'

и която съдържа екзоните, кодиращи mpl-лиганден полипептид;

ii) включване на ДНК в експресионен вектор;

iii) трансфекция на клетка от бозайник с вектора и експресия на гена; и

iv) изолиране на mpl-лигандния полипептид от клетъчнокултуралната среда.

3. Тромбопоедин-Mpl-лиганден полипептид, получен по метод, който включва:

i) идентифициране на подходящ клетъчен източник на РНК за човешкия mpl-лиганд и приготвяне на една или повече кДНК-библиотеки от тази РНК;

ii) скриниране на библиотеката или библиотеките чрез хибридизация с белязан олигонуклеотид на основата на кодиращата последователност, показана на фиг.9, за да се идентифицира и изолира клон, съдържащ кодиращата последователност на mpl-лиганда;

iii) включване на кодиращата ДНК в експресионен вектор, подходящ за експресия в клетки от бозайници;

iv) трансфекция на клетка от бозайник с вектора и експресия на кДНК;

v) изолиране на mpl-лигандния полипептид от клетъчнокултуралната среда.

4. Тромбопоедин-Mpl-лиганден полипептид, получен по метод, който включва:

i) приготвяне на кДНК-библиотека или библиотеки от mРНК, екстрахирана от човешки бъбречни клетки;

ii) скриниране на библиотеката или библиотеките чрез хибридизация с белязан олигонуклеотид на основата на кодиращата последователност, показана на фиг. 9, за да се идентифицира и изолира клон, съдържащ кодиращата последователност на mрl-лиганда;

iii) включване на кодиращата ДНК в експресионен вектор, подходящ за експресия в клетки от бозайници;

iv) трансфекция на клетка от бозайник с вектора и експресия на кДНК; и

v) изолиране на mрl-лигандния полипептид от клетъчнокултуралната среда.

5. Изолиран, по същество хомогенен mрl-лиганд, характеризиращ се с това, че:

a) лигандът стимулира включването на белязани нуклеотиди (^3H -тимидин) в ДНК на IL-3-зависима-Ba/F3-клетки, трансфектирани с човешки mрlР;

b) лигандът стимулира включването на ^{35}S в циркулиращи тромбоцити в "рикошетен" тромбоцитен тест;

c) лигандът е стабилен при рН 2,5, SDS-0,1% и 2М урея;

d) лигандът е гликопротеин;

e) аминокотерминалната последователност на полипептида е SPAPPACDPRLNKLRRDDHVLHGR или SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRL

6. Тромбопоедин-Mрl-лиганд, получен чрез пречистване от апластична плазма чрез хроматография на хидрофобните взаимодействия, хроматография с имобилизирано багрило и mрl-афинитетна хроматография и имащ видимо молекулно тегло в областта от 18-22 kDa, 28 kDa или 30 kDa, което се установява чрез SDS-PAGE, проведена при редуциращи условия.

7. Тромбопоедин-изолиран mрl-лиганден полипептид, кодиран от нуклеинова киселина, имаща последователност, която хибридизира при умерено строги условия с нуклеинова киселина, имаща последователност от нуклеотид 119 в посока напред на фиг.9 (ID NO:4 или ID NO:5).

8. Изолиран mрl-лиганд съгласно всяка една от предхождащите претенции, който е биологично активен.

9. Mрl-лиганден полипептид, който има най-малко 70% идентичност в последователността с полипептида на всяка една от претенции 1 до 7.

10. Mрl-лиганден полипептид, който е алел или вариант на полипептида на

всяка една от претенции 1 до 7, който запазва биологична активност на mprl-лиганда.

11. Mprl-лиганден полипептид съгласно всяка една от предхождащите претенции, който се получава от нечовешки вид.

12. Mprl-лиганден полипептид съгласно всяка една от предхождащите претенции, който се получава от човешки вид.

13. Mprl-лиганден полипептид съгласно всяка една от предхождащите претенции, който е негликозилиран.

14. Сливане, включващо mprl-лиганда на всяка една от предхождащите претенции, слят с хетероложен полипептид.

15. Изолирана молекула нуклеинова киселина, кодираща полипептид съгласно всяка една от предходните претенции.

16. Изолирана молекула нуклеинова киселина, избрана от:

а) кДНК-клон, който се получава от етап (iii) на претенция 3 или от етап (ii) на претенция 4;

б) ДНК-последователност, която е в състояние да хибридизира при строги условия с клон от а); и

с) генетичен вариант на всяка от ДНК-последователностите на а) и б), който кодира полипептид, притежаващ биологични свойства на природно срещащ се mprl-лиганден полипептид.

17. Изолирана нуклеинова киселина, имаща последователност, която хибридизира при умерено строги условия с нуклеинова киселина, имаща последователност от нуклеотид 119 по посока напред на фиг.9 (ID NO:4 или ID NO:5) и която кодира mprl-лиганд.

18. Геномна ДНК или кДНК, съответстваща поне на част от mprl-лигандния ген и която хибридизира при умерено до силно строги условия с природно срещаща се молекула нуклеинова киселина, имаща последователност, кодираща mprl-лиганд, където mprl-лигандът е, както се дефинира във всяка една от претенции 1 до 7.

19. Нуклеинова киселина на всяка една от претенции 15 до 18, оперативно свързана с промотор.

20. Експресионен вектор, включващ нуклеиновата киселина на всяка една от претенциите 15 до 18, оперативно свързана с контролни последователности, които се разпознават от гостоприемната клетка.

21. Клетка-гостоприемник, трансформирана с нуклеиновата киселина на вся-

ка една от претенции 15 до 20, така че да е в състояние да експресира нуклеиновата киселина за получаване на *mpl*-лиганден полипептид.

22. Метод, характеризиращ се с това, че включва експресията на рекомбинантна нуклеинова киселина на всяка една от претенции 15 до 20 в подходяща клетка-гостоприемник за получаване на *mpl*-лиганден полипептид.

23. Метод съгласно претенция 22, характеризиращ се с това, че *mpl*-лигандният полипептид се получава от клетката-гостоприемник или от средата, в която се култивират гостоприемните клетки.

24. Метод, характеризиращ се с това, че включва експресията в клетка на ендегенен *mpl*-лиганден ген под контрола на промотор/инхансърен елемент, супресор или екзогенен транскрипционен модулаторен елемент, който е включен в генома на клетката в близост и ориентация, достатъчни, за да въздействат върху транскрипцията на ДНК, кодираща *mpl*-лигандния полипептид.

25. Препарат, включващ *mpl*-лиганда на всяка една от претенции 1 до 14 или получен по метода на претенция 22 или 23 и фармацевтично приемлив носител.

26. Метод, характеризиращ се с това, че включва използването на *mpl*-лиганден полипептид на всяка една от претенции 1 до 14 или получен чрез метода на претенция 22 или 23 за получаване на лекарствено средство.

27. Препарат съгласно претенция 25 или получен чрез метод на претенция 26, който допълнително включва терапевтично ефективно количество от агент, избран измежду цитокини, колония-стимулиращи фактори и интерлевкини.

28. Препарат съгласно претенция 27, където средството се избира от LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, Epo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 и IL-11.

29. Метод за амплификация на тестова проба нуклеинова киселина, характеризиращ се с това, че включва инициране на полимеразната реакция с нуклеиновата киселина с нуклеинова киселина, съответстваща поне на част от геномната или кДНК от претенция 18.

30. Метод за определяне наличието на *mpl*-лиганден полипептид, характеризиращ се с това, че включва хибридизиране на нуклеиновата киселина на претенция 18 с тестова проба нуклеинова киселина и определяне наличието на нуклеиновата киселина на *mpl*-лигандния полипептид.

31. Метод, характеризиращ се с това, че включва използването на *mpl*-лиганден полипептид на всяка една от претенциите 1 до 14 или получен чрез процеса на

претенция 22 или претенция 23 за приготвянето на антитяло, специфично за mrl-лиганда.

32. Метод съгласно претенция 31, характеризиращ се с това, че се приготвя моноклонално антитяло.

33. Антитяло, така както се получава чрез метода на претенция 31 или претенция 32.

34. Антитяло, което е в състояние да свързва mrl-лигандния полипептид на всяка една от претенции 1 до 14.

35. Антитяло съгласно претенция 34, което е моноклонално антитяло.

36. Хибридомна клетъчна линия, продуцираща антитялото на претенция 33 или 35.

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: В. Кацарова

Редактор: А. Семерджиева

Пор. № 41497

Тираж: 40 MB

1 tcttccatacccatctgctccccagagggtcctgtgtgcacttggttcctggagcccttctccaccgccgatagattcctcaccccttggcccgccctttg

101 cccacacctactctgccagaagtgaagagcctaagcgccctccatggccccaggaagattcaggggagagggcccccaaacagggagcccacgcccagcca

-20 -10

MetGluLeuThrGluLeuLeuValValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProAlaCysAsp

201 gacacccccggccagaATGGAGCTGACTGAATTGCCTCGTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCCCGGCTCCTCCTGCTTGTTGTG

10 20 30 40

LeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSerGlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeu

301 ACCTCCGAGTCCTCAGTAACACTGCTTCGTGACTCCCATGTCCTTTCACAGCAGACTGAGCCAGTGCCACAGAGGTTACACCCTTTGCCCTACACCTGTCTCCTGCT

50 60 70

ProAlaValAspPheSerLeuGlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaValThrLeuLeuGluGlyVal

401 GCCTGCTGTGGACTTTAGCTTGGGAGAATGGAAAACCCAGATGGAGGAGACCAAGCACAGGACATTTCTGGAGCAGTAGACCTTCTGCTGGAGGGAGTG

80 90 100

MetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSerSerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeuLeu

501 ATGGCAGCACGGGACAACCTGGGACCCACTTGCCCTCTCATCCCTCCTGGGGCAGCTTTCTTGACAGGTCCGTCCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTCC

110 120 130 140

GlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIlePheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysValArgPhe

601 TTGGAACCCAGCTTCCTCCACAGGGCAGGACCACAGCTCACAAAGGATCCCAATGCCATCTTCTCCTGAGCTTCCAACACCTGTCTCCGAGGAAAGGTGCGTTT

150 160 170

LeuMetLeuValGlyGlySerThrLeuCysValArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeuValLeuThrLeuAsnGluLeu

701 CCTGATGCTTGTAGGAGGGTCCACCTCTCGCTCAGGGGGGGCCCCACCCACCCACAGCTGTCCCCAGCAGAACCTCTCTAGTCTCACACTGAACGAGCTC

180 190 200

ProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThrAlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGlyPheArgAlaLysIle

801 CC AACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACCAAACCTTCACTGCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGCGGATTTCAGAGCCCAAGA

FIG. 1 A

FIG. 1B

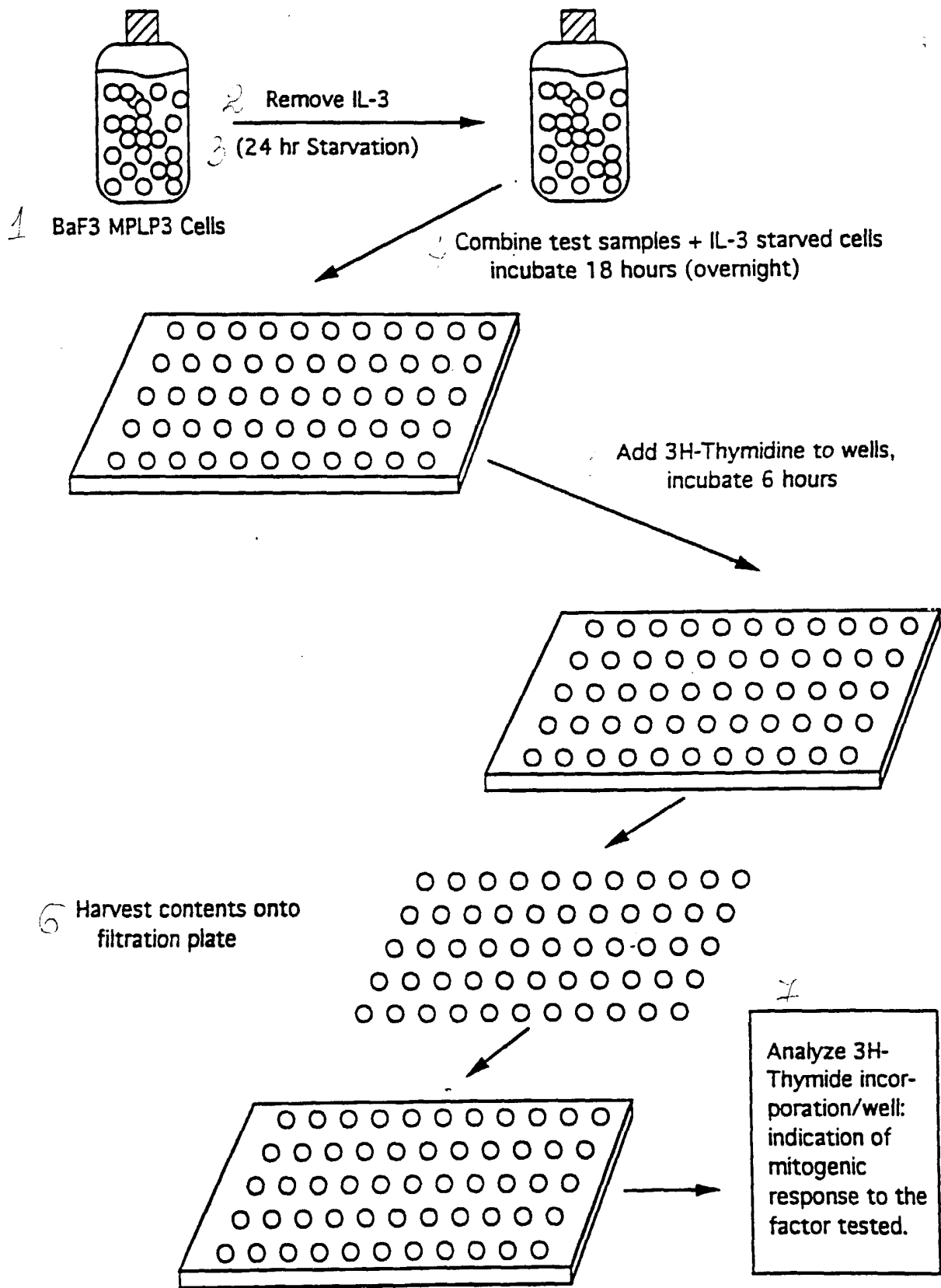


FIG.2

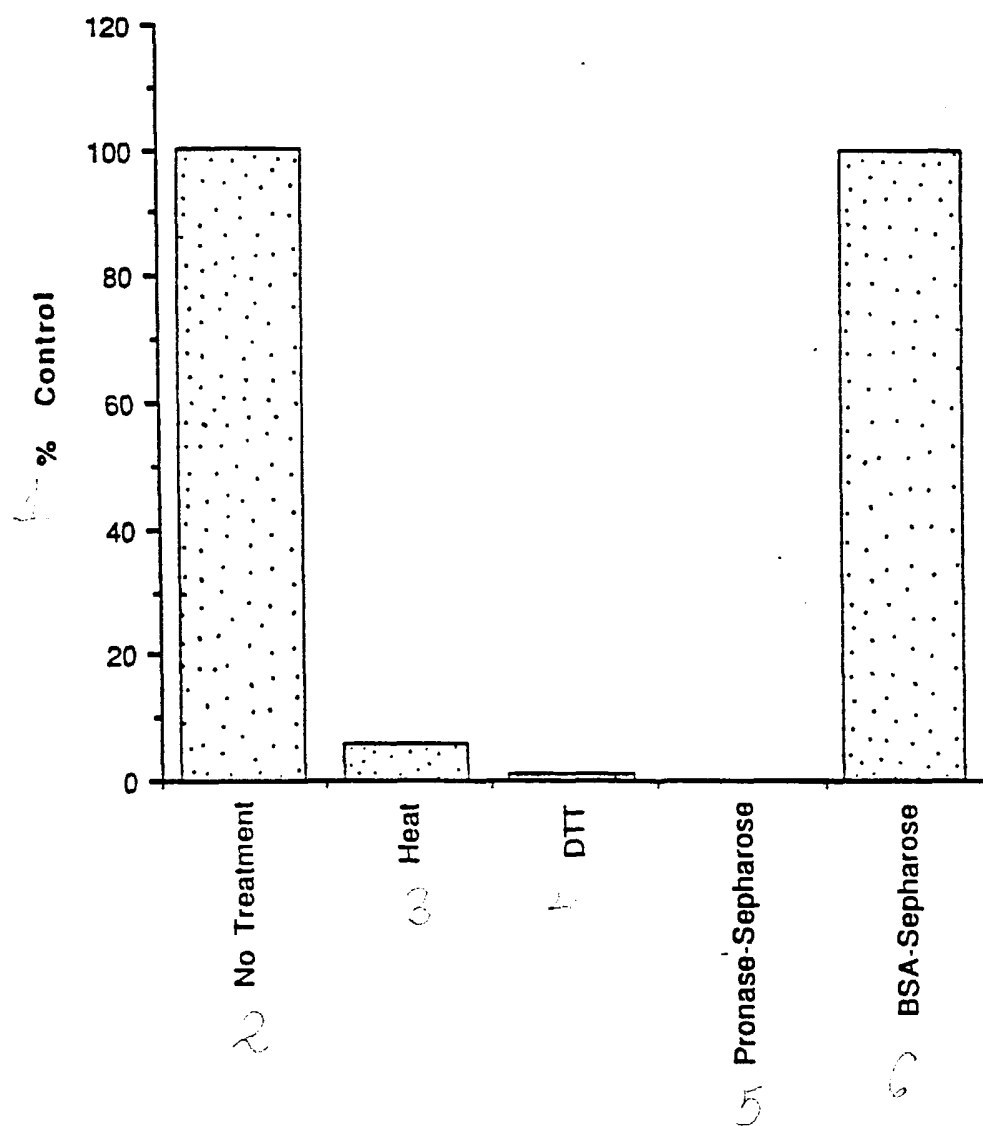


FIG.3

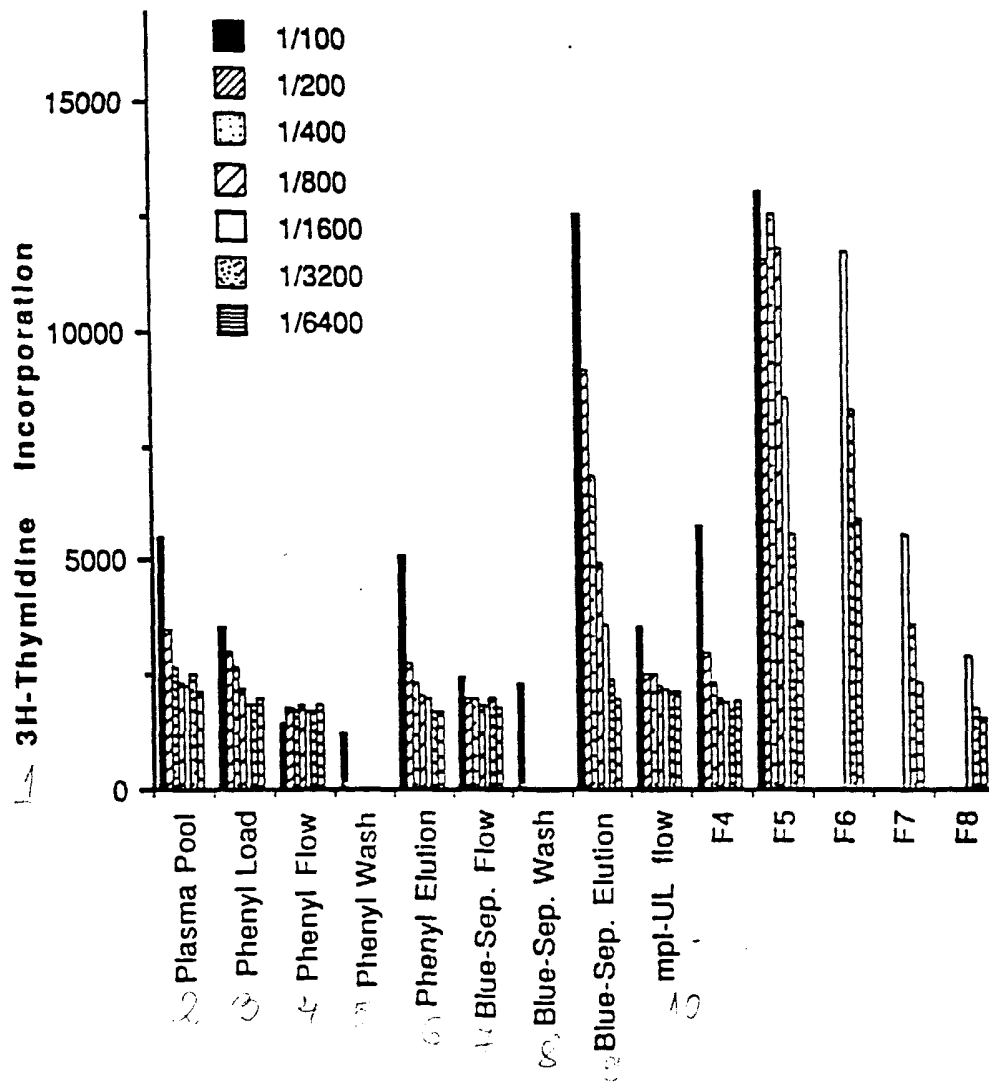


FIG.4

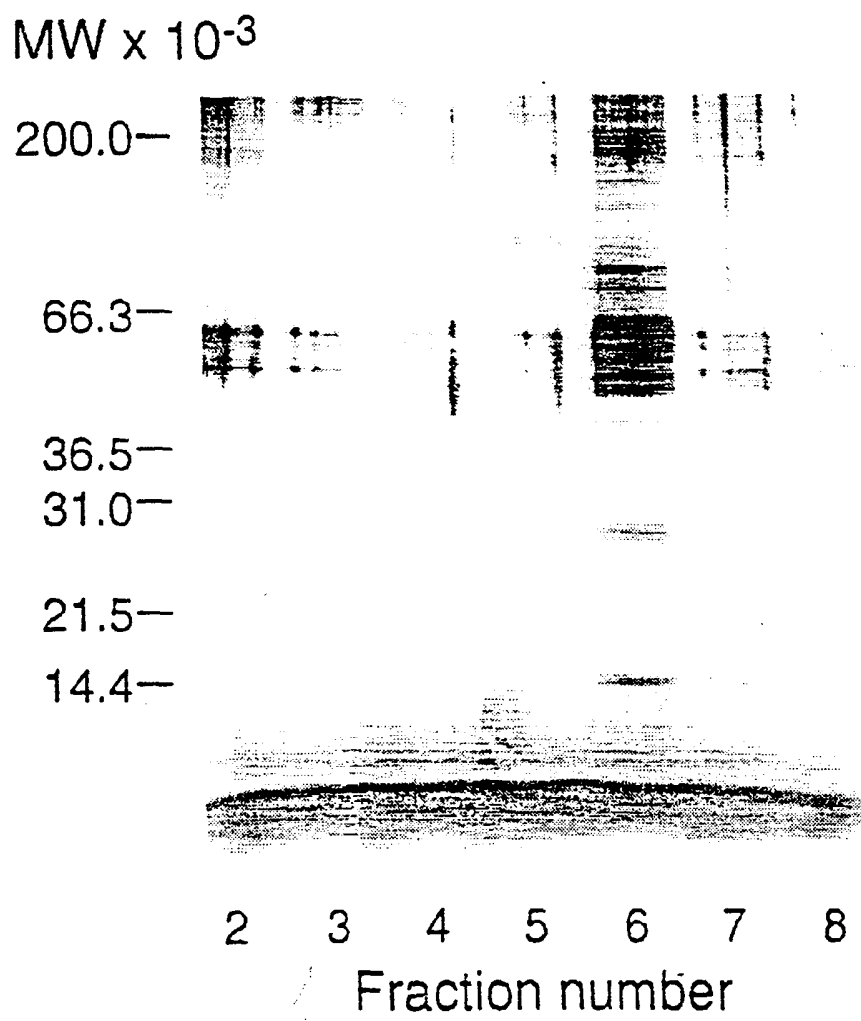


FIG. 5

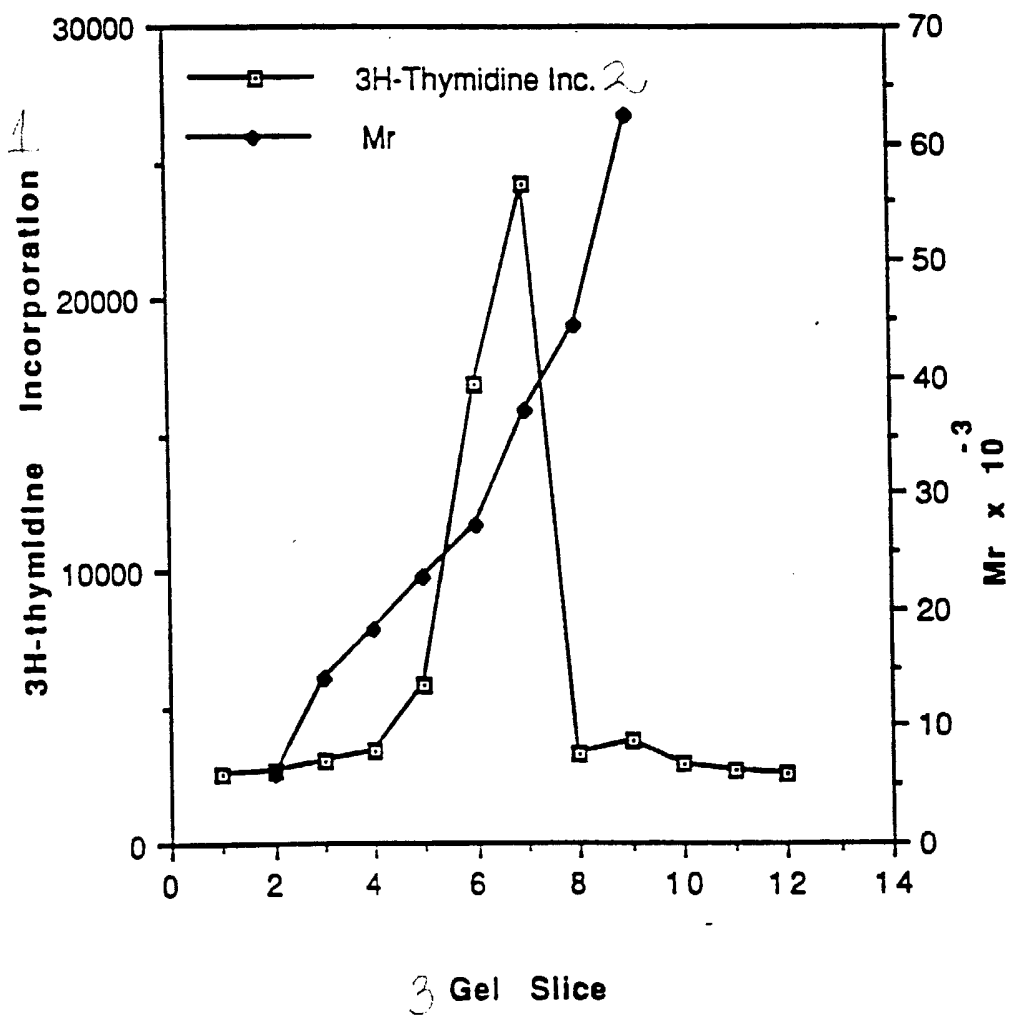


FIG.6

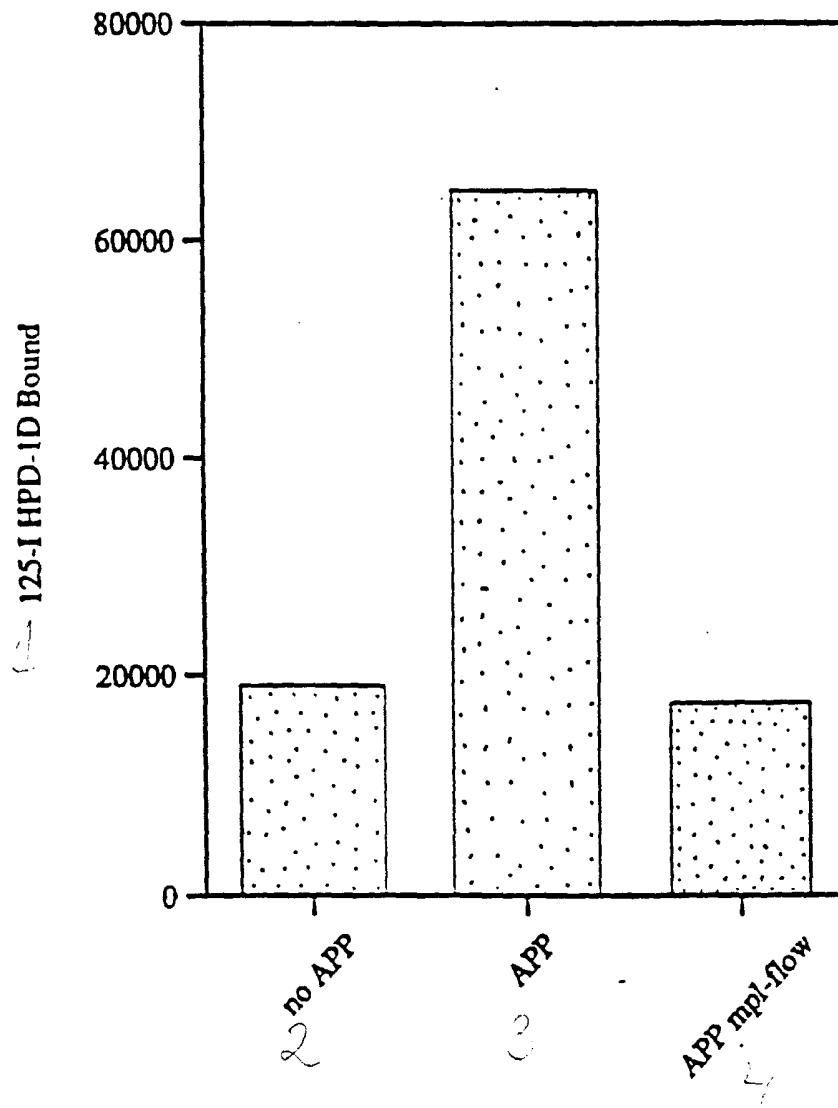


FIG.7

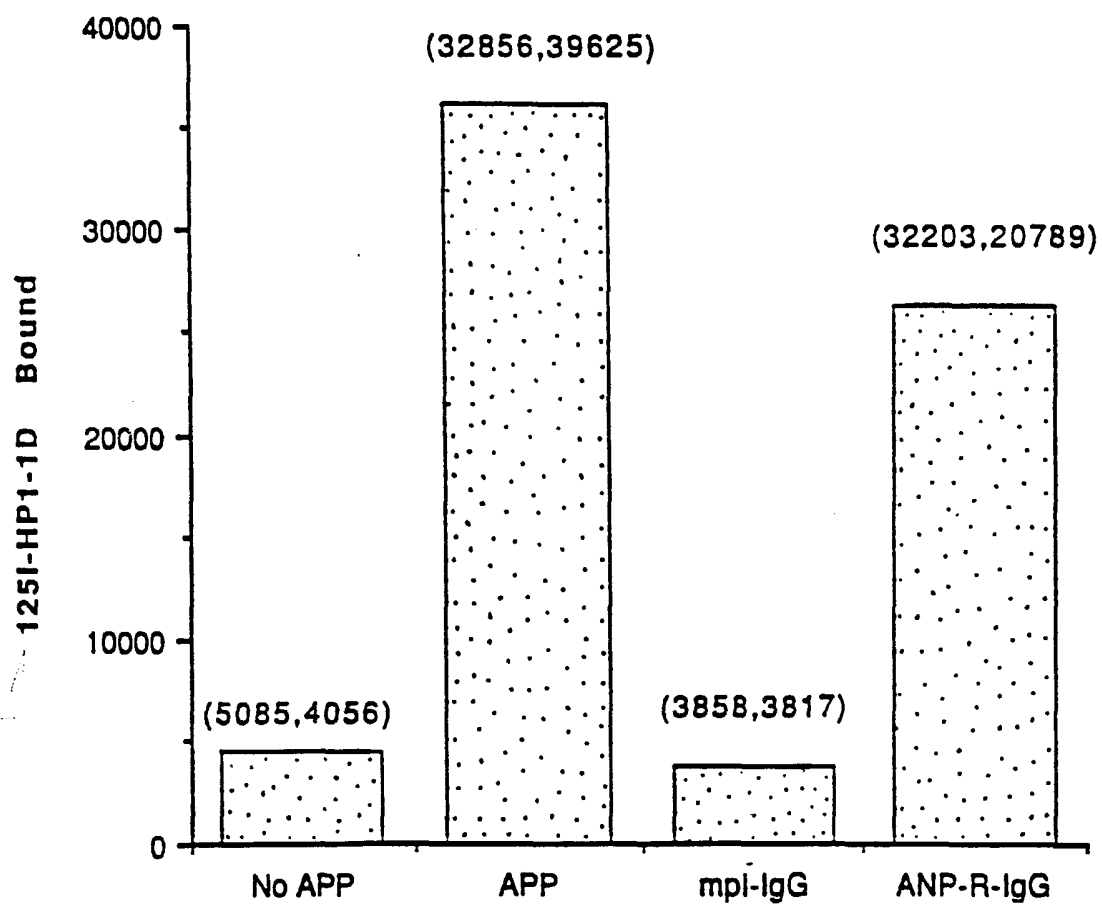


FIG.8

-10

L L L V V M L L L T

↓

1 GAATTCCTGG AATACCAGCT GACAATGATT TCCTCCTCAT CTTTCAACCT CACCTCTCCT CATCTAAGAA TTGCTCCTCG TGGTCATGCT TCTCCTAACT
CTTAAGGACC TTATGGTCGA CTGTTACTAA AGGAGGAGTA GAAAGTTGGA GTGGAGAGGA GTAGATTCTT AACGAGGAGC ACCAGTACGA AGAGGATTGA

10

A R L T L S S P A P P A C D L R V L S K L L R D L L V L H S R L

↓

101 GCAAGGCTAA CGCTGTCCAG CCCGGCTCCT CCTGCTTGAG ACCTCCGAGT CCTCAGTAA CTGCTTCGTG ACTCCCATGT CCTTCACAGC AGACTGGTGA
CGTTCCGATT GCGACAGGTC GGGCCGAGGA GGACGAACAC TGGAGGCTCA GGAGTCATTT GACGAAGCAC TGAGGGTACA GGAAGTGTCTG TCTGACCCACT

20

L L L V L H S R L

201 GAACTCCCAA CATTATCCCC TTATCCGCG TAACTGGTAA GACACCCATA CTCCCAGGAA GACACCATCA CTTCCTCTAA CTCCCTGACC CAATGACTAT
CTTGAGGGTT GTAATAGGGG AAATAGGCGC ATTGACCAAT CTGTGGGTAT GAGGGTCCTT CTGTGGTAGT GAAGGAGATT GAGGAACCTGG GTTACTGATA

301

TCTTCCCATTA TTGTCCCCAC CTAATGATCA CACTCTCTGA CAAGAATTAT TCTTCACAAT ACAGCCCCGA TTTAAAAGCT CTCGTCTAGA
AGAAGGGTAT AACAGGGGTG GATGACTAGT GTGAGAGACT GTTCTTAATA AGAAGTGTTA TGTCGGGCGT AAATTTTTCGA GAGCAGATCT

FIG.9

h-ML 1 S P A P P A C D L R V L S K L L R D S H V L H S R L S Q C P E V H P L P T P V L L P A V D F S L G E
h-epo 1 A P P R L I C D S R V L E R Y L L E A K E A E N I T T G C A E H C S L N E N I T V P D T K V N F Y A

h-ML 51 W K T Q M E E T K A Q D I L G A V T L L L E G V M A A R G Q L G P T C L S - - S L L G Q L S G Q V R
h-epo 51 W K R M E V G Q Q A V E V W O G L A L L S E A V L R G Q A L L V N S S Q P W E P L Q L H V D K A V S

h-ML 99 L L - - L G A L Q S L L G T Q - - L P Q G R T T A H K D P N A I F L S F Q H L L R G K V R F L -
h-epo 101 G L R S L T T L L R A L G A Q K E A I S P P D A A S A A P L R T I T A D T F R K L F R V Y S N F L R

h-ML 143 - - M L V G G S T L C V R R A P P T T A V P S R T S L V L T L N E L P N R T S G L L E T N F T A S A
h-epo 151 G K L K L Y T G E A C R T G D R

h-ML 191 R T T G S G L L K W Q Q G F R A K I P G L L N Q T S R S L D Q I P G Y L N R I H E L L N G T R G L F

h-ML 241 P G P S R R T L G A P D I S S G T S D T G S L P P N L Q P G Y S P S P T H P P T G Q Y T L F P L P P

h-ML 291 T L P T P V V Q L H P L L P D P S A P T P T S P L L N T S Y T H S Q N L S Q E G

FIG. 10

hML	1	SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGE
hML2	1	SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGE
hML3	1	SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGE
hML4	1	SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGE
hML	51	WK TQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLL
hML2	51	WK TQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLL
hML3	51	WK TQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLL
hML4	51	WK TQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLL
hML	101	LGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTL
hML2	101	LGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTL
hML3	101	LGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGK.DFW.IVGDKLH
hML4	101	LGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGK.DFW.IVGDKLH
hML	151	CVRRAPPTTAVPSRTSLVLTNLNLPNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKW
hML2	147	CVRRAPPTTAVPSRTSLVLTNLNLPNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKW
hML3	149	CLSQ.....NYWL.....WAS.EVAAGIQSQDSWSAEPNLQ..
hML4	145	CLSQ.....NYWL.....WAS.EVAAGIQSQDSWSAEPNLQ..

FIG. 11A

hML	201	QQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELNLNGTRGLFPGPSRRTLGA
hML2	197	QQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELNLNGTRGLFPGPSRRTLGA
hML3	179	VPGPNPRIPEEQDTRITLEWNSWTLSWTLTQDPRSPGHFLRNIRHRLPA
hML4	175	VPGPNPRIPEEQDTRITLEWNSWTLSWTLTQDPRSPGHFLRNIRHRLPA
hML	251	PDISSGTSDTGSLPPNLQPGYSPSPTHPPTGQYTLFPLPPTLPTPVVQLH
hML2	247	PDISSGTSDTGSLPPNLQPGYSPSPTHPPTGQYTLFPLPPTLPTPVVQLH
hML3	226	TQ.....PPAWIFSFP.....NPSSYWTVYALPSS.....
hML4	222	TQ.....PPAWIFSFP.....NPSSYWTVYALPSS.....
hML	301	PLLPDPSPAPTPTPTSPLLNTSYTHSQNLSQEG
hML2	297	PLLPDPSPAPTPTPTSPLLNTSYTHSQNLSQEG
hML3	251	THLAHPCGPAAPPAS.....
hML4	247	THLAHPCGPAAPPAS.....

FIG. 1 B

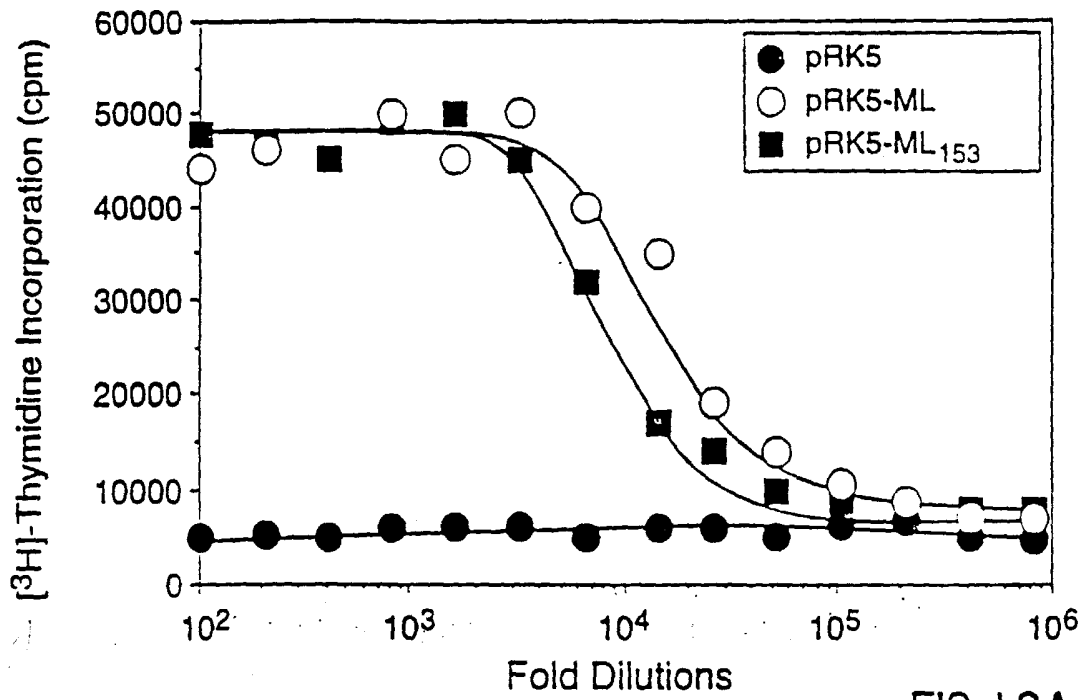


FIG. 1 2A

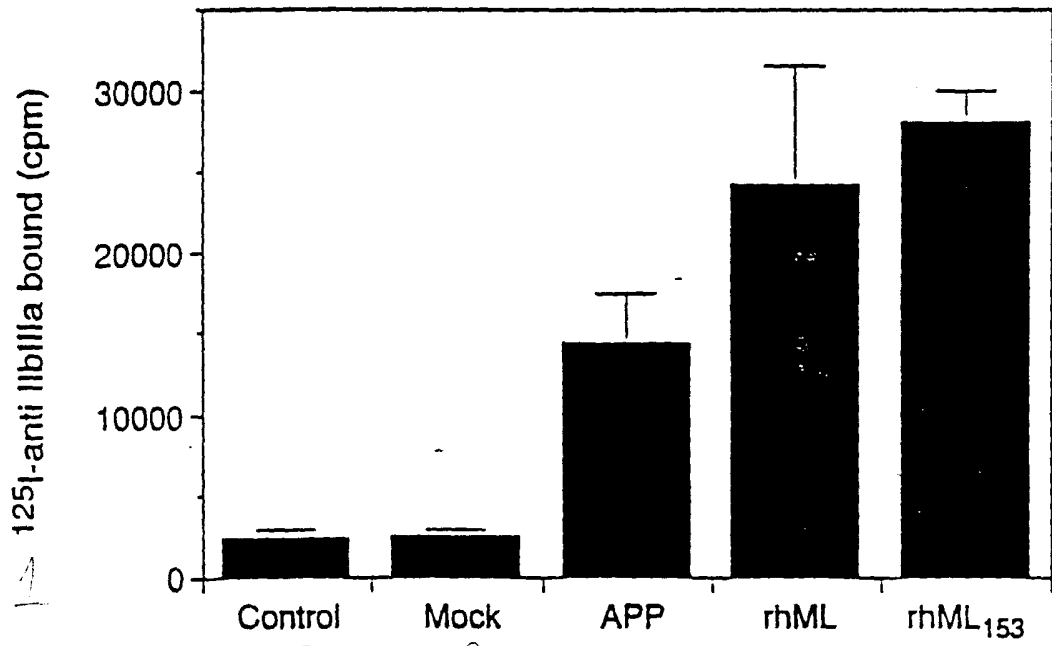


FIG. 1 2B

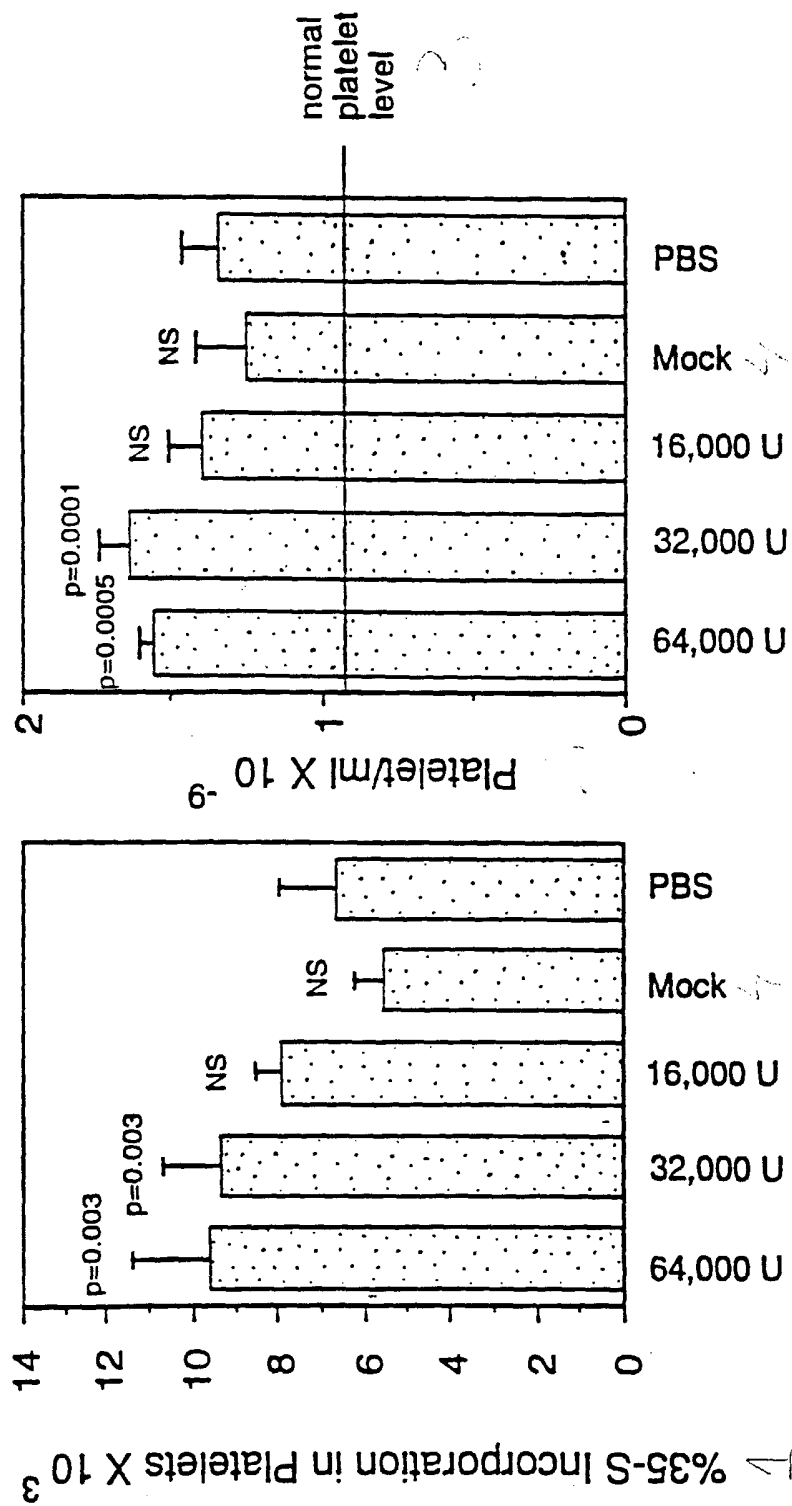


FIG. 12C

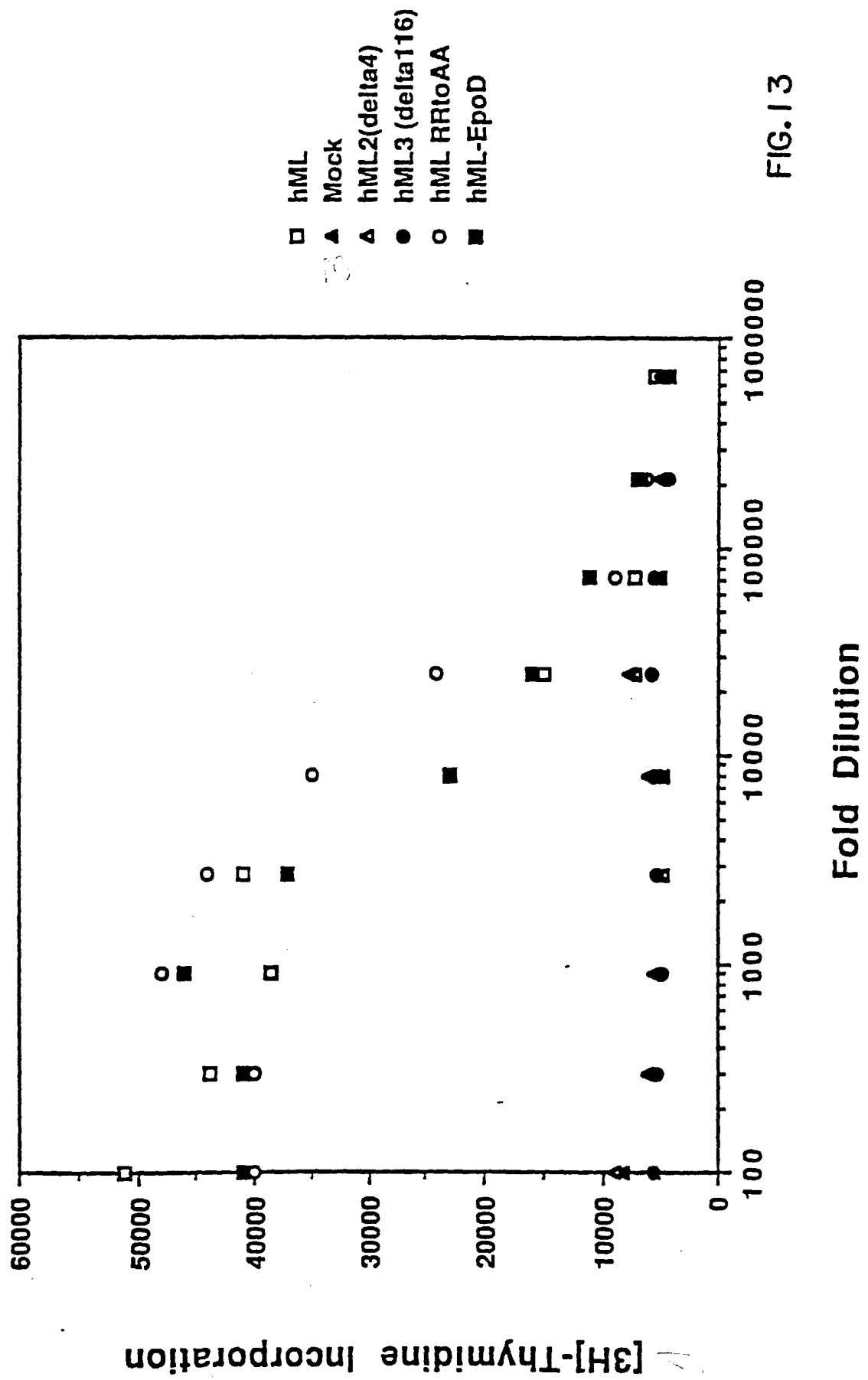


FIG. 13

1 ccagcctccttctctgttccctgggtcatgcctgcctcctgtctctcctgtctcctccacacacacccactatcctcccagctatcccctacaccc
 101 tccttcctaattcttgggagacatctcgtctggctggacgggaaaaattccaggatctaggccacacttctcagcagacatgccccctcttggggaggagga
 201 acaggagagacctgaggaaagtcttgggggacagggggtatgaggatcaagggtcagggccaggaagccccctgaggacagagactgtggggagagactgggac
 301 tgggaagaaagcaaggagctagagccaggggccaaaaaggggggccagcaggagggtatttgcgggggaggtatcttgcggggggtccagcagctgtcttctcctaagaca
 401 gggacacatgggcctggttatttccctctgtcacatgtggaacggtaggagatggaagacggaagacagaacaaggagggccctggggcacagagggtc
 501 tgytgtgtagccatccaagccactggaccccgagcagcagcacctaaagctcaggcttaacccagtgacggtgtgcgcacatacatgtgccccgcacct
 601 gacagtcactcaaccgtccaaaccttccccataacacccaacccataaacaggagatctctctcatgtgggcaatatccgtgttcccacttcgaaaagg
 701 gggaaatgacaagataggactccctagggtattacagaaagaaaagcaggaaaagcaagcatcctgttggtttcagcagcaggtatgatgtccaggggaaaa
 801 gaaatttggaatagccagggtgaaaaacccccaccaaattctaaacaagacctctgtcttcttccccagcaacacaaaatgtcctgccagattcctcctgga
 901 aaaaaacttctgctcctgtccccctccaggtcccaggttgcccatgtccaggaaaagatggatccccctatccaaatcttctcgtggtgtgtgtgggtg
 1001 gaggagtggaccctgggtccaggcagggtccagggaagagaaggcgtcacttccggggccttcaccagtgctgtgtgggtcctccttctctgtattgggca
 1101 gaagtggcccaggcagcgatgacctgctgctgtggaggggctgtgccccaccgccacatgtctTCCTACCCATCTGCTCCCCAGAGGGCTGCCTGCTG
 1201 TGCACCTGGGTCTTGAGCCCTTCTCCACCCGGtgagtggccagcagggtgtgggttatgtgaggggtagaaaggacagcaaaagagaaaaatggggtccccag
 1301 ctggggaggggcaggcaaaactggaacctacaggcactgacctttgtcgagaagagtgtagccttcccagaatgggaggagcagggcagagcaggggtag
 1401 ggggtgggtgctggttctgagggaactgatcacttacttgggtggaatacacgacagccccctggctggccctaaggaaaaggggacacatgagccccagggagaa
 1501 aataagagaggagctgcacttagggcttagcaaacacagtagtaagatggacacagcccccaatccccattcttagctgggtcattcctcgttagcttaag
 1601 gttctgaatctggtgctggggaagctgggcccaggcgaaggaggagggttaattggggaggaggggccccactcatgtttgacagacctacaggaaaa

< Start of cDNA sequence; Exon 1 >

FIG. 14A

9 valValMetLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProAlaCysAspLeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisVal
 3301 GTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACCGCTGTCCAGCCCGCTCCTCTGCTTGTGACCTCCGAGTCTCAGTAAACTGCTTCGTGACTCCCCATG
 End of signal peptide

43 LeuHisSerArgLeu
 3401 TCCTTCACAGCAGACTGgtgagaaactcccaacattatccccctttatccgcgtaactggtgtaagacacccatactcccaggaagacaccatcacttccctcta
 3501 actccttgaccaatgactattcttcccatattgtccccacactactgatacacactctctgacaagaattattcttcacaatacagcccgcatttaaaagc
 3601 tctcgtctagagatagtagtactcatggaggactagcctgcttattaggctaccatagctctctctatttccagctcccttctccccccaccacattctttttcaa
 2 < Exon 4 >
 48 SerGlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSerLeuGlyGluTrpLysThrGlnMet
 3701 cagAGCCAGTGCCACAGAGGTTACCCCTTTGCCCTACACCTGTCTGCTGCCTGTGTGGACTTTAGCTTGGGAGAATGGAAAAACCCAGATGGttaagaaagc
 3801 catccctaacccttggcctccctaagtcctgtcttccagtttccccactgcttccccatggattctccaacattcttggagctttttaaataatctcaccttca
 3901 gcttggccaccctaaccctaattctacattcacctatgatgatagcctgtggataagatgatggcttgagggtccaatatgtgaatagatttgaagctgaac
 4001 accatgaaaagctggagagaaaatcgctcatggccatgccttggacctattccygttcagctcttcttaaattggcatgaagaagcaagactcatatgtcat
 4101 ccacagatgacacaaaagctgggaagtaccactaaaaatacaaaaagactgaatcaagattcaaatcactgaaagactagggtcaaaaaaagggtgaaacaac
 4201 agagataataaacttctacatgtgggcccggggtcacgcctgtaatccccagcacttgggaggccgaggcagatcacctgagggcaggagtttgag
 4301 agcagcctggccaacatggcgaaaaccccgctctctactaagaatacaaaaattagccgggcatggtagtgcctgtaatcccagctacttgggaaggctg
 4401 aagcaggagaaatcccttgaaccaggagggtggagggtttagtgagctgagatcatgccaatgcactccagcctgggtgacaagagcaaaaactccgtctca
 4501 aaagaaaaaaaattctacatgtgtgtaaaattaatgagtaaaagtccatttccagcttccagccttccagcctgcttccatcatttaagcctctggccct
 4601 agcacttctctacgaaaaaggatctgagagaaattaaaattgcccccaaaacttaccatgtaacattactgaagctgctattctttaaaggtagtaattcttgtct
 4701 gttttagtgttttagcatccccattgttggaattgctcgtacagaaactctatttccgagtggaactaacattactgagcctgaacacccggacatccccct
 4801 gaagacatatgtctaatttatttaagaggggaccatatatttaaaactaacatgtgtcttagaaaagcagcagcctgaacagaaaagagactagaagcatgttttatggg

FIG. 14C

225 PheArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsnArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThr
 6401 GATTCAGAGCCCAAGATTCCCTGGTCTGCTGTAACCAACCTCCAGGTCCTGGACCAATCCCGGATACCTGAACAGGATACACGAACCTCTTGAATGGAAC
 258 ArgGlyLeuPheProGlyProSerArgArgThrLeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeuGlnPro
 6501 TCGTGGACTCTTTCTGGACCCCTCAGCAGGACCCCTAGGAGCCCGGACATTTCCCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCCCAACCTCCAGCCT
 291 GlyTyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPheProLeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeu
 6601 GGATATTCTCTCCCTCCCAACCCATCCTCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCTCTTCCACCCACCTTGCCCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCTGTC
 325 ProAspProSerAlaProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsnLeuSerGlnGluGly: STOP
 6701 TTCTTGACCCCTTCTGCTCCAAAGCCCAACCCCTACCCCTACCCCTCTTCTTAACACATCCTACACCCACTCCCAAGATCTGTCTCAGGAAGGGTAAGGTTCTCA
 6801 GACACTGCCGACATCAGCATTTGTCTCATGTACAGCTCCCTTCCCTGCAGGGCGCCCTGGGAGACAACTGGACAAGATTTCTCTACTTTCTCTGAAACCC
 6901 AAAGCCCTGGTAAAGGGATACACAGGACTGAAAAGGGAAATCATTTTTCACGTACATTATAAACCTTCAGAAGCTATTTTTTAAGCTATCAGCAATAC
 7001 TCATCAGAGCAGCTAGCTCTTTGGTCTATTTTCTGCAGAAATTTGCAACTCACTGATTCTCTACATGCTCTTTTCTGTGATAACTCTGCAAGGCCTGG
 7101 GCTGGCCTGGCAGTTGAACAGAGGGAGAGACTAACCTTGAGTCAGAAAACAGAGAAAGGGTAATTTCCCTTTGCTTCAAAATTCAGGCCTTCCAACGCCCC
 7201 CATCCCCCTTACTATCATCTCAGTGGGACTCTGTATCCCATATTCTTTAACAGATCTTTACTCTTGAGAAATGAATAAGCTTTCTCTCAGAAAatgctgtcc
 7301 ctatacactagacaaaactgagcctgtataagggaataaaatgggagcgccgaaaaagctccctaaaaagcaagggaagatgttcttcgaggggtggcaatag
 7401 atccccctcaccctgccaccccccaaaaaagctaacaggaaagccttggagagcctcacacccccaggtaaggctgtgtagacagttcagtaaaagacagg
 7501 acctggatgtgacagctgagcaaaacagctagagcttggcagctcagcaggaggcttggccaggcatggacgcctgcctccctcctgtggagggtcaggag
 7601 gaagtgcaggaaagtggcatgagtcaggctccttgagctcacacagcaggagaacaagtacaagtcaagtacaagttgaaggctcatttccccagttccccgc
 7701 aaatgcatctaaaaagcagctctgtgtgaccaccataaaactctgctaggggatctctaaaaagagtcaggcttatggggccttggcaaaataaagtgtgctgcc
 7801 ttgggtgctcaggaaaaagggttctgtgtgcacaaaaacacaaattccactgc

FIG. 14E

ML332 ML153

— 200

— 116
— 97

— 66.3
— 55.4

— 36.5
— 31.1

— 21.5

FIG.15

1 GAGTCCTTGG CCCACCTCTC TCCACCCCGA CTCTGCCGAA AGAAGCACAG AAGCTCAAGC CGCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTGAGG GAGAGGCCCC
 101 ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCCCT GGCACAGATG GAGCTGACTG ATTTGCTCCT GCGCGCCATG CTTCTTGACG TGGCAAGACT AACTCTGTCC
 SerProValA laProAlaCy sAspProArg LeuLeuAsnL ysLeuLeuAr gAspSerHis LeuLeuHiss erArgLeuSe rGlnCysPro AspValAspPro
 201 AGCCCCGTAG CTCCTGCCTG TGACCCCGA CTCCTAAATA AACTGCTGCG TGACTCCAC CTTCTTACA GCGGACTGAG TCAGTGTCCC GACGTGACCC
 LeuSerIl eProValLeu LeuProAlav alaSpPheSe rLeuGlyGlu TrpLysThrG InThrGluG nSerLysAla GlnAspIleL euGlyAlaVal
 301 CTTTGTCTAT CCTGTCTCTG CTGCTGTCTG TGGACTTTAG TGGGAGAA CCTGGGAGAA TGGAAAAACCC AGACGGAACA GAGCAAGGCA CAGGACATTC TAGGGGCAGT
 SerLeuLeu LeuGlyGlyV alMetAlaAl aArgGlyGln LeuGluProS erCysLeuSe rSerLeuLeu GlyGlnLeuS erGlyGlnVa lArgLeuLeu
 401 GTCCCTTCTA CTGGAGGGAG TGATGGCAGC ACAGGACAG TGGAAACCTT CCTGCCCTCTC ATCCCTCCTG GGACAGCTTT CTGGGCAGGT TCGCCTCCTC
 LeuGlyAlaL euGlnGlyLe uLeuGlyThr GlnGlyArgT hrThrAlaHi sLysAspPro AsnAlaLeuP heLeuSerLe uGlnGlnLeu LeuArgGlyLys
 501 TTGGGGGCCC TGCAGGGCCT CCTAGGAACC CCTAGGAACC CAGGGCAGGA CCACAGCTCA CAAGGACCCC AATGCCCTCT TCTTGAGCTT GCAACAACATG CTTGCGGGAA
 ValArgPh eLeuLeuLeu ValGluGlyP roThrLeuCy sValArgArg ThrLeuProT hrThrAlaVa lProSerSer ThrSerGlnL euLeuThrLeu
 601 AGGTGCGCTT CCTGCTTCTG GTAGAGGCTC CCACCCCTCTG TGTCAGACGG ACCCTGCCAA CCACAGCTGT CCCAAGCAGT ACTTCTCAAC TCCTCACACT

FIG. 16A

170 AsnLysPhe ProAsnArgT hrSerGlyLe uLeuGluThr AsnPheSerV alThrAlaAr gThrAlaGly ProGlyLeuL euSerArgLe uGlnGlyPhe
 701 AAACAAGTTC CCAACACAGGA CTTCTGGATT GTTGGAGACG AACCTTCAGTG TCACAGCCAG AACTGCTGGC CCTGGACTTC TGAGCAGGCT TCAGGGATTTC

180 ArgValLysI leThrProG1 yGlnLeuAsn GlnThrSerA rgSerProVa lGlnIleSer GlyTyrLeuA snArgThrHi sGlyProVal AsnGlyThrHis
 801 AGAGTCAAGA TTAATCTCTGG TCAGCTAAAT CAAACCTCCA GGTCCCCAGT CCAATCTCT GGATACCTGA ACAGGACACA CGGACCTGTG AATGGAACTC

190 GlyLeuPh eAlaGlyThr SerLeuGlnT hrLeuGluAl aSerAspIle SerProGlyA laPheAsnLy sGlySerLeu AlaPheAsnL euGlnGlyGly
 901 ATGGGCTCTT TGCTGGAACC TCACCTTCAGA CCCTGGAAGC CTCAGACATC TCGCCCGGAG CTTTCAACNA AGSCTCCCTG GCATTCAACC TCCAGGGTGG

200 LeuProPro SerProSerL euAlaProAs pGlyHisThr ProPheProP roSerProAl aLeuProThr ThrHisGlyS erProProG1 nLeuHisPro
 1001 ACTTCTCTCT TCTCCAAGCC TTGCTCCTGA TGGACACACA CCCTTCCCTC CTTACACCTGC CTTGCCACAC ACCCATGGAT CTCCACCCCCA GCTCCACCCC

210 LeuPheProA spProSerTh rThrMetPro AsnSerThra laProHisPr oValThrMet TyrProHisP roArgAsnLe uSerGlnGlu Thr
 1101 CTGTTTCTCTG ACCCTTCCAC CACCATGCCT AACCTCTACCG CCCCTCATCC AGTCACAATG TACCCCTCATC CCAGGAATTT GTCTCAGGAA ACATAGCGCG

220 1201 GGCACTGGCC CAGTGAGCGT CTGCAGCTTC TCTCGGGGAC AAGCTTCCCC AGGAAGGCTG AGAGGCAGCT GCATCTGCTC CAGATGTTCT GCTTTCACCT

230 1301 AAAAGGCCCT GGGGAAGGGA TACACAGCAC TGGAGATTGT AAAATTTTAG GAGCTATTTT TTTTAAACCT ATCAGCAATA TTCATCAGAG CAGCTAGCGA

240 1401 TCTTTGGTCT ATTTTCGGTA TAAATTTGAA AATCACTAAT TCT

FIG. 16B

1 gagtccttgccccacacctctctccaccgactctgcccgaagaagcacagaaagctcaagccgctccatgccccaggaaagattcaggggagagggcccc
↓
-20 MetGluLeuThrAspLeuLeuLeuAlaAlaMetLeuLeuAlaAlaValAlaArgLeuThrLeuSer
101 atacaggagaccacttcagttagacaccctggccagaATGGAGCTGACTGATTTGCTCCTGGCGCCATGCTTCTTGACGTGGCAAGACTAACTCTGTCTCC
-10
• 10 • 20 • 30
SerProValAlaProAlaCysAspProArgLeuLeuAsnLysLeuLeuArgAspSerHisLeuLeuHisSerArgLeuSerGlnCysProAspValAspPro
201 AGCCCCGTAGCTCCTGCCTGTGACCCAGACTCCTAAATAAACTGCTGCGTGACTCCCACTCCTTCACAGCCGACTGAGTCAGTGTCTCCGACGTCGACC
40 LeuSerIleProValLeuLeuProAlaValAspPheSerLeuGlyGluTrpLysThrGlnThrGluGlnSerLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaVal
301 CTTTGCTATCCCTGTTCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGCCTGGGAGAAATGGAACCCAGACGGAACAGAGCAAGGCACAGGACATTTCTAGGGGCAGT
70 SerLeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGluProSerCysLeuSerSerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeu
401 GTCCCTTCTACTGGAGGGAGTGATGGCAGCACGAGGACAGTTGGAACCTCCTGCCTCTCATCCCTCCTGGGACAGCTTTCTGGGCAGGTTCCGCCTCCTC
110 120 130
LeuGlyAlaLeuGlnGlyLeuLeuGlyThrGlnLeuProLeuGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaLeuPheLeuSerLeuGlnGlnLeu
501 TTGGGGGCCCTGCAGGGCCTCCTAGGAACCCAGCTTCCTCTACAGGGCAGGACCCACAGCTCACAAAGGACCCCAATGCCCTCTTCTTGAGCTTGCAACAAC
140 150 160
LeuArgGlyLysValArgPheLeuLeuLeuValGluGlyProThrLeuCysValArgArgThrLeuProThrThrAlaValProSerSerThrSerGln
601 TGCTTCGGGGAAAGGTGCGCTTCCTGCTTCTGCTAGAAGGTCCCACCTCTGTGTACAGCGGACCCCTGCCAACCCACAGCTGTCCCAAGCAGTACTTCTCA
170 180 190 200
LeuLeuThrLeuAsnLysPheProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheSerValThrAlaArgThrAlaGlyProGlyLeuLeuSerArg
701 ACTCCTCACACTAAACAAGTCCCAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACGAACTTCAAGTGTACAGCCAGAACTGTGCTGCCCTGGACTTCTGAGCAGG

FIG. 17A

210 LeuGlnGlyPheArgValIleThrProGlyGlnLeuAsnGlnThrSerArgSerProValGlnIleSerGlyTyrLeuAsnArgThrHisGlyProVal
801 CTTCAGGGATTACAGATCAAGATTACTCTGGTCAGCTAAATCAAACCTCCAGGTCCCCAGTCCAAATCTCTGGATACCTGAACAGACACACGGACCTG

240 AsnGlyThrHisGlyLeuPheAlaGlyThrSerLeuGlnThrLeuGluAlaSerAspIleSerProGlyAlaPheAsnLysGlySerLeuAlaPheAsn
901 TGAATGGAACTCATGGGCTCTTTGCTGGAACCTCACTTCAGACCCTGGAAGCCTCAGACATCTCGCCCCGAGCTTTCAACAAGGCTCCCTGGCATTTCAA

270 LeuGlnGlyGlyLeuProSerProSerLeuAlaProAspGlyHisThrProPheProProSerProAlaLeuProThrThrHisGlySerProPro
1001 CCTCCAGGGTGGACTTCCTCCTCCAGCCTTGCTCCTGATGGACACACACCCCTCCCTCCTTCCCTGCCTTGCCCCACCACCCATGGATCTCCACCC

310 GlnLeuHisProLeuPheProAspProSerThrThrMetProAsnSerThrAlaProHisProValThrMetTyrProHisProArgAsnLeuSerGlnGlu
1101 CAGCTCCACCCCTGTTCTCCTGACCCCTTCCACCACCATGCCTAACTCTACCGCCCTCATCCAGTCACAATGTACCCTCATCCCGAGAAATTTGTCTCAGG

Thr
1201 AAACATAGcgcgggcactggcccagtgagcgtctgcagcttctctcgggacaaagcttccccaggaaaggctgagaggcagctgcatctgctccagatggt

1301 ctgctttcacctaaaaagccctggggaaggatcacagcactggagattgtaaaaattttaggagctatttttttaacctatcagcaaatattcatcag

1401 agcagctagcgatcttttggtctatttttcggtataaaatttgaaaaatcactaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

1501 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

FIG.17B

hML3	1	S	P	A	P	A	C	D	L	R	V	L	S	K	L	L	R	D	S	H	V	L	H	S	R	L	S	Q	C	P	E	V	H	P	L	P	T	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E			
mML3	1	S	P	V	A	P	A	C	D	P	R	L	N	K	L	L	R	D	S	H	L	L	H	S	R	L	S	Q	C	P	D	V	D	P	L	S	I	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E			
hML3	51	W	K	T	Q	M	E	T	K	A	Q	D	I	L	G	A	V	T	L	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	Q	L	G	P	T	C	L	S	S	L	L	G	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L			
mML3	51	W	K	T	Q	T	E	Q	S	K	A	Q	D	I	L	G	A	V	S	L	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	Q	L	E	P	S	C	L	S	S	L	L	G	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L		
hML3	101	L	G	A	L	Q	S	L	L	G	T	Q	L	P	P	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	I	F	L	S	F	Q	H	L	L	R	G	K	D	F	W	I	V	G	D	K	L	H	C	L		
mML3	101	L	G	A	L	Q	G	L	L	G	T	Q	L	P	L	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	L	F	L	S	L	Q	L	L	R	G	K	D	F	W	I	V	G	D	E	L	Q	C	H			
hML3	151	S	Q	N	Y	W	L	W	A	S	E	V	A	A	G	I	Q	S	Q	D	S	W	S	A	E	P	N	L	Q	V	P	G	P	N	P	R	I	P	E	Q	D	T	R	T	L	E	W	N	S	W			
mML3	151	S	Q	N	C	W	P	W	T	S	E	Q	A	S	G	I	Q	S	Q	D	Y	S	W	S	A	K	S	N	L	Q	V	P	S	P	N	L	W	I	P	E	Q	D	T	R	T	C	E	W	N	S	W		
hML3	200	T	L	S	W	T	L	T	Q	D	P	R	S	P	G	H	F	L	R	N	I	R	H	R	L	P	A	T	Q	P	P	A	W	I	F	S	F	P	N	P	S	S	Y	W	T	V	Y	A	L	P	S		
mML3	201	A	L	C	W	N	L	T	S	D	P	G	S	L	R	H	L	A	R	S	F	Q	Q	R	L	P	G	I	Q	P	P	G	W	T	S	S	F	S	K	P	C	S											
hML3	250	S	T	H	L	A	H	P	C	G	P	A	P	P	P	A	S																																				

FIG.18

FIG. 18

m-ML	1	S	P	V	A	P	A	C	D	P	R	L	L	N	K	L	L	R	D	S	H	L	L	H	S	R	L	S	Q	C	P	D	V	D	P	L	S	I	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
p-ML	1	S	P	A	P	P	A	C	D	P	R	L	L	N	K	L	L	R	D	S	H	V	L	H	G	R	L	S	O	C	P	D	I	N	P	L	S	T	P	V	L	L	P	A	V	D	F	I	L	G	E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
h-ML	1	S	P	A	P	P	A	C	D	I	R	V	L	S	K	L	L	R	D	S	H	V	L	H	S	R	L	S	Q	C	P	E	V	H	P	L	P	I	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
m-ML	51	W	K	T	Q	T	E	Q	S	K	A	O	D	I	L	G	A	V	S	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	Q	L	E	P	S	C	L	S	S	L	L	G	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
p-ML	51	W	K	T	Q	T	E	Q	T	K	A	O	D	V	L	G	A	T	T	L	L	E	A	V	M	I	A	R	G	Q	V	G	P	P	C	L	S	S	L	L	V	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
h-ML	51	W	K	T	Q	M	E	E	T	K	A	O	D	I	L	G	A	V	T	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	Q	L	G	P	T	C	L	S	S	L	L	G	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
m-ML	101	L	G	A	L	Q	G	L	L	G	I	Q	L	P	L	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	L	F	L	S	L	Q	Q	L	L	R	G	K	V	R	F	L	L	V	E	G	P	T	L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
p-ML	101	L	G	A	L	Q	D	L	L	G	M	Q	L	P	P	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	S	A	I	F	L	N	F	Q	Q	L	L	R	G	K	V	R	F	L	L	V	V	G	P	S	L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
h-ML	101	L	G	A	L	Q	S	L	L	G	T	Q	L	P	P	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	I	F	L	S	F	Q	H	L	L	R	G	K	V	R	F	L	M	L	V	G	S	T	L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
m-ML	151	C	V	R	R	T	L	P	T	T	A	V	P	S	S	T	S	Q	L	T	L	N	K	F	P	I	N	R	I	S	G	L	L	E	T	N	S	S	V	T	A	R	T	A	G	P	G	L	S	R																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
p-ML	151	C	A	K	R	A	P	P	A	I	A	V	P	S	S	T	S	P	F	H	T	L	N	K	L	P	I	N	R	I	S	G	L	L	E	T	N	S	S	I	S	A	R	T	T	G	S	G	F	L	K	R																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
h-ML	151	C	V	R	R	A	P	P	T	T	A	V	P	S	R	I	S	L	V	L	T	L	N	E	L	P	I	N	R	I	S	G	L	L	E	T	N	S	S	A	S	A	R	T	T	G	S	G	L	L	K	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
m-ML	201	L	Q	G	F	R	V	K	I	T	P	G	Q	L	N	I	Q	T	S	R	S	P	V	Q	I	S	G	Y	L	N	R	I	H	E	L	L	N	G	I	H	G	L	F	A	G	I	S	L	Q	T	L	E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
p-ML	201	L	Q	A	F	R	A	K	I	-	P	G	L	L	N	I	Q	T	S	R	S	L	D	Q	I	P	G	H	O	N	G	I	H	G	P	L	S	G	I	H	G	L	F	P	G	P	Q	P	G	A	L	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
h-ML	201	Q	Q	G	F	R	A	K	I	-	P	G	L	L	N	I	Q	T	S	R	S	L	D	Q	I	P	G	Y	L	N	R	I	H	E	L	L	N	G	I	H	G	L	F	P	G	P	S	R	R	I	L	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
m-ML	251	A	S	D	I	S	P	G	A	F	N	K	G	S	L	A	F	N	L	Q	G	G	L	P	P	S	P	S	L	A	P	D	G	H	-	T	P	F	P	P	S	P	A	L	P	T	I	H	G	S	P																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
p-ML	250	A	P	D	I	P	A	T	S	G	M	G	S	R	P	T	Y	L	Q	P	G	E	S	P	S	P	A	H	P	S	P	A	H	P	S	P	G	R	Y	T	L	F	S	P	S	P	T	S	P	S	-	-	P	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
h-ML	250	A	P	D	I	S	S	G	T	S	D	T	G	S	L	P	P	N	L	Q	P	G	Y	S	P	S	P	T	H	P	T	I	G	Q	Y	I	L	F	P	L	P	T	L	P	T	-	-	-	P	V																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
m-ML	300	P	Q	L	H	P	L	F	P	D	P	S	T	I	M	P	N	A	S	T	A	P	H	P	V	T	M	Y	P	H	P	R	N	L	S	Q	E	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
p-ML	297	V	Q	L	Q	P	L	L	P	D	P	S	A	I	T	P	N	A	S	T	A	S	P	L	L	F	A	A	H	P	H	F	Q	N	L	S	Q	E	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
h-ML	297	V	Q	L	H	P	L	L	P	D	P	S	A	P	T	P	T	S	P	L	L	N	T	S	Y	T	H	S	Q	N	L	S	Q	E	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIG. 19

SerProAlaProProAlaCysAspProArgLeuLeuLeuAsnLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisGlyArgLeuSerGlnCysProAspIleAsnPro
 1 AGCCCGGCTCCTGCCTGTGACCCCGACTCCTAAATAAAGTCTTCGTGACTCCCATGTCTCTCACGGCAGACTGAGCCAGTGCACACATTAACC
 30
 LeuSerThrProValLeuLeuProAlaValAspPheThrLeuGlyGluTrpLysThrGlnThrGluGlnThrLysAlaGlnAspValLeuGlyAlaThr
 60
 101 CTTTGTCACACCTGTCTCTGTGCTGCCTGTGACTTCACCTTGGGAGATGGAAAAACCCAGACGGAGCAGACAAAGGCACAGGATGTCTCTGGGAGCCAC
 70
 ThrLeuLeuLeuGluAlaValMetThrAlaArgGlyGlnValGlyProProCysLeuSerSerLeuLeuValGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeu
 90
 201 AACCTTCTGCTGGAGGCAGTGATGACAGCAGCGGGACAAGTGGACCCCTTGCTCTCATCCCTGCTGGTGACGCTTCTGGACAGGTTCGCCCTCCTC
 110
 LeuGlyAlaLeuGlnAspLeuLeuGlyMetGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProSerAlaIlePheLeuAsnPheGlnGlnLeu
 120
 301 CTCGGGGCCCTGCAGGACCTCCTTGGATGCAGCTTCCTCCACAGGGAGGACCCACAGCTCACAAGGATCCCAAGTGCCCATCTTCTCTGAACTTCCCAACAAC
 130
 LeuArgGlyLysValArgPheLeuLeuValValGlyProSerLeuCysAlaLysArgAlaProProAlaIleAlaValProSerSerThrSerPro
 150
 401 TGCTCCGAGCAAGGTGGCTTCTTGCTCTCTGTAGTGGGGCCCTCCCTCTGTGCCAAGAGGGCCCCACCCGCCCATAGCTGTCTCCGAGCAGCACCTCTCC
 160

FIG. 20A

FIG. 20B

352
3/5

```

10
SerProAlaProProAlaCysAspProArgLeuLeuLeuAsnLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisGlyArgLeuSerGlnCysProAspIleAsnPro
1 AGCCCGGCTCCTCCTGCCTGTGACCCCGACTCCTAAATAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCCCTTCACGGCAGACTGAGCCAGTGCCTCCAGACATTAAAC
30

40
LeuSerThrProValLeuLeuProAlaValAlaAspPheThrLeuGlyGluTrpLysThrGlnThrLysAlaGlnAspValLeuGlyAlaThr
101 CTTTGTCCACACCTGTCCCTGCTGCTGTGACTTCACCTTGGAGAAATGGAAACCCAGACGGAGCAGACAAAGGCACAGGATGTCCTGGGAGCCAC
60

70
ThrLeuLeuLeuGluAlaValMetThrAlaArgGlyGlnValGlyProProCysLeuSerSerLeuLeuValGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeu
201 AACCCCTTCTGCTGGAGGCAGTGATGACAGCACGGGGACAAAGTGGGACCCCTTGCCCTCTCATCCCTGCTGGTGCAGCTTCTGGACAGGTTCCGCTCCTC
90

110
LeuGlyAlaLeuGlnAspLeuLeuGlyMetGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProSerAlaIlePheLeuAsnPheGlnGlnLeuLeuArgGlyLys
301 CTCGGGGCCCTGCAGGACCTCCTTGGAAATGCAGGGAAGGACACAGCTCACAAAGGATCCAGTCCCATCTTCTCCTGAACTTCCAACAACACTGCTCCGAGGAA
120 130

140
ValArgPheLeuLeuValValGlyProSerLeuCysAlaLysArgAlaProProAlaIleAlaValProSerSerThrSerProPheHisThrLeu
401 AGGTGCGTTTCCCTGCTCCTTGTAGTGGGGCCCTCCTCCTGTGTGCCAAGAGGGCCCCACCCGCCCATAGCTGTCTCCCGAGCAGCACCTCTCCATTCCACACACT
150 160

```

FIG.2 I A

170
 AsnLysLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnSerSerIleSerAlaArgThrThrGlySerGlyPheLeuLysArgLeuGlnAlaPhe 200
 501 GAACAAGCTCCCAACACAGGACCTCTGGATTGTGGAGACAAACTCCAGTATCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGATTCTCAAGAGGCTGCAGGCATTCT 190
 ArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyHisGlnAsnGlyThrHisGlyProLeuSerGlyIleHisGly 230
 601 AGAGCCAAAGATTCTCTGGTCTGCTGAACCAACCTCCAGGTCCCTAGACCAAAATCCCTGGACACCAAGATGGGACACACGACCCCTTGAGTGAATTCATG 220
 LeuPheProGlyProGlnProGlyAlaLeuGlyAlaProAspIleProProAlaThrSerGlyMetGlySerArgProThrTyrLeuGlnProGlyGlu 260
 701 GACTCTTTCTCTGGACCCCAACCCCGGGCCCTCGGAGCTCCAGACATTCCTCCAGCAACTTCAGGCATGGGCTCCCGGCCAACCTACCTCCAGCCTGGAGA 250
 SerProSerProAlaHisProSerProGlyArgTyrThrLeuPheSerProSerProThrSerProSerProThrValGlnLeuGlnProLeuLeuPro 290
 801 GTCTCCTTCCCGAGCTCACCCCTTCTCCTCGGACGATACACTCTCTCTCCTTCAACCCACCTCGCCCTCCCCCAGTCCAGCTCCAGCCTCTGCTTCCT 280
 AspProSerAlaIleThrProAsnSerThrSerProLeuLeuPheAlaAlaHisProHisPheGlnAsnLeuSerGlnGluGlu 320
 901 GACCCCTCTGCGATCACACCCCAACTCTTACCAGTCCCTCTTCTATTGTGAGCTCACCCCTCATTTCCAGAACCTGTCTCAGGAAGAGTAAGGTGCTCAGACCC 310

1001 TGCCAACTTCAGCA

FIG.2 I B

pML	1	SPAPPACDPRLLNKLLRDSHVLRGRLSQCPDINPLSTPVLPAVDFTLGE
pML2	1	SPAPPACDPRLLNKLLRDSHVLRGRLSQCPDINPLSTPVLPAVDFTLGE
pML	51	WKTEQTKAQDVLGATTLLEAVMTARGQVGPCLSSLLVQLSGQVRLL
pML2	51	WKTEQTKAQDVLGATTLLEAVMTARGQVGPCLSSLLVQLSGQVRLL
pML	101	LGALQDILLGMQLPPQGRTTAHKDPSAIFLNFAQQLLRGKVRFLLLVVGPSL
pML2	101	LGALQDILLGM...QGRTTAHKDPSAIFLNFAQQLLRGKVRFLLLVVGPSL
pML	151	CAKRAPPAAIAVPSSSTSPFFHTLNKLPNRTSGLLETNSSISARTTGSGLKRR
pML2	147	CAKRAPPAAIAVPSSSTSPFFHTLNKLPNRTSGLLETNSSISARTTGSGLKRR
pML	201	LQAFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGHHQNGTHGPLSGIHGLFPGPQPGALGA
pML2	197	LQAFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGHHQNGTHGPLSGIHGLFPGPQPGALGA
pML	251	PDIPPAATSGMGSRPTYLQPGESPSPAHPSPGRYTLFSPSPTSPSPTVQLQ
pML2	247	PDIPPAATSGMGSRPTYLQPGESPSPAHPSPGRYTLFSPSPTSPSPTVQLQ
pML	301	PLLPDPSPAITPNSTSPLLFAAHPHFQNLQEE
pML2	297	PLLPDPSPAITPNSTSPLLFAAHPHFQNLQEE

FIG.22

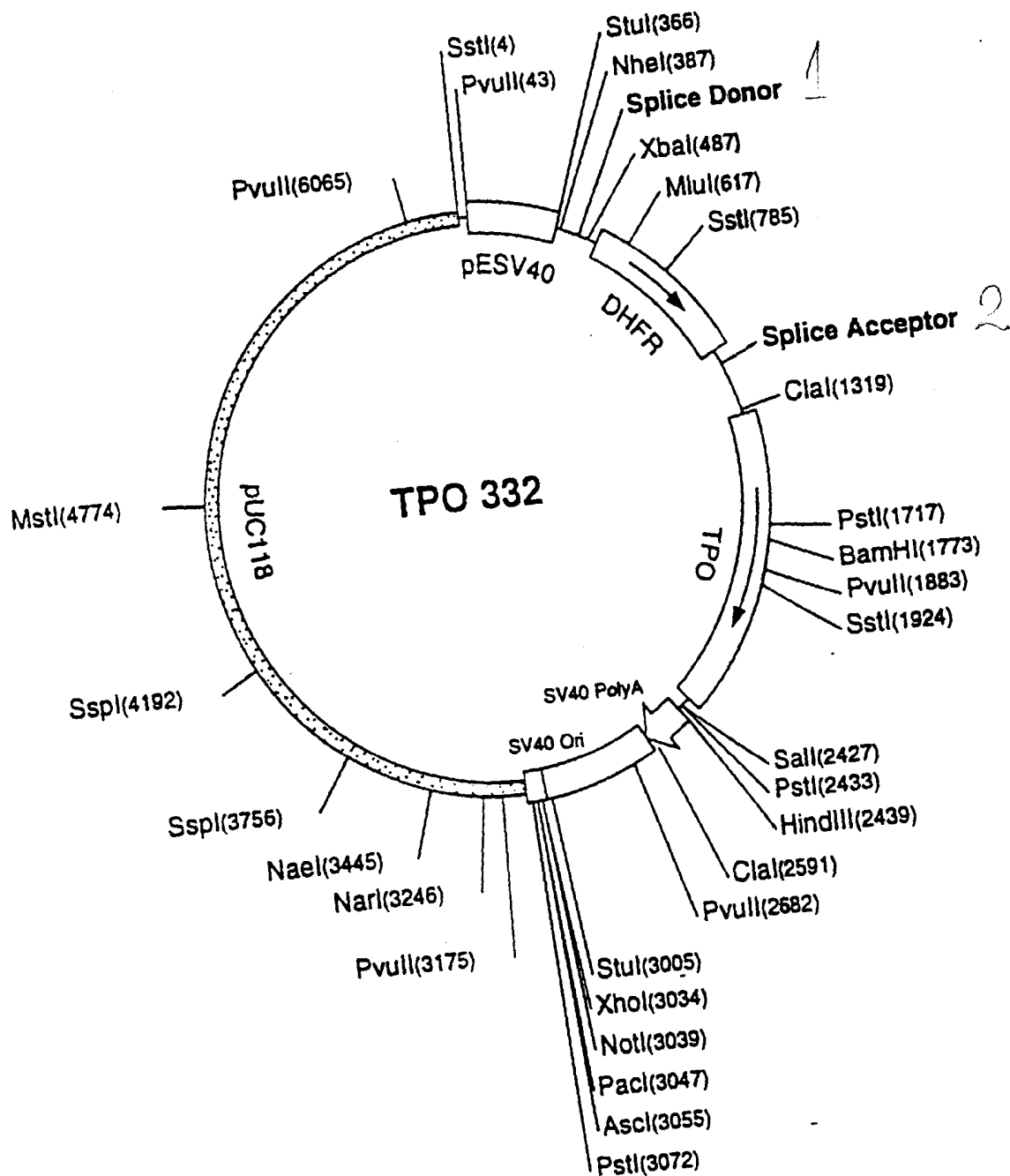


FIG.23

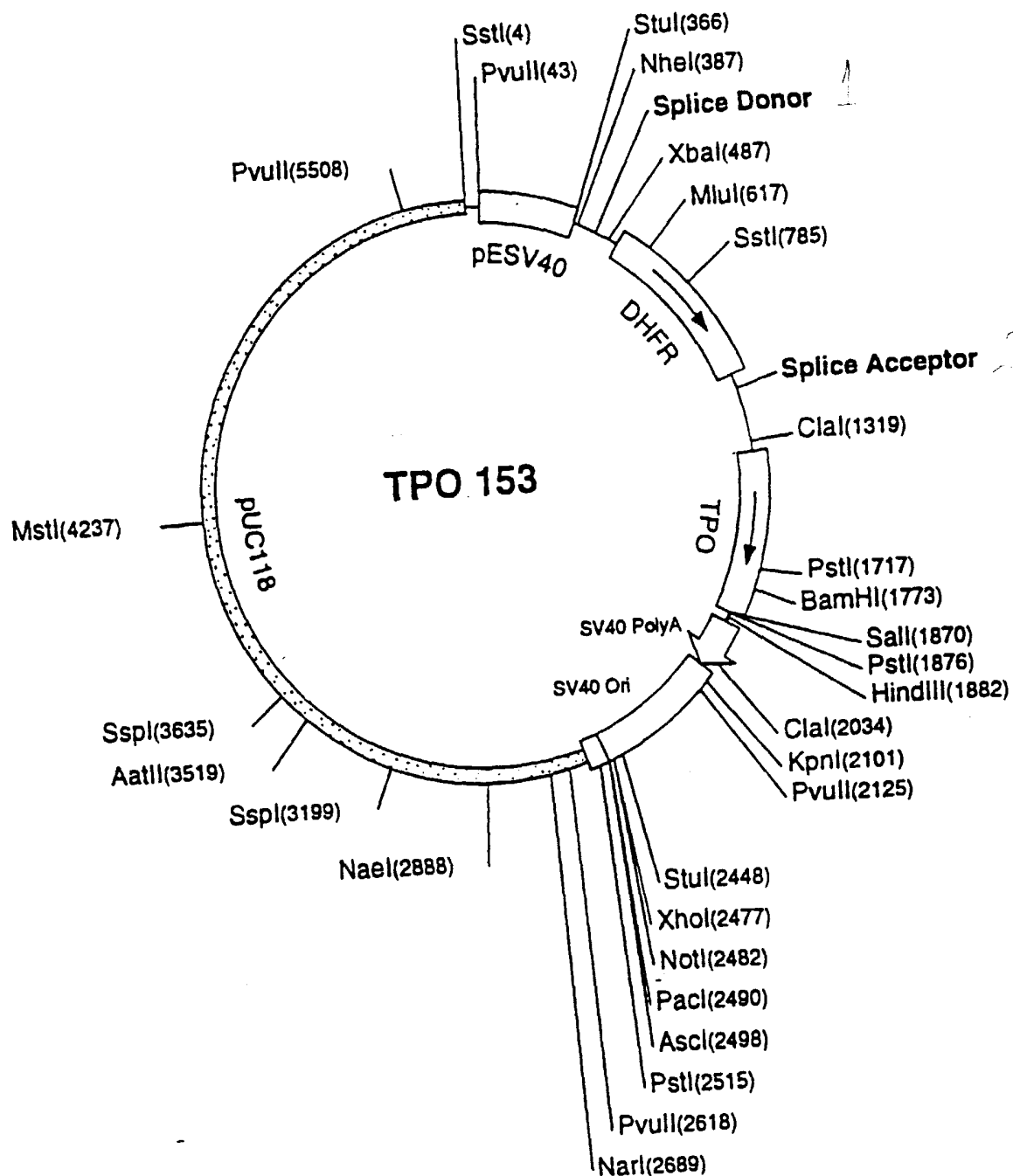
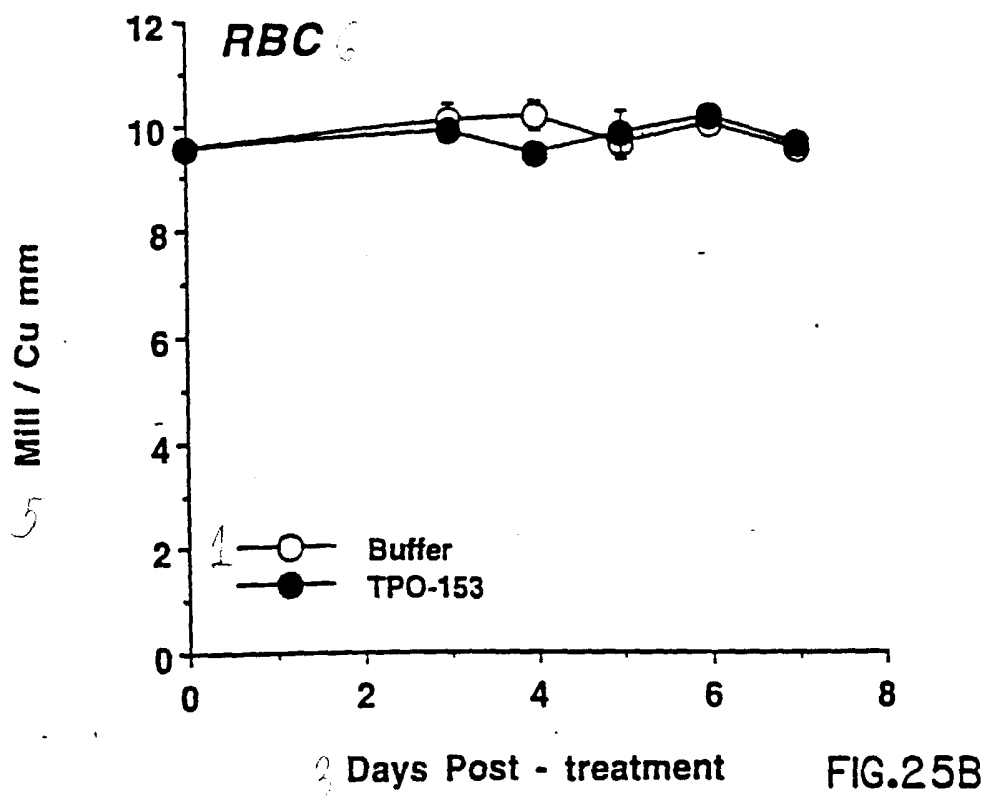
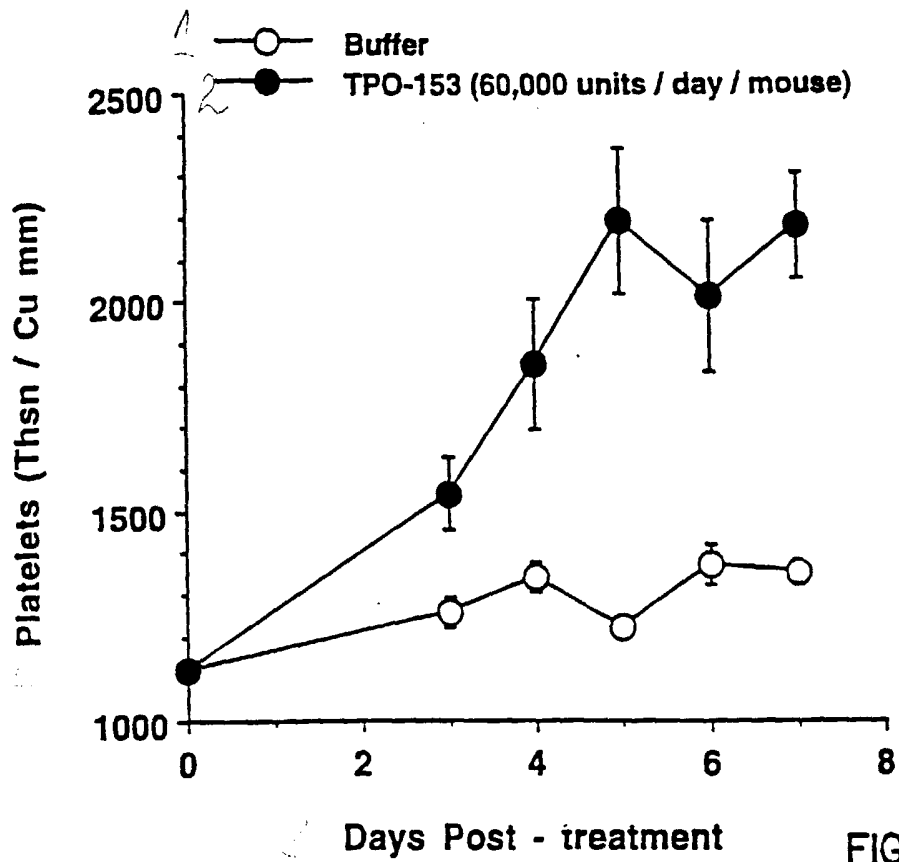


FIG.24



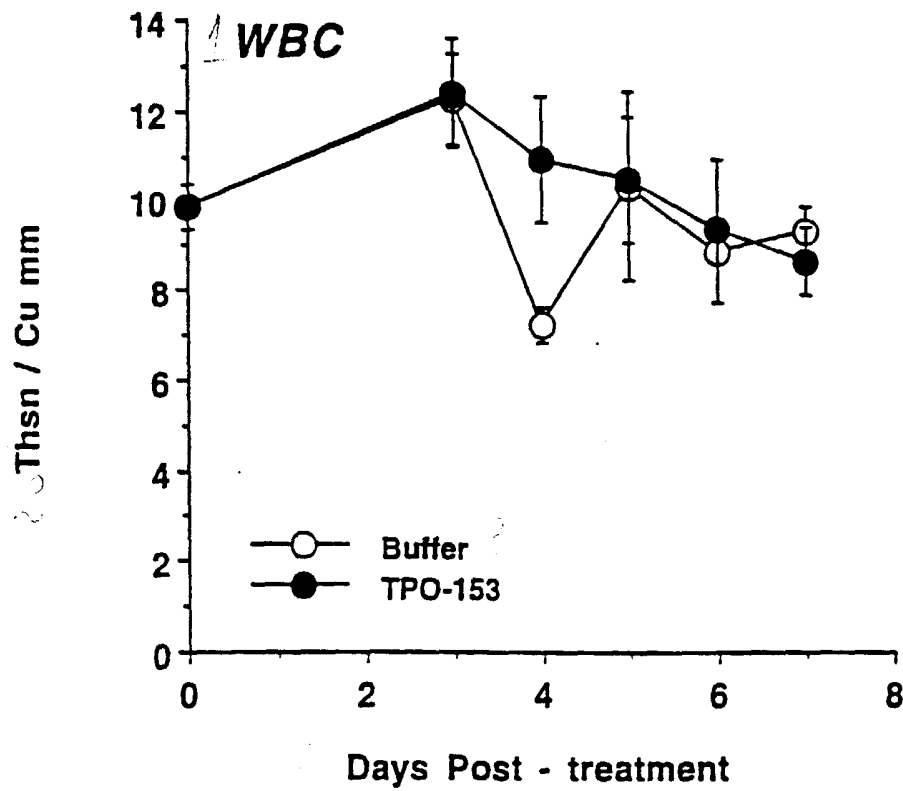


FIG.25C

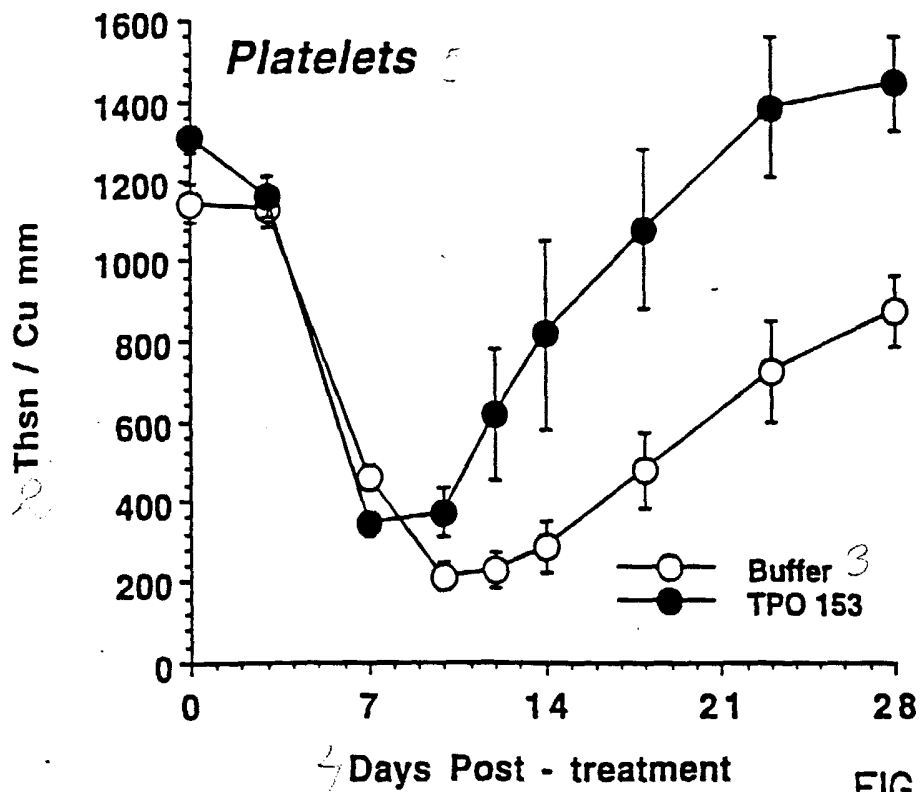


FIG.26A

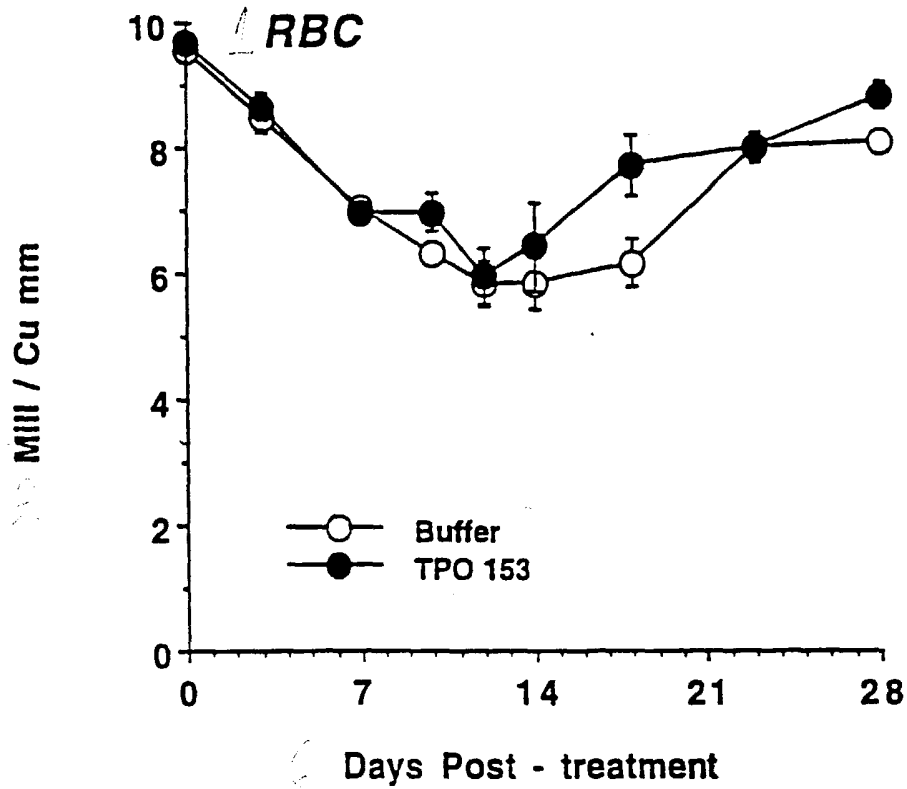


FIG.26B

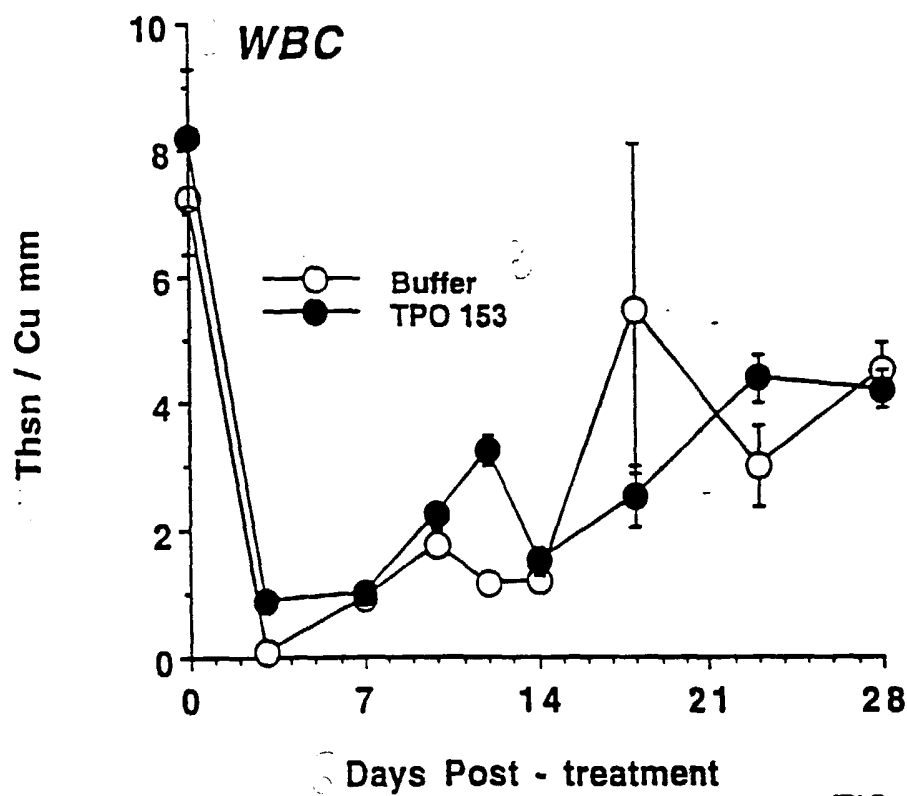


FIG.26C

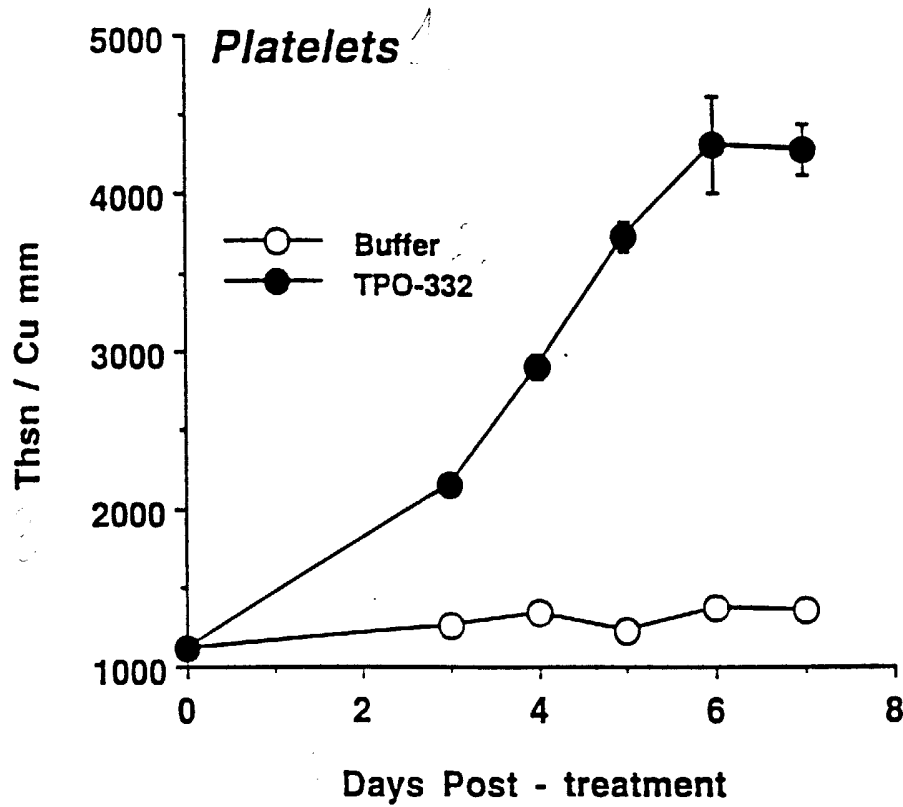


FIG.27A

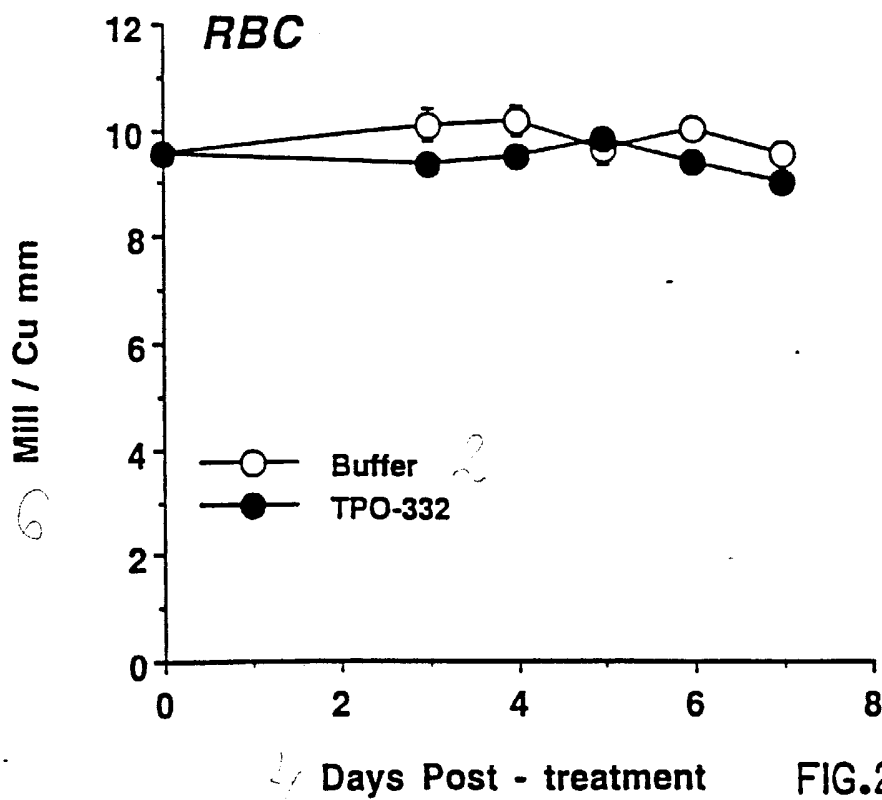


FIG.27B

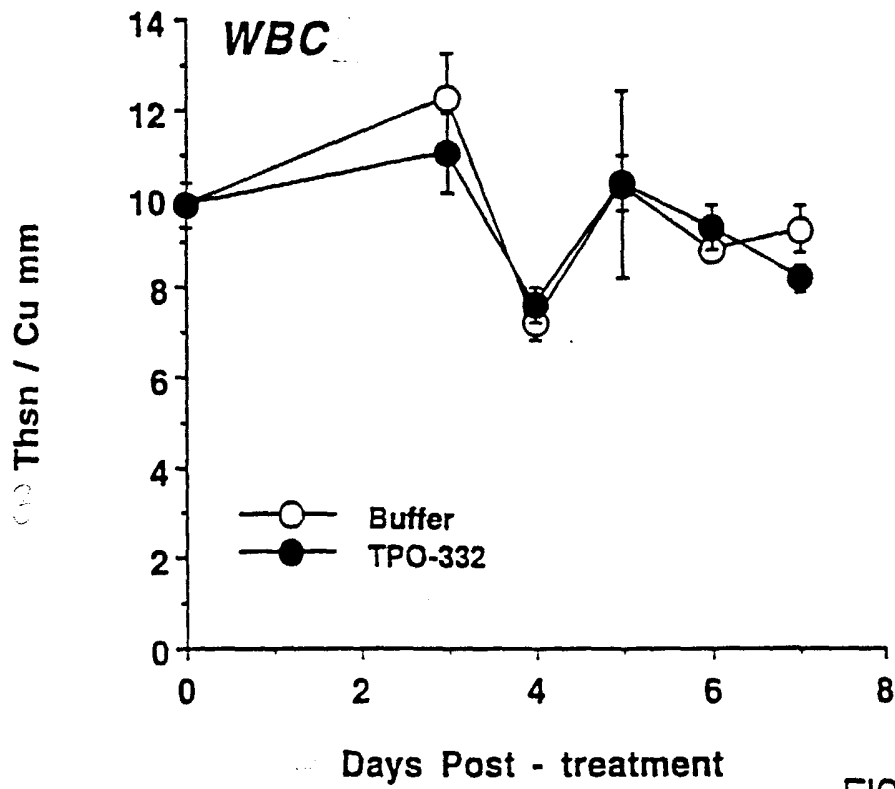


FIG.27C

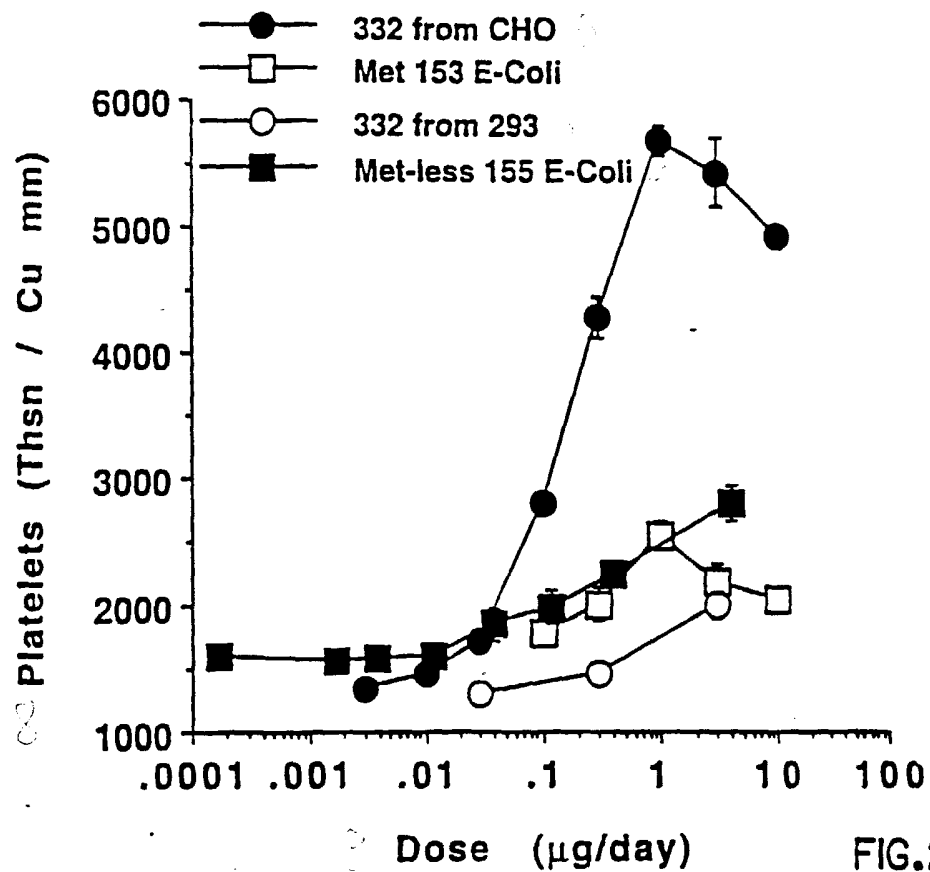


FIG.28

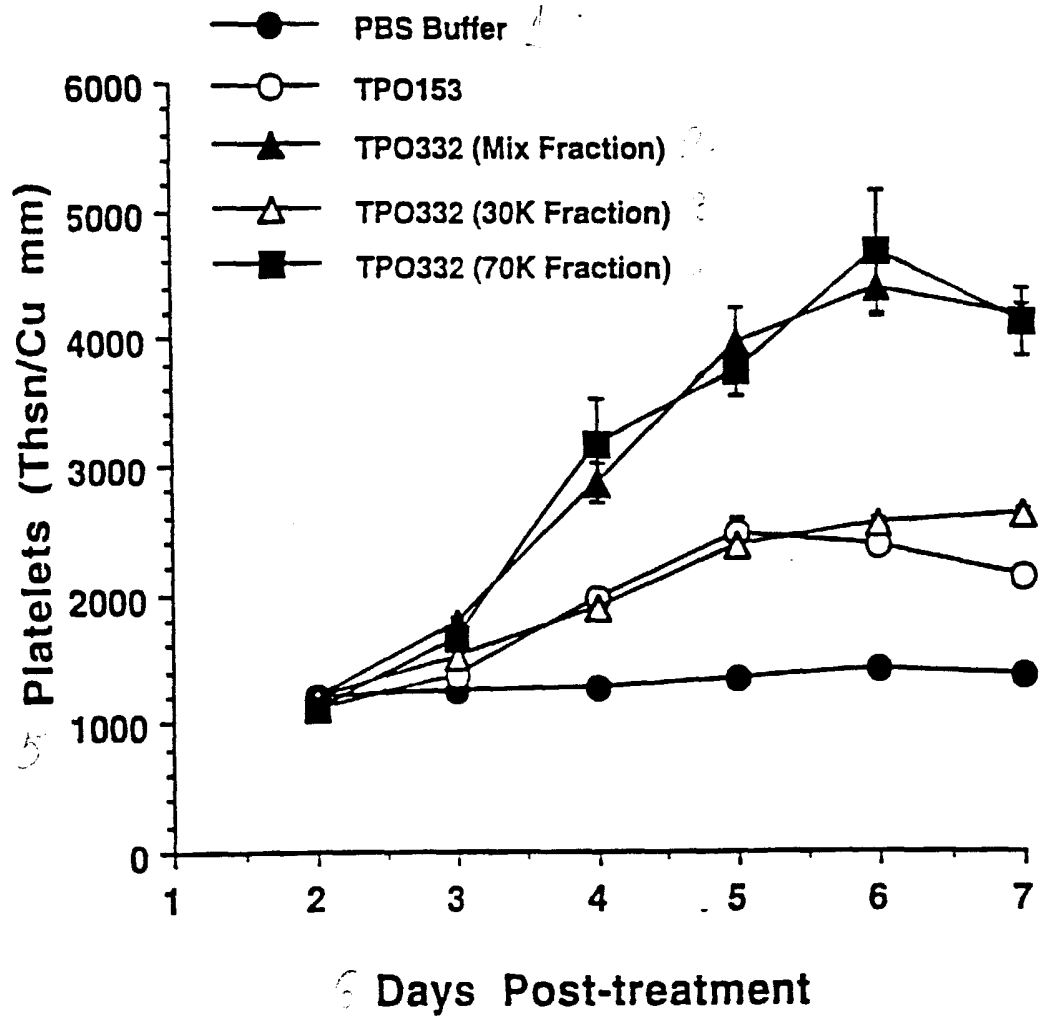
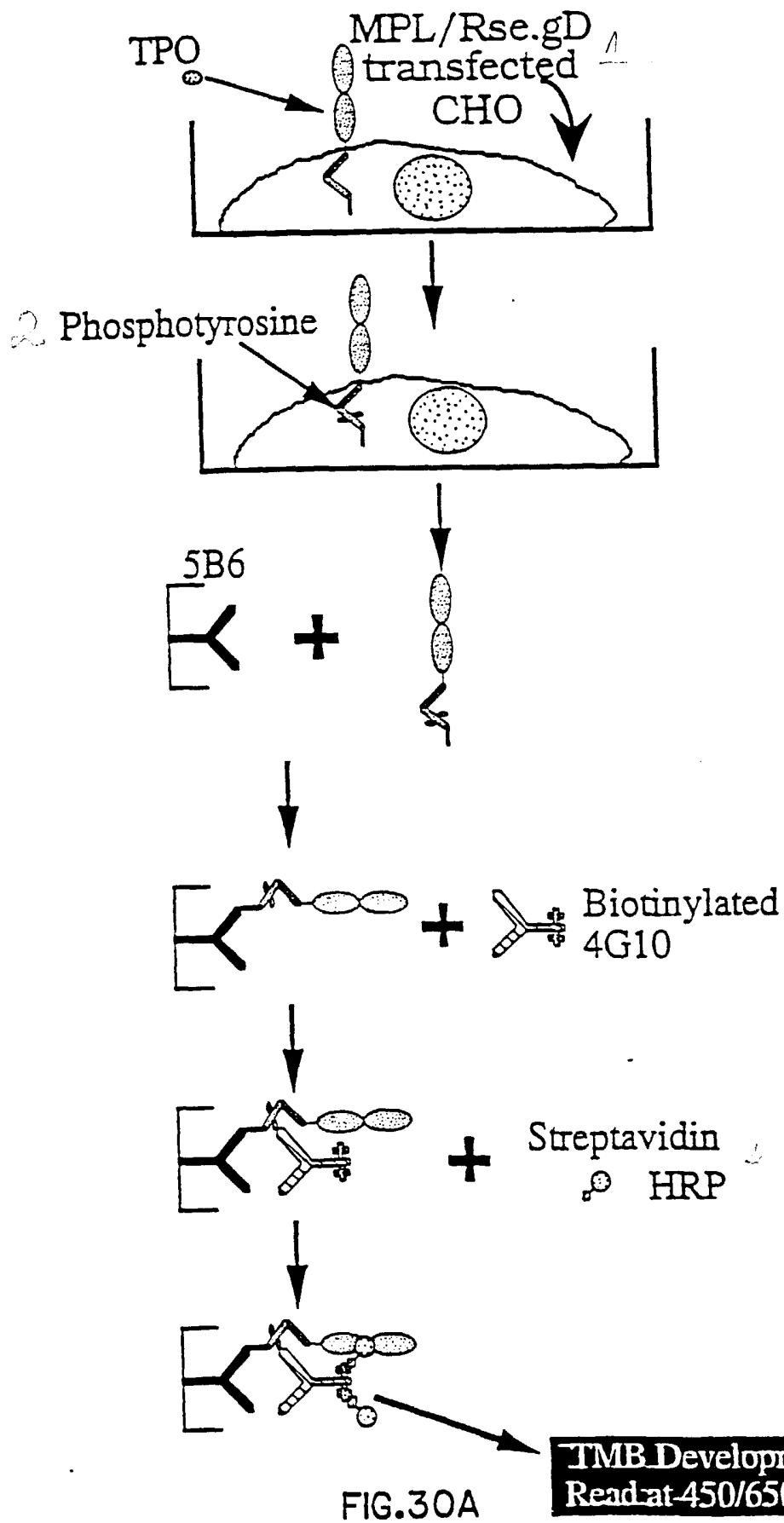


FIG.29



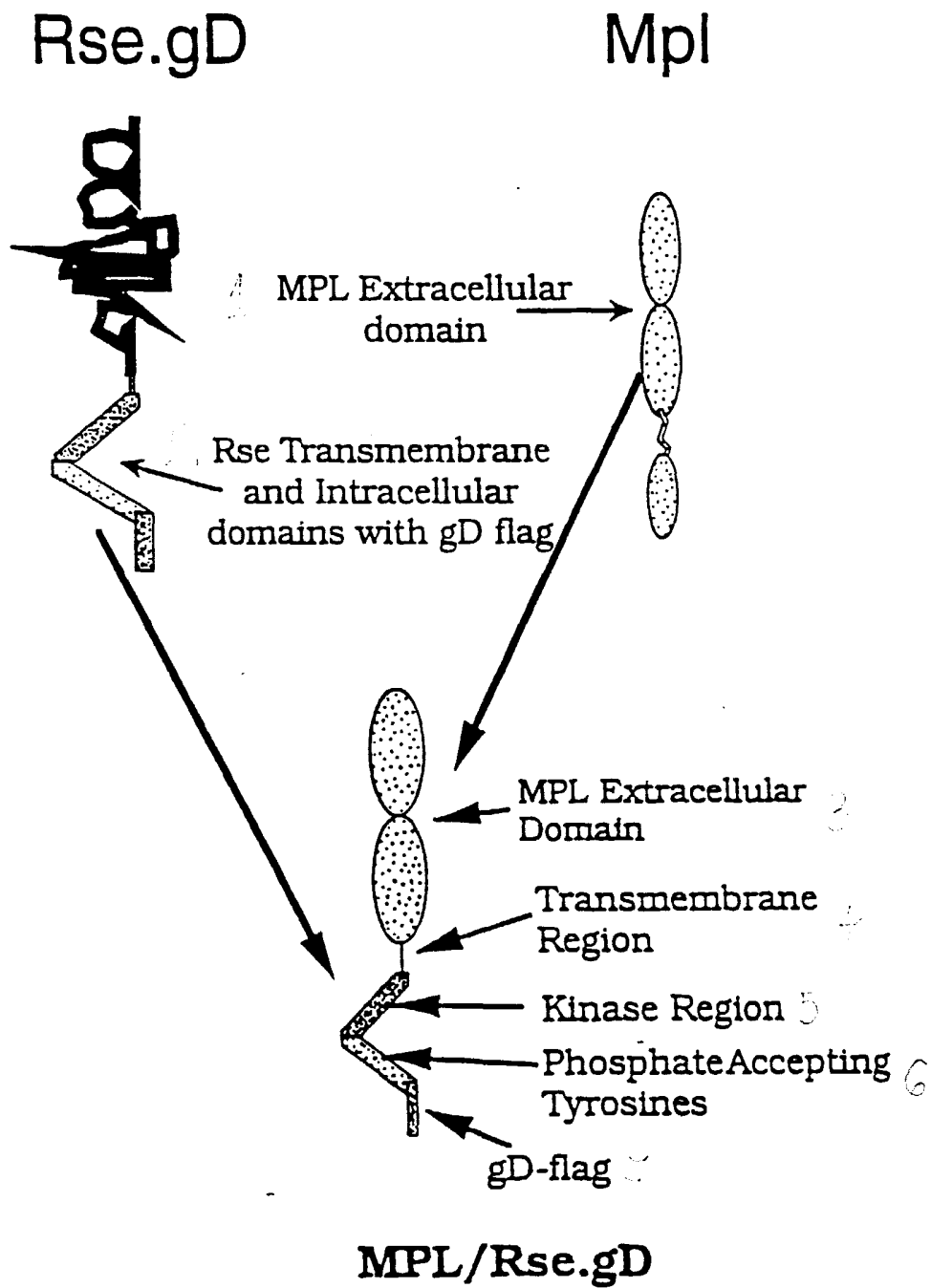


FIG.30B

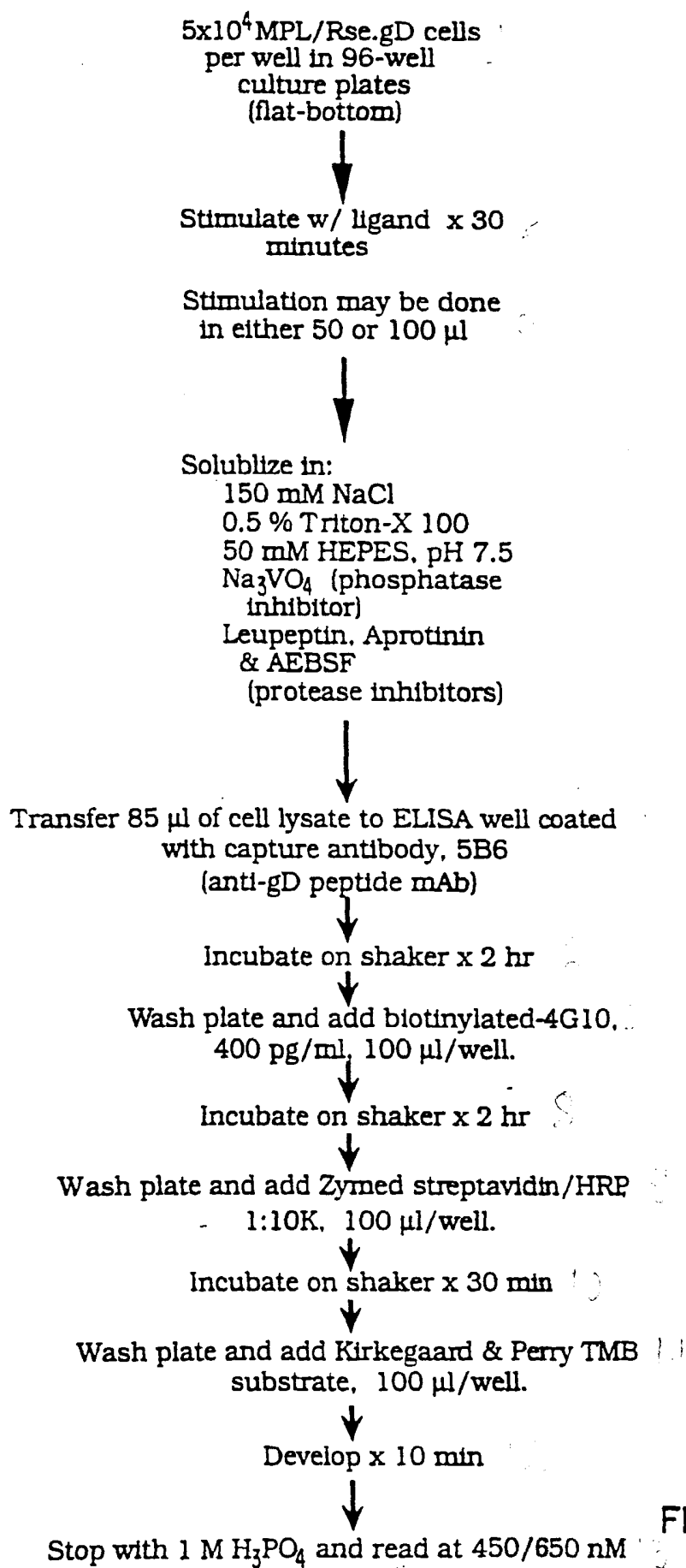


FIG.3 I

```

1  TTCGAGCTCG CCCGACATTG ATTATTGACT AGAGTCGATC GACAGCTGTG GAATGTGTGT CAGTTAGGGT
   AAGCTCGAGC GGGCTGTAAC TAATAACTGA TCTCAGCTAG CTGTCGACAC CTTACACACA GTCAATCCCA

   aluI
   sstI
   sacI
   hgiJII
   hgiAI/aspHI
   ecl136II
   bsp1286
   bsiHKAI
   bmyI
   banII
   taqI
   rmaI mcrI nspBII
   maeI taqI[dam-]
   pleI dpnII[dam-]
   hinfI taqI[dam-]
   pvuI/bspCI
   dpnI[dam+]
   mboI/ndeII[dam-]
   sau3AI pvuII
   aluI

nlaIV
scrFI mvaI ecorII dsav bstNI apyI[dcn+] bsaJI
scrFI mvaI ecorII dsav bstNI apyI sexAI
sfaNI ppulOI nsiI/avaIII nlaIII sphI nspI nspHI
scrFI mvaI ecorII dsav bstNI apyI sexAI
71 GTGGAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAG
   CACCTTTCAG GGGTCCGAGG GGTCCGTCCGT CTTCATAACGT TTCGTACGTA GAGTTAATCA GTCGTTGGTC

```

FIG.32A

```

nlaIV          nlaIII      sfaNI          ppulOI
scrFI          mvaI        nsII/avaIII
ecoRII         dsav       nlaIII
bstNI          sphI
apyI[dcM+]    nspl
bsaJI         nspHI
141 GTGTGGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAAACC
CACACCTTTC AGGGTCCGA GGGGTCGTCC GTCTTCATAC GTTTCGTACG TAGAGTTAAT CAGTCGTTGG
                                     nlaIII
                                     styI
                                     ncoI
                                     bslI dsaI
                                     aciI bsaJI
                                     acil bsrI aciI
                                     acil bsrI aciI CGCCCATTTCT CCGCCCCCATG
                                     foki
211 ATAGTCCCGC CCCTAACTCC GCCCATCCCCG CCCCTAACTC CGCCCAGTTC CGCCCATTTCT CCGCCCCCATG
TATCAGGGCG GGGATTGAGG CGGGTAGGGC GGGGATTGAG GCGGGTCAAG GCGGGTAAGA GCGGGGTAC
                                     fnu4HI
                                     bgli
                                     sfiI
                                     haeIII/palI
                                     mnli mnli
                                     haeIII/pali bsaJI mnli alui
                                     mnli bsaJI aciI haeIII/pali
                                     mnli bsaJl aciI haeIII/pali
281 GCTGACTAAT TTTTTTTATT TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG
CGACTGATTA AAAAAATAA ATACGTCTCC GGCTCCGGCG GAGCCGGAGA CTCGATAAGG TCCTCATCAC
                                     mnli

```

FIG. 3.2B

```

rmaI
styI
bsaJI
blnI
avrII
haeIII/palI
stuI
haeI
mnlI maeI
mnII maeI
351 AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG CAAAAGCTA GCTTATCCGG
TCCTCCGAAA AACCTCCGG ATCCGAAAAC GTTTTTCGAT CGAATAGGCC

haeIII/palI
mcrI
eagI/xmaIII/ecI XI
eaeI
cfrI
mspI
hpall
aluI
rmaI
maeI
nheI
aluI
351 AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG CAAAAGCTA GCTTATCCGG
TCCTCCGAAA AACCTCCGG ATCCGAAAAC GTTTTTCGAT CGAATAGGCC

tfiI
hinFI
aciI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
401 CCGGGAACGG TGCATTGGAA CGCGGATTCC CCGTGCCAAAG AGTGACGTAA GTACCGCCTA TAGAGCGATA
GGCCCTTGCC ACGTAACCTT GCGCCTAAGG GGCACGGTTC TCACTGCATT CATGGCGGAT ATCTCGCTAT
^splice donor

maeII rsal
maeIII csp6I scfI
aciI

fnu4HI
bbvI
nspBII
aciI
nlaIII taqI
sfaNI
pflMI
bslI
471 AGAGGATTTT ATCCCCGCTG CCATCATGGT TCGACCATG AACTGCATCG TCGCCGTGTC CCAAAATATG
TCTCCTAAAA TAGGGCGGAC GGAGTACCA AGCTGGTAAC TTGACGTAGC AGCGGCACAG GGTTTTATAC
DHF ATG^

```

FIG.32C

haeIII/palI
 haeI
 scrFI
 mvaI bsrBI
 ecorII
 dsav
 bstNI aciI
 bsmAI
 apyI[dcn+] xmnI
 bsaJI mnII ddeI asp700
 CCTACCCCTGG CCTCCGCTCA GGAACGAGTT CAAGTACTTC CAAAGAATGA
 541 GGGATTGGCA AGAACGGAGA CCTATCCCTCT GGATGGGACC GGAGGCGAGT CCTTGCTCAA GTTCATGAAG GTTCTTACT
 CCCTAACCCT TCTTGCCTCT

scrFI
 mvaI
 ecorII
 dsav
 bstNI
 apyI[dcn+]
 sexAI
 ddeI

eco57I
 mboII
 earI/ksp632I
 mnII
 tfiI
 hinFI
 alwNI hphI
 GGTAACAGA ATCTGGTGAT TATGGGTAGG AAAACCTGGT TCTCCATTCC
 611 CCACAACCTC TTCAGTGGAA GGTAAACAGA ATCTGGTGAT TATGGGTAGG AAAACCTGGT TCTCCATTCC
 GGTGTTGGAG AAGTCACCTT CCATTGTCT TAGACCACTA ATACCCATCC TTTTGGACCA AGAGGTAAGG

tfiI tru9I
 hinFI mseI
 mboII taqI ahaIII/draI aseI/asnI/vspI
 681 TGAGAAGAAT CGACCTTTAA AGGACAGAAT TAATATAGTT CTCAGTAGAG AACTCAAAGA ACCACCACGA
 ACTCTTCTTA GCTGGAAAT TCCTGTCTTA ATTATATCAA GAGTCATCTC TTGAGTTTCT TGGTGGTGCT

bslI mnII

FIG.32D

sstI
 sacI
 hgiJII
 hgiAI/aspHI
 ecl136II
 bsp1286
 bsiHKAI
 bmyI
 banII
 aluI
 bstXI
 foki
 sfaNI
 mseI
 afaNI/bfrI
 mspl
 hpaII
 bsaWI
 751 GGAGCTCATT TTCTTGCCAA AAGTTTGGAT GATGCCCTTAA GACTTATTGA ACAACCGGAA TTGGCAAGTA
 CCTCGAGTAA AAGAACGGTT TTCAAACCTA CTACGGAATT CTGAATAACT TGTTGGCCTT AACCGTTCAT
 accI nlaIII
 821 AAGTAGACAT GGTTTGGATA GTCGGAGGCA GTTCTGTGTTA CCAGGAAGCC ATGAATCAAC CAGGCCACCT
 TTCATCTGTA CCAAACCTAT CAGCCTCCGT CAAGACAAAT GGTCCTTCGG TACTAGTTG GTCCGGTGGA
 haeIII/palI
 haeI
 scrFI
 mvaI
 mvaI
 ecorII
 dsav
 tfiI
 dsav
 bstNI
 nlaIII
 bstNI
 ddeI
 apyI[dcM+]
 hinfi
 apyI[dcM+]

FIG.32E


```

scrFI
mvaI
ecoriI
dsav
bstNI
apyI[dcm+]
sau96I
avaII
asuI      mnlI      sfanI      accI      mboII
1001 AGTCCAGGA GGA AAAAGGC ATCAAGTATA AGTTGAAGT CTACGAGAAG AAAGACTAAC AGGAAGATGC
TCCAGGTCCT CCTTTTCCG TAGTTCATAT TCAAACCTCA GATGCTCTC TTTCTGATTG TCCTTCTACG
^END DHER

                                     nlaIII
                                     styI
                                     ncoI
                                     dsal
                                     ppulOI
                                     mnlI      aluI      nsII/avaIII      bsaJI
1071 TTTC AAGTTC TCTGCTCCCC TCCTAAAGCT ATGCATTTT ATAAGACCAT GGGACTTTTG
AAAGTCAAG AGACGAGGGG AGGATTTCGA TACGTAAAAA TATTCTGGTA CCTGAAAAAC

```

FIG.32G

styI
 bsaJI
 sau3AI
 mboI/ndeII{dam-}
 dpnI{dam+}
 dpnII{dam-}
 alwI{dam-}
 bstYI/xhoII
 1131 CTGGCTTTAG ATCCCCTTGG CTTCGTTAGA ACGCGGCTAC AATTAATACA TAACCTTATG TATCATAAC
 GACCGAAATC TAGGGGAACC GAAGCAATCT TCGCCCGATG TTAATTATGT ATTGAATAC ATAGTATGTG
 fnu4HI
 aciI
 thaI
 fnuDII/mvnI tru9I
 bstUI mseI
 bsh1236I aseI/asnI/vspI
 sau96I
 avaiI
 asuI
 scrFI
 mvaI
 ecorII
 dsav
 bstNI
 apyI{dcm+}
 bsaJI
 bslI
 1201 ATACGATTTA GGTGACACTA TAGATAACAT CCACCTTTGCC TTCTCTCCA CAGGTGTCCA CTCCCAGGTC
 TATGCTAAAT CCACTGTGAT ATCTATTGTA GTGAAACGG AAAGAGAGGT GTCCACAGGT GAGGGTCCAG
 maeIII
 hphI scfI foki
 1201 ATACGATTTA GGTGACACTA TAGATAACAT CCACCTTTGCC TTCTCTCCA CAGGTGTCCA CTCCCAGGTC
 TATGCTAAAT CCACTGTGAT ATCTATTGTA GTGAAACGG AAAGAGAGGT GTCCACAGGT GAGGGTCCAG

FIG.32H

```

scrFI
nciI
mspI
hpaII
dsav
xmaI/pspAI
smaI
scrFI
nciI
dsav
cauII
bsaJI
avaI
sau3AI
mboI/ndeII(dam-)
dpmI(dam+)
dpmII(dam-)
pleI
nlaIV cauII
bstYI/xhoII
hinfI
taqI rmaI bamHI bsaJI
sali maeI alwI(dam-)
hincII/hindII alwI(dam-)
accI xbaI mnlI bsaJI
GTCGACTCTA GAGGATCCCC
CAGCTGAGAT CTCCTAGGGG
1271 CAACTGCACC TCGGTTCTAA GCTTCTGCAG
GTTGACGTGG AGCCAAGATT CGAAGACGTC

```

FIG.32I

sau96I
 acII haeIII/palI
 fnu4HI asuI
 bglI nlaIII
 sfiI styI
 eaeI ncoI
 cfrI dsaI
 ecorI taqI haeIII/palI
 apoI claiI/bsp106 bsaJI
 1321 GGGGAATTCA ATCGATGGCC GCCATGGCCC AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAGCA
 CCCCTTAAGT TAGCTACCGG CGGTACCGG TTGAACAAAT AACGTCGAAT ATTACCAATG TTTATTTCGT
 ^sv40 early poly A
 maeIII
 aluI
 fnu4HI
 bbvI
 rmaI
 bsmI maeI
 1391 ATAGCATCAC AAATTTCACA AATAAAGCAT TTTTTCACCT GCATTCTAGT TGTGGTTGT CCAAACTCAT
 TATCGTAGTG TTTAAAGTGT TTATTTCGTA AAAAAAGTGA CGTAAGATCA ACACCAAACA GGTGTGAGTA

FIG.32J

```

sau3AI
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+]
dpnII[dam-]
pvuI/bspCI
mcrI
  taqI[dam-] tru9I
    claiI/bsp106[dam-]
sau3AI msel
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+] xmnI
dpnII[dam-] aseI/asnI/vspI
  nlaIII alwI[dam-] asp700
1461 CAATGTATCT TATCATGTCT GGATCGATCG GGAATTAATT
    GTTACATAGA ATAGTACAGA CCTTAGCTAGC CCTTAATTAA
      sv40 origin^

haeIII/palI
  haeI
    styI
      fnu4HI ncoI
        bbvI dsal
          hinPI bsaJI
            hhaI/cfoI nlaIII
1501 CGGCGCAGCA CCATGGCCTG AAATAACCTC TGAAGAGGGA ACTTGTTAG GTACCTTCTG AGCGGAAAG
      GCCGCGTCGT GGTACCGGAC TTATTGGAG ACTTCTCCT TGAACCAATC CATGGAAGAC TCCGCCCTTC

```

FIG.32K

FIG. 32M

```

          aciI      hinPI      bspMI
            haeIII/palI      hhaI/cfoI
              mcrI      thal
                eagI/xmaIII/ecI XI fnuDII/mvnI
                  taqI eaeI      bstUI
                    xhoI notI      hinPI      scfI
                      paeR7I cfrI      tru9I      hhaI/cfoI tru9I pstI
                        avai fnu4HI      paci      ascI      ahaIII/draI
                          mnlI aciI      msel      tru9I bsh1236I msel      bsgI
                            aluI maeIII bsrBI fnu4HI      msel bssHII swaI      sse8387I
                                CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT GTTACCTCGA GCGGCCGCTT AATTAAGGCG CGCCATTAA ATCCTGCAGG
                                GATCCGAAAA CGTTTTTCGA CAATGGAGCT CGCCGGCGGA TTAATTCCGC GCGGTAAATT TAGGACGTCC
                                ^start pUC118

```

Linearization linker inserted into HpaI site

```

          scrFI
            mvaI
              ecoRII
                dsav
                  bstNI
                    apyI{dcm+I}      tru9I
                      bsaJI      maeIII      msel
                        maeII      bsrI      maeIII      maeIII      CCAACTTAAT
                          TCGTTTTTACA ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC
                            ATTGTCGAAC CGTGACCGGC AGCAAAATGT TGCAGCACTG ACCCTTTTGG GACCGCAATG GGTGAATTA

```

FIG.32N

sau3AI
 sau96I mboI/ndeII[dam-]
 haeIII/palI
 asuI dpnI[dam+] dpnII[dam-]
 mnlI
 mboII aciI pvuI/bspCI
 earI/ksp632I mcrI
 GCGAAGAGGC CCGCACCGAT
 CGCTTCTCCG GCGTGGCTA
 aluI
 pvuII
 nspBII
 fnu4HI foki
 bbvI
 2041 CGCCTTGCAG CACATCCCC CTTCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT
 GCGGAACGTC GTGTAGGGG GAAGCGGTCG ACCGCATTAT CGCTTCTCCG GCGTGGCTA
 hinPI
 hhaI/cfoI
 nlaIV
 narI
 kasi
 hinII/acyI
 hgiCI
 haeII
 bani
 bglI
 2101 CGCCCTTCCC AACAGTTGCG TAGCCTGAAT GGCGAATGGC GCCTGATGCG GTATTTC TC CTTACGCATC
 GCGGAAGGG TTGTCAACGC ATCGGACTTA CCGCTTACCG CGGACTACGC CATAAAGAG GAATGCCGTAG
 bglI
 ahaII/bsaHI
 sfaNI
 sfaNI

FIG.320

```

                hinPI
                thal
                fnuDII/mvnI
                bstUI scfI          hinPI
                bsh1236I          hhaI/cfoI
                rsal hhaI/cfoI    fnu4HI
                csp6I    bslI    aciI
                2171 TGTGCGGTAT TTCACACCGC ATACGTCAA GCAACCATAG TACGCGCCCT GTAGCGGCGC
                    ACACGCCATA AAGTGTGGCG TATGCAGTTT CGTTGGTATC ATGCGCGGGA CATCGCCGCG
                aciI          aciI    maeII
                fnu4HI          fnu4HI
                thal          hinPI
                fnuDII/mvnI    hhaI/cfoI
                bctUI          thal
                hinPI aciI      fnuDII/mvnI
                hhaI/cfoI      bstUI
                tru9I aciI      bsh1236I          aciI
                mseI bsh1236I    maeIII bbvI    maeIII
                2231 ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
                    TAATTGCGCG CGCCACACACC ACCAATGCGC GTCGCACTGG CGATGTGAAC GGTCGCGGGA TCGCGGCGGA
                mboII          maeII cfr10I
                2301 CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCGG GCTTCCCGG TCAAGCTCTA AATCGGGGCG
                    GGAAAGCGAA AGAAGGGAAG GAAAGAGCGG TGCAAGCGGC CGAAAGGGGC AGTTCGAGAT TTAGCCCCCG
                mspI          hpaII          naeI
                nlaIV          hgiJII          bsp1286          bmyI          banII

```

FIG.32P

```

                mnlI
                nlaIV
                hgiCI
                bani   taqI
                hphI
2371 TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTGG
    AGGAAATCC CAAGGCTAAA TCACGAAATG CCGTGGAGCT GGGGTTTTT GAACTAAACC

                nlaIV
                maeII   haeIII/palI
                draIII   sau96I
                bsaAI   asuI
2401 GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
    CACTACCAAG TGCATCACCC GGTAGCGGGA CTATCTGCCA AAAAGCGGGA AACTGCAACC TCAGGTGCAA

                maeII pleI
                drdI   hinfi   maeII
                bslI
                bslI   auaI
2501 CTTTAATAGT GGAATCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC AACCTATCT CGGGCTATTC TTTTGATTTA
    GAAATTATCA CCTGAGAACCA AGGTTTGACC TTGTTGTGAG TTGGGATAGA GCCCGATAAG AAAACTAAAT

                tru9I
                mseI
                haeIII/palI   mseI
                aluI   mseI   apoI
2571 TAAGGGATTT TGCCGATTTC GGCCTATTGG TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT
    ATCCCTAAA ACGGCTAAAG CCGGATAACC AATTTTTTAC TCGACTAAAT TGTTTTTAAA

                tru9I
                mseI

```

FIG.32Q

2631 hgiAI/aspHI
 bsp1286
 bsiHKAI
 bmyI ddeI
 apaLI/snoI rsaI
 alw44I/snoI csp6I
 GGTGCACTCT CAGTACAATC
 CCACGTGAGA GTCATGTTAG
 2691 fnu4HI tru9I maeII nlaIII hhaI/cfoI
 bsrI hinPI
 maeIII fnu4HI
 maeII nlaIII hhaI/cfoI
 bsaAI tth111I/aspI bbvI
 ACGTGACTGG GTCATGGCTG CGCCCCGACA
 TGCCTATCGA TCGGTTGAG GCGATAGCGA
 TGCCTGACC CAGTACCGAC GCGGGGCTGT
 2761 aciI
 CCCGCCAACA CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGCTCTG CTCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG
 GGGCGGTTGT GGGCGACTGC GCGGGAAGTGC CCGAACAGAC GAGGGCCGTA GCGGAATGTC TGTTCGACAC
 nspBII bsh1236I
 aciI hgaI drdI
 cauII aciI
 dsav foki
 nciI
 scrFI
 hpaII
 mspI
 sfaNI
 hinPI
 hhaI/cfoI
 thal
 fnuDII/mvnI
 bstUI
 nciI
 dsav foki
 cauII aciI
 maeIII

FIG.32R

scrFI
 nciI
 mspI
 hpaII
 dsav
 esp3I
 bsmAI
 bslI cauII aluI nlaIII mnlI hphI hphI
 2831 ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT GTGTCAGAGG TTTTCACCGT CATCACCGAA ACGCGCGAGG CAGTATTCTT
 TGGCAGAGGC CCTCGACGTA CACAGTCTCC AAAAGTGGCA GTAGTGGCTT TGCGCGCTCC GTCATAAGAA

thaI
 fnuDII/mvnI
 bstUI
 bsh1236I
 hinPI
 hhaI/cfoI
 thaI mnlI
 fnuDII/mvnI
 bstUI
 bsh1236I

mnlI
 haeIII/palI
 mboII sau96I
 bpuAI asuI
 bbsI ecoO109I/draII
 2901 GAAGACGAAA GGCCTCGTG ATACGCCCTAT TTTTATAGGT TAATGTCATG
 CTTCTGCTTT CCCGGAGCAC TATGCGGATA AAAATATCCA ATTACAGTAC

nlaIII
 rcaI
 tru9I
 mseI
 bspHI

hinII/acyI
 ahaII/bsaHI
 aatII
 ddeI maeII
 2951 ATAATAATGG TTTCTTAGAC GTCAGGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTGCG
 TATTATTACC AAAGAATCTG CAGTCCACCG TGAAAAGCCC CTTTACACCG

aciI
 thaI
 fnuDII/mvnI
 bstUI
 bsh1236I
 hinPI
 hhaI/cfoI

FIG.32S


```

                                bsmAI
                                rcaI
                                bsrBI nlaIII
                                acilI bspHI
nlaIV
3001 CGGAACCCCT ATTTGTTTAT TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC TCATGAGACA ATAACCCCTGA
GCCTTGGGGA TAAACAAATA AAAAGATTTA TGTAAGTTTA TACATAGGCG AGTACTCTGT TATTGGGACT

                                mboII
                                earI/ksp632I
                                sspI
3071 TAAATGCTC AATAATATG AAAAAGGAAG AGTATGAGTA TTCAACATT TCCGTGTCGCC CTTATTCCCT
ATTACGAAG TTATTATAAC TTTTTCCTTC TCATACTCAT AAGTTGTAA GGCACAGCGG GAATAAGGGA

                                fnu4HI
                                aciI
                                hphI
                                hphI
                                sfaNI
3141 TTTTGGCGC ATTTGCGCTT CCTGTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAG
AAAAACGCCG TAAACGGAA GGACAAAAC GAGTGGGTCT TTGCGACCAC TTTCATTTTC

                                hgiAI/aspHI
                                bsp1286
                                sau3AI
                                mboI/ndeII(dam-)
                                dpnI(dam+)
                                dpnII(dam-)
                                bstYI/xhoII
                                mboII(dam-)
                                apaLI/snoI
                                eco57I
                                alw44I/snoI
                                maeIII
                                bsrI
                                nspBII
3201 ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA
TACGACTTCT AGTCAACCCA CGTGCTCACC CAATGTAGCT TGACCTAGAG TTGTCGCCAT

```

FIG.32T

sau3AI
 mboI/ndeII(dam-)
 dpnI(dam+)
 dpnII(dam-)
 alwI(dam-)
 bstYI/xhoII
 3261 AGATCCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTAAAGTTC
 TCTAGGAACT CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTCAGG
 hgiAI/aspHI
 bsp1286 tru9I
 bsiHKAI mseI
 bmyI ahaIII/draI
 maeII
 psp1406I
 xmnI
 asp700
 mboII
 3321 TGCTATGTGG CGCGGTATTA TCCCGTGATG ACGCCGGGCA AGAGCAACTC GGTCGCCGCA
 ACGATACACC GCGCCATAAT AGGGCACTAC TGCGGCCCGT TCTCGTTGAG CCAGCGGCGT
 acil
 nciI
 mspI
 hpaII
 dsav
 hinII/acyI
 hgaI cauII
 ahaII/bsaHI
 bclI mcrI fnu4HI
 acil
 3381 TACACTATTC TCAGAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCAGT CACAGAAAAG CATCTTACGG
 ATGTGATAAG AGTCTTACTG AACCAACTCA TGAGTGGTCA GTGTCTTTC GTAGAATGCC
 rsal
 csp6I bsrI
 scaI hphI maeIII
 sfaNI foki
 ddeI

FIG.32U

hinPI mspI
 hhaI/cfoI hpaII
 mstI scrFI
 aviII/fspI aluI nciI
 maeII tru9I rmaI dsav
 msp1406I mseI maeI cauII
 3651 CAATGGCAAC AACGTTGCGC AAACATATTAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA GCTTCCCGGC
 GTTACCGTTG TTGCAACGCG TTTGATAATT GACCGCTTGA TGAATGAGAT CGAAGGGCCG
 bglI
 sau96I haeIII/palI
 hinPI asuI mspI
 hhaI/cfoI hpaII
 3711 AACAAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG ACCACTTCTG CGCTCGGCC TTCCGGCTGG
 TTGTTAATTA TCTGACCTAC CTCCGCCTAT TTCAACGTCC TGGTGAAGAC GCGAGCCCGG AAGGCCGACC
 mspI thal
 hpaII fnuDII/mvni
 cfr10I bstUI
 nlaIV hphI bsmAI aciI fnu4HI
 gsuI/bpmI bsaI bsh1236I bbvI
 3781 CTGGTTTATT GCTGATAAAT CTGGAGCCCG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC
 GACCAAATAA CGACTATTTA GACCTCGGCC ACTCGCACCC AGAGCGCCAT AGTAACGTCTG

FIG.32W

352

FIG.32X

```

sau96I      pleI
asuI        hinfi
nlaIV       eam1105I
bsrI haeIII/palI mnlI
3841 ACTGGGGCCA GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC
TGACCCCGGT CTACCATTCG GGAGGGCATA GCATCAATAG ATGTGCTGCC CCTCAGTCCG

ddeI
sau3AI      nlaIV
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+] hgiCI
dpnII[dam-] banI mnlI
fokI        tru9I mseI
3901 AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTG
TTGATACCTA CTTGCTTTAT CTGTCTAGCG ACTCTATCCA CGGAGTGACT AATTCGTAAC

tru9I      mseI
maeIII     ahaIII/draI mseI
3961 GTAACGTGCA GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT GATTTAAAC TTCATTTTAA
CATTGACAGT CTGGTTCAA TGAGTATATA TGAATCTAA CTAAATTTTG AAGTAAAAAT

rmaI      sau3AI
sau3AI hphI mboI/ndeII[dam-]
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+] dpnI[dam+]
dpnII[dam-] dpnII[dam-]
tru9I bstYI/xhoII alwI[dam-]
mseI alwI[dam-] bstYI/xhoII
ahaIII/draI maeI mboII[dam-]
4021 ATTTAAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCCTTT TGATAATCTC ATGACCACAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTCG
TAAATTTTCC TAGATCCACT TCTAGGAAAA ACTATTAGAG TACTGGTTT AGGGAATTGC ACTCAAAAGC

```

FIG. 32Y

```

sau3AI
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+] sau3AI
dpnII[dam-] mboI/ndeII[dam-]
bstYI/xhoII dpnI[dam+]
sau3AI alwI[dam-] dpnII[dam-]
mboI/ndeII[dam-] alwI[dam-]
dpnI[dam+] mboII[dam-]
dpnII[dam-] bstYI/xhoII
4091 TTCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTT
AAGGTGACTC GCAGTCTGGG GCATCTTTC TAGTTTCCTA GAAGAACTCT AGGAAAAAAA

          hgaI
          ddeI
          thal
          fnuDII/mvnI
          bstUI
          bsh1236I
          hinPI      fnu4HI
          hhaI/cfoI  bbvI
4151 CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTGTGTTG
GACGCGCATT AGACGACGAA CGTTTGTTT TTTGGTGGCG ATGGTCGCCA CCAAACAAAC

          sau3AI
          mboI/ndeII[dam-]
          dpnI[dam+]
          dpnII[dam-]
          alwI[dam-]
          mspl
          hpaII      aluI
4211 CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCCTTTTCCG AAGTAACTG GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG
GGCCTAGTTC TCGATGGTTG AGAAAAAGGC TTCCATTGAC CGAAGTCGTC TCGCGTCTAT GGTATTATGAC
          bsrI      maeIII      eco57I      hhaI/cfoI      hinPI

```

```

      rmaI      haeIII/palI
      maeI      bslI      haeI
4281 TCCTTCTAGT GTAGCCGCTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA CCGCTACAT ACCTCGCTCT
      AGGAAGATCA CATCGGCATC AATCCGGTGG TGAAGTTCTT GAGACATCGT GCGGATGTA TGGAGCGAGA

      fnu4HI
      alwNI      bsvI
      bsrI      fnu4HI
      maeIII      bsvI      bsrI
4351 GCTAATCCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA CCGGGTTGA CTCAAGACGA
      CGATTAGGAC AATGGTCACC GACGACGGTC ACCGCTATTC AGCACAGAAT GGGCCAACTT GAGTCTGCT

      scrFI
      nciI
      mspI
      hpaII
      dsav      pleI
      cauII      hinfI
      hgiAI/aspHI
      bsp1286
      bsiHKAI
      bmyI
      apaLI/snoI
      alw44I/snoI      aluI
4421 TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA
      ATCAATGGCC TATTCGCGT CGCCAGCCCC ACTTGCCCCC CAAGCACGTG TGTCGGGTG AACCTCGCTT

      hinPI
      hhaI/cfoI
      haeII
      ddeI      scfI
4491 CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCATTG AGAAGCGCC ACGCTTCCC AAGGAGAAA
      GCTGGATGTG GCTTGACTCT ATGGATGTGC CACTCGTAAC TCTTTCGCGG TGCGAAGGGC TTCCCTCTTT

```

FIG.32Z-1

Figure 1

4561	acil	GGCGGACAGG	TATCCGGGTAA	GCGGCAGGGT	CGGAACAGGA	GAGCGCACGA	GGGAGCTTCC	AGGGGAAAC	scrFI	mval	ecorII	dsav	bstNI	bsaJI	alul	apyI[dcm+]
	mspi	hpaII	bsli	bsaWI	fnu4HI	acil	hinPI	mnli	hhaI/cfoI	gagCGGTGCT	CCCTCGAAGG	TCCCCCTTTG				
	4631	GCCTGGTATC	TTTATAGTCC	TGTCGGGTTT	CGCCACCTCT	GACTTGAGCG	TCGATTTTGG	TGATGCTCGT	mnli	drdI	hgaI	taqI				
		CGGACCATAG	AAATATCAGG	ACAGCCCCAA	GCGGTGGAGA	CTGAACTCGC	AGCTAAAAAC	ACTACGAGCA								
	4701	CAGGGGGGCG	GAGCCTATGG	AAAAACGCCA	GCAACGCGGC	GTCCCCCGCG	CTCGGATACC	TTTTTGCGGT	haeIII/palI	fnu4HI	acil	thaI	bsli	fnuDII/mvnI	bstUI	bsh1236I

FIG.32Z-2


```

haeIII/palI
scrFI
mvaI bslI
ecorII
dsaV
bstNI
nlaIV haeI
apyI[dcm+] haeIII/palI nspI
nlaIII haeI aflIII
4741 CTTTTTACGG TTCCTGGCCT TTTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC CCCTGATTCT tfiI
GAAAAATGCC AAGGACCGGA AAACGACCGG AAAACGAGTG TACAAGAAAG GACGCAATAG GGGACTAAGA hinfI

fnu4HI
bbvI
bsrBI aciI
alul aciI fnu4HI mcrI
4811 GTGGATAACC GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATACCG CTCGCCGCAG CCGAACGACC
CACCTATTGG CATAATGGCG GAAACTCACT CGACTATGGC GAGCGGCGTC GGCTTGCTGG

hinPI
haeII
sapI hhaI/cfoI
mboII
mnlI aciI earI/ksp632I
4871 GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG GAAGAGCGCC CAATACGCAA ACCGCCCTCTC acilI
CTCGCGTCGC TCAGTCACTC GTCCTTCGC CTTCTCGCGG GTTATGCGTT TGGCGGAGAG

```

FIG.32Z-3

```

    thai
    fnuDII/mvnI
    bstUI
    bsh1236I
    hinPI
    hhaI/cfoI
    thai
    fnuDII/mvnI
    bstUI
    bsh1236I haeIII/palI      tru9I aluI
    bslI eaeI tfilI aseI/asnI/vspI      pvuII
    aciI cfrI hinfiI mselI nspBII
4931 CCCGCGCGTT GGCCGATTCA TTAATCCAGC TGGCAGCACA GGTTCCTCCGA bsrI aciI
    GGGCGCGCAA CCGCTAAGT AATTAGGTCTG ACCGTGCTGT CCAAAGGGCT GACCTTTCGC
    scrFI
    mvaI
    ecoRII
    dsav
    nlaIV bstNI
    hgiCI apyI[dcm+]
    banI bsaJI
    hinPI
    mselI maeIII
    hhaI/cfoI aseI/asnI/vspI mnlI
4991 GGCAGTGAGC GCAACGCAAT TAATGTGAGT TACCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA CACTTTATGC
    CCGTCACTCG CGTTGCGTTA ATTACACTCA ATGGAGTGAG TAATCCGTGG GTCCCGAAAT GTGAAATACG

```

FIG.32Z-4

```

mspI      acil      aluI      nlaIII
hpaII     bsrBI
5061 TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTCACACA GGAACAGCT ATGACCATGA
AAGGCCGAGC ATACAACACA CCTTAACACT CGCCTATTGT TAAAGTGTGT CCTTGTCTGA TACTGGTACT

```

```

tru9I
mseI
aseI/asnI/vspI
xmnI
asp700
5131 TTACGAATTA A
AATGCTTAAT T

```

FIG.32Z-5

>length: 5141

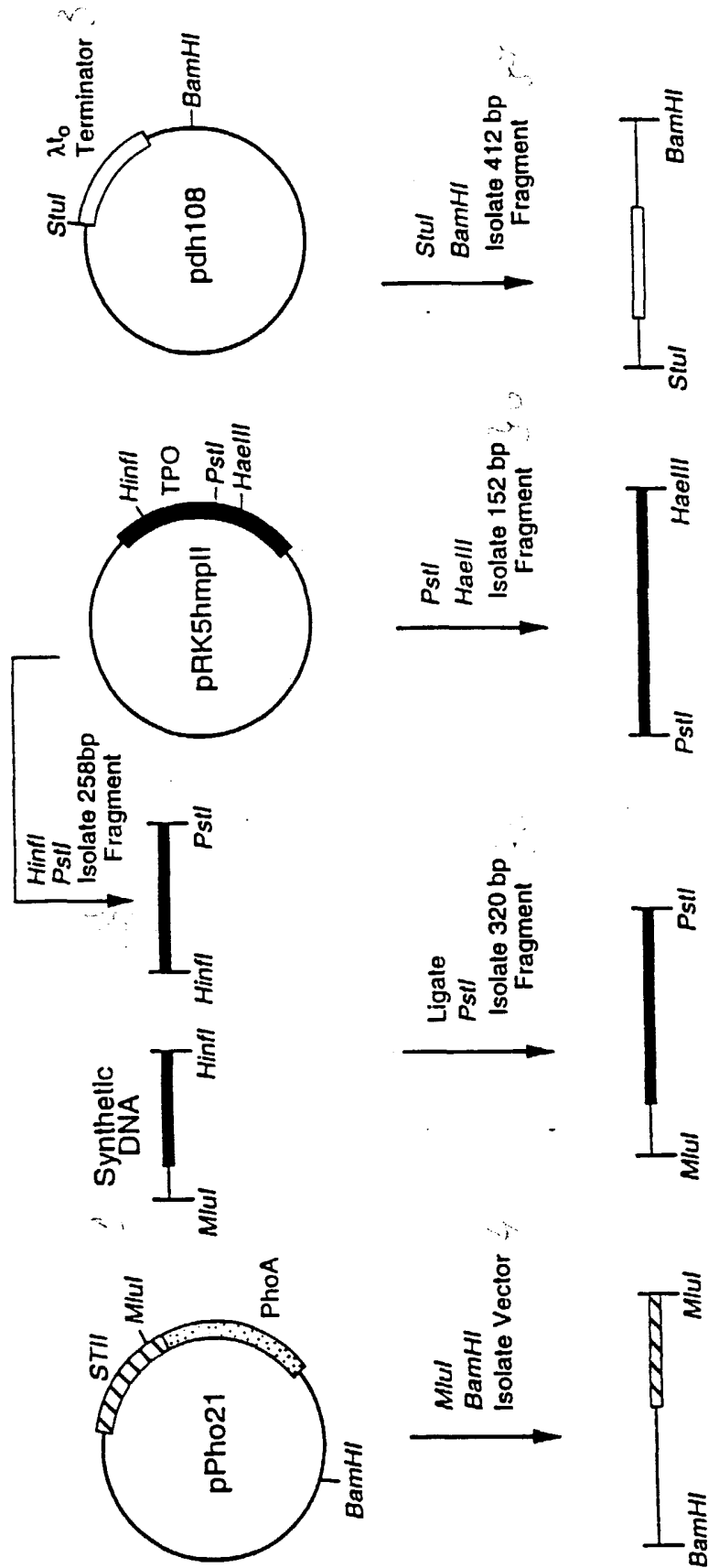


FIG.33A

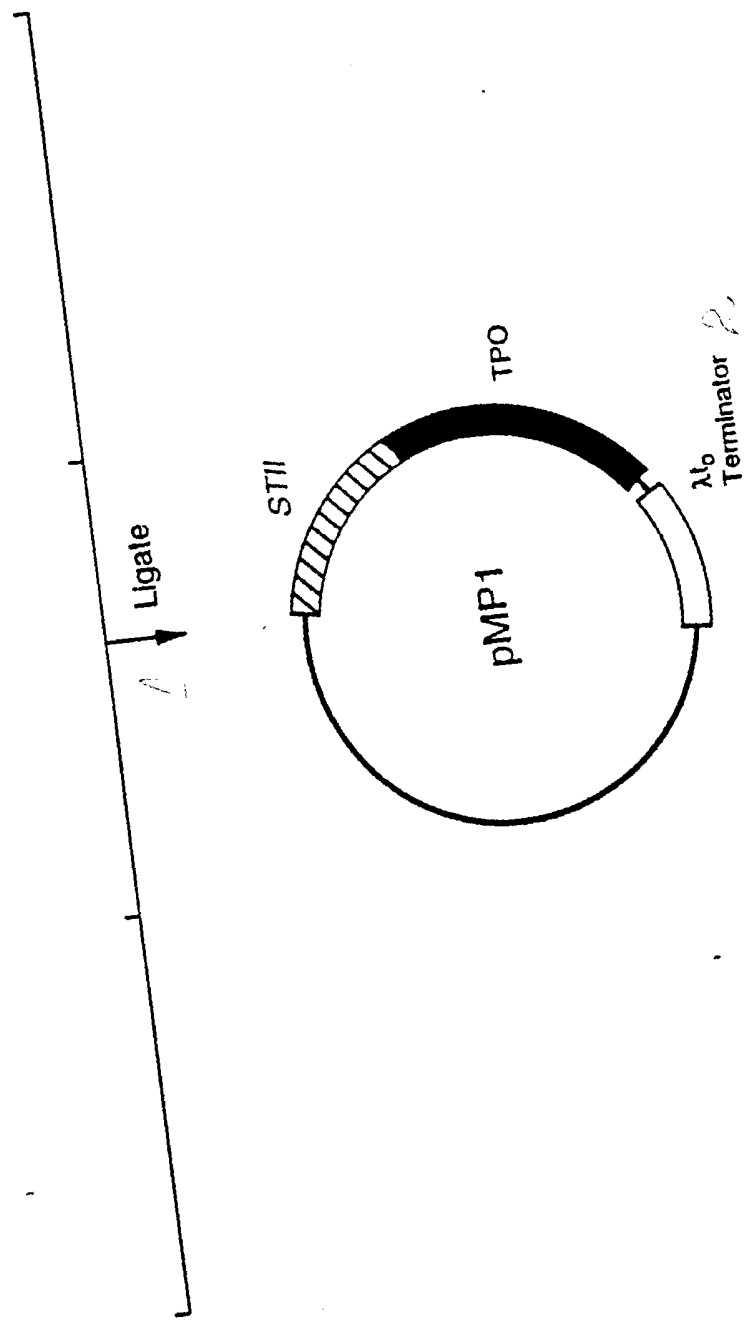


FIG.33B

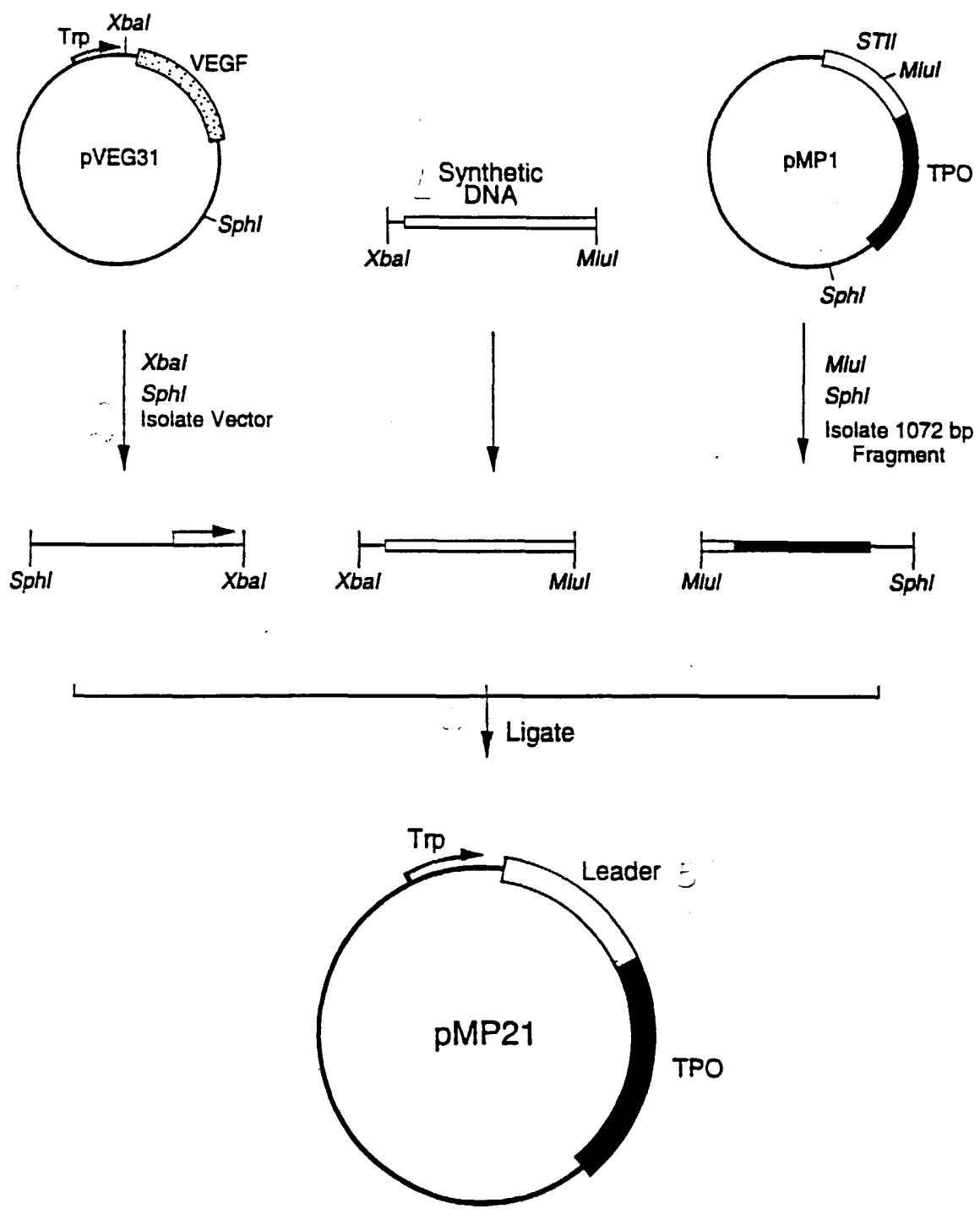


FIG.34

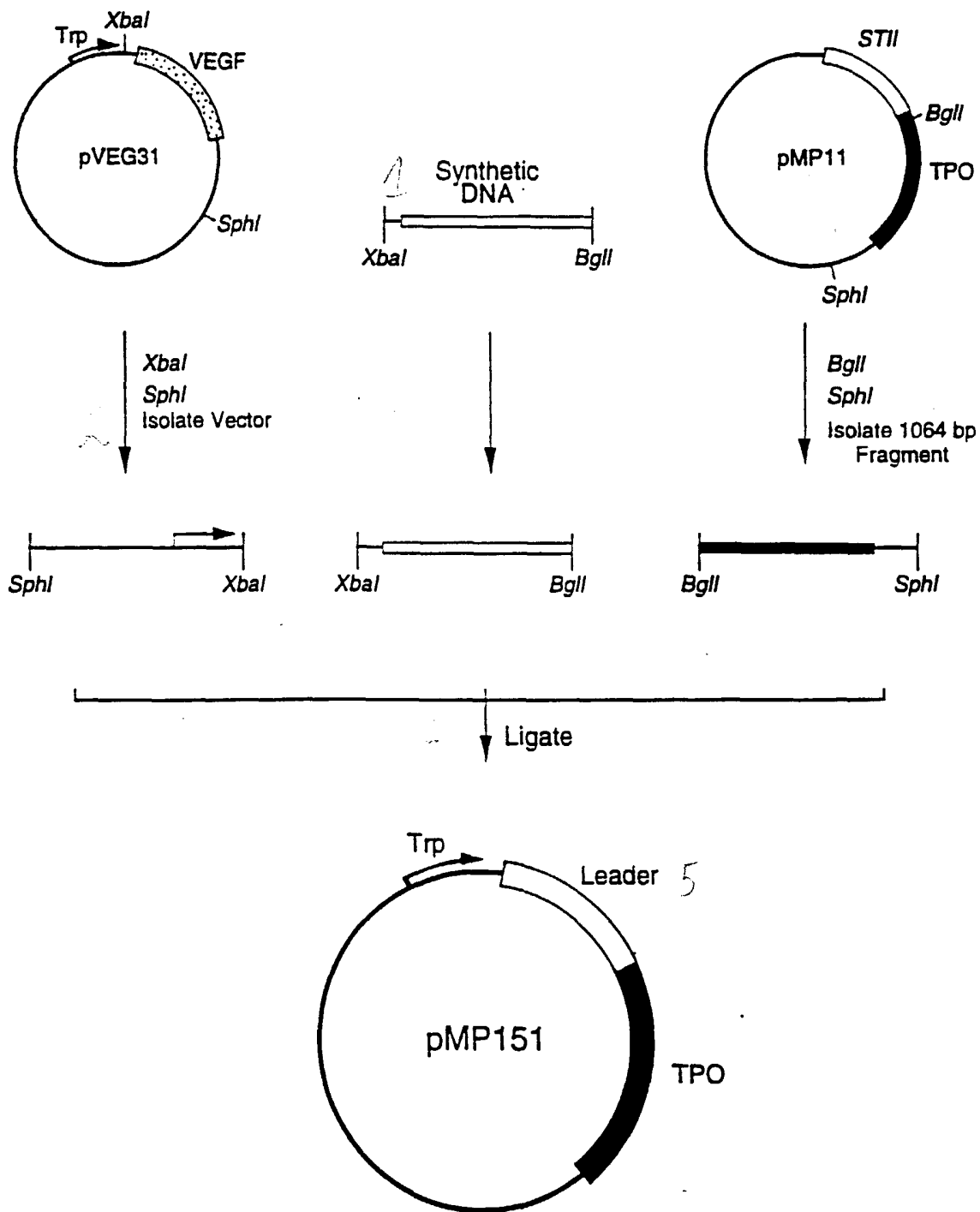


FIG.35

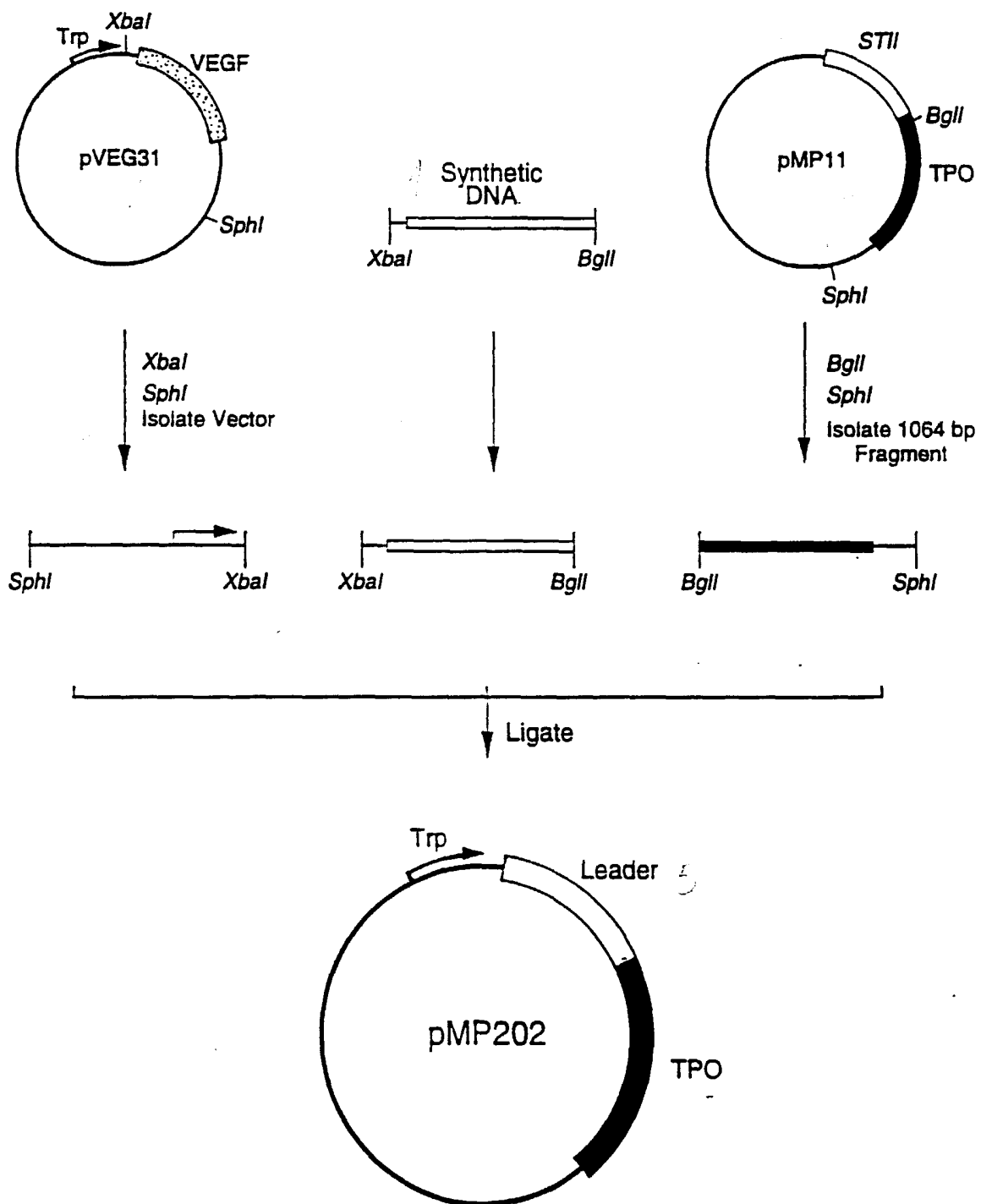


FIG.36

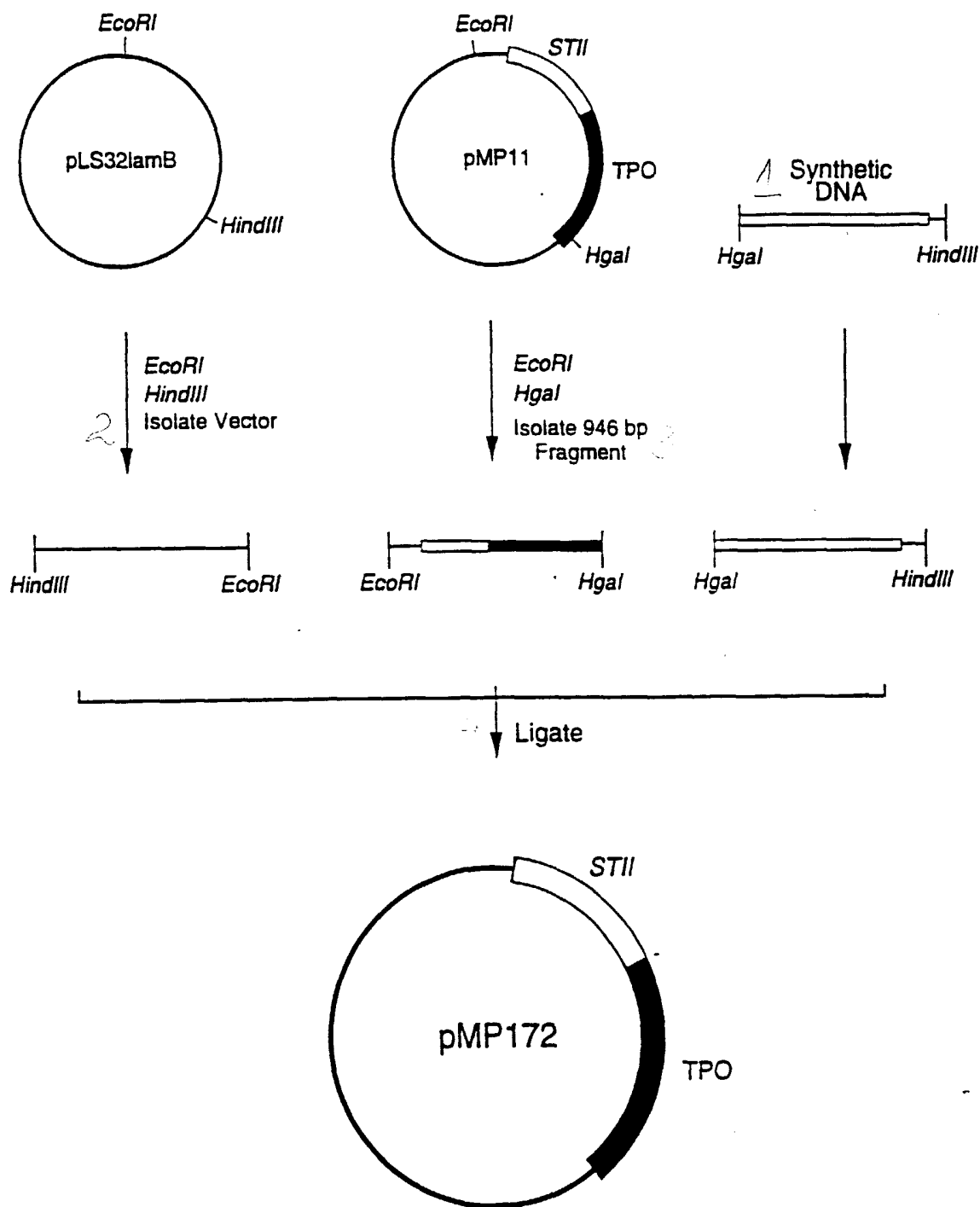


FIG.37

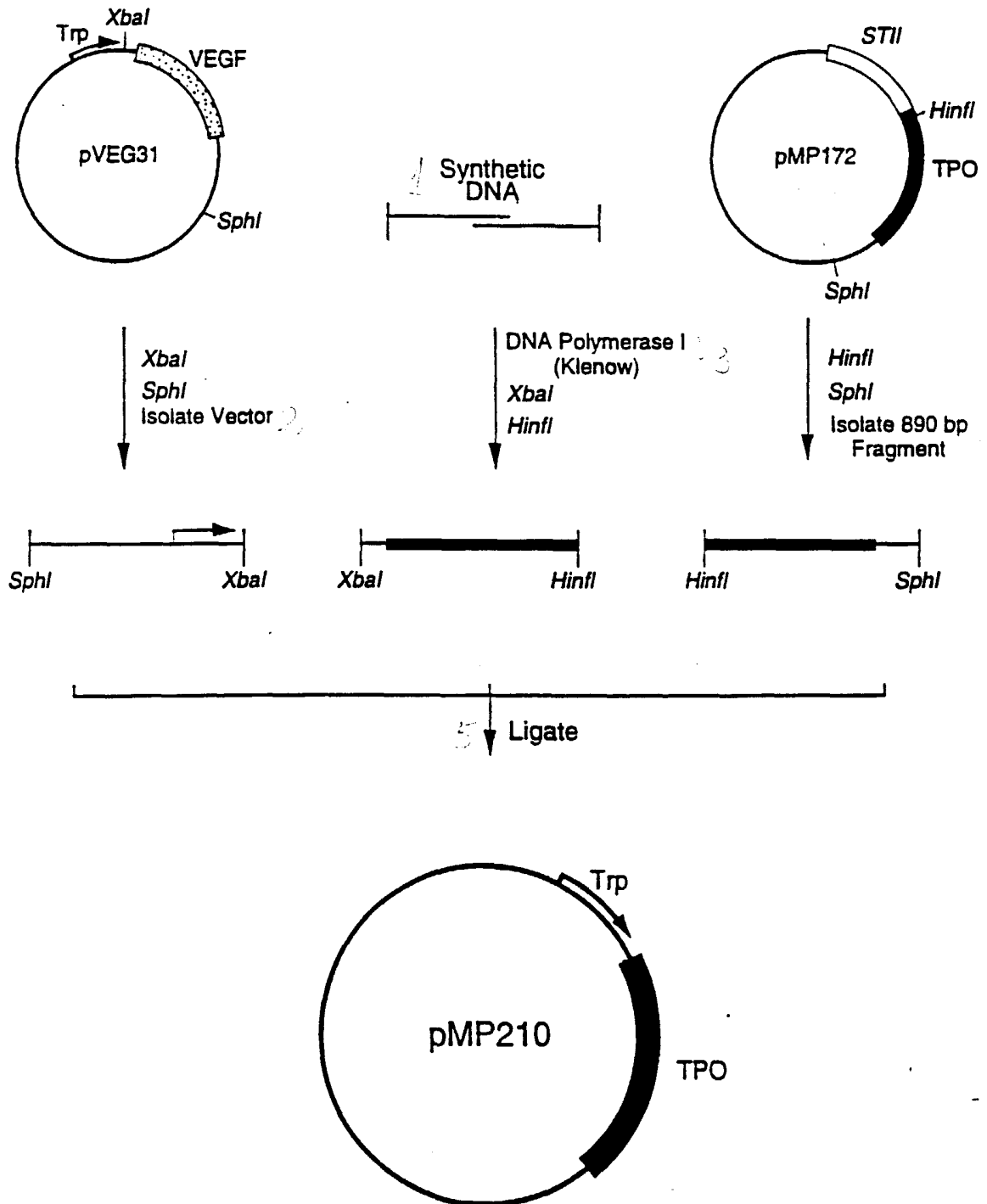


FIG.38

	Met	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala
MP210 Bank	ATG	TCN	CCN	GCN	CCN	CCN	GCN
MP210-1	ATG	TCT	CCA	GCG	CCG	CCA	GCG
MP210-T8	ATG	TCG	CCT	GCT	CCA	CCT	GCT
MP210-21	ATG	TCG	CCA	GCG	CCA	CCA	GCC
MP210-24	ATG	TCC	CCA	GCC	CCA	CCC	GCA
MP210-25	ATG	TCG	CCA	GCG	CCG	CCA	GCG

FIG.39

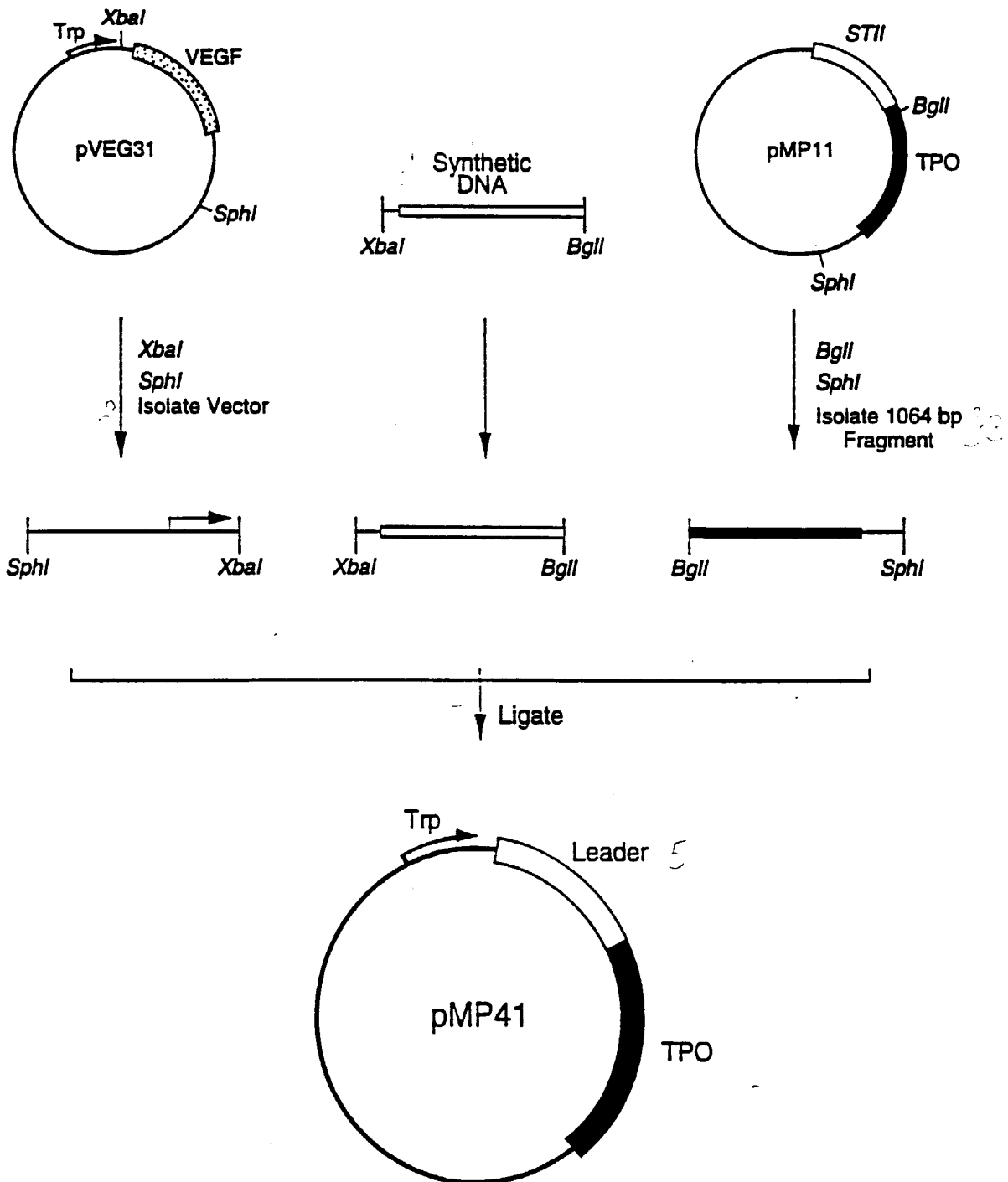


FIG.40

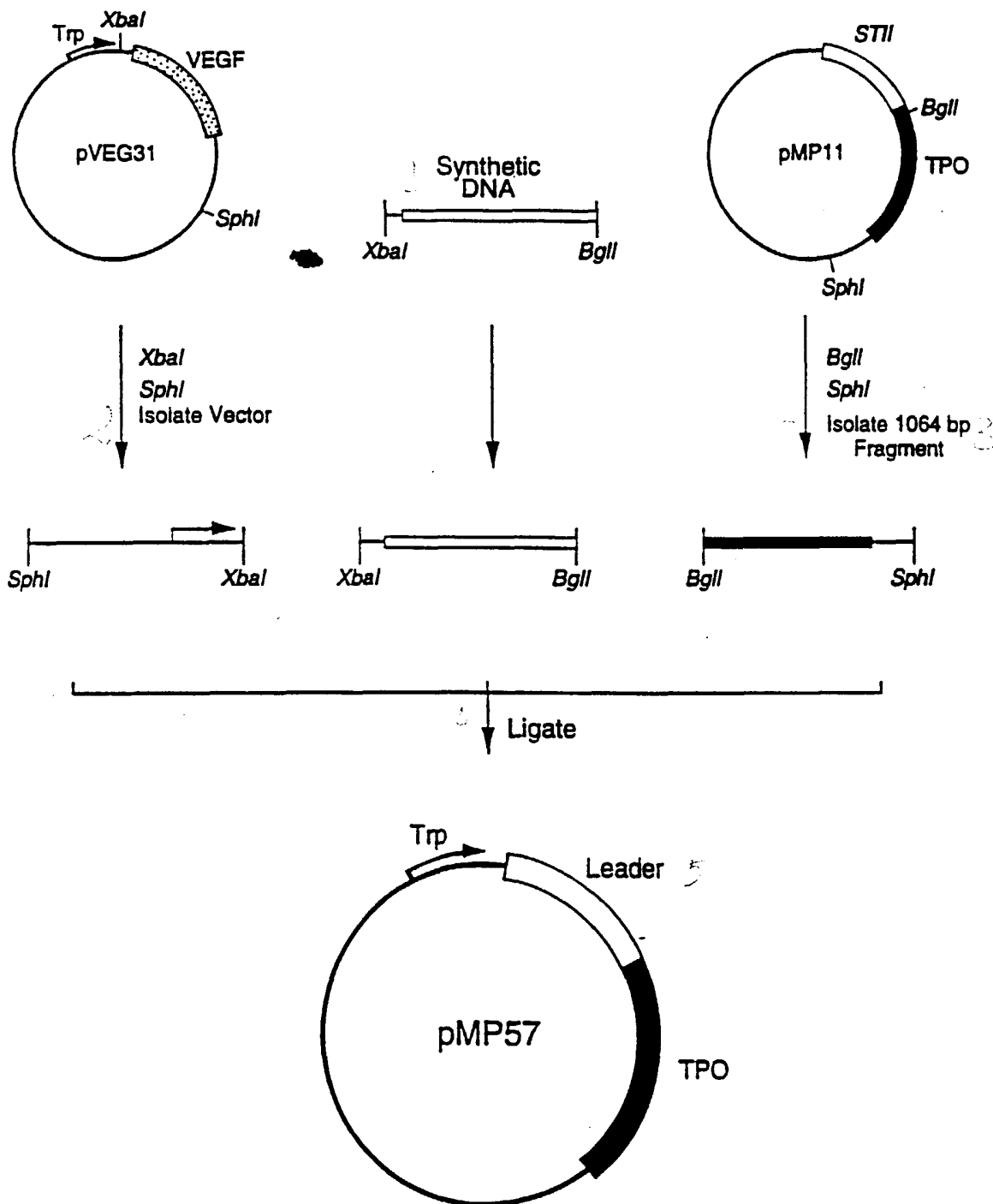


FIG.4 I

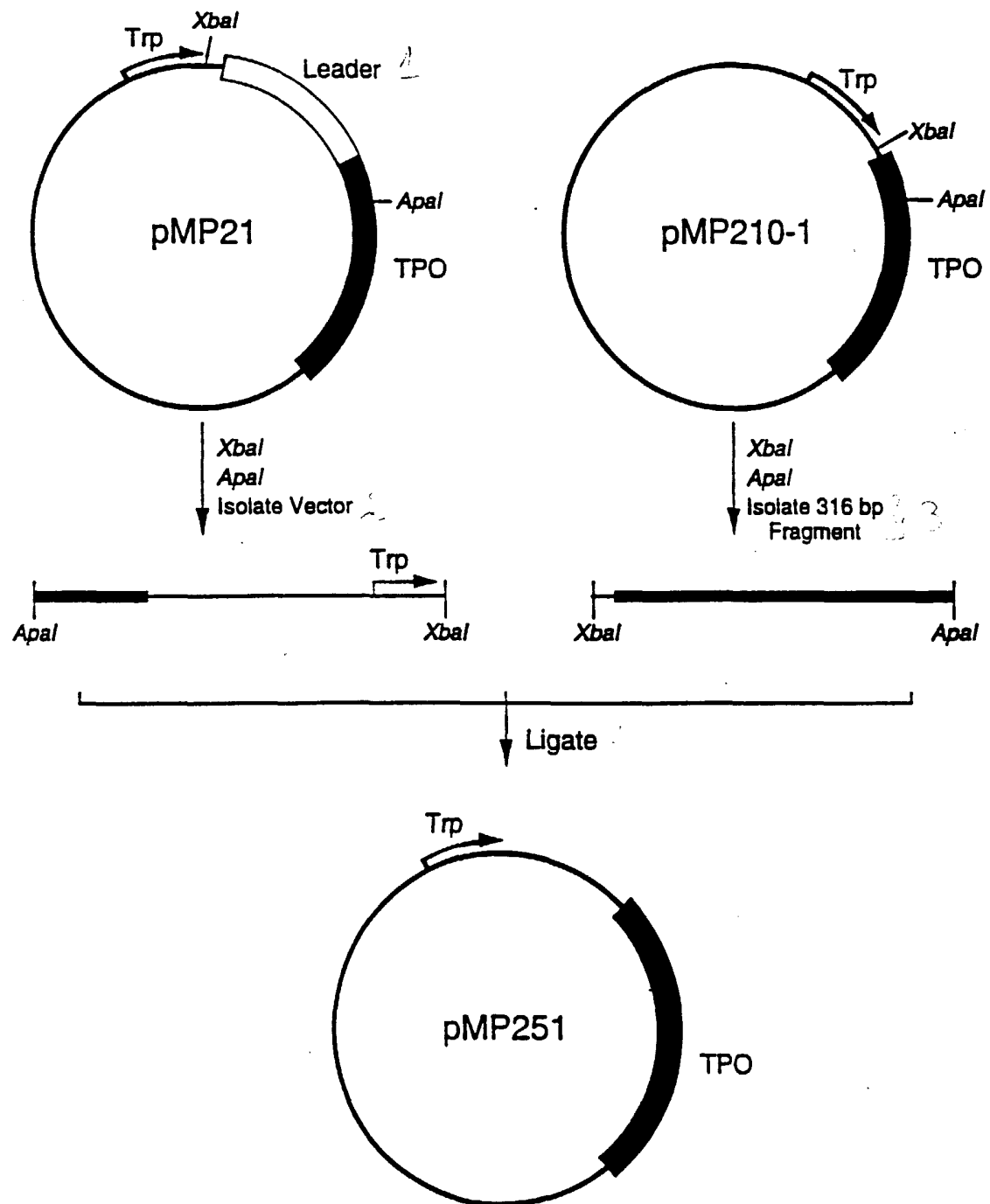


FIG.42

ТЕКСТ КЪМ ФИГУРИТЕ

Фиг. 2. 1 - BaF3-MPLP3-клетки; 2 -отстрани IL-3; 3 - 24 часа гладуване; 4 - комбинирай тест-пробите + клетките, гладували за IL-3, инкубирай 18 часа (през нощта); 5 - добави 3H-тимидин към ямките, инкубирай 6 часа; събери съдържимото върху филтрационна плака; 7 - анализирай включването на 3H-тимидин/ямка: показател за митогенен отговор към тестирувания фактор.

Фиг. 3. 1 - % от контролата; 2 - без третиране; 3 - нагряване; 4 - DTT (дитиотреитол); 5 - проназа-сефароза; 6 - BSA (говежди серумен албумин)-сефароза.

Фиг. 4. 1 - включване на 3H-тимидин; 2 - плазмен пул; 3 - фенил-натоварване; 4 - фенил-поток; 5 - фенил-промивка; 6 - фенил-елуиране; 7 - Blue Sep.-поток; 8 - Blue Sep.-промивка; 9 - Blue Sep.-елуиране; 10 mpi-UL (UltraLink)-поток.

Фиг. 5. 1 - номер на фракцията

Фиг. 6. 1 - включване на 3H-тимидин; 2 - включване на 3H-тимидин; 3 - гелно късче.

Фиг. 7. 1 - свързан 125-I HPD-ID; 2 - без APP (апластична свинска плазма); 3 - APP; 4 - APP mpi-поток.

Фиг. 8. 1 - свързан 125-I HPD-ID; 2 - без APP.

Фиг. 12A. 1 - включване на [³H]-тимидин (срт); 2 - пъти разреждане.

Фиг. 12B. 1 - свързан ¹²⁵I-анти Ilbllla (срт); 2 - контрола; фалшивоположителна контрола.

Фиг. 12С. 1 - ^{35}S включване в тромбоцити $\times 10^3$; 2 - тромбоцити/мл $\times 10^{-9}$; 3 - нормално ниво на тромбоцитите 4 - фалшивоположителна контрола.

Фиг. 13. 1 - включване на $[3\text{H}]$ -тимидин; 2 - пъти разреждане; 3 - фалшивоположителна контрола.

Фиг. 14А. 1 - < начало на кДНК-последователността; екзон 1 >.

Фиг. 14В. 1 - < екзон 2 >; 2 - < екзон 3 >.

Фиг. 14С. 1 - край на сигналния пептид; 2 - < екзон 4 >.

Фиг. 14D. 1 - < екзон 5 >; 2 - < екзон 6 >; 3 - място за алтернативен сплайсинг; 4 - С за кДНК-клона; 5 - край на ЕРО-домена.

Фиг. 14Е. 1 - полиА-място; 2 - край.

Фиг. 23 и 24. 1 - донорно място за сплайсинг; 2 - акцепторно място за сплайсинг.

Фиг. 25А и 25В. 1 - буфер; 2 - ТРО-153 (60 000 единици/ден/мишка0; 3 - дни след третирането; 4 - тромбоцити (хиляди/клетъчни единици на мм); 5 - милиони/клетъчни единици на мм; 6 - ЧКК (червени кръвни клетки).

Фиг. 25С и 26А. 1 - БКК (бели кръвни клетки); 2 - хиляди/клетъчни единици на мм; 3 - буфер; 4 - дни след третирането; 5 - тромбоцити.

Фиг. 26В и 26С. 1 - ЧКК (червени кръвни клетки); 2 милиони/клетъчни единици на мм; 3 - буфер; 4 - БКК (бели кръвни клетки); 5 - милиони клетъчни единици на мм; 6 - дни след третирането.

Фиг. 27А и 2В. 1 - тромбоцити; 2 - буфер; 3 - хиляди/клетъчни единици на мм; 4 - дни след третирането; 5 - БКК (бели кръвни клетки); 6 - милиони клетъчни единици на мм.

Фиг. 27С и Фиг. 28. 1 - БКК (бели кръвни клетки); 2 - буфер; 3 - хиляди/клетъчни единици на мм; 4 - дни след третирането; 5 - 332 от CHO; 6 - 332 от 293; 7 - без метионин 155 E-Coli; 8 - тромбоцити (хиляди/клетъчни единици на мм); 9 - доза (мкг/ден).

Фиг. 29. 1 - PBS-буфер; 2 - TPO332 (смесена фракция); 3 - TPO332 (30K-фракция); 4 - TPO332 (70K-фракция); 5 - тромбоцити (хиляди/клетъчни единици на мм); 6 - дни след третирането.

Фиг. 30А. 1. CHO, трансфектирани с MPL/Rse.gD; 2 - фосфотирозин; 3 - биотинилирано 4G10; 4 - стрептавидин-HPR (пероксидаза от хрян); 5 - проявяване с TMB, прочети на 450/460 нм.

Фиг. 30 В. 1 - MPL екстрацелуларен (извънклетъчен) домен; 2 - Rse трансмембранен и вътреклетъчен домен с gD-"опашка"; 3 - MPL екстрацелуларен домен; 4 - трансмембранна област; 5 - киназна област; 6 - тирозини акцептори на фосфати; 7 - gD-"опашка".

Фиг. 31. 1 - 5×10^4 MPL/Rse.gD-клетки на ямка в 96-ямкови културални плаки (с плоско дъно); 2 - стимулирай я(ямка)/лиганд x 30 минути; 3 - стимулацията може да се извърши с 50 или 100 мкл; 4 - Разтвори в: 150 mM NaCl, 0,5% Triton-X 100, 50 mM HEPES, pH 7,4, Na_2VO_4 (фосфатазен инхибитор), леупептин, апротинин & AEBSF (протеазни инхибитори); 5 - прехвърли 85 мкл от клетъчния лизат в ELISA-ямка, натоварена с улавящото антитяло, 5B6 (mAb[моноклонално антитяло] срещу gD-пептида); 6 - инкубирай на клатачка x 2 часа; 7 - промий плаките и прибави биотинилирано 4G10, 400 пг/мл, 100 мкл/ямка; 8 - инкубирай на клатачка

х 2 часа; 9 - промий плаката и прибави конюгиран с ензим стрептавидин/HRP(пероксидаза от хрян), 1:10K, 100 мкл/ямка; 10 - инкубирай на клатачка х 30 мин; 11 - промий плаката и прибави TMB-субстрат на Kirkegaard & Perry, 100 мкл/ямка; 12 - промий х 10 мин; 13 - прекрати с 1 M H_3PO_4 и прочети на 450/650 нм.

Фиг. 33A. 1 - синтетична ДНК; 2 - изолирай фрагмента от 258 нд; 3 - терминатор; 4 - изолирай вектора; 5 - изолирай фрагмента от 320 нд; 6 - изолирай фрагмента от 152 нд; 7 - изолирай фрагмента от 412 нд.

Фиг. 33B. 1 - лигирай; 2 - терминатор.

Фиг. 34. 1 - синтетична ДНК; 2 - изолирай вектора; 3 - изолирай фрагмента от 1072 нд; 4 - лигирай; 5 - лидер.

Фиг. 35 и 36. 1 - синтетична ДНК; 2 - изолирай вектора; 3 - изолирай фрагмента от 1064 нд; 4 - лигирай; 5 - лидер.

Фиг. 37. 1 - синтетична ДНК; 2 - изолирай вектора; 3 - изолирай фрагмента от 946 нд; 4 - лигирай.

Фиг. 38. 1 - синтетична ДНК; 2 - изолирай вектора; 3 - ДНК-полимераза I (Кленов); 4 - изолирай фрагмента от 890 нд; 5 - лигирай.

Фиг. 39. 1 - MP210-банка.

Фиг. 40 и 41. 1 - синтетична ДНК; 2 - изолирай вектора; 3 - изолирай фрагмента от 1064 нд; 4 - лигирай; 5 - лидер.

Фиг. 42. 1 - лидер; 2 - изолирай вектора; 3 изолирай фрагмента от 316 нд; 4 - лигирай.

Фиг. 32N. 1 - начало на pUC118; 2 - линкер за линеаризиране, включен в HpaI-мястото.