

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

296 130

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/19 (1990.01)

C07K 14/52 (1995.01)

C07K 16/24 (1995.01)

A61K 38/19 (1995.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLICA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **1996-1922**
- (22) Přihlášeno: **28.12.1994**
- (30) Právo přednosti: **03.01.1994** US **1994/176553**
21.01.1994 US **1994/185607**
15.02.1994 US **1994/196689**
04.04.1994 US **1994/223263**
25.05.1994 US **1994/249376**
02.12.1994 US **1994/348657**
02.12.1994 US **1994/348658**
- (40) Zveřejněno: **14.05.1997**
(Věstník č. 5/1997)
- (47) Uděleno: **09.11.2005**
- (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **11.01.2006**
(Věstník č. 1/2006)
- (86) PCT číslo: **PCT/US1994/014553**
- (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1995/018858**

(73) Majitel patentu:

Genentech, Inc., South San Francisco, CA, US

(72) Původce:

Eaton Dan L., San Rafael, CA, US

De Sauvage Frederic J., Foster City, CA, US

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273, Praha 4,
14021

(54) Název vynálezu:

Ligand mpl

(57) Anotace:

Je popsán izolovaný ligand mpl, izolovaná DNA kódující ligand mpl a rekombinantní nebo syntetické metody přípravy a čištění ligandu mpl. Je ukázáno, jak různé formy ligandu mpl ovlivňují replikaci, diferenciaci a zrání krevních buněk, zvláště megakaryocytů a buněk progenitorů megakaryocytů. Proto mohou být tyto sloučeniny použity k léčení trombocytopenie.

CZ 296130 B6

Ligand *mpl*

Oblast techniky

5

Vynález se týká izolace, purifikace a rekombinantní nebo chemické syntézy proteinů, které ovlivňují životnost, proliferaci, diferenciaci nebo zrání hematopoetických buněk, zvláště destičkových progenitorových buněk. Tento vynález se zvláště týká klonování a exprese nukleových kyselin kódujících proteinové ligandy schopné vázat a aktivovat *mpl*, člena podskupiny cytokinových receptorů. Vynález dále popisuje použití těchto proteinů samotných nebo v kombinaci s dalšími cytokiny k léčení imunitních nebo hematopoetických onemocnění včetně trombocytopenie.

10

Dosavadní stav techniky

15

I. Hematopoetický systém

Hematopoetický systém produkuje zralé vysoce specializované krevní buňky, o kterých je známo, že jsou nezbytné pro přežití všech savců. Tyto zralé buňky zahrnují erytrocyty, specializované na transport kyslíku a oxidu uhličitého, T- a B-lymfocyty, zodpovědné za imunitní odpověď zprostředkovanou buňkami a protilátkami, destičky nebo trombocyty, specializované na tvoření krevních sraženin, a granulocyty a makrofágy, specializované k odstraňování nečistot a jako pomocné buňky při boji s infekcí. Granulocyty jsou dále rozděleny na neutrofilů, eosinofilů, basofilů a mastocytů. Specializované buněčné typy mají své specializované funkce. Je pozoruhodné, že všechny tyto specializované zralé krevní buňky jsou odvozeny od jediného společného primitivního buněčného typu, uváděného jako pluripotentní (nebo totipotentní) kmenová buňka, která se nachází zejména v kostní dřeni (Dexter a kol., *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 3: 423–441 (1987)).

20

25

Zralé vysoce specializované krevní buňky musí být ve velkých množstvích produkovány kontinuálně v průběhu života savce. Převážná většina těchto specializovaných krevních buněk je odsouzena k tomu, aby byly funkčně aktivní pouze několika hodin až týdnů (Cronkite a kol., *Blood Cells*, 2: 263–284 (1976)). Tedy kontinuální obnova zralých krevních buněk, samotných primitivních kmenových buněk, stejně jako jakýchkoliv mezistupňů, které leží mezi primitivními a zralými buňkami, je nezbytná k udržení normálního stabilního stavu krevních buněk, nutného u savců.

30

35

Ve středu hematopoetického systému leží pluripotentní kmenová buňka (buňky). Těchto buněk je na počet relativně málo a prodělávají sebeobnovu proliferací a produkují dceřinné kmenové buňky nebo jsou transformovány, v řadě diferenciačních kroků, na kmenově-vymezené progenitorové buňky se stoupající zralostí, a nakonec vznikají vysoce specializované zralé krevní buňky.

40

Například některé multipotentní progenitorové buňky, uváděné jako CFC-Mix, odvozené z kmenových buněk prodělávajících proliferaci (sebeobnovu) a vývoj, produkují kolonie obsahující všechny různé myeloidní buňky, erytrocyty, neutrofilů, megakaryocyty (předchůdci destiček), makrofágy, basofilů, eosinofilů, a mastocytů. Ostatní progenitorové buněčné lymfoidní kmeny prodělávají proliferaci a vývoj na T-buňky a B-buňky.

45

Dále mezi progenitorovými buňkami CFC-Mix a myeloidními buňkami leží další řada progenitorových buněk intermediárních ve vztahu k jejich potomkům. Tyto kmenově vymezené progenitorové buňky jsou klasifikovány na základě potomků, které produkují. Známí přímí předchůdci myeloidních buněk jsou: erythroidní jednotky tvořící kolonie (CFU-E) pro erytrocyty, buňky tvořící granulocytové/makrofágové kolonie pro megakaryocyty, buňky tvořící eosinofilní kolonie (Eos-CFC) pro mastocytů. Ostatní intermediární předchůdci buněk mezi pluripotentními kmenovými buňkami a zralými krevními buňkami jsou známí (viz níže) nebo budou pravděpodobně objeveni, a mají měnit se stupeň rodového vymezení a sebeobnovy kapacity.

50

55

Vlastním vedoucím činitelem normálního hematopoetického buněčného systému se jeví být snížení kapacity samoobnovy při ztrátě multipotence a získání kmenovém vymezení a zralosti. Tedy na jednom konci hematopoetického buněčného spektra leží pluripotentní kmenové buňky, které mají kapacitu pro sebeobnovu a diferenciaci na všechny různé kmenově-vymezené zaměřené progenitorové buňky. Tato kapacita je základem terapie transplantací kostní dřeně, kdy primitivní kmenové buňky znovu osídlí celý hematopoetický buněčný systém. Na druhém konci spektra leží vysoce kmenově vymezené progenitory a jejich potomci, kteří ztratili schopnost samoobnovy, ale získali zralou funkční aktivitu.

Proliferace a vývoj kmenových buněk a kmenově vymezených progenitorových buněk je pečlivě kontrolován různými hematopoetickými růstovými faktory nebo cytokiny. Úloha těchto růstových faktorů *in vivo* je komplexní a není zcela pochopena. Některé růstové faktory, jako je interleukin-3 (IL-3), jsou schopné stimulovat multipotentní kmenové buňky stejně dobře jako zaměřené progenitorové buňky některých kmenů, včetně například megakaryocytů. Předpokládalo se, že u dalších faktorů jako je granulocytový/makrofágový faktor stimulující kolonie (GM-CSF) je jejich působení omezeno na GM-CFC. Později však bylo objeveno, že GM-CSF také ovlivňuje proliferaci a vývoj *inter alia* megakaryocytů. Bylo zjištěno, že biologické aktivity IL-3 a GM-CSF se překrývají, i když účinnost se různí. Nedávno bylo zjištěno, že interleukin-6 (IL-6) i interleukin-11 (IL-11) naproti tomu nemají zjevný vliv na samotnou formaci kolonií megakaryocytů, působí synergicky s IL-3, stimulují zrání megakaryocytů (Yonemura a kol., *Exp. Hematol.*, 20: 1011-1016 (1992)).

Hematopoetické růstové faktory mohou ovlivňovat růst a diferenciaci jednoho nebo více rodů, mohou se překrývat s ostatními růstovými faktory v ovlivňování jednotlivých progenitorových buněčných linií, nebo mohou působit synergicky s dalšími faktory.

Také bylo objeveno, že hematopoetické růstové faktory mohou projevovat své účinky v různých fázích buněčného vývoje od totipotentních kmenových buněk přes různě zaměřené buňky kmenově-vymezených progenitorů až po zralé krevní buňky. Například u erythropoetinu (epo) bylo objeveno, že zahajuje proliferaci pouze zralých erythroidních progenitorových buněk. IL-3 uplatňuje své účinky dříve, ovlivňuje primitivní kmenové buňky a mezistupňové kmenově vymezené progenitorové buňky. Další růstové faktory jako je kmenový buněčný faktor (SCF) mohou ovlivňovat více vývoj primitivních buněk.

Vzhledem k předcházejícím informacím bude oceněno, že mohou být použity nové hematopoetické růstové faktory, které ovlivňují životnost, proliferaci, diferenciaci nebo zrání jakýchkoliv krevních buněk nebo jejich předchůdců, zvláště pomáhají při rekonstrukci oslabeného hematopoetického systému, jenž může být oslaben onemocněním nebo po radiační nebo chemoterapii.

II. Megakaryocytopoéza – produkce destiček

Regulace megakaryocytopoézy a produkce destiček byly popsány v: Mazur, *Exp. Hematol.*, 15: 248 (1987) a Hoffman, *Blood*, 74: 1196-1212 (1989). Krátce, pluripotentní kmenové buňky kostní dřeně se diferencují na megakaryocyty, erythrocyty a myelocytické buněčné linie. Věří se, že mezi kmenovými buňkami a megakaryocyty existuje hierarchie specializovaných megakaryocytických progenitorových buněk. Byly identifikovány nejméně tři třídy megakaryocytických progenitorových buněk, a to jednotka tvořící blasty megakaryocytů (BFU-MK), jednotka tvořící kolonie megakaryocytů (CFU-MK) a megakaryocytové progenitorové buňky o nízké hustotě (LD-CFU-MK). Samotné zrání megakaryocytů je kontinuální vývoj, který může být rozdělen na postupně založené na standardních morfologických kritériích. Nejranějším rozpoznatelným členem skupiny megakaryocytů (MK nebo meg) jsou megakaryoblasty. Tyto buňky mají nejprve 20 až 30 μm v průměru a mají basofilní cytoplazmu a mírně nepravidelné jádro s volným, poněkud retikulárním chromatinem a několika jádérky. Později mohou megakaryoblasty obsahovat až 32 jáder (polyploid), ale cytoplazma zůstává řídká a nezralá. Zrání pokračuje, jádro se stává lobulární

a zakulacené a zvyšuje se množství cytoplazmy a stává se více acidofilní a zrnitá. U nejzralejších buněk této skupiny se může objevovat uvolňování destiček na jejich periférii. Normálně je méně než 10 % megakaryocytů ve stádiu blastů a více než 50 % je zralých. Morfologická klasifikace obvykle uplatňovaná na řady megakaryocytů jsou megakaryoblasty pro nejranější formu; promegakaryocyty nebo basofilní megakaryocyty pro střední mezistupňovou formu; a zralé (acidofilní, granulární nebo produkující destičky) megakaryocyty pro pozdní formu. Zralé megakaryocyty natahují vlákna cytoplazmy do sinusoidálních prostor, kde se oddělují a fragmentují do jednotlivých destiček (Williams a kol., Hematology, 1972).

Soudí se, že megakaryocytopoéza zahrnuje několik regulačních faktorů (Williams a kol., Br. J. Haematol., 52: 173 (1982) a Williams a kol., J. Cell. Physiol., 110: 101 (1982)). Rané stadium megakaryocytopoézy je považováno za mitotické, zahrnuje buněčnou proliferaci a koloniou iniciaci z CFU-MK, ale není ovlivněno počtem destiček (Burstein a kol., J. Cell Physiol., 109: 333 (1981) a Kimura a kol., Exp. Hematol., 13: 1048 (1985)). Pozdější stadium zrání je nemitotické, zahrnuje jadernou polyploidizaci a cytoplazmické zrání a je pravděpodobně regulováno zpětnovazebným mechanismem počtem periferálních destiček (Odell a kol., Blood, 48: 765 (1976) a Ebbe a kol., Blood, 32:787 (1968)).

Byla diskutována existence rozdílných a specifických megakaryocytických kolonie-stimulujících faktorů (MK-CSF) (Mazur, Exp. Hematol., 15: 340-350 (1987)). Nicméně většina autorů věří, že proces tak životně důležitý k přežití jako je produkce destiček bude regulován cytokinem (cytokiny) výhradně odpovědným za tento proces. Hypotéza, že existuje megakaryocytově/destičkově specifický citokin (cytokiny), tvoří základ více než 30letého výzkumu – ale do dneška žádné takovéto cytokiny nebyly purifikovány, sekvenovány ani stanoveny jako specifický MK-CSF (TPO).

Ačkoliv bylo publikováno, že MK-CSF byly částečně purifikovány u experimentálně vzniklé trombocytopenie (Hill a kol., Exp. Hematol., 14: 752 (1986)) z média kondicionovaného lidskými embryonálními játry (CM) (McDonald a kol., J. Lab. Clin. Med., 85: 59 (1975) a u člověka při plastické anémii a idiopatické trombocytopenické purpře z urinárních extraktů (Kawakita a kol., Blood, 6: 556 (1983)) a plazmy (Hoffman a kol., J. Clin. Invest., 75: 1174 (1985)), jejich fyziologická funkce je ještě stále v mnoha případech neznámá.

Jako megakaryocytových potenciátorů bylo použito kondicionované médium, mitogeny slezinných buněk aktivovaných líčidlem americkým (PWM-SpCM) a myší myelomonocytové buněčné linie WEHI-3 (WEHI-3CM). PWM-SpCM obsahují faktory zvyšující CFU-MK růst (Metcalf a kol., Pro. Natl. Acad. Sci., USA, 72: 1744-1748 (1975); Quesenberry a kol., Blood, 65: 214 (1985); a Iscove, N. N., v Hematopoetic Cell Differentiation, ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular biology, Vol. 10, Golde a kol., editoři, (New York, Academy Press) str. 37-52 (1978)), jeden z nich je interleukin-3 (IL-3), multikmenový kolonie stimulující faktor (multi-CSF [Burstein, Blood Cells, 11: 469 (1986)]). Ostatní faktory v tomto médiu nebyly dosud identifikovány a izolovány. WEHI-3 je myší myelomonocytová buněčná linie vylučující relativně velká množství IL-3 a menší množství GM-CSF; bylo zjištěno, že IL-3 potenciuje růst velké skupiny hematopoetických buněk (Ihle a kol., J. Immunol., 13: 282 [1983]). Dále bylo zjištěno, že IL-3 také působí synergicky s mnoha známými hematopoetickými hormony nebo růstovými faktory (Bartelmez a kol., J. Cell Physiol., 122: 362-369 [1985] a Warren a kol., Cell, 46: 667-674 [1988]), včetně erythropoetinu (EPO) i interleukinu-1 (IL-1), při indukci velmi raných multipotenciálních prekurzorů a formování velmi rozsáhlých smíšených hematopoetických kolonií.

Další zdroje megakaryocytových potenciátorů byly objeveny v kondicionovaném médiu myších plicních, kostních, makrofágových buněčných linií, buněk peritoneálního exsudátu a buňkách lidských zárodečných ledvin. Přes některé sporné údaje (Mazur, Exp. Hematol., 15: 340-350 [1987]), existuje několik důkazů (Geissler a kol., Br. J. Haematol., 60: 233-238 [1985]), že aktivované T lymfocyty spíše než monocyty mají důležitou úlohu v megakaryocytopoéze. Tato zjištění předpokládají, že sekrety aktivovaných T-lymfocytů jako jsou interleukiny mohou být regu-

lačními faktory ve vývoji MK (Geissler a kol., *Exp. Hematol.*, 15: 845–853 [1987]). Množství studií megakaryocytopoézy s purifikovaným erythropoetinem EPO (Vainchenker a kol., *Blood*, 54: 940 [1979]; McLeod a kol., 261: 492–4 [1976]; a Williams a kol., *Exp. Hematol.*, 12: 734 [1984]) naznačují, že tento hormon má silný vliv na MK formaci kolon. To bylo také demonstrováno v kulturách bez séra i obsahujících sérum a v nepřítomnosti pomocných buněk (Williams a kol., *Exp. Hematol.*, 12: 734 [1984]). Předpokládá se, že EPO zasahuje více do jedno- a dvou-

buněčné fáze z hlediska megakaryocytopoézy tak, že působí proti účinku PWM–SpCM, které zasahuje do čtyřbuněčné fáze vývoje megakaryocytů. Interakce všech těchto faktorů v časně i v pozdní fázi vývoje megakaryocytů zbývá objasnit.

Údaje zjištěné v některých laboratořích předpokládají, že jediné multikmenové faktory, které individuálně mají aktivitu stimulující kolonie MK jsou GM–CSF a IL–3 a v menší míře B–buněčný stimulační faktor IL–6 (Ikebuchi a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9035 [1987]). Nedávno několik autorů publikovalo, že faktor inhibující leukemii IL–11 (LIF) působí synergicky s IL–3 na zvýšení megakaryocytové velikosti a ploidie (Yonemura a kol., *British Journal of Hematology*, 84: 16–23 [1993]; Burstein a kol., *J. Cell. Physiol.*, 153: 305–312 [1992]; Metcalf a kol., *Blood*, 76, 50–56 [1990]; Metcalf a kol., *Blood* 77: 2150–2153 [1991]; Bruno a kol., *Exp. Hematol.*, 19: 378–381; a Yonemura a kol., *Exp. Hematol.*, 20: 1011–1016 [1992]).

Ostatní dokumenty, které se tímto zabývají, zahrnují: Eppstein a kol., US 4 946 091; Chong, US 4 879 111; Fernandes a kol., US 4 604 377; Wissler a kol., US 4 512 971; Gottlieb, US 4 468 379; Bennet a kol., US 5 215 895; Kogan a kol., US.5 250 732; Kimura a kol., *Eur. J. Immunol.*, 20(9): 1927; Secor a kol., *J. of Immunol.*, 144(4) 1484–1489 [1990]; Warrena kol. *J. of Immunol.*, 140(1): 94–99 [1988]; Waren a kol., *Eex. Hematol.*, 17(11): 1095–1099 [1989]; Bruno a kol., *Exp. Hematol.*, 17(10): 1038–1043 [1989]; Tanikawa a kol., *Exp. Hematol.*, 17(8): 883–888 [1989]; Koike a kol., *Blood*, 75(12): 2286–2291 [1990]; Lotem, *Blood*, 75(5): 1545–1551 [1989]; Rennick a kol., *Blood*, 73(7): 1828–1835 [1989]; a Clutterbuck a kol., *Blood*, 73(6): 1504–1512 [1989].

III. Trombocytopenie

Destičky jsou rozhodujícím prvkem krevního srážecího mechanismu. Deplece hladiny cirkulujících destiček, nazývaná trombocytopenie, se vyskytuje za různých klinických stavů a u různých onemocnění. Trombocytopenie je obvykle definována jako počet destiček pod 150×10^9 na litr. Hlavní příčiny trombocytopenie mohou být rozděleny na tři kategorie na základě životnosti destičky, a to: (1) snížená produkce destiček kostní dřeně, (2) sekvestrování destiček ve slezině (splenomegalie), nebo (3) zvýšená destrukce destiček v periferní cirkulaci (např. autoimunitní trombocytopenie nebo chemoterapie a radiační terapie). Dále u pacientů, kteří dostávají velké objemy rychle podávaných krevních produktů, chudých na destičky, se může rozvinout trombocytopenie způsobená zředěním.

Klinické krvácivé projevy trombocytopenie závisí na intenzitě trombocytopenie, která je způsobila, a možných přidružených koagulačních defektech. Obecně pacienti s počtem destiček mezi 20 a 100×10^9 na litr jsou v nebezpečí excesivního post traumatického krvácení, zatímco pacienti s počtem destiček pod 20 a 100×10^9 na litr mohou krvácet spontánně. Tito druzí pacienti jsou kandidáty transfuze destiček s kontrolovaným imunitním a virálním rizikem. Při jakémkoliv stupni trombocytopenie budou sklony ke krvácení silnější, pokud příčinou je snížená produkce spíše než zvýšená destrukce destiček. Trombocytopenie mohou být následkem různých onemocnění stručně popsaných níže. Podrobnější popis je možné nalézt v Schafner, A.I., „Trombocytopenia and Disorders of Platelet Function,“ *Internal Medicine*, 3. vydání, John J. Hutton a kol., editoři, Little Brown and Co., Boston/Toronto/London [1190].

(a) Trombocytopenie způsobená sníženou produkcí destiček

Příčiny kongenitální trombocytopenie zahrnují konstituční aplastickou anemii (Fanconiho syndrom) a kongenitální amegakaryocytickou trombocytopenii, které mohou být spojeny se skeletálními malformacemi. Získaná onemocnění produkce destiček jsou způsobena buď hypoplasíí megakaryocytů nebo neefektivní trombopoézou. Megakaryocytická hypoplasie může být následkem různých stavů, včetně aplasie dřene (včetně idiopatických forem nebo myelosuprese chemoterapeutickými činidly nebo radiační terapií), myelfibrózy, leukemie a napadení kostní dřene metastatickým tumorem nebo granulomázou. U některých případů, toxinů, infekčních agens nebo léků mohou relativně selektivně interferovat s trombopoézou; příklady zahrnují přechodné trombocytopenie způsobené alkoholem a některými virálními infekcemi a mírnou trombocytopenii spojenou s podáváním triazidových diuretik. Nakonec, neefektivní trombopoéza sekundární k megaloblastickým procesům (deficience folátu nebo B₁₂) může také způsobit trombocytopenii, obvykle s koexistující anémií a leukopenií.

Současné léčení trombocytopenií způsobených snížením produkce destiček závisí na rozpoznání a zvrácení základní příčiny nedostatečnosti kostní dřene. Transfuze destiček jsou obvykle vyhrazeny pro pacienty s vážnými krvácivými komplikacemi, nebo pro pokrytí potřeby během chirurgických zákroků, poněvadž izoimunizace může vést k tomu, že další transfuze destiček nezabírají. Mukózní krvácení, které je následkem silné trombocytopenie může být zlepšeno orálním nebo intravenózním podáváním antifibrinolytických agens. Mohou se ale rozvinout trombotické komplikace, pokud jsou antifibrinolytická agens použita u pacientů s rozšířenou intravaskulární koagulací (DIC).

(b) Trombocytopenie způsobená slezinnou sekvestrací

Splenomegalie způsobená jakoukoliv příčinou může být spojena s mírnou až slabou trombocytopenií. Je to převážně pasivní proces (hypersplenismus) slezinné destičkové sekvestrace, ve srovnání s aktivní destrukcí destiček slezinou v případech imunitou zprostředkované trombocytopenie diskutované níže. Ačkoliv nejobvyklejší příčinou hypersplenismu je kongestivní splenomegalie z portální hypertenze způsobená alkoholickou cirhózou, další formy kongestivní, infiltrativní nebo lymfoproliferativní splenomegalie jsou také spojeny s trombocytopenií. Jako následek samotného hypersplenismu obvykle neklesne počet destiček pro 50×10^9 na litr.

(c) Trombocytopenie způsobená neimunitně-zprostředkovanou destrukcí destiček

Trombocytopenie může být následkem zrychlené destrukce destiček různými neimunologickými procesy. Onemocnění tohoto typu zahrnují rozšířenou intravaskulární koagulaci, protetické intravaskulární prostředky, mimotělní cirkulaci krve, a trombotickou mikroangipatii jako je trombotická trombocytická purpura. Ve všech těchto případech cirkulující destičky, které jsou vystaveny působení buď umělých povrchů nebo abnormálních vaskulárních ztenčení, v obou případech jsou zničeny na těchto místech nebo jsou poškozeny a poté předčasně odstraněny retikuloendoteliálním systémem. Chorobné stavy nebo onemocnění, u kterých se může objevit rozšířená intravaskulární koagulace (DIC), jsou dále detailněji popsány v Braunwald a kol., (editoři), Harrison s Principles of Internal Medicine, 11. vydání, str. 1478, McGraw Hill [1987]. Intravaskulární protetické prostředky, včetně srdečních chlopní a intra-aortických balónků mohou způsobovat mírnou až slabou destruktivní trombocytopenii, a přechodná trombocytopenie u pacientů prodávajících kardiopulmonární bypass nebo hemodialýzu může být následkem spotřeby nebo zničení destiček při mimotělním oběhu.

(d) Léky-indukovaná imunitní trombocytopenie

Bylo prokázáno, že více než 100 léků má vliv na imunologicky zprostředkovanou trombocytopenii. Avšak pouze quinidin, quinín, zlato, sulfonamidy, cephalothin a heparin byly charakterizo-

vány dobře. Léky–indukovaná trombocytopenie je často velmi silná a obvykle se prudce projeví během dnů, kdy pacient užívá tyto senzitivující léky.

(e) Imunitní (autoimunitní) trombocytopenická purpura (ITP)

5

ITP u dospělejších je chronické onemocnění charakterizované autoimunitní destrukcí destiček. Autoprotilátky jsou obvykle IgG, i když byly publikovány i další imunoglobuliny. I když bylo zjištěno spojení autoprotilátky ITP s destičkovou membránovou GPII_bIII_a, destičková antigenní specifita nebyla dosud ve většině případů identifikována. Extravaskulární destrukce senzitivova-

10

(f) HIV–indukovaná ITP

15

ITP je stále častější komplikací infekce HIV (Morris a kol., *Ann. Intern. Med.*, 96: 714–717 [1982]), a může se vyskytnout v jakémkoliv stadiu progresu choroby, jak u pacientů s diagnózou syndromu získané imunodeficiencie (AIDS), i u komplexu onemocnění příbuzných AIDS i u HIV infekce bez symptomů AIDS. HIV infekce je přenosné onemocnění v konečné fázi charakterizované hloubkovou deficiencí buněčné imunitní funkce, stejně jako výskytu oportunních infekcí a malignit. Primární imunologická abnormalita, která je následkem infekce HIV je progresivní deplece a funkční narušení T lymfocytů exprimujících CD4 buněčné povrchové glykoproteiny (Lane a kol., *Ann. Rev. Immunol.*, 3: 477 [1985]). Ztráta CD4 pomahačské/induktorové T buněčné funkce je pravděpodobně příčinou těžkých defektů v buněčné a humorální imunitě vedoucí k oportunním infekcím a malignitám charakteristickým pro AIDS (H. Lane výše).

20

25

Ačkoliv mechanismus ITP spojeného s HIV je neznámý, předpokládá se, že se liší od mechanismu ITP nespojeného s HIV infekcí. (Walsh a kol., *N. Eng. J. Med.*, 311: 636–639 [1984]; a Ratner, *Am. J. Med.* 86: 194–198 [1989]).

30

IV. Současná terapie trombocytopenie

Terapeutický postup při léčení pacientů s trombocytopenií je řízen silou a naléhavostí klinické situace. Léčení je podobné pro trombocytopenii spojenou s HIV a trombocytopenii ne–HIV typu, a ačkoliv se užívá mnoho různých terapeutických postupů, terapie zůstává kontroverzní.

35

Počet destiček u pacientů, u kterých byla diagnostikována trombocytopenie, se úspěšně zvyšuje glukokortikoidovou (např. prednisolon) terapií, ale u mnoha pacientů je odpověď nedokonalá, nebo dojde k opětovnému zhoršení při snížení dávky nebo při přerušení podávání. Na základě těchto studií s pacienty s ITP spojeným s HIV někteří výzkumníci předpokládají, že glukokortikoidová terapie může mít za následek predispozici k AIDS. Glukokortikoidy jsou obvykle podávány, pokud počet destiček klesne pod 20×10^9 /litr nebo pokud se objeví spontánní krvácení.

40

Pacientům, u kterých nezabírají glukokortikoidy, byla k léčení těžkých případů ITP ne–HIV typu s úspěchem použita sloučenina: 4–(2–chlorfenyl)–9–methyl–2–[3–(4–morfolinyl)–3–propanon–1–yl]6H–thieno[3,2,f][1,2,4]thiazolo[4,3,a][1,4]diazepin (WEB 2086). Pacient s počtem destiček 37000–58000/ml byl léčen WEB 2086 a po 1 až 2týdenním léčení počet destiček vzrostl na 140000–190000/ml. (EP 361,077 a Lohman a kol., *Lancet*, 1147 [1988]).

45

50

Ačkoliv optimální léčení získané amegakaryocytické trombocytopenické purpury (AATP) je nejasné, bylo zjištěno, že antithymocytový globulin (ATGT), koňské antisérum k lidské thymové tkáni vyvolává prolongovanou kompletní remisi (Trimble a kol., *Am. J. Hematol.*, 37: 126–127 [1991]). Poslední zprávy ovšem naznačují, že hematopoetické efekty ATG je možné přisoudit

thimerosalu, kde pravděpodobně protein působí jako nosič rtuti (Panella a kol., Cancer Research, 50: 4429–4435 [1990]).

5 Byly publikovány dobré výsledky při splenektomii. Splenektomie odstraní hlavní místo destrukce destiček a hlavní zdroj produkce autoprotilátek u mnoha pacientů. Tento postup má u velkého množství pacientů za výsledek prolongované remise, ve kterých není třeba léčení. Ale poněvadž chirurgickému řešení se vyhýbáme u imunitně ohrožených pacientů, je splenektomie doporučována pouze v těžkých případech trombocytopenie (např. těžké s HIV spojená ITP), u pacientů, u kterých je neúčinná dvou až třítydenní léčba glukokortikoidy, nebo u kterých nebylo dosaženo zachování odpovědi po přerušení podávání glukokortikoidů. Na základě současných vědeckých poznatků je nejasné, zda splenektomie predisponuje pacienty k AIDS.

15 Kromě prednisolonové terapie a splenektomie, mohou se některá cytotoxická činidla např. vincristin a azidothimidin (AZT, zidovudin) také projevovat slibně v léčení HIV-indukované ITP, ovšem výsledky jsou předběžné.

Z předcházejícího bude oceněno, že jednou cestou léčení trombocytopenie by bylo získání agens schopné urychlit diferenciaci a zrání megakaryocytů nebo jejich prekurzorů do destičky produkující formy. Značné úsilí bylo vynaloženo na identifikaci takovéhoho činidla, obvykle uváděného jako „trombopoetin“ (TPO). Další názvy pro TPO, které můžeme nalézt v literatuře, zahrnují: trombocytopenie stimulující faktor (TSF), megakaryocytový kolonie–stimulující faktor (MK–CSF), megakaryocyt–stimulující faktor a megakaryocytový potenciátor. TPO aktivita byla poprvé pozorována v roce 1959 (Rak a kol., Med. Exp., 1:125) a až do dnešní doby probíhají pokusy charakterizovat a purifikovat toto agens. Zatímco existují zprávy o částečné purifikaci TPO–aktivních polypeptidů (viz, např. Tayrien a kol., J. Biol. Chem., 262: 3262 [1987] a Hoffman a kol., J. Clin. Invest. 75: 1174 [1985]), další zprávy naznačují, že TPO není samostatný subjekt v pravém slova smyslu, ale spíše je to polyfunkční projev známého hormonu IL–3, (Sparrow a kol., Prog. Clin. Biol. Res., 215: 123 [1986]). Bez ohledu na jeho formu nebo původ, molekula vykazující trombopoetickou aktivitu by měla významnou terapeutickou hodnotu. Ačkoliv žádný protein nebyl jednoznačně identifikován jako TPO, značným zájmem byl provázen nedávný objev, že *mpl*, předpokládaný cytokinový receptor, může transdukovat trombopoetický signál.

V. *Mpl* je megakaryocytopoetický cytokinový receptor

35 Věřilo se, že proliferace a zrání hematopoetických buněk jsou citlivě regulovány faktory, které pozitivně nebo negativně ovlivňují proliferaci pluripotentních kmenových buněk a multikmenovou diferenciaci. Tyto efekty jsou zprostředkovány vysokoafinitní vazbou extracelulárních proteinových faktorů na specifické buněčné povrchové receptory. Tyto buněčné povrchové receptory mají společnou značnou homologii a jsou obecně klasifikovány jako členové cytokinové receptorové nadskupiny. Členové nadskupiny zahrnují receptory pro: IL–2 (b a g řetězce) (Hatakeyama a kol., Science, 244: 551–556 [1989]; Takeshita a kol., Science, 257: 379–382 [1991]), IL–3 (Itoh a kol., Science, 247: 324–328 [1990]; Gorman a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5459–5463 [1990]; Kitamura a kol., Cell, 66: 1165–1174 [1991a]; Kitamura a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5082–5086 [1991b]), IL–4 (Mosley a kol., Cell, 59: 335–348 [1989]), IL–5 (Takaki a kol., EMBO J., 9: 4367–4374 [1990]; Tavernier a kol., Cell, 66: 1175–1184 [1991]), IL–6 (Yamasaki a kol., Science, 241: 825–828 [1988]; Hibi a kol., Cell, 63: 1149–1157 [1990]), IL–7 (Goodwin a kol., Cell, 60: 941–951 [1990]), IL–9 (Renault a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5690–5694 [1992]), granulocytový makrofágový faktor stimulující kolonie (GM–CSF) (Gearing a kol. EMBO J., 8: 3667–3676 [1991]; Hyashida a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 244: 9655–9659 [1990]), granulocytový faktor stimulující kolonie (G–CSF) (Fukunaga a kol., Cell, 61: 341–350 [1990a]; Fukunaga a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8702–8706 [1990b]; Larsen a kol., J. Exp. Med., 172: 1559–1570 [1990]), EPO (D Andrea a kol., Cell, 57: 277–285 [1989]; Jones a kol., Blood, 76: 31–35 [1990]), leukemii inhibující faktor (LIF) (Gearing a kol., EMBO J., 10: 2839–2848 [1991]), oncostatin M (OSM) (Rose a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8641–8645 [1991]) a také receptory pro prolaktin (Boutin a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

88: 7744–7748 [1988]; Ederly a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2112–2116 [1989]), růstový hormon (GH) (Leung a kol., Nature, 330: 537–543 [1987]) a ciliární neutrofilní faktor (CNTF) (David a kol., Science, 253: 59–63 [1991]).

5 Členové cytokinové receptorové nadskupiny mohou být rozděleni do třech funkčních kategorií (pro přehled viz Nicola a kol., Cell, 67: 1–4 [1991]). První třída obsahuje jednořetězcové receptory, jako je receptor erythropoetinový (EPO-R) nebo receptor granulocytového kolonového stimulačního receptoru (G-CSF-R), který váže ligandy s vysokou afinitou přes extracelulární doménu a také generuje intracelulární signál. Druhá třída receptorů, také nazývaná a-podjednotky, zahrnuje receptor interleukinu-6 (IL6-R), receptor granulocytového-makrofágového faktoru stimulačního kolonie (GM-CSF-R), receptor interleukinu-3 (IL-3-Ra) a další členové cytokinové receptorové nadskupiny. Tyto a-podjednotky váží ligandy s nízkou afinitou, ale nemohou transdukovat intracelulární signál. Vysokoafinitní receptor schopný signalizace je generován heterodimerem mezi a-podjednotkou a členem třetí skupiny cytokinových receptorů, nazývaných b-podjednotky, např. b_c, běžná b-podjednotka pro tři a-podjednotky IL3-Ra a GM-CSF-R.

Důkaz, že *mpl* je členem nadskupiny cytokinových receptorů, vychází ze sekvenční homologie (Gearing, EMBO J., 8: 3667–3676 [1988]; Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6834–6938 [1990]; David a kol., Science, 253: 59–63 [1991] a Vigon a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5640–5644 [1992]) a z jeho schopnosti transdukovat proliferativní signály.

Odvozená proteinová sekvence z molekulárního klonování myši *c-mpl* ukazuje, že tento protein je homologický k dalším cytokinovým receptorům. Extracelulární domény obsahují 465 aminokyselinových zbytků a skládají se z dvou subdomén, každá se čtyřmi vysoce konzervovanými cysteiny a partikulárními prvky na N-koncové subdoméně a na C-koncové subdoméně. Předpokládá se, že ligandy vázající extracelulární domény mají podobnou dvojitou b-barelovou násobnou strukturální geometrii. Tato duplikovaná extracelulární doména je vysoce homologická k signál transdukujícímu řetězci společnému s IL-3, IL-5 a GM-CSF receptorům, stejně jako nízko-afinitně vázací doméně LIF (Vigon a kol., Oncogene, 8:2607–2615 [1993]). *Mpl* tedy může patřit k nízko-afinitně vázající třídě cytokinových receptorů.

Srovnání myši *mpl* a zralé lidské *mpl* P ukazuje, že tyto dva proteiny vykazují 81% sekvenční identitu. Specifičtější, N-koncové a C-koncové extracelulární subdomény vykazují 70% a 80% sekvenční identitu, respektive. Nejzachovanější *mpl* oblast je cytoplazmatická doména vykazující 91% aminokyselinovou identitu, s sekvencí 37 zbytků blízko transmembránové doméně identickou pro oba druhy. Na základě toho je publikováno, že *mpl* je jeden z nejvíce zachovaných členů nadskupiny cytokinových receptorů (Vigon, výše).

Důkazem, že *mpl* je funkční receptor, schopný transdukce proliferativního signálu, pochází z konstrukce chimérických receptorů obsahujících extracelulární doménu z cytokinového receptoru mající vysokou afinitu pro známý cytokin s *mpl* cytoplazmatickou doménou. Poněvadž nebyly publikovány žádné známé ligandy pro *mpl*, bylo nutné konstruovat chimérický vysokoafinitní ligand vázající extracelulární doménu z třídy jedna cytokinových receptorů jako je IL-4R nebo G-CSFR. Vigon a kol., výše, fúzoval extracelulární doménu G-CSFR s transmembránovou a cytoplazmatickou doménou *c-mpl*. IL-3 dependentní buněčná linie, BAF/B03 (Ba/F3) byla transfekována G-CSFR/*mpl* chimérou spolu s kontrolou G-CSFR plné délky. Buňky transfektované s chimérou rostly stejně dobře v přítomnosti cytokinu IL-3 nebo G-CSF. Podobně buňky transfektované s G-CSFR také rostly dobře v IL-3 nebo G-CSF. V nepřítomnosti růstových faktorů všechny buňky uhynuly. Podobný experiment byl proveden Skodou a kol., EMBO J., 12(7): 2645–2653 [1993], ve kterém byly i extracelulární i transmembránové domény lidského IL-4 receptoru (hIL-4-R) fúzovány do myši *mpl* cytoplazmatické domény, a transfektovány do myši IL-3 dependentní Ba/F3 buněčné linie. Ba/F3 buňky transfektované s divokým typem hIL-4-R proliferovaly normálně v přítomnosti buď druhově specifického IL-4 nebo IL-3. Ba/F3 buňky transfektované s hIL-4R/*mpl* proliferovaly normálně v přítomnosti hIL-4 (v přítomnosti nebo

nepřítomnosti IL-3), což ukazuje, že v Ba/F3 buňkách *mpl* cytoplazmické domény obsahují všechny prvky nutné k indukci proliferativního signálu.

5 Tyto chimérické experimenty ukazují schopnost proliferativní signalizace *mpl* cytoplazmatické domény ale latentně sledují, jestli *mpl* extracelulární doména může vázat ligand. Tyto výsledky jsou v souladu s posledními dvěma možnostmi, konkrétně *mpl* je jednořetězcový (třída jedna) receptor jako je EPO-R nebo G-CSFR nebo je to signál transdukující b-podjednotka (třída tři) vyžadující a-podjednotku jako je IL-3 (Skoda a kol., výše).

10 VI. Mpl ligand je trombopoetin (TPO)

Jak je popsáno níže, předpokládalo se, že sérum obsahuje jedinečný faktor, někdy zmiňovaný jako trombopoetin (TPO), který působí synergicky s různými dalšími cytokiny při podpoře růstu a zrání megakaryocytů. Dosud nebyly nikdy izolovány žádné takovéto přírodní faktory ze séra ani ze žádného jiného zdroje, i když bylo provedeno velké množství pokusů mnoha skupinami. I když není známo, zda *mpl* je schopný přímé vazby megakaryocytového stimulačního faktoru, nedávné pokusy ukázaly, že *mpl* je zapojen do proliferativní signální transdukce z faktoru nebo faktorů nalezených v séru pacientů s aplastickou kostní dření (Methia a kol., Blood, 82(5): 1395: 1395-1401 [1993]).

20 Důkaz, že se jedinečný sérový faktor stimulující kolonie lišící se od IL-1a, IL-3, IL-4, IL-6, IL-11, SCF, EPO, G-CSF a GM-CSF transdukuje proliferativní signál přes *mpl* pochází z testování distribuce *c-mpl* exprese v primitivních a zaměřených hematopoetických buněčných liniích a z *mpl* komplementárních studií v jedné z těchto buněčných linií.

25 Užití reverzní transkriptázy (RT)-PCR v imuno-purifikovaných lidských hematopoetických buňkách, Methia a kol., výše ukázalo, že silné *mpl* mRNA odezvy byly nalezeny pouze v CD34⁺ purifikovaných buňkách, megakaryocytech a destičkách. CD34⁺ buňky purifikované z kostní dřeně (BM) představují 1 % procento všech BM buněk a jsou rozšířené v primitivních a specializovaných progenitorech všech kmenů (např. erythroidy, granulomakrofágy a megakaryocyty).

35 Ukázalo se, že *mpl* stejnosměrně oligodeoxynukleotidy suprimují megakaryotické formace kolonií z pluripotentních CD34⁺ buněk kultivovaných v séru z pacientů s aplastickou dření (bohatý zdroj megakaryotické kolonie-stimulační aktivity [MK-CSA]). Tyto stejné komplementární oligodeoxynukleotidy nemají žádný efekt na formaci kolonií erythroidů nebo granulomakrofágů.

40 Jestli *mpl* přímo váže ligand a jestli sérový faktor způsobuje megakaryocytózu řízenou přes *mpl* není dosud známo. Předpokládá se, že pokud *mpl* přímo váže ligand, jeho aminokyselinová sekvence je pravděpodobně vysoce zachovává a má kmene mající křížovou reaktivitu vzhledem ke značně velké sekvenční identitě mezi lidskými a myšimi *mpl* extracelulárními doménami (Vigna a kol., výše [1993]).

VII. Cíle

45 Vzhledem k předcházejícímu je třeba uznat, že existuje v této oblasti nynější i budoucí potřeba izolovat a identifikovat molekuly schopné stimulování proliferace, diferenciace a zrání hematopoetických buněk, zvláště megakaryocytů nebo jejich předchůdců pro terapeutické účely při léčení trombocytopenie. Věří se, že takováto molekula je *mpl* ligand a tedy existuje dále potřeba izolovat takový ligand (ligandy), aby mohla být zhodnocena jeho (jejich) role v buněčném růstu a diferenciaci.

Cílem tohoto vynálezu je získat farmaceuticky čistou molekulu schopnou stimulovat proliferaci, diferenciaci a/nebo zrání megakaryocytů na zralou destičku produkující formu.

Dalším cílem je získání molekuly ve formě pro terapeutické použití k léčení hematopoetických onemocnění, zvláště trombocytopenie.

5 Dalším cílem předkládaného vynálezu je izolovat, purifikovat a specificky identifikovat proteinové ligandy schopné vazby *in vivo* a cytokinové nadskupiny receptorů známých jako *mpl* a transdukujících proliferativní signál.

10 Dalším cílem je získat molekuly nukleových kyselin kódujících takovéto proteinové ligandy a použití těchto molekul nukleových kyselin k produkci *mpl* vázajících ligandů v kultuře rekombinantních buněk pro diagnostické a terapeutické použití.

Dalším cílem je získat deriváty a modifikované formy proteinových ligandů zahrnujících varianty aminokyselinových sekvencí, varianty glykoproteinových forem a jejich kovalentní deriváty.

15 Dalším cílem je získání fúzních polypeptidových forem kombinujících *mpl* ligandy a heterologní protein a jejich kovalentní deriváty.

20 Dalším cílem je získání variant polypeptidových forem kombinujících *mpl* ligand s aminokyselinovými doplňky a substitucemi z EPO sekvence, aby produkoval protein schopný regulování proliferace a růstu destiček i progenitorů červených krevních buněk.

Dalším cílem je připravit imunogeny pro přípravu protilátek proti *mpl* ligandům nebo jejich fúzním formám, stejně jako získat protilátky schopné vázat takovéto ligandy.

25 Tyto a další cíle předkládaného vynálezu budou, s ohledem na celkovou specifikaci, zřejmé pro osoby vzdělané v dané problematice.

30 Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je izolovaný ligand *mpl*, který: (a) stimuluje inkorporaci značených nukleotidů (³H-thymidin) do DNA IL-3 dependentních buněk Ba/F3 transfekovaných lidským *mpl* P; a (b) kde aminokoncová sekvence polypeptidu je SPAPPACDPRLLNKLLRDDHVLHGR, nebo SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRL.

35 Cíle vynálezu jsou dosaženy zajištěním izolované savčí megakaryocytopoetické proliferace a proteinu zahajujícího zrání, pojmenovaného „*mpl* ligand“ (ML) nebo „trombopoetin“ (TPO), schopného stimulování proliferace, zrání a/nebo diferenciacie megakaryocytů na zralou destičku produkující formu.

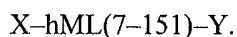
40 Prakticky homogenní protein může být purifikován z přírodního zdroje metodou obsahující:

45 (1) kontaktování zdrojové plazmy obsahující *mpl* ligandové molekuly, které mají být purifikovány, s imobilizovaným na nosiči, za podmínek, při kterých *mpl* ligandové molekuly, které mají být purifikovány, jsou selektivně adsorbovány na imobilizovaný receptorový polypeptid, (2) promytí imobilizovaného receptorového polypeptidu a jeho nosiče k odstranění neadsorbovaného materiálu, a (3) eluce *mpl* ligandových molekul z imobilizovaného receptorového polypeptidu, na kterém jsou adsorbovány, elučním pufrém. Výhodněji je přírodním zdrojem savčí plazma nebo moč obsahující *mpl* ligand. Nepovinně je savec aplastický a imobilizovaný receptor je *mpl*-IgG fúze.

50 Nepovinně, preferovaný megakaryocytopoetickou proliferaci a zrání zahajující protein je izolovaný prakticky homogenní *mpl* ligandový polypeptid připravený syntetickými nebo rekombinantními postupy.

55

„*Mpl* ligandový“ polypeptid nebo „TOP“ v tomto vynálezu má výhodněji nejméně 70 % celkové sekvenční identity s aminokyselinovou sekvencí vysoce purifikovaného prakticky homogenního vepřového *mpl* ligandového polypeptidu a nejméně 80 % sekvenční identity s „EPO-doménou“ vepřového *mpl* ligandového polypeptidu. Nepovinně, *mpl* ligand z tohoto vynálezu je zralý lidský *mpl* ligand (hML), který má zralou aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 1 (SEQ ID NO: 1), nebo jeho posttranskripčně modifikovaná forma nebo protein, který má 80 % sekvenční identity se zralým lidským *mpl* ligandem. Nepovinně je varianta *mpl* ligandu fragment, zvláště amino-koncový nebo „EPO-doménový“ fragment, zralého lidského *mpl* ligandu (hML). Výhodněji si amino-koncový fragment ponechává prakticky všechny lidské ML sekvence mezi prvním a čtvrtým cysteinovým zbytkem, ale může obsahovat substanciální doplňky, delece nebo substituce mimo tuto oblast. Podle tohoto provedení může být fragment polypeptidu vyjádřen vzorcem:



Kde hML(7-151) představuje lidskou TPO (hML) aminokyselinovou sekvenci od Cys⁷ po Cys¹⁵¹ včetně, X představuje aminoskupinu Cys⁷ nebo jeden nebo více amino-koncových aminokyselinových zbytků zralého hML nebo aminokyselinové zbytky jeho prodloužení jako je Met, Tyr nebo leaderová sekvence, obsahující např. proteolytická štěpicí místa (např. faktor Xa nebo trombin); a Y představuje karboxy-koncovou skupinu Cys¹⁵¹ nebo jeden nebo více karboxy-koncových aminokyselinových zbytků zralého hML nebo aminokyselinové zbytky jeho prodloužení.

Nepovinně *mpl* ligandové polypeptidy nebo jejich fragmenty mohou být fúzovány do heterologního polypeptidu (chiméry). Preferovaný heterologní polypeptid je cytokin, faktor stimulující kolonie nebo interleukin nebo jejich fragment, zvláště kit-ligand (KL), IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, EPO, GM-CSF nebo LIF. Nepovinný preferovaný heterologní polypeptid je imunoglobulinový řetězec, zvláště lidský IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgD, IgM nebo jejich fragment, zejména obsahující konstantní doménu IgG těžkého řetězce.

Další provedení tohoto vynálezu poskytuje prostředek obsahující izolovaného *mpl* agonistu, který je biologicky aktivní a je výhodněji schopen stimulace inkorporace značených nukleotidů (např. ³H-thymidinu) do DNA IL-3 dependentních Ba/F3 buněk transfektovaných lidským *mpl*. Nepovinně *mpl* agonista je biologicky aktivní *mpl* ligand a je nepovinně schopný stimulování inkorporace ³⁵S do cirkulujících destiček v myším destičkovém revazebném stanovení. Vhodný *mpl* agonista zahrnuje hML₁₅₃, hML(R153A, R154A), hML2, hML3, hML4, mML, mML2, mML3, pML a pML2 nebo jejich fragmenty.

V dalším provedení tento vynález poskytuje izolované protilátky schopné vazby na *mpl* ligand. Izolovaná protilátka schopná vazby na *mpl* ligand může být nepovinně fúzována do druhého polypeptidu a protilátka nebo její fúze může být použita k izolaci a purifikaci ligandu ze zdroje, jak je popsáno výše pro imobilizovaný *mpl*. V dalším provedení tohoto provedení vynález poskytuje metodu detekce *mpl* ligandu *in vitro* nebo *in vivo* obsahující kontakt protilátky se vzorkem, zvláště sérového vzorku, u kterého předpokládáme obsah ligandu, a detekci, zda se objeví vazba.

V dalším provedení vynález poskytuje izolovanou molekulu nukleové kyseliny, kódující *mpl* ligand nebo jeho fragmenty, kde molekula nukleové kyseliny může být nepovinně značena detekovatelnou skupinou, molekula nukleové kyseliny mající sekvenci, která je komplementární k, nebo hybridizované za mírných až vysoce náročných podmínek s, molekulou nukleové kyseliny mající sekvenci kódující *mpl* ligand. Preferované molekuly nukleové kyseliny jsou ty, které kódují lidský, vepřový a myší *mpl* ligand, včetně genomické RNA a DNA, a cDNA. V dalším provedení tohoto provedení molekula nukleové kyseliny je DNA kódující *mpl* ligand a dále poskytuje replikovatelný vektor, v kterém je DNA operabilně navázána na kontrolní sekvence rozpoznané hostitelem transformovaným s vektorem. Nepovinně DNA je cDNA mající sekvenci uvedenou na obr. 1 5-3 (SEQ ID NO:2), 3-5 nebo jejich fragment. Toto provedení dále zahrnuje hostitelské

buňky, výhodněji CHO buňky, transformované s vektorem a metodu použití DNA k ovlivnění produkce *mpl* ligandu, výhodněji zahrnujícího expresi cDNA kódující *mpl* ligand v kultuře transformovaných hostitelských buněk a získání *mpl* ligandu z hostitelských buněk nebo hostitelské buněčné kultury. *Mpl* ligand připravený tímto způsobem je výhodněji lidský *mpl* ligand.

5

Vynález dále zahrnuje metody léčení savců s hematopoetickými onemocněními, zvláště trombocytopenií, zahrnující podávání terapeuticky účinného množství *mpl* ligandu savci. Nepovinně *mpl* ligand je podáván v kombinaci s cytokinem, zvláště faktorem stimulujícím kolonie nebo interleukinem. Výhodné faktory stimulující kolonie nebo interleukiny zahrnují; kit–ligand (KL), LIF, G–CSF, GM–CSF, M–CSF, EPO, IL–1, IL–3, IL–6 a IL–11.

10

Vynález dále zahrnuje postup izolace a purifikace TPO (ML) z TPO produkujících mikroorganismů zahrnující:

15

(1) rozrušení nebo lýzi buněk obsahujících TPO,

(2) nepovinně separaci rozpustného materiálu z nerozpustného materiálu obsahujícího TPO,

(3) solubilizaci TPO v nerozpustném materiálu se solubilizačním pufrům,

20

(4) separaci solubilizovaného TPO z dalších rozpustných a nerozpustných materiálů,

(5) znovuzmíchání TPO v redoxním pufru,

25

(6) separace dobře rozmíchaných TPO z nerozmíchaných TPO.

Postup zahrnuje pro solubilizaci nerozpustných materiálů obsahujících TPO chaotropické agens, kdy chaotropické agens je vybráno ze skupiny: sůl guanidinu, thiokyanát sodný nebo urea. Postup dále zahrnuje, že solubilizovaný TPO je separován od dalších rozpustných a nerozpustných materiálů jedním nebo více kroky vybranými ze skupiny: centrifugace, gelová filtrace a chromatografie na reverzní fázi. Krok znovuzmíchání v procesu zahrnuje redoxní pufr obsahující jak oxidační tak redukční agens. Obecně oxidační agens je kyslík nebo sloučenina obsahující nejméně jednu disulfidovou vazbu a redukční činidlo je sloučenina obsahující nejméně jeden volný sulfhydryl. Výhodně, oxidační agens je vybráno z oxidovaného glutathionu (GSSG) a cystinu a redukční agens je vybráno z redukovaného glutathionu (GSH) a cysteinu. Výhodněji je oxidační činidlo oxidovaný glutathion (GSSG) a redukční agens je redukovaný glutathion (GSH). Také je preferováno, že molární poměr oxidačního agens je stejný nebo větší než redukčního agens. Redoxní pufr dále obsahuje detergent, výhodně vybraný z CHAPS a CHAPSO, přítomný v koncentraci nejméně 1 %. Redoxní pufr dále obsahuje NaCl výhodně v koncentračním rozmezí od 0,1 do 0,5M, a glycerol výhodně v koncentraci větší než 15 %. pH redoxního pufru je výhodně v rozmezí od 7,5 do 9,0, a rozmíchávací krok je prováděn ve 4 stupních 12 až 48 hodin. Výsledkem rozmíchávacího kroku je biologicky aktivní TPO, kde jsou vzniklé disulfidové vazby mezi Cys nejbližším amino–konci s Cys nejbližší karboxy–konci EPO domény.

30

35

40

45

Vynález dále zahrnuje způsob purifikace biologicky aktivního TPO z mikroorganismu zahrnující:

(1) lýze alespoň extracelulární membrány mikroorganismu,

(2) působení na lyzát, obsahující TPO, chaotropickým agens,

50

(3) znovuzmíchání TPO, a

(4) separace nečistot a nerozmíchaného TPO z dobře rozmíchaného TPO.

55

Stručný popis obrázků

Obr. 1 ukazuje vyvozené aminokyselinové sekvence (SEQ ID NO:1) lidského *mpl* ligandu (hML) cDNA a kódující nukleotidové sekvence (SEQ ID NO:2). Nukleotidy jsou číslovány na začátku každé řádky. 5 a 3 netranslatované oblasti jsou označeny menšími psacími písmeny. Aminokyselinové zbytky jsou číslovány nad sekvencí začínající na Ser 1 zralé *mpl* ligandové (ML) proteinové sekvence. Hranice předpokládaného exonu 3 označeného šipkami a potenciální N-glykosylovaná místa jsou ve čtverci. Cysteinové zbytky jsou označeny tečkou nad sekvencí. Podtržené sekvence odpovídají N-koncové sekvenci stanovené z *mpl* ligandu purifikovaného z vepřové plazmy.

Obr. 2 ukazuje postup použití pro *mpl* ligandové ³H-thymidinové inkorporační stanovení. Stanovení přítomnosti *mpl* ligandu z různých zdrojů, *mpl* P Ba/F3 buňky vyhladovělé IL-3 po 24 hodin ve zvlhčeném inkubátoru při 37 °C v 5 % CO₂ a vzduchu. Následně IL-3 vyhladovělé buňky byly nanášeny na 96-jamkové kultivační misky s nebo bez rozpuštěných vzorků a kultivovány 24 hodin v inkubátoru buněčných kultur. 20 ml séra média bez RPMI obsahujícího 1 mCi ³H-thymidinu bylo přidáno do každé misky posledních 6 až 8 hodin. Buňky byly poté odebrány na 96 filtračních papírů a promyty vodou. Filtráty byly poté odečteny.

Obr. 3 ukazuje vliv pronázy, DTT a tepla na schopnost APP stimulovat Bs/F3-*mpl* buněčnou proliferaci. Pro pronázové digesci APP pronáza (Boehringer Mannheim) nebo hovězí sérový albumin byly navázány na Affi-gel10 (Biorad) a inkubovány individuálně s APP 18 hodin při 37 °C. Následně byla pryskyřice odstraněna centrifugací a supernatanty byly stanoveny. APP byl také zahřát na 80 °C po dobu 4 minut nebo přidáno 100mM DTT a poté dialýza proti PBS.

Obr. 4 ukazuje eluci *mpl* ligandové aktivity z kolony Phenyl-Toyopearl, kolony Blue-Sepharose a Ultralink-*mpl* kolony. Frakce 4-8 z *mpl* afinitní kolony měly maximum aktivity frakcí eluovaných z kolony.

Obr. 5 ukazuje SDS-PAGE eluovaných Ultralink-*mpl* frakcí. Ke 200 ml každé z frakcí 2 až 8 byl přidán při -20 °C 1 ml acetonu obsahujícího 1mM HCl. Po třech hodinách při -20 °C byly vzorky centrifugovány a výsledné pelety byly promyty 2x acetonem při -20 °C. Acetonové pelety byly následně rozpuštěny v 30 ml SDS-solubilizačního pufru, přidáno 100mM DTT a zahřáty na 90 °C po 5 min. Vzorky byly poté rozpuštěny v 4 až 20% SDS-polyakrylamidovém gelu a proteiny byly vizualizovány barvením stříbrem.

Obr. 6 ukazuje eluci *mpl* ligandové aktivity z SDS-PAGE. Frakce 6 z *mpl*-afinitní kolony byla rozpuštěna v 4 až 20% SDS-polyakrylamidovém gelu za neredukujících podmínek. Následně byla elektroforéza gelu rozdělena na 12 stejných částí a elektroeluována, jak je popsáno v příkladech. Elektroeluované vzorky byly dialyzovány do PBS a stanoveny při 1/20 ředění. Standardy použité ke kalibraci gelu byly standardy Novex Mark 12.

Obr. 7 ukazuje vliv *mpl* ligandově deplečních APP na lidskou megakaryocytopoézu. *Mpl* ligandově depleční APP byl připraven průchodem 1 ml přes 1ml *mpl*-afinitní kolonu (700ml *mpl*-IgG/ml HMS-superose, Pharmacia). Ke kulturám lidských periferních kmenových buněk byl přidán 10% APP nebo 10% *mpl* ligandově depleční APP a byly kultivovány 12 dní. Megakaryocytopoéza byla kvantifikována, jak je popsáno v příkladech.

Obr. 8 ukazuje vliv *mpl*-IgG na stimulaci lidské megakaryocytopoézy APP. Do kultury lidských periferních kmenových buněk byl přidán 10% s APP a byly kultivovány 12 dní. Ve dnech 0, 2 a 4, byly přidány *mpl*-IgG (0,5 ml) nebo AN/R-IgG (0,5ml). Po 12 dnech megakaryocytopoézy byla provedena kvantifikace, jak je popsáno v příkladech. Průměr duplicitních vzorků je znázorněn v grafu s aktuálními párovými daty ve dvojici.

Obr. 9 ukazuje pásy 390 bp fragmentu lidské genomické DNA kódující *mpl* ligand. Je znázorněna vyvozená aminokyselinová sekvence „exonu 3“ (SEQ ID NO:3), kódující sekvence (SEQ ID NO: 4), a jeho odpovídající vzorek (SEQ ID NO: 5).

- 5 Obr. 10 ukazuje aminokyselinovou sekvenci zralého lidského *mpl* ligand (hML) (SEQ ID NO: 6) a zralého lidského erythropoetinu (hEPO) (SEQ ID NO: 7). Vyvozená aminokyselinová sekvence lidského *mpl* ligandu je srovnána s lidskou erythropoetinovou sekvencí. Identické aminokyseliny jsou ve čtverečku a mezery vložené pro optimální porovnání jsou označeny pomlčkou. Potenciální N-glykosylovaná místa jsou podtržena jednoduchou čarou pro hML a přerušovanou čarou pro hEPO. Dva cysteiny důležité pro erythropoetinovou aktivitu jsou označeny velkou tečkou.

10 Obr. 11 ukazuje vyvozenou aminokyselinovou sekvenci izoformy zralého lidského *mpl* ligandu hML (SWQ ID NO: 6), hML2 (SEQ ID NO: 8), hML3 (SEQ ID NO: 9) a hML4 (SEQ ID NO: 10). Identické aminokyseliny jsou ve čtverečku a mezery zavedené pro optimální položení vedle sebe jsou označeny pomlčkou.

Obr. 12A, 12B a 12C ukazují vliv lidského *mpl* ligandu na Ba/F3-*mpl* buněčnou proliferaci (A), *in vitro* lidské megakaryocytopoézy s kvantifikačním použitím radioznačené myši IgG monoklonální protilátky specifické k megakaryocytovému glykoproteinu GPII_bIII_a (B), a myši trombo-
20 poéza měřená v destičkovém revazebném stanovení (C).

293 buňky byly transfektovány CaPO₄ metodou (Gorman, C in DNA Cloning: A New Approach 2: 143–190 [1985] s pRK5 samotným vektorem, pRK5 nebo s pRK5–ML₁₅₃ přes noc (pRK5–ML₁₅₃ byl generován zavedením stop kodonu za zbytek 153 hML pomocí PCR). Médium bylo
25 poté kondicionováno 36 hodin a stanoveno na stimulaci buněčné proliferace Ba/F3-*mpl*, jak je popsáno v příkladu 1 (A) nebo *in vitro* lidské megakaryocytopoézy (B). Megakaryocytopoéza byla kvantifikována s použitím ¹²⁵I radioznačené myši IgG monoklonální protilátky (HP1–1D) k megakaryocytovému specifickému glykoproteinu GPII_bIII_a jak je popsáno (Grant a kol., Blood 69: 1334–1339 [1987]). Vliv parciálně purifikovaného rekombinantu ML (rML) na *in vivo* produkci
30 destiček (C) byl stanoven s použitím revazebného trombocytózy testu popsaného McDonal-dem, T. P. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 144: 1006–10012 (1973). Částečně purifikovaný rML byl připraven z 200 ml kondicionovaného média obsahujícího rekombinant ML. Médium bylo naneseno na 2ml Blue–Sephrose kolonu ekvilibrovanou v PBS a kolona byla promyta PBS a eluována PBS obsahujícím 2M urei a 2M NaCl. Aktivní frakce byla dialyzována do PBS a přidáno
35 1mg/ml s BSA bez toxinů. Vzorek obsahoval méně než jednu jednotku endotoxinu/ml. Myši bylo injektováno 64000, 32000 nebo 16000 jednotek rML nebo samotný excipient. Každá skupina se skládala ze šesti myši. Jsou ukázány hlavní a standardní odchylky každé skupiny. Hodnoty p byly stanoveny mediány dvojdílného srovnávacího T–testu.

40 Obr. 13 srovnává vliv lidských *mpl* ligandových izoform a variant v Ba/F3-*mpl* buněčném proliferčním stanovení. hML, imitace (mock), hML2, hML3, hML(R153A, R154A) a hML₁₅₃ byly stanoveny v různých ředěních, jak je popsáno v příkladu 1.

45 Obr. 14A, 14B a 14C ukazuje vyvozené aminokyselinové sekvence (SEQ ID NO: 1) lidského *mpl* ligandu (hML) nebo lidského TPO (hTPO) a lidské genomické DNA kódující sekvence (SEQ ID NO: 11). Nukleotidy a aminokyselinové zbytky jsou číslovány na začátku každé řádky.

Obr. 15 ukazuje SDS–PAGE purifikovaného 293–rhML₃₃₂ a purifikovaného 293–rhML₁₅₃.

50 Obr. 16 ukazuje nukleotidovou sekvenci: cDNA kódující (SEQ ID NO: 12) a vyvozenou aminokyselinovou sekvenci (SEQ ID NO: 13) otevřeného čtecího rámu myši ML izoformy. Tato izoforma zralého myšního *mpl* ligandu obsahuje 331 aminokyselinových zbytků, o čtyři méně než předpokládaná plná délka mMML, a je označena mMML2. Nukleotidy jsou číslovány na začátku každé řádky. Aminokyselinové zbytky jsou číslovány nad sekvencí se začátkem na Ser 1. Poten-

ciální N-glykosylovaná místa jsou podtržena. Cysteinové zbytky jsou označeny tečkou nad sekvencí.

5 Obr. 17 ukazuje cDNA sekvenci (SEQ ID NO: 14) a vyvozenou proteinovou sekvenci (SEQ ID NO: 15) této myši ML izoformy (mML). Nukleotidy jsou číslovány na začátku každé řádky. Aminokyselinové zbytky jsou číslovány nad sekvencí se začátkem na Ser 1. Tato izoforma zralého myšního *mpl* ligandu obsahuje 335 aminokyselinových zbytků a předpokládá se, že je stejně dlouhá jako *mpl* ligand plné délky, označený mML. Signální sekvence je označena čárkovaným podtržením a štěpicí místa jsou označena šipkou. 5 a 3 netranslatované oblasti jsou označeny menšími psacími písmeny. Dvě delece, které jsou výsledkem alternativního spojení (mML2 a mML3) jsou podtrženy. Čtyři cysteinové zbytky jsou označeny tečkou. Sedm potenciálních N-glykosylačních míst je ve čtverečku.

15 Obr. 18 srovnává vyvozenou aminokyselinovou sekvenci lidské ML izoformy hML3 (SEQ ID NO: 9) a myši ML izoformy označené mML3 (SEQ ID NO: 16). Vyvozená aminokyselinová sekvence pro lidský *mpl* ligand je položena vedle myšší *mpl* ligandové sekvence. Identické aminokyseliny jsou ve čtverečku a mezery zavedené pro optimální porovnání jsou označeny pomlčkou. Aminokyseliny jsou číslovány na začátku každého řádku.

20 Obr. 19 srovnává vyvozené aminokyselinové sekvence zralých ML izoforem z myši-ML (SEQ ID NO: 17, vepřové-ML (SEQ ID NO: 18) a lidské-ML (SEQ ID NO: 6). Aminokyselinové sekvence jsou položeny vedle sebe s mezerami, označenými pomlčkami, zavedenými pro optimální porovnání. Aminokyseliny jsou číslovány na začátku každé řádky s identickými zbytky ve čtverečku. Potenciální N-glykosylovaná místa jsou označena vystínovanými čtverečky a cysteinové zbytky jsou označeny tečkou. Konzervované di-bazické aminokyselinové prvky, které představuje potenciální proteázová štěpicí místa, jsou podtrženy. Čtyři aminokyselinové delece, u kterých bylo zjištěno, že se nacházejí u třech kmenů (ML2) jsou vyznačeny silným čtverečkem.

30 Obr. 20 ukazuje cDNA sekvenci (SEQ ID NO: 19) a vyvozenou zralou proteinovou sekvenci (SEQ ID NO: 18) vepřové ML izoformy (pML). Tato vepřova *mpl* ligandová izoforma obsahuje 332 aminokyselinových zbytků a předpokládá se, že je to celá délka vepřového *mpl* ligandu, označeného pML. Nukleotidy jsou číslovány na začátku každé řádky. Aminokyselinové zbytky jsou číslovány nad sekvencí se začátkem na Ser 1.

35 Obr. 21 ukazuje cDNA sekvenci a vyvozenou sekvenci zralého proteinu (SEQ ID NO: 21) vepřové ML izoformy (pML2). Tato izoforma vepřového *mpl* ligandu obsahuje 328 aminokyselinových zbytků a je čtyřzbytkovou deleční formou vepřového *mpl* ligandu plné délky, označeného pML2. Nukleotidy jsou číslovány na začátku každé řádky. Aminokyselinové zbytky jsou číslovány nad sekvencí se začátkem na Ser 1.

40 Obr. 22 srovnává vyvozenou aminokyselinovou sekvenci vepřové ML izoformy pML plné délky (SEQ ID NO: 18) a vepřové ML izoformy označené pML2 (SEQ ID NO: 21). Vyvozená aminokyselinová sekvence pro pML je položena vedle pML2 sekvence. Identické aminokyseliny jsou ve čtverečku a mezery zavedené pro optimální porovnání jsou označeny pomlčkou. Aminokyseliny jsou číslovány na začátku každého řádku.

Obr. 23 ukazuje příslušné znaky plazmidu pSVI5.ID.LL.MLORF („plné délky“ nebo TPO₃₃₂) používaného k transfekci hostitelských CHO-DP12 buněk pro produkci CHO-rhTPO₃₃₂.

50 Obr. 24 ukazuje příslušné znaky plazmidu pSVI5.ID.LL.MLEPO-D („zkráceného“ nebo TPO₁₅₃) používaného k transfekci hostitelských CHO-DP12 buněk pro produkci CHO-rhTPO₁₅₃.

55 Obr. 25A, 25B, a 25C ukazují vliv E. coli-rhTPO_(Met-1, 153) na destičky (A), červené krevní buňky (B) a (c) bílé krevní buňky u normální myši. Dvěma skupinám 6 samic C57 B6 myši byly injektovány denně buď PBS pufrem nebo 0,3mg E. coli-rhTPO_(Met-1, 153) (100ml sc.). Ve dni 0 a ve

dnech 3 až 7 bylo odebráno 40 ml krve z orbitálního sinusu. Krev byla okamžitě naředěna 10 ml komerčního diluantu a k celkovému krevnímu stanovení byl použit Serrono Baker Hametology Analyzer 9018. Data jsou uvedena s ± standardní odchylkou.

5 Obr. 26A, 26B a 26C ukazují vliv E. coli-rhTPO_(Met-1, 153) na destičky (A), červené krevní buňky (B) a (C) bílé krevní buňky u subletálně ozářených myší. Dvě skupiny 10 samic C57 B6 myší byly subletálně ozářeny 750 cGy gama záření ze zdroje ¹³⁷Cs a injektovány denně buď PBS pufrem nebo 0,3mg E. coli-rhTPO_(Met-1, 153) (100ml sc.). Ve dni 0 a v subsekventních mezech bylo odebráno 40 ml krve z orbitálního sinusu. Krev byla okamžitě naředěna 10 ml komerčního diluantu a k celkovému krevnímu stanovení byl použit Serrono Baker Hametology Analyzer 9018. Data jsou uvedena s ± standardní odchylkou.

15 Obr. 27A, 27B a 27C ukazují vliv CHO-rhTPO₃₃₂ na (A) destičky (trombocyty), (B) červené krevní buňky (erytrocyty) a (C) bílé krevní buňky (leukocyty) u normální myši. Dvě skupiny 6 samic C57 B6 myší byly injektovány denně buď PBS pufrem nebo 0,3mg CHO-rhTPO₃₃₂ (100ml sc.). Ve dni 0 a ve dnech 3 až 7 bylo odebráno 40 ml krve z orbitálního sinusu. Krev byla okamžitě naředěna 10 ml komerčního diluantu a k celkovému krevnímu stanovení byl použit Serrono Baker Hematology Analyzer 9018. Data jsou uvedena s ± standardní odchylkou.

20 Obr. 28 ukazuje křivky odpovědi na dávku pro různé formy rhTPO získaných z různých buněčných linií. Křivky odpovědi na dávku byly sestrojeny k rhTPO z následujících buněčných linií: hTPO₃₃₂ z CHO (plné délky z buněk křeččích vaječníků); hTPO_{Met-1 153} (E. coli-produkovaná zkrácená forma s N-terminálním methioninem); hTPO₃₃₂ (TPO plné délky z lidských 293 buněk); E-Coli 155 bez Met (zkrácená forma [rhTPO155] bez terminálního methioninu z E. coli).
25 Skupinám 6 samic C57B6 myší bylo injektováno denně 7 dní rhTPO v závislosti na skupině. Každý den bylo odebráno 40 ml krve z orbitálního sinusu pro celkové krevní stanovení. Data uvedená výše mají maximální efekt při různém léčení a kromě (met 152 E-Coli) se projevil v sedmém dni léčení. U zmíněné „met 153 E-Coli“ skupiny se projevil maximální efekt v pátém dni. Data jsou uvedena s ± standardní odchylkou.

30 Obr. 29 ukazuje křivky odpovědi na dávku srovnáním aktivity plné délky a zkrácených forem rhTPO produkovaných CHO buňkami se zkrácenými formami z E. coli. Skupiny 6 samic C57B6 myší byly injektovány denně 0,3mg fh TPO různých typů. Ve dnech 2 až 7 bylo odebráno 40 ml krve z orbitálního sinusu pro celkové krevní stanovení. Skupiny byly léčeny TPO₁₅₃ zkrácenou formou TPO z E. coli; TPO₃₃₂ (Mix frakce) plné délky TPO obsahující přibližně 80 až 90 % forem plné délky a 10 až 20 % zkrácených forem, TPO332 (30K frakce) = purifikovaná TPO frakce plné délky z původní „mix“ preparace; TPO332 (70K frakce) = purifikovaná TPO frakce plné délky z původní „mix“ preparace. Data jsou uvedena s ± standardní odchylkou.

40 Obr. 30 ukazuje stanovení KIRA ELISA pro měření TPO. Obr. ukazuje MPL/Rse.gD chiméru a odpovídající části receptorů stejně jako finální konstrukci (pravá část obrázku) a průběhový diagram (levá část obrázku) ukazující kroky stanovení.

Obr. 31 ukazuje schéma pro stanovení KIRA ELISA ukazující každý krok postupu.

45 Obr. 32A–32L ukazují nukleotidovou sekvenci (SEQ ID NO: 22) pSVI17.ID.LL expresního vektoru použitého pro expresi Rse.gD v příkladu 17.

Obr. 33 je schematická ukázka přípravy plazmidu pMP1.

50 Obr. 34 je schematická ukázka přípravy plazmidu pMP21.

Obr. 35 je schematická ukázka přípravy plazmidu pMP151.

55 Obr. 36 je schematická ukázka přípravy plazmidu pMP202.

Obr. 37 je schematická ukázka přípravy plazmidu pMP172.

Obr. 38 je schematická ukázka přípravy plazmidu pMP210.

5

Obr. 39 je tabulka pěti nejlepších expresních TPO klonů z pMP210 plazmidové banky (SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 a 28).

Obr. 40 je schematická ukázka přípravy plazmidu pMP41.

10

Obr. 41 je schematická ukázka přípravy plazmidu pMP57.

Obr. 42 je schematická ukázka přípravy plazmidu pMP251.

15

Podrobný popis vynálezu

I. Definice

20 Obecně, následující slova nebo slovní spojení jsou definicemi, pokud jsou použita v popisu, příkladech a patentových nárocích.

25 „Chaotropní agens“ znamená sloučeninu, která může ve vodném roztoku a ve vhodných koncentracích způsobit změny v prostorové konfiguraci nebo konformaci proteinů přinejmenším parciálním narušením sil odpovědných za udržení normální sekundární a terciární struktury proteinu. Takovéto sloučeniny zahrnují např. močovinu, guanidin.HCl a thiokyanát sodný. K dosažení těchto konformačních efektů na proteiny jsou obvykle třeba vysoké koncentrace těchto sloučenin, obvykle 4 až 9M.

30 „Cytokin“ je obecně použitelný termín pro proteiny uvolňované jednobuněčnou populací, které působí na jiné buňky jako intracelulární mediátory. Příklady takovýchto cytokinů jsou lymfokiny, monokiny a obvyklé polypeptidové hormony. Mezi tyto cytokiny jsou zahrnuty růstový hormon, inzulinu podobné růstové faktory, lidský růstový hormon, N-methionylový lidský růstový hormon, hovězí růstový hormon, parathyoidní hormon, thyroxin, inzulin, proinzulin, relaxin, prorelaxin, glykoproteinové hormony jako je folikuly stimulující hormon (FSH), thyroideální stimulační hormon (TSH), a leutinizační hormon (LH), hematopoetický růstový faktor, hepatický růstový faktor, fibroblastový růstový faktor, prolaktin, placentální laktogen, tumorický nekrotizující faktor- α (TNF- α a TNF- β) mullerian-inhibující substance, myší peptid příbuzný gonadotropinu, inhibin, aktivin, vaskulární endotheliální růstový faktor, integrin, nervové růstové faktory jako je NGF- β , destičkový-růstový faktor, transformující růstové faktory (TGF) jako je TGF- α a TGF- β , inzulinu podobný růstový faktor-I a -II, erythropoetin (EPO), osteoinduktivní faktory, interferony jako je interferon- α , - β , a - γ , faktory stimulující kolonie (CSF) jako je makrofágový-CSF (M-CSF), granulocyt-makrofágový-CSF (GM-CSF), a granulocytový-CSF (G-CSF), interleukiny (IL) jako je IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12 a další polypeptidické faktory zahrnující LIF, SCF a kit-ligand. Je míněno, že předcházející termíny, jak jsou zde použity, zahrnují proteiny z přírodních zdrojů nebo z rekombinantní buněčné kultury. Podobně termíny zahrnují biologicky aktivní ekvivalenty, které se liší např. v aminokyselinové sekvenci jednou nebo více aminokyselinami nebo v typu nebo v rozsahu glykosylace.

50 „Ligand *mpl*“, „ligandový polypeptid *mpl*“, „ML“, „trombopoetin“ nebo „TPO“ jsou použité vzájemně zde zaměnitelně a zahrnují jakýkoliv polypeptid, který vykazuje schopnost vazby na *mpl*, člena cytokinové receptorové nadskupiny, a má biologické vlastnosti ML, jak je definováno výše. Exemplární biologickou vlastností je schopnost stimulovat inkorporaci značených nukleotidů (např. ^3H -thymidinu) do DNA IL-3 dependentních Ba/F3 buněk transfekovaných lidským *mpl* P. 55 Další exemplární biologickou vlastností je schopnost stimulovat inkorporaci ^{35}S do cirkulujících

destiček v myším destičkovém revazebném stanovení. Tato definice zahrnuje polypeptidy izolované z ligandového *mpl* zdroje, jako je aplastická vepřová plazma zde popsaná, nebo z dalších zdrojů, stejně jako dalších zvířecích druhů, zahrnujících lidské nebo připravené rekombinací nebo syntetickými metodami a zahrnujícími variantní formy zahrnující jejich funkční deriváty, fragmenty, alely, izoformy a analogy.

„Ligandový fragment *mpl*“ nebo „TPO fragment“ je část přirozeně se vyskytujícího materiálu plné délky ligandu *mpl* nebo TPO sekvence, které chybí jedna nebo více aminokyselinových zbytků ne uhlovodíků. Chybějící aminokyselinový zbytek (zbytky) se mohou vyskytovat kdekoliv v peptidu včetně N–terminálního nebo C–terminálního konce nebo uvnitř. Fragment bude vykazovat nejméně jednu biologickou vlastnost společnou s ligandem *mpl*. Ligandové fragmenty *mpl* budou mít konsekutivní sekvenci nejméně 10, 15, 20, 25, 30 nebo 40 aminokyselinových zbytků, které jsou identické se sekvencemi ligandu *mpl* izolované u savců včetně ligandu izolovaného z aplastické vepřové plazmy nebo lidského nebo myšího ligandu, zvláště jeho EPO–domény. Reprezentativním příkladem N–terminálních fragmentů jsou hML₁₅₃ nebo TPO_(Met⁻¹₁₋₁₅₃).

„Ligandové varianty *mpl*“ nebo „varianty ligandové sekvence *mpl*“ jako jsou zde definovány znamenají biologicky aktivní ligand *mpl*, jak je definováno výše, která má méně než 100 % sekvencí identity z ligandem *mpl* izolovaným z rekombinantní buněčné kultury nebo aplastické vepřové plazmy nebo lidského ligandu majícího vyvozenou sekvenci popsanou na obr. 1 (SEQ ID NO: 1). Obvykle biologicky aktivní ligandová varianta *mpl* má aminokyselinovou sekvenci nejméně 70 % aminokyselinové sekvencí identity s ligandem *mpl* izolovaným z aplastické vepřové plazmy nebo zralého myšího nebo lidského ligandu nebo jejich fragmentů (viz obr. 1 [SEQ ID NO:1]), výhodně nejméně 75 %, výhodněji nejméně 80 %, více výhodněji 85 %, ještě více výhodněji nejméně 90 % a nejvýhodněji nejméně 95 %. „Chimérický ligand *mpl*“ je polypeptid obsahující plnou délku ligandu *mpl* nebo jeden nebo více jeho fragmentů fúzovaných nebo navázaných na sekundární helerologní polypeptid nebo jeden nebo více jeho fragmentů. Chiméra vykazuje nejméně jednu biologickou vlastnost obvyklou u ligandu *mpl*. Sekundární polypeptid je obvykle cytokin, imunoglobulin nebo jejich fragment.

„Izolovaný ligand *mpl*“, „vysoce purifikovaný ligand *mpl*“ a „prakticky homogenní ligand *mpl*“ jsou použity zaměnitelně a znamenají ligand *mpl*, který je purifikován ze zdroje ligandu *mpl* nebo je připraven rekombinací nebo dynterickými metodami a je dostatečně vyčištěn od dalších peptidů nebo proteinů (1), aby bylo získáno nejméně 15 a výhodně 20 aminokyselinových zbytků N–terminální nebo vnitřní aminokyselinové sekvence s použitím spinning cup sekvénátoru nebo nejlepšího komerčně dostupného aminokyselinového sekvénátoru nebo modifikací publikovaných metod po datu vstoupení v platnost této aplikace, nebo (2) aby byla dosažena homogenita s použitím SDS–PAGE za neredukujících nebo redukujících podmínek s použitím barvení Coomassie blue nebo, výhodněji, stříbrem. Homogenita zde znamená méně než 5% kontaminace dalšími zdroji proteinů.

„Biologické vlastnosti“, pokud jsou použity buď s „ligandem *mpl*“ nebo „izolovaným ligandem *mpl*“ znamenají trombopoetickou aktivitu nebo *in vivo* efektorovou nebo antigenní funkci nebo aktivitu, která je přímo nebo nepřímo způsobena nebo provedena ligandem *mpl* (v nativní nebo denaturované konformaci) nebo jeho fragmentem. Efektorové funkce zahrnují vazbu *mpl* a jakoukoliv vazebnou aktivitu nosiče, agonismus nebo antagonismus *mpl*, zvláště transdukcí proliferativního signálu včetně replikace, DNA regulační funkci, modulaci biologické aktivity dalších cytokinů, receptorovou (zvláště cytokinovou) aktivaci, deaktivaci, regulaci zvýšení nebo snížení buněčného růstu nebo diferenciací atd. Antigenní funkce znamená výskyt epitopu nebo antigenního místa, které je schopno křížové reakce s protilátkami produkovanými proti ligandu *mpl*. Principem antigenní funkce ligandového polypeptidu *mpl* je to, že se váže s afinitou nejméně 10⁶l/mol na protilátku produkovanou proti ligandu *mpl* izolovaného z aplastické vepřové plazmy. Obvykle se polypeptid váže s afinitou nejméně 10⁷l/mol. Nejvýhodněji je antigenně aktivní ligandový polypeptid *mpl*, který se váže na protilátku produkovanou proti ligandu *mpl* mající jednu

z výše popsaných efektorových funkcí. Protilátky použité k definici „biologické aktivity“ jsou králičí polyklonální protilátky připravené upravením ligandu *mpl* izolovaného z rekombinantní buněčné kultury nebo aplastické vepřové plazmy ve Freudově kompletním adjuvans, subkutánní injekcí preparátu, a posilováním imunitní odpovědi intraperitoneální injekcí preparátu, až je titr ligandové protilátky *mpl* stálý.

„Biologicky aktivní“, pokud je použito ve spojení buď s „ligandem *mpl*“ nebo „izolovaným ligandem *mpl*“ znamená ligand *mpl* nebo polypeptid, který vykazuje trombopoetickou aktivitu nebo vykazuje efektorovou funkci ligandu *mpl* izolovaného z aplastické vepřové plazmy nebo produkovaného v rekombinantní buněčné kultuře zde popsané. Principiálně známá efektorová funkce ligandu *mpl* nebo polypeptidu je zde vazba na *mpl* a stimulace inkorporace značeného nukleotidu (³H–thymidin) do DNA IL–3 dependentních Ba/F3 buněk transfekovaných lidským *mpl* P. Další známou efektorovou funkcí ligandu nebo polypeptidu *mpl* je zde schopnost stimulovat inkorporaci ³⁵S do cirkulujících destiček v myším destičkovém revazebném stanovení. Dosud známá další efektorová funkce ligandu *mpl* je schopnost stimulovat *in vitro* lidskou megakaryocytopoézu, která může být kvantifikována s použitím radioaktivně značených monoklonálních protilátek specifických k megakaryocytovému glykoproteinu GPII_bIII_a.

„Procentuální aminokyselinová sekvenční identita“ ve vztahu k ligandové sekvenci *mpl* je zde definována jako procento aminokyselinových zbytků v posuzované sekvenci, které je identické se zbytky v ligandové sekvenci *mpl* izolované z aplastické vepřové plazmy nebo myší nebo lidské ligandy, které mají vyvozenou aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 1 (SEQ ID NO: 1); po položení sekvencí vedle sebe a vložení pomlček, pokud je to nutné, se zjišťuje maximální procento sekvenční identity, a neberou se v úvahu žádné konzervativní substituce jako část sekvenční identity. Nesmí být konstruovány žádné N–terminální, C–terminální nebo interní prodloužení, delece nebo inserce do ligandové sekvence *mpl* k ovlivnění sekvenční identity nebo homologie. Tedy u exepříkladných biologicky aktivních ligandových polypeptidů *mpl* se bere v úvahu, že mají identické sekvence včetně ligandu prepro–*mpl*, ligandu pro–*mpl* a zralého ligandu *mpl*.

„Ligandové mikrosekvenování *mpl*“ může být provedeno jakýmkoliv vhodným standardním postupem, pokud je tento postup dostatečně citlivý. V jedné takovéto metodě je získán vysoce purifikovaný polypeptid z SDS gelů nebo z finálního kroku HPLC jsou sekvenovány přímo automatickou Edmanovou (fenzylizothiokyanátovou) degradací s použitím modelu 470A Applied Biosystems sekvenátoru na plynné fázi, vybaveného 120A fenylthiohydantionovým (PTH) aminokyselinovým analyzátozem. Navíc ligandové fragmenty *mpl* připravené chemickou (např. CNBr, hydroxylamin, 2–nitro–5–thiokyanobenzoát) nebo enzymatickou (např. trypsin, klostripain, stafylokoková proteáza) digescí a následující fragmentovou purifikací (např. HPLC) mohou být podobně sekvenovány. PTH aminokyseliny jsou analyzovány s použitím informačního systému ChromPerfect (Justice Innovations, Palo Alto, CA). Sekvenční interpretace je provedena na VAX 11/785 Digital Equipment Co. počítači tak jak popsal Henzel a kol., J. Chromatography, 404: 31–52 [1987]. Nepovinně, alikvoty HPLC frakcí mohou být elektroforézovány na 5–20% SDS–PAGE, efektrotransferovány do PVDF membrány (ProBlott, AIB, Foster City, CA) a barveny Coomassie Brilliant Blue (Matsurdiara, J. Biol. Chem., 262: 10035–10038 [1987]). Specifický protein identifikovaný barvením je vyříznut z blotu a je provedeno N–koncové sekvenování sekvenátorem na plynné fázi popsaným výše. Pro vnitřní proteinové sekvence jsou HPLC frakce vysušeny ve vakuu (SpeedVac), resuspendovány ve vhodných pufoch, a digestovány kyano-genbromidem, Lys–specifickým enzymem Lys–C (Wako Chemicals, Richmond, Va), nebo Asp–N (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Po digesci jsou výsledné peptidy sekvenovány jako směs nebo po výsledné HPLC na C4 koloně s propanolovým gradientem v 0,1% TFA jsou sekvenovány před zplynováním.

„Trombocytopenie“ je definována jako počet destiček pod 150x10⁹ na litr krve. „Trombopoetická aktivita“ je definována jako biologická aktivita, která se skládá z akcelerace proliferace, diferenciace a/nebo zrání megakaryocytů nebo megakaryocytových prekurzorů na destičky–produkující formy těchto buněk. Tato aktivita může být měřena různými stanoveními včetně *in vivo*

myšího destičkového revazebného stanovení, stanovení indukce destičkového povrchového antigenu měřeného jako anti–destičkové imunostanovení (anti–GPII_bIII_a) pro lidskou leukemickou megakaryoblastickou buněčnou linii (CMK), a indukce polyploidizace v megakaryoblastické buněčné linii (DAMI).

5

„Trombopoetin“ (TPO) je definován jako sloučenina, která má trombopoetickou aktivitu nebo je schopná zvyšovat počet destiček v séru u savců. TPO je výhodně schopný zvyšovat endogenní počet destiček nejméně o 10 %, výhodněji o 50 % a nejvýhodněji zvyšovat počet destiček u člověka více než 150×10^9 na litr krve.

10

„Izolovaná ligandová nukleová kyselina *mpl*“ je RNA nebo DNA obsahující více než 16 a výhodně 20 nebo více sekvenčních nukleotidových bází, které kódují biologickou aktivitu ligandu *mpl* nebo jeho fragmentu, je komplementární k RNA nebo DNA, nebo hybridní k RNA nebo DNA a ponechává si stabilní vazby i při ovlivnění náročnými podmínkami. Tato RNA nebo DNA je vyčištěná od nejméně jednoho kontaminujícího zdroje nukleových kyselin, které ji normálně doprovází v přirozených zdrojích a výhodně je substanciálně čistá od jakýchkoliv savčích RNA nebo DNA. Fáze „vyčištěná od nejméně jednoho kontaminujícího zdroje nukleových kyselin, které jí normálně doprovází“ zahrnuje případ, kdy nukleová kyselina je přítomna ve zdroji nebo přírodní buňce, ale v jiné chromozomální lokalizaci nebo jinak obklopena aminokyselinovými sekvencemi, které se v normální zdrojové buňce nenachází. Příkladem izolované ligandové nukleové kyseliny *mpl* je RNA a DNA, která kóduje biologicky aktivní ligand *mpl* vykazující nejméně 75 % sekvenční identity, výhodně 80 %, výhodněji 85 %, ještě výhodněji 90 % a nejvýhodněji 95 % sekvenční identity s lidským, myším nebo vepřovým ligandem *mpl*.

15

20

25

„Kontrolní sekvence“ ve vztahu k expresi znamená DNA sekvence nutné pro expresi operabilně navázané kódující sekvence v konkrétním hostitelském organizmu. Kontrolní sekvence, které jsou vhodné pro prokaryota, např. zahrnují promotorovou, nepovinně operátorovou sekvenci, ribosomové vazebné místo a možno i další dosud málo prozkoumané sekvence. Je známo, že eukaryotické buňky používají promotory, polyadenylační signalizaci a enhancery.

30

„Operativně navázané“ ve vztahu k nukleovým kyselinám znamená nukleové kyseliny, které jsou umístěny ve funkčním vztahu s další sekvencí nukleové kyseliny. Např. DNA pro presekvenční nebo sekretorický leader jsou operabilně navázané na DNA pro polypeptid, pokud je exprimován jako preprotein, který participuje v sekreci polypeptidu; promotor nebo enhancer je operabilně navázan na kódující sekvenci, když má vliv na transkripci sekvence; nebo ribosomové vazebné místo je operabilně navázané na kódující sekvenci, když je umístěno tak, že usnadňuje translaci. Obecně „operabilně navázaný“ znamená, že DNA sekvence, takto navázané, sousedí, a v případě sekretorického leaderu, sousedí a jsou ve fázi čtení. Ovšem enhancery nemusí být sousední. Vazba je provedena ligací na vhodných restričních místech. Pokud tato místa neexistují, jsou použity v souladu s běžným postupem syntetické oligonukleotidové adaptory nebo linkery.

35

40

„Exogenní“ ve vztahu k prvkům znamená sekvence nukleových kyselin, které jsou buňce cizí, nebo jsou homologní k buňce, ale v pozici uvnitř nukleové kyseliny hostitelské buňky, v které se prvek obvykle nenachází.

45

„Buňka“, „buněčná linie“, a „buněčná kultura“ jsou zde použity zaměnitelně a jako termín zahrnují všechny potomky buňky nebo buněčné linie. Tedy například termíny jako „transformanty“ a „transformované buňky“ zahrnují primární subjekty buňky a kultury od nich odvozené bez ohledu na počet transferů. Také je zřejmé, že všichni potomci nemusí mít přesně identický obsah DNA, kvůli omezeným nebo rozvinutým mutacím. Zahrnují mutantní potomky, kteří mají stejnou funkční nebo biologickou aktivitu, která byla zjištěna u originálních transformovaných buněk. Pokud popis není jasný, bude jasný v kontextu.

50

„Plazmidy“ jsou autonomní replikační cirkulární DNA molekuly mající nezávislé zdroje replikace a jsou zde označeny malým písmenem „p“, které předchází a/nebo následují velká písmena

55

a/nebo čísla. Všechny zde uvedené výchozí plazmidy jsou komerčně dostupné, obecně dostupné na neomezeném základě nebo mohou být sestrojeny z takto dostupných plazmidů podle publikovaných postupů. Dále další odpovídající plazmidy jsou v oboru dobře známy a jsou uvedeny v metodice.

5

„Digesce restrikčním enzymem“ ve vztahu kDNA znamená katalytické štěpení vnitřních fosfodiesterových vazeb DNA enzymem, který působí pouze na některá místa v sekvenci DNA. Takovéto enzymy se nazývají „restrikční endonukleázy“. Každá restrikční endonukleáza rozpozná specifickou DNA sekvenci nazývanou „restrikční místo“, které vykazuje dvojčetnou symetrii. Různé restrikční enzymy zde použité jsou komerčně dostupné a jejich reakční podmínky, kofaktory a další požadavky pro provedení jsou použity podle výrobce enzymu. Restrikční enzymy jsou obvykle označeny zkratkami složenými z velkých písmen následovanými dalšími písmeny představujícími mikroorganismus, z kterého restrikční enzym pochází a z kterého byl získán a poté následuje číslo označení samotného enzymu. Obecně, na 1 mg plazmidu nebo fragmentu DNA jsou použity 1–2 jednotky enzymu v 20 ml pufrálního roztoku. Vhodná množství pufru a substrátu pro jednotlivé restrikční enzymy jsou specifikována výrobcem. Obvykle je použita inkubace 1 hod při 37 °C, ale může se lišit podle instrukcí výrobcem. Obvykle je použita inkubace 1 hod při 37 °C, ale může se lišit podle instrukcí dodavatele. Po inkubaci je protein nebo polypeptid odstraněn extrakcí s fenolem nebo fluoroforem a digestovaná nukleová kyselina je získána z vodné frakce precipitací s ethanolem. Digesci restrikčními enzymy může následovat hydrolyza koncových 5 fosfátů bakteriální alkalickou fosfatázou jako prevence dvou restrikcí štěpených konců DNA fragmentu z cirkularizace nebo vznik uzavřené smyčky, která by bránila vložení dalšího fragmentu DNA do restrikčního místa. Digesce plazmidů nemusí být následována 5 koncovou defosforylací. Postupy a reagensy pro defosforylací jsou popsány v sekcích 1.56 – 1.61 Sambrook a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989].

„Získání“ nebo „izolace“ za zisku fragmentu DNA z restrikční digesce znamená separaci digestu na polyakrylamidu nebo agarózovém gelu elektroforézou, identifikaci fragmentu, který nás zajímá, srovnáním jeho mobility proti markerům DNA fragmentů, u kterých známe molekulovou hmotnost, vyjmutí gelové sekce, která obsahuje požadovaný fragment, a separaci DNA z gelu. Postup je obecně znám. Např. viz Lawn a kol., *Nucleic Acids Res.*, 9: 6103–6114 [1981], a Goeddel a kol., *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 [1980].

„Southern analýza“ nebo „Southern blotting“ je metoda, kde přítomnost DNA sekvencí v restrikčním endonukleázovém digestu DNA, nebo ve směsi obsahující DNA, je potvrzena hybridizací na známé, značené oligonukleotidy nebo DNA fragmenty. Southern analýza obvykle zahrnuje elektroforetickou separaci DNA digestů na agarózových gelech, denaturaci DNA po elektroforetické separaci a přenesení DNA do nitrocelulózy, nylonu nebo jiné vhodné membrány pro analýzu radioznačením, byotinylací, nebo stanovením enzymovým značením jak je popsáno v sekcích 9.37 – 9.52 Sambrook a kol., viz výše.

„Northern analýza“ nebo „Northern blotting“ je metoda používaná k identifikaci RNA sekvencí, které jsou hybridizovány na známé vzorky jako jsou oligonukleotidy, DNA fragmenty, cDNA nebo jejich fragmenty, nebo RNA fragmenty. Vzorky jsou značeny radioizotopy jako je ³²P, nebo biotinylací nebo enzymem. RNA je obvykle analyzována elektroforetickou separací na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu, přenesena do nitrocelulózy, nylonu nebo jiné vhodné membrány a hybridizována se vzorkem, s použitím standardních technik dobře známých v oboru, které jsou popsány v sekcích 7.39 – 7.52 Sambrook a kol., viz výše.

50

„Ligace“ je proces vzniku fosfodiesterových vazeb mezi dvěma fragmenty nukleových kyselin. Pro ligaci dvou fragmentů, musí být konce fragmentů navzájem kompatibilní. V některých případech mohou být konce kompatibilní přímo po endonukleázové digesci. Ovšem může být nejprve nutné převedení roztřepených konců, obvykle vzniklých po endonukleázové digesci, na tupé konce, aby byly kompatibilní pro ligaci. Pro otupení konců se na DNA působí ve vhodném pufru nej-

55

- méně 15 minut při 15 °C 10 jednotkami Klenowova fragmentu DNA polymerázy I nebo T4 DNA polymerázy v přítomnosti čtyř deoxyribonukleotidtrifosfátů. DNA je poté purifikována extrakcí fenol–chloroform a ethanolovou precipitací. DNA fragmenty, které mají být spolu ligovány, jsou poté uvedeny do roztoku v ekvimolárním množství. Roztok bude také obsahovat ATP, ligázový pufr a ligázu jako je T4 DNA ligáza v množství 10 jednotek na 0,5 mg DNA. Pokud má být DNA ligována do vektoru, vektor je nejprve linealizován digescí s vhodnou restriční endonukleázou (endonukleázami). Na linearizovaný vektor poté působí bakteriální alkalické fosfatáza nebo telecí intestinální fosfatáza jako prevence autoligace během ligačního kroku.
- 10 „Preparace“ DNA z buněk znamená izolaci plazmidové DNA z kultury hostitelských buněk. Obvykle používané metody DNA preparace jsou preparace ve velkém nebo malém měřítku, popsané v sekcích 1.25 – 1.33. Sambrook a kol., viz výše. Po preparaci může být DNA purifikována metodami v oboru dobře známými, které jsou popsány v sekci 1.40 Sambrook s kol., viz výše.
- 15 „Oligonukleotidy“ jsou krátké, jedno– nebo dvouvláknové polydeoxynukleotidy, které jsou chemicky syntetizovány známými metodami (jako je fosfotriesterová, fosfitová nebo fosforamiditová chemie, s použitím technik na pevné fázi jak je popsáno v EP 266 032 publikovaném 4. května 1988, nebo přes deoxynukleosidové H–fosfonátové intermediáty jak je popsáno Froehlerem a kol., Nucl. Acids Res., 14: 5399–5407 [1986]). Další metody zahrnují reakci polymerázových
- 20 řetězců definovanou níže a další autoprimerní metody a oligonukleotidové syntézy na pevných nosičích. Všechny tyto metody jsou popsány v Engels a kol., Angew. Chem. Ing. Ed. Eng., 28: 716–734 (1989). Tyto metody jsou použity, pokud je známá celá sekvence nukleových kyselin genu, nebo je vhodná sekvence nukleové kyseliny komplementární kódujícímu vlákně. Nebo pokud je známá cílová aminokyselinová sekvence, můžeme odvodit potenciální aminokyselinovou sekvenci s použitím známých a výhodných kódujících zbytků pro každý aminokyselinový zbytek. Poté jsou oligonukleotidy purifikovány na polyakrylamidových gelech.
- 25 „Polymerázová řetězová reakce“ nebo „PCR“ znamená postup nebo techniku, kde malé množství specifické části nukleové kyseliny, RNA a/nebo DNA, je prodlouženo, jak popisuje US 4 683 195 vydaný 28. července 1987. Obecně, musí být dostupné sekvenční informace z konců regionu, který nás zajímá nebo který je třeba, takže mohou být zkonstruovány oligonukleotidové primery; tyto primery budou identické nebo sekvenčně podobné k protějškové řetězci šablony, která má být prodloužena. 5 koncové nukleotidy dvou primerů se mohou shodovat s konci prodloužovaného materiálu. PCR může být použita k prodloužení specifických RNA sekvencí, specifických DNA sekvencí z celkové genomické DNA a cDNA transkribované z celkové buněčné RNA, bakteriofágových nebo plazmidových sekvencí, atd. Viz obecně Mullis a kol., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263 [1987]; Erlich, editor, PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989). Jak je zde použita, PCR je považována za jeden, ne však jediný, příklad metody polymerázové reakce nukleových kyselin pro prodloužení testovaného vzorku nukleové kyseliny zahrnujícího použití známé nukleové kyseliny jako primeru a polymerázy nukleových kyselin k prodloužení nebo přípravě specifické části nukleové kyseliny.
- 30 „Přísné podmínky“ jsou (1) použití nízké iontové síly a vysoké teploty pro promývání, například 0,015 M NaCl/0,0015 M citrát sodný/0,1% NaDodSO₄ (SDS) při 50 °C, nebo (2) použití denaturačních agens během hybridizace jako je formamid, například 50 % obj. formamidu s 0,1 % hovězího sérového albuminu/0,1 % Ficoll/0,1 % polyvinylpyrrolidonu/50mM sodný fosfátový pufr při pH 6,5 s 750 mM NaCl, 75 mM citrát sodný při 42 °C. Dalším příkladem je použití 50 % formamidu, 5xSSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrát sodný), 50 mM fosfát sodný (pH 6,8), 0,1 % pyrofosfát sodný, 5x Denhardtův roztok, ultrazvukovaná DNA z lososího spermatu (50 mg/ml), 0,1 SDS, a 10 % dextransulfátu při 42 °C, s promytím při 42 °C v 0,2 x SSC a 0,1 % SDS.
- 45 „Středně přísné podmínky“ jsou popsány v Sambrook a kol., viz výše, a zahrnují použití promývacího roztoku a hybridizačních podmínek (např. teplota, iontová síla a % SDS) méně náročných, než je popsáno výše. Příkladem mírně náročných podmínek jsou podmínky jako je inkubace přes noc při 37 °C v roztoku obsahujícím: 20 % formamidu, 5xSSC (150 mM NaCl, 15mM citrát tri-
- 50

sodný), 50 mM fosfát sodný (pH 7,6), 5xDenhardtův roztok, 10 % dextran sulfát a 20 ml/ml denaturované DNA z lososího spermatu, a následné promytí filtru 1xSSC při 37–50 °C. Člověk vzdělaný v daném oboru dokáže posoudit nastavení teploty, iontové síly apod., pokud bude nutné tyto faktory přizpůsobit délce vzorku a podobně.

5

„Protilátky“ (Abs) a „imunoglobuliny“ (Igs) jsou glykoproteiny, které mají stejnou strukturální charakteristiku. Zatímco protilátky vykazují vazebnou specifitu ke specifickému antigenu, imunoglobuliny zahrnují jak protilátky tak molekuly podobné protilátkám, kterým chybí antigenní specifita. Polypeptidy druhého druhu jsou např. produkovány v nižších úrovních lymfatického systému a při zvyšování hladiny při myelomázách.

10

„Nativní protilátky a imunoglobuliny“ jsou obvykle heterotetramerické glykoproteiny m. hm. kolem 150000, složené ze dvou identických lehkých (L) řetězců a dvou identických těžkých (H) řetězců. Každý lehký řetězec je navázán na lehký řetězec jednou kovalentní disulfidovou vazbou, zatímco počet disulfidových vazeb mezi těžkými řetězci se liší u různých imunoglobulinových izotypů. Každý těžký a lehký řetězec také má pravidelné prostorové intrařetězcové disulfidové můstky. Každý těžký řetězec má na jednom konci variabilní doménu (V_H) následovanou množstvím konstantních domén. Každý lehký řetězec má variabilní doménu na jednom (V_L) a konstantní doménu na svém druhém konci; konstantní doména na lehkém řetězci je svázána s první konstantní doménou těžkého řetězce, a variabilní doména lehkého řetězce je svázána s variabilní doménou těžkého řetězce. Předpokládá se, že spojení mezi variabilními doménami lehkého a těžkého řetězce tvoří jednotlivé aminokyselinové zbytky (Clothia a kol., *J. Mol. Biol.*, 186: 651–663 [1985]; Novotny a Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4592–4596 [1985]).

15

20

25

Termín „variabilní“ znamená skutečnost, že některé části variabilních domén se významně liší v sekvenci mezi protilátkami a jsou použity k vazbě a specifitě každé jednotlivé protilátky pro její jednotlivý antigen. Ovšem variabilita není vždy lokalizována na variabilních doménách protilátek. Je soustředěna ve třech segmentech, nazývaných komplementaritu determinující oblasti (CDR) nebo hypervariabilní regiony variabilních domén těžkého a lehkého řetězce. Nejvíce konzervované části variabilních domén jsou nazývány jako framework (FR). Variabilní domény nativních těžkých a lehkých řetězců obsahují každá čtyři FR oblasti, rozsáhlé konfiguraci b–hřbetu, spojené třemi CDR, které tvoří smyčky, v některých případech jejich část, a spojují b–hřbety. CDR na každém řetězci drží pohromadě, v těsné blízkosti FR regiony a s CDR z dalších řetězců tvoří formaci antigenního vazebného místa protilátky (viz Kabat a kol., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institute of Health, Bethesda, MD [1987]. Konstantní domény nejsou přímo zahrnuty do vazby protilátky na antigen, ale vykazují různé efektorové funkce, jako je participace protilátky v protilátkově–dependentní celulární toxicitě.

30

35

Při papainové digesci protilátek vznikají dva identické antigenní vazebné fragmenty, nazývané „Fab“ fragmenty, každý s jedním antigenním vazebným místem, a resukuální „Fc“ fragment, jehož název odráží jeho schopnost snadno krystalizovat. Výsledkem pepsinového působení je $F(ab)_2$ fragment, který má dvě antigenní kombinovaná místa a je stále schopný křížové vazby antigenu.

40

45

„Fv“ je minimální protilátkový fragment, který obsahuje kompletní antigenní rozpoznávací a vazebné místo. Tato oblast se skládá z dimeru variabilních domén jednoho těžkého a jednoho lehkého řetězce v těsném, nekovalentním spojení. Je to konfigurace, kde tři CDR každé variabilní domény interagují a definují antigenní vazebné místo na povrchu V_H – V_L dimeru. Celkově šest CDR tvoří antigenní vazebnou specifitu protilátky. Ovšem každá jednotlivá variabilní doména (nebo polovina Fv obsahující pouze CDR specifické pro antigen) má schopnost rozpoznat a vázat antigen, ovšem s nižší afinitou než úplné vazebné místo.

50

Fab fragment také obsahuje konstantní doménu lehkého řetězce a první konstantní doménu (CH1) těžkého řetězce. Fab fragmenty se liší od Fab fragmentů tím, že mají navíc několik zbytků na karboxylaci CH1 domén těžkého řetězce, včetně jednoho nebo více cysteinů z protilátkové

55

otočné oblasti. Fab-SH je zde označení pro Fab, v kterém cysteinové zbytky konstantních domén nesou volnou thiolovou skupinu. F(ab)₂ protilátkové fragmenty jsou produkovány jako páry Fab fragmentů, které mají mezi sebou cysteinové spoje. Jsou známé i další chemické páry protilátkových fragmentů.

5

„Lehké řetězce“ protilátek (imunoglobulinů) jakéhokoliv druhu mohou být označeny jako jeden ze dvou zřetelně se lišících typů, nazývaných kappa a lambda (I), založených na aminokyselinových sekvencích jejich konstantních domén.

10

V závislosti na aminokyselinové sekvenci konstantní domény jejich těžkého řetězce mohou být imunoglobuliny rozděleny do různých tříd. Existuje pět hlavních tříd imunoglobulinů: IgA, IgD, IgE, IgG a IgM, a některé z nich jsou dále rozděleny do podtříd (izotypů), např. IgG-1, IgG-2, IgG-3 a IgG-4; IgA-1 a IgA-2. Konstantní domény těžkého řetězce, které odpovídají různým třídám imunoglobulinů, se nazývají a, delta, epsilon, g a m. Podjednotkové struktury a trojrozměrné konfigurace jednotlivých skupin imunoglobulinů jsou dobře známy.

15

Termín „protilátka“ je používám v obsáhlém významu a specificky vyjadřuje jednotlivé monoklonální protilátky (včetně agonistů a antagonistů protilátek), protilátkové směsi s polyepitopickou specificitou, stejně jako protilátkové fragmenty (např. Fab, F(ab)₂, a Fv), pokud vykazují požadovanou biologickou aktivitu.

20

Termín „monoklonální protilátka“ zde označuje protilátku získanou z populace prakticky homogenních protilátek, tj. populace obsahující individuální protilátky, které jsou identické kromě možných přirozeně se vyskytujících mutací, které se mohou vyskytnout v minoritním množství. Monoklonální protilátky jsou vysoce specifické, jsou směřovány proti jednotlivému antigennímu místu. Dále na rozdíl od preparátů polyklonálních protilátek, které obvykle zahrnují různé protilátky, směřované proti různým determinantům (epitopům), každá monoklonální protilátka je směřována proti jedné determinantě antigenu. Dále k jejich specifitě, monoklonální protilátky jsou výhodné proto, že jsou syntetizovány hybridomovou kulturou, nejsou kontaminovány jinými imunoglobuliny. Přívlastek „monoklonální“ označuje charakter protilátky, znamená to, že byla získána z prakticky homogenní populace protilátek a požadovaná protilátka nebyla připravena žádnou jinou metodou. Například monoklonální protilátky používané podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny hybridomovou metodou poprvé popsanou Kohlerem a Milsteinem, Nature, 256: 495 (1975), nebo připraveny rekombinantní DNA metodou (viz, např. US 4 816 567 [Cabillz a kol.].

30

Monoklonální protilátky zde zahrnují zejména „chimérické“ protilátky (imunoglobuliny), ve kterých část lehkého a/nebo těžkého řetězce je identická nebo homologní k odpovídajícím sekvencím v protilátkách odvozených z konkrétních druhů nebo patřících ke konkrétní třídě nebo podtřídě protilátek, zatímco zbytek řetězce (řetězců) je identický nebo homologní k odpovídajícím sekvencím v protilátkách odvozených z jiných druhů nebo patřících k jiné třídě nebo podtřídě protilátek, stejně jako k fragmentům těchto protilátek, pokud vykazují požadovanou biologickou aktivitu (US 4 816 567 (Cabilly a kol.); a Morrison a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 [1984]).

40

„Humanizované“ formy non-humánních (např. myších) protilátek jsou chimérické imunoglobuliny, imunoglobulinové řetězce nebo jejich fragmenty (jako jsou Fv, Fab, Fab, F(ab)₂ nebo další antigen-vážící subsekvence imunoglobulinu) které obsahují minimálně sekvenci odvozenou z non-humánního imunoglobulinu. Z největší části jsou humanizované protilátky lidské imunoglobuliny (příjemcové protilátky) v kterých zbytky komplementárních determinujících regionů (CDR) příjemce jsou nahrazeny zbytky CDR non-humánních druhů (donorové protilátky) jako jsou myší, krysí nebo králičí, které mají požadovanou specificitu, afinitu a kapacitu. V některých případech Fv rámcové zbytky lidského imunoglobulinu jsou nahrazeny odpovídajícím non-humánními zbytky. Dále, humanizované protilátky mohou obsahovat zbytky, které se nenachází ani v příjemcové protilátce ani v importované CDR nebo rámcové sekvenci. Tyto modifikace jsou

50

55

provedeny kvůli další optimalizaci protilátkové specificity. Obecně, humanizované protilátky budou zahrnovat prakticky všechny protilátky s nejméně jednou a obvykle dvěma variabilními doménami, u kterých všechny nebo prakticky všechny CDR regiony odpovídají těmto regionům non-humánních imunoglobulinů a všechny nebo prakticky všechny FR regiony odpovídají těmto regionům humánní imunoglobulinové shodné sekvence. Humanizované protilátky optimálně také obsahují nejméně část imunoglobulinové konstantního regionu (Fc), obvykle lidského imunoglobulinu. Další podrobnosti viz: Jones a kol., Nature, 321. 522–525 [1986]; Reichmann a kol., Nature, 332: 323–329 [1988]; a Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593–596 [1992].

„Neimunogenní pro člověka“ znamená, že po kontaktu polypeptidu ve farmaceuticky přijatelném nosiči a v terapeuticky účinném množství s vhodnou lidskou tkání se neobjeví žádný projev senzitivity nebo rezistence k polypeptidu po druhé dávce polypeptidu po vhodné latentní periodě (např. 8 až 14 dní).

II. Výhodná provedení vynálezu

Výhodné polypeptidy podle tohoto vynálezu jsou prakticky homogenní polypeptidy, vztahující se k ligandu *mpl* (ligandům) nebo trombopoetinu (TPO), který vykazuje schopnost vazby na *mpl*, člena receptorové cytokinové skupiny, a má biologickou schopnost stimulace inkorporace značných nukleotidů (³H-thymidin) do DNA IL-3 dependentních Ba/F3 buněk transfekovaných lidským *mpl* P. Výhodnější ligandy *mpl* jsou izolované savčí proteiny, které mají hematopoetickou, zvláště megakaryopoetickou nebo trombopoetickou aktivitu – konkrétně jsou schopné stimulovat proliferaci, zrání a/nebo diferenciaci nezralých megakaryocytů nebo jejich předchůdců na zralou destičku–produkcující formu. Nejvýhodnější polypeptidy podle tohoto vynálezu jsou lidské ligandy *mpl* včetně jejich fragmentů, které mají hematopoetickou, megakaryocytopoetickou nebo trombopoetickou aktivitu. Nepovinně tyto lidské ligandy *mpl* postrádají glykosylaci. Další výhodné lidské ligandy *mpl* jsou „EPO-domény“ hML označované jako hML₁₅₃ nebo hTPO₁₅₃, zkrácené formy hML označované jako hML₂₄₅ nebo hTPO₂₄₅ a zralý polypeptid plné délky, který má aminokyselinovou sekvenci znázorněnou na obr. 1 (SEQ ID NO: 1), označovaný jako hML, hML₃₃₂ nebo hTPO₃₃₂ a biologicky aktivní substitucionální varianty hML(R153A, R154A).

Nepovinně výhodné polypeptidy podle tohoto vynálezu jsou biologicky nebo imunologicky aktivní varianty ligandu *mpl* vybrané ze skupiny skládající se z: hML2, hML3, hML4, mML, mML2, mML3, pML a pML2.

Nepovinně výhodné polypeptidy podle tohoto vynálezu jsou biologicky aktivní varianty ligandu *mpl*, jejichž aminokyselinová sekvence má nejméně 70% aminokyselinovou sekvenci identitu s lidským ligandem *mpl* (viz obr. 1 [SEQ ID NO: 1], myším ligandem *mpl* (viz obr. 16 [SEQ ID NO: 12 a 13], rekombinantním vepřovým ligandem *mpl* izolovaným z aplastické vepřové plazmy, výhodně nejméně 75%, výhodněji nejméně 80%, ještě výhodněji nejméně 85%, ještě více výhodněji nejméně 90% a nejvýhodněji nejméně 95%.

Ligand *mpl* izolovaný z aplastické vepřové plazmy má následující charakteristiky:

1. Parciálně purifikovaný ligand eluovaný z gelové filtrační kolony buď v PBS, PBS obsahující 0,1% SDS nebo PBS obsahující 4M MgCl₂ s Mr 60000 až 70000;
2. Ligandová aktivita je zrušena pronázou;
3. Ligand je stabilní do nízkého pH (2,5), SDS do 0,1% a 2M močoviny;
4. Ligand je glykoprotein, na základě jeho vazby na různé lektinové kolony;
5. Vysoce purifikovaný ligand je eluován z neredukující SDS-PAGE s Mr 25000 až 35000. Menší množství aktivity je také eluováno Mr 18000, 22000 a 60000;

6. Vysoce purifikovaný ligand se objevil na redukující SDS-PAGE jako dublet s Mr 28000 a 31000;
- 5 7. Aminokoncová sekvence pásů 18000–22000, 28000 a 31000 je stejná – SPAPPACDPR-LLNKLLRDDHVLHGR(SEQ ID NO:29); a
8. Ligand se váže a eluuje z následujících afinitních kolon.
- 10 Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-S, Lentil lektin-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Ether 650m Toyopearl, Butyl 650m Toyopearl, Fenyl 650m Toyopearl a Fenyl-Sepharose.

Výhodnější ligandové polypeptidy *mpl* jsou kódovány lidskou genomickou nebo cDNA, která má aminokyselinovou sekvenci popsanou na obr. 1 (SEQ ID NO: 1).

Další výhodné přirozeně se vyskytující biologicky aktivní ligandové polypeptidy *mpl* podle tohoto vynálezu zahrnují ligand prepro-*mpl*, ligand pro-*mpl*, zralý ligand *mpl*, fragmenty ligandu *mpl* a jejich glykosylované varianty.

20 Ještě další výhodné polypeptidy podle tohoto vynálezu zahrnují ligandové sekvenční varianty a chiméry *mpl*. Obvykle výhodné ligandové sekvenční varianty a chiméry *mpl* jsou biologicky aktivní ligandové varianty *mpl*, které mají nejméně 70% aminokyselinovou sekvenční identitu s lidským ligandem *mpl* nebo ligandem *mpl* izolovaným z aplastické vepřové plazmy, výhodně

25 nejméně 75%, výhodněji nejméně 80%, ještě výhodněji nejméně 85%, ještě více výhodněji nejméně 90% a nejvýhodněji nejméně 95%. Zvláště výhodnou variantou ligandu *mpl* je N-koncová doména hML varianty (označovaná jako „EPO-doména“ pro její sekvenční homologii s erythropoetinem). Výhodná hML EPO-doména obsahuje prvních 153 aminokyselinových zbytků zralého hML a je označována jako hML 153. Nepovinně výhodná hML sekvenční varianta zahrnuje

30 variantu, kde jedna nebo více bazických nebo dibazických aminokyselinových zbytků v C-koncové doméně jsou substituovány nebazickými aminokyselinovými zbytky (např. hydrofobními, neutrálními, kyselými, aromatickými, Gly, Pro atd.). Výhodná sekvenční varianta hML C-koncové domény zahrnuje variantu, kde Arg zbytky 153 a 154 jsou zaměněny za zbytky Ala. Tato varianta je označována jako hML₃₃₂(R153A, R514A). Jiná výhodná hML varianta zahrnuje

35 buď hML₃₃₂ nebo hML₁₅₃, kde aminokyselinové zbytky 111–114 (QLPP nebo LPPQ) jsou vnečnány nebo nahrazeny jinou tetrapeptidovou sekvencí (např. AGAG nebo podobnou). Následující deleční mutanti jsou označováni jako D4hML₃₃₂ nebo 4hML₁₅₃.

Výhodná chiméra je fúze mezi ligandem *mpl* nebo jeho fragmentem (definovaným výše) s heterologním polypeptidem nebo jeho fragmentem. Například, hML 153 může být fúzován do IgG fragmentu, aby se zlepšil sérový poločas, nebo do IL-3, G-CSF nebo EPO, aby vznikla molekula s vyšší trombopoetickou nebo chimérickou hematopoetickou aktivitou.

45 Jinou výhodnou lidskou ligandovou chimérou *mpl* je „ML-EPO“ doménová chiméra, která se skládá z N-koncových zbytků 153 až 157 hML substituovaných jedním nebo více, ale ne všemi, lidskými EPO zbytky, jak je naznačeno na obr. 10 (SEQ ID NO: 7). V tomto provedení by byla hML chiméra dlouhá 153–166 zbytků, kdy jednotlivé zbytky nebo bloky zbytků z lidské EPO sekvence jsou přidány nebo substituovány do hML sekvence v pozicích odpovídajících tomu, jak je naznačeno na obr. 10 (SEQ ID NO: 6). Příklad blokových sekvenčních inzertů do N-koncové

50 části hML může zahrnovat jeden nebo více N-glykosylovaných míst v pozicích (EPO) 24–27, 38–40 a 83–85; jeden nebo více než čtyři předpokládané alifatické α -helikální závitě v polohách (EPO) 9–22, 56–76, 90–107 a 132–152; a další vysoce rigidní oblasti zahrnující N-terminální a C-terminální oblasti a zbytky v polohách (EPO) 44–52 (viz např. Wen a kol., Blood, 82: 1507–1516 [1993] a Boissel a kol., J. Biol. Chem., 268(21): 15983–15993 [1993]). U této „ML-EPO

doménové chiméry“ se předpokládá, že bude mít smíšenou trombopoeticko-erythropoetickou (TEPO) biologickou aktivitu.

5 Další výhodné polypeptidy podle tohoto vynálezu zahrnují ligandové fragmenty *mpl*, které mají po sobě jdoucí sekvence nejméně 10, 15, 20, 25, 30 nebo 40 aminokyselinových zbytků, které jsou identické se sekvencemi ligandu *mpl* izolovaného z aplastické vepřové plazmy nebo lidského ligandu *mpl* zde popsaného (viz např. tab. 14, příklad 24). Výhodný fragment ligandu *mpl* je lidský ML[1-X], kde X je 153, 164, 191, 205, 207, 217, 229 nebo 245 (viz obr. 1 [SEQ ID NO:1] pro sekvenci zbytku 1-X]). Další výhodné fragmenty ligandu *mpl* zahrnují fragmenty, které jsou
10 produkovány jako výsledek chemické nebo enzymatické hydrolyzy nebo digesce purifikovaného ligandu.

Dalším výhodným aspektem vynálezu je metoda purifikace molekul ligandů *mpl* kontaktem zdroje ligandu *mpl* obsahujícího molekuly ligandu *mpl* s imobilizovaným receptorovým polypeptidem, konkrétně s *mpl* nebo fúzním polypeptidem *mpl*, za podmínek, kdy molekuly ligandu *mpl*,
15 které mají být purifikovány, jsou selektivně adsorbovány na imobilizovaný receptorový polypeptid, nosič je promyt, aby byl odstraněn neadsorbovaný materiál, a molekuly, které mají být purifikovány, jsou eluovány z imobilizovaného receptorového polypeptidu elučním puřrem. Zdrojem obsahujícím ligand *mpl* může být plazma, kde je imobilizovaný receptor výhodně *mpl*-IgG fúze.

20 Jinou možností je, že zdrojem obsahujícím ligand *mpl* je rekombinantní buněčná kultura, kde koncentrace ligandu *mpl* buď v kultivačním médiu nebo v buněčném lyzátu je obecně vyšší než v plazmě nebo dalších přirozených zdrojích. Výše uvedenou imunoafinitní metodou *mpl*-IgG obvykle není nutné použít, mohou být použity běžnější metody purifikace proteinů, které jsou
25 v dané oblasti dobře známy. Krátce, výhodné purifikační metody k získání prakticky homogenního ligandu *mpl* zahrnují: odstranění větších nečistot, buď hostitelských buněk nebo lýzovaných fragmentů, např. centrifugací nebo ultrafiltrací; nepovinně mohou být proteiny koncentrovány komerčně dostupným proteinovým koncentračním filtrem; následuje separace ligandu od dalších nečistot jedním nebo více kroky, které se skládají z: imunoafinitní chromatografie, iontové výměny (např. DEAE nebo matrice obsahující karboxymethylové nebo sulfopropyllové skupiny),
30 chromatografie na těchto materiálech – Blue-Sepharse, CM Blue-Sepharse, MONO-Q, MONO-S, lentil lektin-Sepharse, WHA-Sepharse, Con A-Sepharse, Ether Toypearl, Butyl Toypearl, Fenyl Toypearl, protein A Sepharse, SDS-PAGE, HPLC s reverzní fází (např. silikagel s připojenými alifatickými skupinami) nebo Sephadexové molekulární síto nebo exkluzní chromatografie, nebo precipitace v ethanolu nebo amonium sulfátu. Kterýkoliv předcházející
35 krok může obsahovat inhibici proteolýzy pomocí methylsulfonylfluoridu (PMSF).

V dalším výhodném provedení předkládaný vynález zahrnuje izolovanou protilátku schopnou vazby na ligand *mpl*. Výhodná ligandová izolovaná protilátka *mpl* je monoklonální (Kohler a Milstein, Nature, 256: 195-497 [1975]; Campbell, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Burdon a kol., editoři, Vol. 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam [1985]; a Huse a kol., Science, 246: 1295-1281 [1989]). Výhodná ligandová izolovaná protilátka
40 *mpl* je protilátka, která se váže na ligand *mpl* s afinitou nejméně 10^6 l/mol.

45 Výhodněji se protilátka váže s afinitou nejméně 10^7 l/mol. Nejvýhodněji protilátka proti ligandu *mpl* má jednu nebo více výše uvedených efektorových funkcí. Izolovaná protilátka schopná vázat ligand *mpl* může být nepovinně fúzována do sekundárního polypeptidu a protilátka nebo jejich fúze může být použita k izolaci nebo purifikaci ligandu *mpl* ze zdroje, jak bylo popsáno výše pro imobilizovaný polypeptid *mpl*. V dalším výhodném aspektu tohoto provedení vynález zahrnuje
50 způsob detekce ligandu *mpl* *in vitro* nebo *in vivo* zahrnující kontakt protilátky se vzorkem, zvláště vzorkem séra, u kterého se předpokládá obsah ligandu, a detekce, jestli se objeví vazba.

V dalším výhodném provedení vynález zahrnuje izolaci molekuly nukleové kyseliny kódující ligand *mpl* nebo jeho fragment, kde molekula nukleové kyseliny může být značená nebo neznačená detekovatelnou skupinou, a molekula nukleové kyseliny má sekvenci, která je komplemen-
55

tární k molekule nukleové kyseliny, která obsahuje sekvenci kódující ligand *mpl*, nebo hybridizovaná za náročných nebo mírně náročných podmínek na molekulu nukleové kyseliny, která obsahuje sekvenci kódující ligand *mpl*. Výhodná nukleová kyselina ligandu *mpl* je RNA nebo DNA, která kóduje biologicky aktivní ligand *mpl* vykazující nejméně 75 % sekvenční identity, výhodněji nejméně 80 %, ještě výhodněji nejméně 85 %, ještě více výhodněji nejméně 90 % a nejméně výhodněji nejméně 95 % sekvenční identity s lidským ligandem *mpl*. Výhodnějšími izolovanými molekulami nukleové kyseliny jsou DNA sekvence kódující biologicky aktivní ligand *mpl*, vybrané ze skupiny, sestávající se z: (a) DNA založená na kódující oblasti savčího ligandového genu *mpl* (např. DNA obsahující nukleotidové sekvence uvedené na obr. 1 (SEQ ID NO: 2), nebo její fragmenty); (b) DNA schopná hybridizace na DNA z bodu (a) za nejméně mírně náročných podmínek; a (c) DNA je degenerovaná na DNA definovanou v bodě (a) nebo (b), což je výsledkem degenerace genetického kódu. Je pozorováno, že nové ligandy *mpl* zde popsány mohou být členy skupiny ligandů nebo cytokinů, které mají vhodnou sekvenční identitu, když jejich DNA může hybridizovat s DNA, která je na obr. 1 (SEQ ID NO: 2) (nebo komplementem nebo jejich fragmenty) za slabě až mírně náročných podmínek. Tedy další aspekty tohoto vynálezu zahrnují DNA, která hybridizuje za mírně slabě až středně přísných podmínek s DNA kódující ligandové polypeptidy *mpl*.

V dalším výhodném provedení vynálezu je molekula nukleové kyseliny cDNA kódující ligand *mpl* a dále zahrnuje replikovatelný vektor, v kterém je cDNA oddělitelně navázána na kontrolní sekvence rozpoznávané vektorem transformovaným hostitelem. Tento aspekt dále zahrnuje hostitelské buňky transformované vektorem a metodu použití cDNA k ovlivnění produkce ligandu *mpl*, zahrnující expresi cDNA kódující ligand *mpl* v kultuře transformovaných hostitelských buněk a odstranění ligandu *mpl* z hostitelské buněčné kultury. Ligand *mpl* připravený tímto způsobem je výhodně prakticky homogenní lidský ligand *mpl*. Výhodné hostitelské buňky pro produkci ligandu *mpl* jsou buňky vaječníků čínských křečků Chinese hamster ovary (CHO).

Vynález dále zahrnuje výhodné metody léčení savců, kteří trpí imunologickým nebo hematopoetickým onemocněním, zejména trombocytopenií, zahrnující podávání terapeuticky účinného množství ligandu *mpl* savci. Nepovinně je ligand *mpl* podáván v kombinaci s cytokinem, zvláště faktorem stimulujícím kolonie nebo interleukinem. Výhodné faktory stimulující kolonie nebo interleukiny zahrnují: kit-ligand, LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 nebo IL-11.

35 III. Způsoby provedení

Mnoho autorů se dlouho domnívalo, že produkce destiček je kontrolována mnohočetnými kmenově specifickými humorálními faktory. Bylo zjištěno, že dvě různé cytokinové aktivity, označené jako megakaryocytový faktor stimulující kolonie (meg-CSF) a trombopoetin, regulují megakaryocytopoézu a trombopoézu (Williams a kol., J. Cell Physiol., 110: 101–104 [1982] Williams a kol., Blood Cells, 15: 123–133 [1989]; a Gordon a kol., Blood, 80: 302–307 [1992]). Podle těchto hypotéz, meg-CSF stimuluje proliferaci progenitorových megakaryocytů, zatímco trombopoetin v první řadě ovlivňuje zrání nebo další diferenciaci buněk a omezeně uvolňování destiček. Od šedesátých let dvacátého století byla dobře dokumentována indukce, vznik a výskyt aktivit meg-CSF a trombopoetinu v plazmě, séru a moči zvířat a lidí a následné trombocytopenické příhody (Odell a kol., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 108: 428–431 [1961], Nakeff a kol., Acta Haematol., 54: 340–344 [1975]; Specter, Proc. Soc. Exp. Biol., 108: 146–149 [1961]; Schreiner a kol., J. Clin. Invest., 49: 1709–1713 [1970]; Ebbe, Blood, 44: 605–608 [1974]; Hoffman a kol., N. Engl. J. Med., 305: 533 [1981]; Straneva a kol., Exp. Hematol., 17:1122–1127 [1988]; Mazur a kol., Exp. Hematol., 13: 1164 [1985]; Mazur a kol., J. Clin. Invest. 68: 733–741 [1981]; Sheiner a kol., Blood, 56: 183–188 [1980]; Hill a kol., Exp. Hematol., 20: 354–360 [1992]; Hegyi a kol., Int. J. Cell Cloning. 8. 236–244 [1990]. Bylo publikováno, že tyto aktivity jsou kmenově specifické a liší se od známých cytokinů (Hill R. J. a kol., Blood 80: 346 (1992); Erickson–Miller C. L. a kol., Brit. J. Hematol., 84: 197–203 (1993); Straneva J. E. a kol., Exp. Hematol. 20: 4750

(1992); a Tsukada J. a kol., Blood 81: 866–867 [1993]. Až dosud byly pokusy purifikovat meg-CSF nebo trombopoetin z trombocytopenické plazmy nebo moči neúspěšné.

V souladu s výše uvedenými pozorováními popisujícími trombocytopenickou plazmu, jsme zjistili, že aplastická vepřová plazma (APP) získaná z ozářených vepřů stimuluje lidskou megakaryocytopoézu *in vitro*. Zjistili jsme, že tato stimulační aktivita je zrušena rozpustnou extracelulární doménou *c-mpl*, potvrzující APP jako potenciální zdroj předpokládaného ligandu *mpl* (ML). Nyní jsme úspěšně purifikovali ligand *mpl* z APP a aminokyselinová sekvenční informace byla použita k izolaci myší, vepřové a lidské ML cDNA. Tyto ML vykazují sekvenční homologii s erythropoetinem a mají aktivitu meg-CSF i aktivitu trombopoetivového typu.

1. Purifikace a identifikace ligandu *mpl* z plazmy

Jak je uvedeno dále, bylo publikováno, že aplastická plazma z různých druhů obsahuje aktivity, které stimulují hematopoézu *in vitro*, ovšem nebylo dříve publikováno, že by stimulační faktory byly izolovány z plazmy. Jeden zdroj aplastické plazmy byl získán z ozářených vepřů. Tato aplastická vepřová plazma (APP) stimuluje lidskou hematopoézu *in vitro*. Stanovení, zda APP obsahuje ligand *mpl*, bylo provedeno měřením ³H-thymidinové inkorporace do Ba/F3 buněk transfekovaných lidským *mpl* P (Ga/F3-*mpl*) postupem ukázaným na obr. 2. APP stimulovala ³H-thymidinovou inkorporaci do Ba/F3-*mpl* buněk, ale ne do Ba/F3 kontrolních buněk (tj. netransfekovaných lidským *mpl* P). Dále nebyla pozorována žádná aktivita v normální vepřové plazmě. Tyto výsledky ukazují, že APP obsahuje faktor nebo faktory, které transdukuje proliferativní signál přes *mpl* receptory a tedy mohou být přirozeným ligandem pro tyto receptory. Toto bylo dále podpořeno zjištěním, že působení APP spolu s rozpustným *mpl*-IgG blokuje stimulační efekty APP na Ba/F3-*mpl* buňky.

Zjistilo se, že aktivitu v APP vyazuje protein, protože pronáza, DTT nebo teplo aktivitu v APP ničí (obr. 3). Aktivita byla také nedialyzovatelná. Aktivita byla ale stabilní při nízkém pH (pH 2,5 po dobu 2 hod.) a vyazuje vazbu a eluci u některých lektinových afinitních kolon, což ukazuje, že to je glykoprotein. K dalšímu objasnění struktury a identity této aktivity byla dále aktivita afinitně purifikována z APP s použitím *mpl*-IgG chiméry.

APP byla upravena podle postupu uvedeného dále v příkladu 1 a 2. Krátce, ligand *mpl* byl purifikován s použitím hydrofobní interakční chromatografie (HIC), hrubozrnné imobilizované chromatografie a *mpl*-afinitní chromatografie. Výskyt aktivity v každém kroku je ukázan na obr. 4 a stupeň purifikace je uveden v tab. 1. Celkový výtěžek aktivity po *mpl*-afinitní koloně byl přibližně 10 %. Frakce s nejvyšší aktivitou (F6) z *mpl*-afinitní kolony vykazovala specifickou aktivitu $9,8 \times 10^6$ jednotek/mg. Celková purifikace z 5 litrů APP byla přibližně 4×10^6 násobná (z 0,8 jednotek/mg na $3,3 \times 10^6$ jednotek/mg) s 83×10^6 násobnou redukcí proteinů (z 250 mg na 3 mg). Předpokládáme, že specifická aktivita ligandu, eluovaného z *mpl*-afinitní kolony, je přibližně 3×10^6 jednotek/mg.

Tabulka 1

Purifikace ligandu *mpl*

	Objem ml	Proteiny mg/ml	Jednotky/ml	Jednotky	Specifická aktivita Jednotky/mg	Výtěžek %	Stupeň purifikace
App	5000	50	40	200000	0,8	–	1
Fenyl	4700	0,8	40	200000	50	94	62
Blue-Sep.	640	0,93	400	256000	430	128	538
<i>mpl</i> (ml) (Fxns 5–7)	12	5×10^{-4}	1666	20000	3300000	10	4100000

Protein byl stanoven Bradfordovým stanovením. Koncentrace proteinů eluovaných frakcí *mpl* 5 až 7 byly určeny na základě barevné intenzity SDS-gelu barveného stříbrem. Jedna jednotka je definována tak, že způsobuje 50 % maximální stimulace Ba/F3 buněčné proliferace.

5

Analýza eluovaných frakcí z *mpl* afinitní kolony pomocí SDS-PAGE (4–20%, Novex gel) probíhající za redukujících podmínek ukázala přítomnost několika proteinů (obr. 5). Proteiny, které při barvení stříbrem ukázaly nejsilnější intenzitu, měly Mr 66000, 55000, 30000, 28000 a 18000–22000. Ke stanovení, které z těchto proteinů stimuluje proliferaci Ba/F3 buněčných kultur, byly proteiny eluovány z gelu postupem, který je popsán v příkladu 2.

10

Výsledky experimentu ukazují, že většinu aktivity eluované z gelu obsahuje protein s Mr 28000–32000, menší aktivita byla eluována z oblasti gelu 18000–22000 (obr. 6). Jediné proteiny viditelné v této oblasti mají Mr 30000, 28000 a 18000–22000. K identifikaci a získání proteinové sekvence proteinů vyskytujících se v těchto oblastech gelu (tj. pásy 30, 20 a 18–22 000) byly tyto tři proteiny elektroblotovány do PVDF a sekvenovány jak je popsáno v příkladu 3. Získané aminokoncové sekvence jsou uvedeny v tab. 2.

15

20 Tabulka 2

Amino-koncové sekvence ligandu *mpl*

m. hm. 30 000	
1 5 10 15 20 25	(SEQ ID NO: 30)
(S)PAPPA(C)DPRLLNKLLRDD(H/S)VLH(G)RL	
m. hm. 28 0000	
1 5 10 15 20 25	(SEQ ID NO: 31)
(S)PAPPAXDPRLLNKLLRDD(H)VL(H)GR	
m. hm. 18 – 22 0000	
1 5 10	(SEQ ID NO: 32)
XPAPPAXDPRLX(N)	

Počítačově provedené analýzy ukázaly, že tyto aminokyselinové sekvence jsou nové. Protože všechny tři sekvence byly stejné, předpokládá se, že proteiny 30 000, 28 000 a 18–22 000 byly příbuzné a mohou být různými formami stejného nového proteinu. Dále tento protein (proteiny) byl také možným přirozeným ligandem *mpl* pro aktivitu vykazovanou na SDS-PAGE ve stejné oblasti (28000–32000) 4–20% gelu. Kromě toho parciálně purifikovaný ligand migroval s Mr 17000–30000, pokud byl podroben gelové filtrační chromatografii s použitím kolony Superose 12 (Pharmacia). Předpokládá se, že různé Mr formy ligandu jsou výsledkem proteolýzy nebo glykosylačních rozdílů nebo jiných post nebo pre-translačních modifikací.

25

30

Jak je popsáno dříve, protisměrná *mpl* RNA ruší megakaryocytopoézu v kulturách lidské kostní dřene obohacených CD 34+ progenitorovými buňkami aniž by zasahovala diferenciaci dalších kmenů hematopoetických buněk. (Methia a kol., viz výše). Tyto výsledky svědčí o tom, že *mpl* receptor může hrát roli v diferenciaci a proliferaci megakaryocytů *in vitro*. K dalšímu objasnění úlohy ligandu *mpl* v megakaryocytopoéze byl srovnán vliv APP a ligandově depleční APP *mpl* na *in vitro* lidskou megakaryocytopoézu. Vliv APP na lidskou megakaryocytopoézu byl stanoven s použitím modifikace kapalného suspenzního megakaryocytopoézového stanovení popsáno v příkladu 4. V tomto stanovení byly lidské periferální kmenové buňky (PSC) zpracovány pomocí APP před a po *mpl*-IgG afinitní chromatografii. GPII_bIII_a stimulace megakaryocytopoézy byla kvantifikována ¹²⁵I-anti-II_bIII_a protilátkou (obr. 7). Jak je ukázáno na obr. 7, 10% APP způsobuje přibližně 3-násobnou stimulaci, zatímco APP bez ligandu *mpl* nemá žádný efekt. Výrazně se projevilo, že APP bez ligandu *mpl* neindikuje proliferaci Ba/F3-*mpl* buněk.

35

40

45

V dalším experimentu lidský *mpl*-IgG přidáný ve dni 0, 2 a 4 do kultur obsahujících 10% APP neutralizoval stimulační efekty APP na lidskou megakaryocytopoézu (obr. 8). Tyto výsledky naznačují, že ligand *mpl* hraje roli v regulaci lidské megakaryocytopoézy a může být použit pro léčeni trombocytopenie.

5

2. Molekulární klonování ligandu *mpl*

Na základě amino-terminálních aminokyselinových sekvencí získaných z proteinů 30 000, 28 000 a 18–22 000 (viz tab. 2 výše) byly sestrojeny dvě skupiny degenerovaných oligonukleotidových primerů a byly použity k rozšíření vepřové genomické DNA pomocí PCR. Pokud amino-koncová aminokyselinová sekvence byla kódována jedním exonem, bylo logicky očekáváno, že správný PCR produkt bude dlouhý 69 bp. DNA fragment této velikosti byl nalezen a subklonován do pGEMT. Sekvence oligonukleotidů PCR primerů a tři získané klony jsou uvedeny v příkladu 5. Aminokyselinová sekvence (PRLLNKLLR [SEQ ID NO: 33]) peptidu kódovaného mezi PCR primery byla identická se sekvencí získanou amino-koncovým proteinovým sekvenováním vepřového ligandu (viz zbytky 9–17 pro 28 a 30 000 vepřové proteinové sekvence výše).

10

15

Syntetické oligonukleotidy založené na sekvenci PCR fragmentu byly použity ke screeningu lidské genomické DNA knihovny. 45-merový oligonukleotid, označený pR45, byl označen a syntetizován na bázi sekvence PCR fragmentu. Tento oligonukleotid má následující sekvenci:

20

5 GCC-GTG-AAG-GAC-GTG-GTC-GTC-ACG-AAG-CAG-TTT-ATT-TAG-GAG-TCG 3 (SEQ ID NO: 34)

Tento deoxyoligonukleotid byl použit ke screeningu lidské genomické DNA knihovny v Igem12 při slabě náročných hybridizačních a promývacích podmínkách podle příkladu 6. Pozitivní klony byly sebrány, plaky purifikovány a analyzovány restričním mapováním a southern blotováním. 390 bp EcoRI-XbaI fragment, který hybridizoval na 45-mer, byl subklonován do pBluescript SC-. DNA sekvenování tohoto klonu potvrdilo, že byl izolován lidský homolog vepřové DNA kódující ligand *mpl*. Lidská DNA sekvence a její vyvozená aminokyselinová sekvence jsou znázorněny na obr. 9 (SEQ ID NO: 3 a 4). Předpokládané polohy intronů v genomické sekvenci jsou označeny šípkami, a definují předpokládaný exon („exon 3“).

25

30

Na základě lidské sekvence „exonu 3“ (příklad 6) byly syntetizovány oligonukleotidy odpovídající 3 a 5 koncům exonové sekvence. Tyto dva primery byly použity k PCR reakcím a sloužily jako šablona cDNA připravené z různých lidských tkání. Očekávaná velikost správného PCR produktu byla 140 bp. Po analýzách PCR produktů na 12% polyakrylamidovém gelu byly očekávané velikosti detekovány v cDNA knihovnách připravených z lidských dospělých ledvin, 293 zárodečných ledvinových buněk a dDNA připravené z lidských zárodečných jater.

35

40

cDNA knihovna zárodečných jater (7x10⁶ klonů) v lambda DR2 byla potom podrobena screeningu se stejným 45-merovým oligonukleotidem, který byl použit ke screeningu lidské genomické knihovny a knihovny cDNA zárodečných jater za slabě náročných hybridizačních podmínek. Pozitivní klony byly sebrány, plak purifikován a velikost inzertu byla stanovena PCR. Jeden klon s 1,8 kb inzertem byl vybrán pro další analýzu. S použitím postupů popsanych v příkladu 7 byl získán nukleotid a vyvozená aminokyselinová sekvence lidského ligandu *mpl* (hML). Tyto sekvence jsou uvedeny na obr. 1 (SEQ ID NO: 1 a 2).

45

50

3. Struktura lidského ligandu *mpl* (hML)

cDNA sekvence lidského ligandu *mpl* (hML) (obr. 1 [SEQ ID NO: 2]) zahrnuje 1774 nukleotidů následovaných poly(A) prodloužením. Obsahuje 215 nukleotidů 5 netranslatované sekvence a 3 netranslatované oblasti 498 nukleotidů. Předpokládaný iniciační kodon v nukleotidové pozici (216–218) včetně sekvence příznivé pro eukaryotickou translační iniciaci. Otevřený čtecí rámec je 1059 nukleotidů dlouhý a kóduje polypeptid s 353 aminokyselinovými zbytky, začínající v po-

55

loze nukleotidu 220. N-konec vyvozené aminokyselinové sekvence je vysoce hydrofobní a pravděpodobně odpovídá signálnímu peptidu. Počítačová analýza vyvozené aminokyselinové sekvence (von Heijne a kol., Eur. J. Biochem. 133: 19–21 [1983]) ukazuje potenciální štěpné místo pro signální peptidázu mezi zbytky 21 a 22. Štěpením v této poloze by vznikl zralý polypeptid s 332 aminokyselinovými zbytky začínající amino-koncovou sekvencí získanou z ligandu *mpl* purifikovaného z vepřové plazmy. Vyvozená non-glykosylovaná molekulová hmotnost ligandu s 332 aminokyselinovými zbytky je 38 000. Má 6 potenciálních N-glykosylačních míst a 4 cysteinové zbytky.

Srovnání sekvence ligandu *mpl* se sekvencí z databáze Genové banky vykazuje 23% identitu mezi aminokoncovými 153 zbytky zralého lidského ligandu *mpl* a lidského erythropoetinu (obr. 10 [SEQ ID NO 6 a 7]). Pokud bereme v úvahu konzervativní substituce, tato oblast hML vykazuje 50% podobnost s lidským erythropoetinem (hEPO). hEPO a hML obsahují čtyři cysteiny. Tři ze čtyř cysteinu jsou v hML, včetně prvního a posledního cysteinu. Pokusy s místně cílenou mutagenézí ukázaly, že první a poslední cystein erythropoetinu tvoří disulfidovou vazbu, která je požadována pro funkci (Wang, F. F. a kol., Endocrinology 116: 2286–2292 [1983]). Analogicky první a poslední cystein hML může také tvořit rozhodující disulfidovou vazbu. Žádné z glykosylačních míst není v hML zachováno. Všechna hML N-vazebná glykosylační místa jsou lokalizována v karboxy-koncové polovině hML polypeptidu.

Podobně jako hEPO, tak hML mRNA neobsahuje shodné polyadenylační sekvence AAUAAA, ani regulační prvek AUUUA, který je přítomen v 3 netranslační oblasti mnoha cytokinů a předpokládá se, že má vliv na mRNA stabilitu (Shawet a kol., Cell, 46: 659–667 [1986]). Analýza northern blot ukázala nízké hladiny jednotlivých 1,8 kb hML RNA transkriptů u zárodečných i dospělých ledvin. Pro srovnání, lidský erythropoetin je exprimován ve fetálních játrech a, jako odpověď na hypoxii, dospělými ledvinami a játry (Jacobs a kol., Nature, 313: 804–809 [1985] a Bondurant a kol., Molec. Cell. Biol., 6: 2731–2733 [1986]).

Význam C-koncové oblasti hML zůstává k objasnění. Na základě přítomnosti šesti potenciálních míst pro N-vazebnou glykosylaci a schopnosti ligandu vázat se na lectinové afinitní kolony je zřejmé, že je tato oblast hML glykosylovaná. V některých gelových elučních pokusech jsme pozorovali aktivitu odpovídající Mr 60000, která může představovat glykosylovanou molekulu plné délky. C-koncová oblast může tedy působit stabilizačně a zvyšovat poločas cirkulace hML. V případě erythropoetinu mají neglykosylované formy plnou *in vitro* biologickou aktivitu, ale mají výrazně snížený plazmatický poločas v poměru ke glykosylovanému erythropoetinu (Takeuchi a kol., J. Biol. Chem., 265: 12127–12130 [1990], Narhi a kol., J. Biol. Chem., 266: 23022–23026 [1991] a Spivack a kol., Blood, 7: 90–99 [1989]). C-koncová doména hML obsahuje dvě dibazické aminokyselinové sekvence [Arg–Arg v polohách 153–154 a 245–246], které mohou sloužit jako potenciální funkční místa. Štěpení v těchto místech může být odpovědné za vznik 30, 28 a 18–22 000 forem ML izolovaných z APP. Je zřejmé, že se Arg₁₅₃–Arg₁₅₄ objevuje za doménou ML erythropoetinového typu. Tato pozorování znamenají, že ML plné délky může představovat prekurzor proteinu, z něhož po limitované proteolýze vzniká zralý ligand.

4. Izofomy a varianty lidského ligandu *mpl*

V lidských dospělých játrech byly pomocí PCR zjištěny izofomy nebo alternativně spojené formy lidského ligandu *mpl*. Krátce, byly syntetizovány primery odpovídající každému konci i vybraným vnitřním oblastem kódující sekvence hML. Tyto primery byly použity v RT-PCR k amplifikaci RNA lidských dospělých jater, jak je popsáno v příkladu 10. Kromě formy plné délky, nazývané hML, byly pozorovány nebo odvozeny další tři formy, nazývané hML2, hML3 a hML4. Zralá vyvozená aminokyselinová sekvence všech čtyř izoform je ukázána na obr. 11 (SEQ ID NO: 6, 8, 9 a 10). hML má 116 nukleotidovou delecí polohy 700, která způsobuje aminokyselinovou delecí i delecí čtecího rámce. cDNA nyní kóduje zralý polypeptid, který je dlouhý 265 aminokyselin a odchyluje se od hML sekvence v aminokyselinovém zbytku 139. hML4 má 12 nukleotidovou delecí, která následuje za nukleotidovou polohou 618 (která se také

nalézá u myši a prasečí sekvence [viz níže]) a 116 bp delece se nachází v hML3. Ačkoliv u člověka nebyly izolovány žádné klony s 12 bp delecí (následující po nukleotidu 619) (označené hML2), tato forma pravděpodobně existuje, protože takováto izoforma byla identifikována u myši i vepřů (viz níže), a protože byla identifikována ve spojení s 116 nukleotidovou delecí u hML4.

Aby mohlo být stanoveno, zda je k biologické aktivitě potřebná plná délka ML, byla sestrojena substituovaná varianta hML s dibazickou Arg₁₅₃--Arg₁₅₄ sekvencí nahrazenou dvěma alaninovými zbytky a forma hML se zkrácenou „EPO-doménou“. Varianta se substituovanou dibazickou sekvencí Arg₁₅₃--Arg₁₅₄, označená jako hML (R153A, R154A), byla sestrojena pomocí PCR jak je popsáno v příkladu 10. Byla také připravena „EPO-doménově“ zkrácená forma hML₁₅₃ pomocí PCR zavedením stop kodonu následujícího po Arg₁₅₃.

5. Expresse rekombinantního lidského ligandu *mpl* (rhML) v přechodně transfekovaných lidských embryonálních ledvinových (293) buňkách

Aby bylo potvrzeno, že klonovaná lidská cDNA kóduje ligand pro *mpl*, byl exprimován ligand v savčích 293 buňkách za kontroly cytomegalovirového přímého časného promotoru s použitím expresních vektorů pRK5-hML nebo pRK5-hML₁₅₃. Bylo zjištěno, že supernatant z přechodně transfekovaných lidských zárodečných ledvinových (293) buněk stimuluje ³H-thymidinovou inkorporaci v Ba/F3-*mpl* buňkách, ale ne v Ba/F3 buňkách (obr. 12A). Samotné médium z 293 buněk transfekovaných s pRK vektorem neobsahuje tuto aktivitu. Přidání *mpl*-IgG do média zrušilo stimulaci (data nejsou uvedena). Tyto výsledky ukazují, že klonovaná dDNA kóduje funkční lidský ML (hML).

Ke stanovení, zda „EPO-doména“ samotná také může vázat a aktivovat *mpl*, byla v 293 buňkách exprimována zkrácená forma hML, rhML₁₅₃. Bylo zjištěno, že supernatanty z transfekovaných buněk mají podobnou aktivitu jako supernatanty z buněk exprimujících hML plné délky (obr. 12A), což znamená, že C-koncová doména ML není pro vazbu a aktivaci c-*mpl* nutná.

6. Ligandová stimulace *mpl* megakaryocytopoézy a trombopoézy

Forma plné délky rhML i zkrácená rhML₁₅₃ forma rekombinantního hML stimulovaly lidskou megakaryocytopoézu *in vitro* (obr. 12B). Tento efekt byl pozorován v nepřítomnosti dalších exogenně přidaných hematopoetických růstových faktorů. S výjimkou IL-3 je ML jediný hematopoetický testovaný faktor, který vykazuje tuto aktivitu. IL-11, IL-6, IL-1, erythropoetin, G-CSF, IL-9, LIF, kit ligand (KL), M-CSF, OSM a GM-CSF neměli na megakaryocytopoézu žádný vliv, pokud byly testovány samostatně v našem stanovení (data nejsou uvedena). Tyto výsledky ukazují, že ML má megakaryocyty-stimulující aktivitu, a ukazují úlohu ML v regulaci megakaryocytopoézy.

Ukázalo se, že trombopoetické aktivity přítomné v plazmě trombocytopenických zvířat stimulují produkci destiček v myším revazebném trombocytózovém stanovení (McDonald, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 14: 1006-1001 [1973] a McDonald a kol., Scand. J. Haematol., 16: 326-334 [1976]). V tomto modelu byla u myši vyvolána akutní trombocytopenie s použitím specifického antideštičkového séra, jejímž výsledkem byla předpověditelná revazebná trombocytóza. Takovéto imino-trombocythemické myši nyní vykazovaly mnohem silnější odpověď na exogenní aktivity trombopoetického typu než normální myši (McDonald, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 14: 1006-1001 [1973]), stejně jako exhypoxické myši jsou citlivější na erythropoetin než normální myši (McDonald, a kol., J. Lab. Clin. Med., 77: 134-143 [1971]). Ke stanovení, zda rML stimuluje produkci destiček *in vivo*, byl myším pro revazebnou trombocytózu injektován parciálně purifikovaný rhML. Byl kvantifikován počet destiček a inkorporace ³⁵S do destiček. Injekce myši s 64000 nebo 32000 jednotkami rML signifikantně zvýšila produkci destiček, s 20% vzrůstem počtu destiček (p=0,0005 a 0,0001, respektive) a 40% vzrůstem ³⁵S inkorporace do destiček (p=0,003) u léčených myši oproti kontrolním myším, kterým byl injektován pouze excipient

(obr. 12C). Tento stupeň stimulace je srovnatelný se stupněm stimulace, který byl pozorován u IL-6 v tomto modelu (data nejsou uvedena). Léčení 16000 jednotkami rML nevykazovalo signifikantní stimulaci produkce destiček. Tyto výsledky ukazují, že ML stimuluje produkci destiček způsobem závislým na dávce a tudíž vykazuje aktivitu trombopoetinového typu.

5

293 buňky byly transfekovány s dalšími hML izoformami konstruovanými jak je popsáno výše a supernatanty byly stanoveny s použitím Ba/F3-*mpl* proliferativního stanovení (viz obr. 13). hML2 a hML3 nevykazují detekovatelnou aktivitu v tomto stanovení, ovšem aktivita hML(R153A, R154A) byla podobná jako u hML a hML153, což ukazuje, že proces na Arg¹⁵³-Arg¹⁵⁴ dibazickém místě aktivitu ani nepodmiňuje ani neruší.

10

7. Megakaryocytopoéza a ligand *mpl*

Předpokládalo se, že megakaryocytopoéza je regulována na vícenásobných buněčných úrovních (Williams a kol., J. Cell Physiol., 110: 101–104 [1982] a Williams a kol., Blood Cells, 15: 123–133 [1989]). Toto je více založeno na pozorování, že některé hematopoetické růstové faktory stimuluje proliferaci megakaryocytových progenitorů, zatímco jiné vykazují primární vliv na zrání. Zde uvedené výsledky předpokládají, že ML má vliv i na proliferaci i na zrání. Tato ML stimulace proliferace megakaryocytových progenitorů je podpořena několika druhy důkazů. Za prvé, APP stimuluje proliferaci i zrání lidských megakaryocytů *in vitro*, a tato stimulace je kompletně inhibována pomocí *mpl*-IgG (obr. 7 a 8). Dále inhibice megakaryocytové kolonové formace pomocí *c-mpl* protisměrných oligonukleotidů (Methia a kol., Blood, 82: 1395–1401 [1993]) a zjištění, že *c-mpl* může transdukovat proliferativní signál v buňkách, do kterých je transfekován (Skoda a kol., EMBO, 12: 2645–2653 [1993] a Vigon a kol., Oncogene, 8: 2607–1615 [1993]) také ukazují, že ML stimuluje proliferaci. Zjevná exprese *c-mpl* během všech stupňů megakaryocytické diferenciaci (Methia a kol., Blood, 82: 1395–1401 [1993]) a schopnost rekombinantní ML výrazně stimulovat produkci destiček *in vivo* ukazuje, že ML také ovlivňuje zrání. Dostupnost ML poskytuje možnost pečlivého zhodnocení jeho úlohy v regulaci megakaryocytopoézy a trombopoézy, stejně jako jeho schopnosti ovlivňovat další hematopoetické kmeny.

15

20

25

30

8. Izolace genu lidského ligandu *mpl* (TPO)

Klony lidské genomické DNA TPO genu byly izolovány screeningem lidské genomické knihovny v I-Gem12 s pR45, za málo přísných podmínek nebo za vysoce náročných podmínek s fragmentem, který odpovídá 3 polovině lidské cDNA kódující ligand *mpl*. Byly izolovány přesahující lambda klony s rozsahem 35 kb. Přesahující fragmenty (BamH1 a EcoRI) obsahující celý TPO gen byly subklonovány a sekvenovány (obr. 14A, 14B a 14C).

35

Struktura lidského genu je kromě 7 kb genomické DNA složena z 6 exonů. Hranice všech spojení exon/intron jsou shodné s takovými prvky, které byly objeveny v savčích genech (Shapiro, M. B. a kol., Nucl. Acids Res. 15: 7155 [1987]). Exon 1 a exon 2 obsahují 5 netranslatované sekvence a počáteční čtyři aminokyseliny signálního peptidu. Zbytek sekretorického signálu a prvních 26 aminokyselin zralého proteinu jsou kódovány v exonu 3. Celá karboxylová doména a 3 netranslatované sekvence stejně jako přibližně 50 aminokyselin domény erythropoetinového typu jsou kódovány v exonu 6. Čtyři aminokyseliny postihnuté delecí pozorovanou u hML-2 (hTPO-2) jsou kódovány na 5 konci exonu 6.

40

45

Analýza lidské genomické DNA pomocí Southern blotu a ukázala, že gen pro TPO je přítomen v jedné kopii. Chromozomální lokalizace genu byla stanovena fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH), která mapovala chromozom 3q27–28.

50

9. Exprese a purifikace TPO z 293 buněk

Preparace a purifikace ML nebo TPO z 293 buněk je detailně popsána v příkladu 19. Krátce, cDNA odpovídající TPO úplnému otevřenému čtecímu rámci byla získána pomocí PCR s použi-

55

tím pRK5-*hmpl* I. Produkt PCR byl purifikován a klonován mezi restrikčními místy ClaI a XbaI plazmidu pRK5tkneo (pRK5 odvozeného vektoru modifikovaného pro expresi genu rezistentního na neomycin za kontroly thymidin kinázové podpory) za získání vektoru pRK5tkneo. ORF (vektor kódující úplný otevřený čtecí rámeček).

5

Druhý vektor kódující EPO homologní doménu byl připraven stejně, ale s použitím jiných PCR primerů, aby byl získán konečný produkt nazývaný pRK5-tkneoEPO-D.

10 Tyto dva konstrukty byly transfekovány do buněk lidských embryonálních ledvin metodou CaPO₄ a neomycin-rezistentní klony byly selektovány a byly ponechány růst. U těchto klonů byla stanovena exprese ML₁₅₃ nebo ML₃₃₂ v obohaceném médiu pomocí Ba/F3-*mpl* proliferativního stanovení.

15 Purifikace rhML₃₃₂ byla provedena jak je popsáno v příkladu 19. Krátce, 293-rhML332 obohacené médium bylo nanášeno na kolonu Blue-Sepharose (Pharmacia), která byla následně promyta pufrům obsahujícím 2M močoviny. Kolona byla eluována pufrům obsahujícím 2M močoviny a 1M NaCl. Eluát z Blue-Sepharose byl přímo nanášen na kolonu WGA-Sepharose, promytou desetinásobkem objemu kolony pufru obsahujícího 2M močoviny a 1M NaCl, a eluován stejným pufrům obsahujícím 0,5M N-acetyl-D-glukosamin. WGA-Sepharose eluát byl nanášen na kolonu C4-HPLC (Synchrom, Inc.) a eluován diskontinuálním propanolovým gradientem. Pomocí SDS-PAGE purifikovaný 293-rhML₃₃₂ migroval jako široký pás v oblasti gelu 68–80 000 (viz obr. 15).

25 Purifikace rhML₁₅₃ byla také provedena jak je popsáno v příkladu 19. Krátce, médium obohacené 203-rhML₁₅₃ bylo analyzováno na Blue-Sepharose jak je uvedeno pro rhML₃₃₂. Blue-Sepharose eluát byl nanášen přímo na *mpl*-afinitní kolonu jak je popsáno výše. RhML₁₅₃ eluovaný z *mpl*-afinitní kolony byl purifikován za účelem homogenizace s použitím C4-HPLC kolony za stejných podmínek, které byly použity pro rhML₃₃₂. Při SDS-PAGE se purifikovaný rhML₁₅₃ rozdělil na 2 hlavní a 2 menší pásy s Mr 18000–22000 (viz obr. 15).

30

10. Myší ligand *mpl*

Pomocí PCL byl získán DNA fragment odpovídající kódující oblasti lidského ligandu *mpl*, gel byl purifikován a značen v přítomnosti ³²P-dATP a ³²P-dCTP. Tento test byl použit ke screeningu 10⁶ klonů cDNA knihovny myších jater v IGT10. Byl izolován a sekvenován myší klon (obr. 16 [SEQ ID NO: 16 a 13]) obsahující inzert s 1443 páry bází. Předpokládáný iniciační kodon na nukleotidové pozici 138–141 byl v souladu se sekvencí příznivou pro eukaryotickou translační iniciaci (Kozak, M. J. Cell Biol., 108: 229–241 [1989]). Tuto sekvenci definuje otevřený čtecí rámeček 1056 nukleotidů, které napovídají, že primární produkt bude mít 352 aminokyselin. Tento otevřený čtecí rámeček lemuje 137 nukleotidů 5 netranslatované sekvence a 247 nukleotidů 3 netranslatované sekvence. Není tam žádné poly(A) prodloužení za 3 netranslatovanou oblastí, které by znamenalo, že klon je pravděpodobně nekompletní. N-konec předpokládané aminokyselinové sekvence je vysoce hydrofobní a pravděpodobně představuje signální peptid. Počítačová analýza (von Heijne, G. Eur. J. Biochem. 133: 17–21 [1983]) ukázala potenciální štěpná místa pro signální peptidázu mezi zbytky 21 a 22. Štěpením v tomto místě vznikne zralý polypeptid s 331 aminokyselinami (35 000) identifikovaný jako mML₃₃₁ (nebo mML2 z důvodu popsaných níže). Sekvence obsahuje 4 cysteiny, všechny zachované v lidské sekvenci, a sedm potenciálních N-glykosylačních míst, 5 z nich je zachováno v lidské sekvenci. Znovu, stejně jako hML, všech sedm potenciálních N-glykosylačních míst je lokalizováno na C-koncové polovině proteinu.

50

Ve srovnání s lidskou ML, byla u nukleotidů i aminokyselinových sekvencí pozorována značná identita v „EPO-doménách“ těchto ML. Avšak pokud dáme vyvozené aminokyselinové sekvence lidské a myší ML vedle sebe, myší sekvence vykazuje tetrapeptidovou delecí mezi zbytky 111–114 odpovídající 12 nukleotidové delecí, která následuje za nukleotidovou polohou 618, pozorovanou u lidské (viz výše) a vepřové (viz níže) cDNA. Proto byly zkoumány další klony, aby byly

55

nalezeny další možné izoformy ML. Jeden klon kódoval polypeptid s vyvozenou sekvencí 335 aminokyselin obsahující „chybějící“ tetrapeptid LPLQ. Předpokládá se, že tato forma je myší ML plné délky a označuje se jako mML nebo mML₃₃₅. Nukleotidová a vyvozená aminokyselinová sekvence mML je uvedena na obr. 17 (SEQ ID NO: 14 a 15). Tato cDNA klon se skládá z 1443 párů bází následovaných poly(A) zakončením. Má otevřený čtecí rámeček 1068 bp lemovaný 134 bázemi 5 netranslatované sekvence a 241 bázemi 3 netranslatované sekvence. Vyvozený iniciační kodon leží v poloze nukleotidů 138–140. Otevřený čtecí rámeček kóduje vyvozený protein o 356 aminokyselinách, prvních 21 z nich je vysoce hydrofobní a pravděpodobně funguje jako sekreční signál.

Nakonec byl izolován třetí myší klon, byl sekvenován a bylo zjištěno, že obsahuje delecí 116 nukleotidů odpovídající hML3. Tato myší izoforma je proto nazvána mML3. Srovnání vyvozené aminokyselinové sekvence těchto dvou izoform je ukázána na obr. 18 (SEQ ID NO: 9 a 16).

Celková aminokyselinová sekvenční identita mezi lidskou a myší ML [obr. 19 SEQ ID NO: 6 a 17]) je 72%, ale homologie není rozložena pravidelně. Oblast definovaná jako „EPO-doména“ (aminokyseliny 1–153 pro lidskou sekvenci a 1–149 pro myší) je lépe zachována (86% homologie) než karboxy-koncová oblast proteinu (62% homologie). Toto může dále znamenat, že EPO-doména“ je důležitá pro biologickou aktivitu proteinu. Je zajímavé, že z di-bazických aminokyselinových prvků nacházejících se v hML, pouze di-bazický prvek následující ihned po „EPO-doméně“ (zbytek v poloze 153–154) v lidské sekvenci je přítomen v myší sekvenci. Je to v souladu s možností, že ML plné délky představuje prekurzor proteinu, který podléhá limitované proteolýze za vzniku zralého ligandu. Eventuálně proteolýza mezi Arg₁₅₃–Arg₁₅₄ může napomáhat vyčištění ML.

Expresní vektor obsahující úplnou kódující sekvenci mML byl přechodně transfekován do 293 buněk jak je popsáno v příkladu 1. Obohacené médium těchto buněk stimulovalo ³H-thymidinovou inkorporaci do Ba/F3 buněk exprimujících buď myší nebo lidský *mpl*, ale nemá vliv na parentální (bez *mpl*) buněčnou linii. To znamená, že klonovaná myší ML cDNA kóduje funkční ligand, který je schopen aktivovat myší i lidský ML receptor (*mpl*).

11. Vepřový ligand *mpl*

Byla izolována vepřová ML (pML) cDNA pomocí RACE PCR jak je popsáno v příkladu 13. V ledvinách byl nalezen produkt PCR 1342 bp cDNA a byl subklonován. Některé klony byly sekvenovány a nalezen klon, který kóduje vepřový ligand *mpl* s 332 aminokyselinovými zbytky označený jako pML (nebo pML₃₃₂) mající nukleotidovou a vyvozenou aminokyselinovou sekvenci zobrazenou na obr. 20 (SEQ ID NO: 18 a 29).

Opět byla identifikována druhá forma, označená jako pML2, kódující protein s delecí 4 aminokyselinových zbytků (228 aminokyselinových zbytků) (viz obr. 21 [SEQ ID NO: 21]). Srovnání aminokyselinové sekvence pML a pML2 ukázalo, že pML2 je identický kromě tetrapeptidu QLPP odpovídajícího zbytkům 111–114, které zahrnuje delecí (viz obr. 22 [SEQ ID NO: 18 a 21]). Delecí čtyř aminokyselin pozorovaná u myší i vepřové ML cDNA se vyskytuje v přesně stejné poloze vyvozených proteinů.

Srovnání vyvozených aminokyselinových sekvencí zralého ML u člověka, myši a vepře (obr. 19 [SEQ ID NO: 6, 17 a 18]) ukazuje, že celková sekvenční identita je 72 procent mezi myší a lidskou, 68 procent mezi myší a vepřovou a 73 procent mezi vepřovou a lidskou. Homologie je prakticky větší v amino-koncové polovině ML (EPO homologní doména). Tato doména je identická mezi dvěma druhy v 80 až 84 procentech, zatímco karboxy-koncová polovina (uhlovodíková doména) je identická pouze od 57 do 67 %. Dibazický aminokyselinový prvek, který by mohl představovat proteázové štěpné místo, je přítomen na karboxylovém konci erythropoetinové homologní domény. Tento prvek je zachován mezi třemi druhy v této poloze (obr. 19 [SEQ ID NO: 6, 17 a 18]). Druhé dibazické místo přítomné v polohách 245 a 246 v lidské sekvenci není

přítomno v myši nebo vepřové sekvenci. Myší a vepřové ML sekvence obsahují 4 cysteiny, všechny zachované v lidské sekvenci. Existuje sedm potenciálních N-glykosylačních míst v myším ligandu a šest ve vepřovém ML, 5 z nich je zachováno v lidské sekvenci. Opět všechna potenciální N-glykosylační místa jsou lokalizována v C-koncové polovině proteinu.

5

12. Exprese a purifikace TPO z buněk vaječnicků čínských křečků (Chinese Hamster Ovary) (CHO)

10 Expresní vektory použité k transfekci CHO buněk jsou označeny: pSVI5.ID.LL.MLORF (plné délky nebo TPO₃₃₂), a pSVI5.ID.LL.MLEPO-D (zkrácený nebo TPO₁₅₃). Související znaky těchto plazmidů jsou uvedeny na obr. 23 a 24.

15 Transfekční postup byl proveden jak je popsáno v příkladu 20. Krátce, cDNA odpovídající úplnému otevřenému čtecímu rámci TPO byla získána pomocí PCR. Produkt PCR byl purifikován a klonován mezi dvěma restrikčními místy (ClaI a SalI) plazmidu pSVI5.ID.LL, aby byl získán vektor pSVI5.ID.LL.MLORF. Druhý konstrukt odpovídající EPO homologní doméně byl připraven stejným způsobem, ale s použitím jiného reverzního primeru (EPOD.SalI). Konečný konstrukt pro vektor kódující EPO homologní doménu TPO je nazýván pSVI5.ID.LL.MLEPO-D.

20 Tyto dva konstrukty byly linearizovány s NotI a transfekovány do buněk vaječnicků čínského křečka (CHO-DP12 buňky, EP 307 247 publikovaný 15. března 1989) elektroporací. 10⁷ buněk bylo elektroporováno v BRL elektroporační aparatuře (360 voltů, 330 mF, nízká kapacitance) v přítomnosti 10, 25 nebo 50 mg DNA jak je popsáno (Andreason, G. L. J. Tissue Cult. Meth. 15,56 [1993]). Den po transfekci byly buňky rozrušeny v selektivním médiu (vysoce glukózové DMEM-F12 50:50 bez glycinu, 2mM glutamin, 2-5% dialyzované fetální telecí sérum). O 10 až 25 15 dní později byly jednotlivé kolonie přeneseny na 96-jamkové destičky a ponechány růst až vznikly shluky. Exprese ML₁₅₃ nebo ML₃₃₂ v obohaceném médiu z těchto klonů byla stanovena s použitím Ba/F3-*mpl* proliferativního stanovení (popsáno v příkladu 1).

30 Postup purifikace a izolace TPO z tekutiny vypěstovaných CHO buněčných kultur je popsán v příkladu 20. Krátce, tekutina vypěstovaných buněk kultury (HCCF) je nanášena na kolonu Blue Sepharose (Pharmacia) v poměru přibližně 100 l HCCF na litr pryskyřice. Kolona je poté promyta pufrům obsahujícím 2,0M močoviny, množstvím 3 až 5 násobným objemu kolony. TPO je poté eluován pufrům obsahujícím 2,0M močoviny a 1,0M NaCl, množstvím 3 až 5 násobným 35 objemu kolony.

40 Eluát z Blue Sepharose obsahující TPO je pak nanášen na kolonu Wheat Germ Lectin Sepharose (Pharmacia) ekvilibrovanou elučním pufrům Blue Sepharose v poměru od 8 do 16 ml eluátu Blue Sepharose na ml pryskyřice. Kolona je poté promyta 2 až 3 objemy kolony ekvilibračního pufru. TPO je poté eluován 2 až 5 objemy kolony pufru obsahujícího 2,0M močoviny a 0,5M N-acetyl-D-glukosaminu.

45 Wheat Germ Lectin eluát obsahující TPO je poté okyselen a je přidán C₁₂E₈ do celkové koncentrace 0,04 %. Výsledný eluát je nanášen na C4 kolonu s reverzní fází ekvilibrovanou 0,1% TFA, 0,04% C₁₂E₈ při naplnění 0,2 až 0,5 mg proteinu na ml pryskyřice.

Protein je eluován dvoufázovým lineárním gradientem acetonitrilu obsahujícím 0,1% TFA a 0,04% C₁₂E₈ a eluát rozdělen na SDS-PAGE.

50 C4 eluát byl poté zředěn a diafiltrován proti přibližně 6 objemům pufru na Amiconu YM nebo ultrafiltrační membránou s hranicí molekulární hmotnosti 10000 až 30000. Výsledný diafiltrát může být zpracován přímo, nebo dále koncentrován ultrafiltrací. Diafiltrát/konzentrát je obvykle upraven na výslednou koncentraci 0,01 % Tween-80.

Všechny nebo část diafiltrátu/ultrafiltrátu odpovídající 2 až 5 % vypočítaného objemu kolony byly naneseny na Sephacryl S-300 HR kolonu (Pharmacia) ekvilibrovanou pufrům obsahujícím 0,01% Tween-80 a chromatografován. Frakce obsahující TPO, ve kterých nejsou shluky a produkty proteolytické degradace, byly poté rozděleny na SDS-PAGE, zfiltrány a skladovány při 2-8 °C.

13. Způsob transformace a indukce syntézy TPO v mikroorganismu a izolace, purifikace a znovusvinutí takto připraveného TPO

Konstrukce *E. coli* TPO expresních vektorů je detailně popsána v příkladu 21. Krátce, plazmidy pMP21, pMP151, pMP41, pMP57 a pMP202 byly všechny konstruovány pro expresi prvních 155 aminokyselin TPO po směru malého leaderu, který se liší mezi různými konstrukty. Leadery zajišťují zejména vysoký stupeň translační iniciace a rychlou purifikaci. Plazmidy pMP210-1, -T8, -21, -22, -24, -25 jsou konstruovány pro expresi prvních 153 aminokyselin TPO po směru iniciačního methioninu a liší se pouze v použití kodonu pro prvních 6 aminokyselin v TPO, zatímco plazmid pMP251 je derivátem pMP210-1 v kterém je karboxy-koncový konec TPO prodloužen o dvě aminokyseliny. Všechny výše uvedené plazmidy budou produkovat vysoké hladiny intracelulární exprese TPO v *E. coli* za indukce tryptofanového promotoru (Yansura, D. G. a kol., *Methods in Enzymology* (Goeddel, D. V., editor) 185: 54-60, Academic Press, San Diego [1990]). Plazmidy pMP₁₇₂ jsou meziproducty při konstrukci výše uvedených TPO intracelulárních expresních plazmidů.

Výše uvedené TPO expresní plazmidy byly použity k transformaci *E. coli* s použitím CaCl₂ tepelné šokové metody (Mandel, M. a kol., *J. Mol. Biol.*, 53: 159-162, [1970]) a dalších postupů uvedených v příkladu 21. Krátce, transformované buňky byly pěstovány při 37 °C za optické hustoty (600nm) kultury dosahující přibližně 2 až 3. Kultura byla poté naředěna a, po růstu s provzdušňováním, byla přidána kyselina. Kultura byla poté ponechána znovu růst se vzdušněním dalších 15 hod. a po této době byly buňky odděleny centrifugací.

Izolační, purifikační a znovusvinovací postupy uvedené níže pro získání biologicky aktivního, znovusvinutého TPO nebo jeho fragmentů, jsou popsány v příkladu 22 a 23, mohou být aplikovány pro získání jakékoliv TPO varianty včetně N- a C-koncových prodloužených forem. Další postupy vhodné pro znovusvinutí rekombinantního nebo syntetického TPO mohou být nalezeny v následujících patentech; Builder a kol., US 4 511 502; Jones a kol., US 4 512 922; Olson US 4 518 526 a Builder a kol., US 4 620 948; jako obecný popis postupu získání a znovusvinutí pro různé rekombinantní proteiny exprimované v rozpustné formě v *E. coli*.

A. Znovuzískání nerozpustného TPO

Mikroorganismus jako je *E. coli* exprimující TPO kódovaný jakýmkoliv vhodným plazmidem je fermentován za podmínek při kterých je TPO uložen do nerozpustných „refraktivních částic“. Nepovinně jsou buňky nejprve promyty v buňky rozrušujícím pufru. Obvykle je 100 g buněk resuspendováno v desetinásobném objemu buňky rozrušujícího pufru (např. 10mM Tris, 5mM EDTA, pH 8) s, například, Polytron homogenizérem a buňky jsou centrifugovány při 5000xg 30 min. Buňky jsou poté lýzovány s použitím obvyklých technik, jako je tonický šok, ultrazvuk, tlakový cyklus, chemické nebo enzymatické metody. Například promyté buněčné pelety mohou být resuspendovány v dalším desetinásobku objemu buňky rozrušujícího pufru s homogenizérem a buněčná suspenze protlačena přes LH buněčný rozrušovač (Cell Disrupter, LH Inceltech, Inc.) nebo přes mikrofluidizér (Microfluidics International) podle komerčního návodu. Hmota obsahující TPO je poté separována z kapalně fáze a nepovinně promyta vhodnou kapalinou. Například suspenze buněk může být centrifugována při 5000xg 30 min., resuspendována a nepovinně centrifugována podruhé za vzniku promytých pelet refraktivních částic. Promyté pelety mohou být použity ihned nebo nepovinně skladovány zmražené (při -70 °C).

B. Solubilizace a purifikace monomerního TPO

Nerozpuštěný TPO v peletách refraktilních částic je poté solubilizován solubilizačním pufrům. Solubilizační pufr obsahuje chaotropní agens a je obvykle pufrován při bazickém pH a obsahuje redukční agens ke zlepšení výtěžku monomerního TPO. Představitelem chaotropního agens je močovina, guanidin.HCl a thiokyanát sodný. Výhodným chaotropním agens je guanidin.HCl. Koncentrace chaotropního agens je obvykle 4–9M, výhodněji 6–8M. pH solubilizačního roztoku je zajištěno vhodným pufrům v rozmezí pH od 7,5 do 9,5, výhodněji 8,0–9,0 a nejvýhodněji 8,0. Solubilizační pufr také výhodněji obsahuje redukční agens napomáhající vzniku monomerní formy TPO. Vhodné redukční agens je organická sloučenina obsahující volný thiol (RSH). Představitelem redukčního agens je dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE), merkaptoethanol, glutathion (GSH), cysteamin a cystein. Výhodným redukčním činidlem je dithiothreitol (DTT). Nepovinně může solubilizační pufr obsahovat mírné oxidační agens (např. molekulární kyslík) a siřičitanovou sůl tvořící monomerní TPO sulfitolýzou. V tomto provedení je výsledný TPO–S–sulfonát později znovusvinut v přítomnosti redoxního pufru (např. GSH/GSSG) na vzniku správně svinutého TPO.

TPO protein je obvykle dále purifikován s použitím např. centrifugace, gelové filtrační chromatografie a kolonové chromatografie s reverzní fází.

Pro ilustraci, vhodný výtěžek monomerního TPO byl získán následujícím postupem. Pelety refraktilních částic byly resuspendovány v 5 objemech hmotnosti solubilizačního pufru (20 mM Tris, pH 8, s 6–8M guanidin a 25mM DTT) a míchány 1–3 hodiny, nebo přes noc, při 4 °C, aby byla úspěšná solubilizace TPO proteinu. Vysoké koncentrace močoviny (6–8M) jsou také účinné, ale celkový výsledek ukazuje poněkud nižší výtěžky ve srovnání s guanidinem. Po solubilizaci je roztok centrifugován při 30000xg 30 min. za vzniku čistého supernatantu obsahujícího denaturovaný, monomerní TPO protein. Supernatant je poté chromatografován na Superdex 200 gelové filtrační koloně (Pharmacia, 2,6 x 60 cm) při průtoku 2 ml/min a protein eluován 20 mM Na fosfátem, pH 6,0, s 10mM DTT. Byly shromážděny frakce obsahující monomerní denaturovaný TPO protein eluovaný mezi 160 a 200 ml. TPO protein je dále purifikován na semi–preparativní koloně s reverzní fází C4 (2 x 20 cm VYDAC). Vzorek byl aplikován při 5 ml/min na kolonu ekvilibrovanou 0,1% TFA (kyselina trifluoroctová) s 30 % acetonitrilu. Protein je eluován lineárním gradientem acetonitrilu (30 – 60 % v 60 min). Purifikovaný redukovaný protein eluuje při 50 % acetonitrilu. Tento materiál je použit pro znovusvinutí za získání biologicky aktivní varianty TPO.

C. Znovusvinutí TPO na vzniku biologicky aktivní formy

Po solubilizaci a další purifikaci TPO je získána biologicky aktivní forma znovusvinutím denaturovaného monomerního TPO v redoxním pufru. Z důvodu vysoké účinnosti TPO (polovina maximální stimulace v Ba/F3 vazebném stanovení je dosažena při 3 pg/ml) je možné k získání biologicky aktivního materiálu použít mnoho různých pufru, detergentů a redoxních podmínek. Ovšem za mnoha podmínek je získáno velmi malé množství správně svinutého materiálu (<10 %). Pro komerční průmyslové způsoby přípravy je požadován výtěžek znovusvinutí nejméně 10 %, výhodněji 30–50 % a nejvýhodněji >50 %. Pro produkci nejméně takto svinutého materiálu bylo nalezeno mnoho různých detergentů zahrnujících Triton X–100, dodecyl–beta–maltozid, CHAPS, CHAPSO, SDS, sarkosyl, TWEEN 20 a Tween 80, Zwittergent 3–14 a další. Z těchto detergentů byly ovšem nejvýhodnější detergenty ze skupiny CHAPS (CHAPS a CHAPSO), u kterých bylo zjištěno, že znovusvinovací reakce probíhá nejlépe a omezuje proteinovou agregaci a nevhodné disulfidové formace. Nejvýhodnější je hladina CHAPS vyšší než 1 %. Pro lepší výtěžek byl potřebný chlorid sodný, s optimální hladinou mezi 0,1M a 0,5 M. V redoxním pufru byla preferována přítomnost EDTA (1–5mM) kvůli omezení rozsahu kovem katalyzované oxidace (a agregace), která byla pozorována u některých preparací. Optimální podmínky pro znovusvinutí jsou při koncentraci glycerolu větší než 15 %. Pro maximální výtěžek je nezbytné mít v redoxním pufru redoxní pár skládající se z oxidovaného i redukovaného organického thiolu

(RSH). Vhodný redoxní pár zahrnuje merkaptoethanol, glutathion (GSH), cysteamin, cystein a jejich odpovídající oxidované formy. Výhodným redoxním párem je glutathion(GSH):oxidovaný glutathion(GSSG) nebo cystein:cystin. Nejvýhodnějším redoxním párem je glutathion(GSH):oxidovaný glutathion(GSSG). Obecně vyšší výtěžek je pozorován pokud molární poměr oxidovaného členu redoxního páru je stejný nebo v přebytku proti redukovanému členu redoxního páru. Pro znovusvinutí této varianty TPO jsou optimální pH hodnoty mezi 7,5 a 9. Organické rozpouštědlo (např. ethanol, acetonitril, methanol) bylo tolerováno v koncentracích 10–15 % nebo nižších. Vyšší hladiny organických rozpouštědel zvyšují množství nesprávně svinutých forem. Tris a fosfátové pufrы byly obecně použitelné. Inkubace při 4 °C také zvyšuje hladiny správně svinutého TPO.

Výtěžek znovusvinutí 40–60% (na základě množství redukovaného a denaturovaného TPO použitého v znovusvinovací reakci) je typický pro preparace TPO, kde purifikace probíhá přes první C4 krok. Aktivní materiál může být získán i při omezení purifikační preparace (např. přímo po Superdex 200 koloně nebo po úvodní extrakci refraktilních částic), ovšem výtěžky jsou nižší kvůli rozsáhlé precipitaci a interferenci s non-TPO proteiny během TPO znovusvinovacího procesu.

Zatímco TPO obsahuje 4 cysteinové zbytky, je možné připravit tři různé disulfidové verze tohoto proteinu:

verze 1: disulfidy mezi cysteinovými zbytky 1–4 a 2–3,

verze 2: disulfidy mezi cysteinovými zbytky 1–2 a 3–4,

verze 3: disulfidy mezi cysteinovými zbytky 1–3 a 2–4.

Během počátečních pokusů při stanovení podmínek znovusvinovací reakce, bylo C4 chromatografií s reverzní fází separováno několik různých píků obsahujících TPO protein. Pouze jeden z těchto píků měl signifikantní biologickou aktivitu, jak bylo stanoveno Ba/F3 stanovením. Následně byly svinovací podmínky optimalizovány za přednostního zisku této verze. Za těchto podmínek bylo v solubilizačním kroku získáno méně než 10–20 % chybně svinutého TPO z celkového monomerního TPO.

Hmotnostní spektrometrií a sekvenováním proteinu byl jako disulfidový vzor pro biologicky aktivní TPO stanoven 1–4 a 2–3, kde jsou cysteiny číslovány sekvenčně od amino-konce. Tento cysteinem křížově vázaný vzor je v souladu se známým disulfidovým vazebným vzorem odpovídajícím molekule erythropoetinu.

40 D. Biologická aktivita rekombinantního, znovusvinutého TPO

Znovusvinutý a purifikovaný TPO má aktivitu ve stanoveních *in vitro* i *in vivo*. Např. v Ba/F3 stanovení, byla polovina maximální stimulace thymidinové inkorporace do Ba/F3 buněk pro TPO (Met^{-1} 1–153) zjištěna při 3,3 pg/ml (0,3 pM). V testu ELISA založeným na *mpl*-receptoru byla polovina maximální aktivity pozorována při 1,9 ng/ml (120 pM). U normálních a myelosuprimovaných zvířat připravených téměř letální X–radiací, byla znovusvinutí TPO (Met^{-1} 1–153) vysoce účinná (aktivita byla pozorována při dávce nižší než 30 ng/myš) při stimulaci produkce nových destiček. Podobná biologická aktivita byla pozorována u ostatních forem TPO znovusvinutých podle výše popsaných postupů (viz obr. 25, 26 a 28).

50 14. Způsob měření trombopoetické aktivity

Trombopoetická aktivita může být měřena různými stanoveními, které zahrnují ligandové stanovení Ba/F3 *mpl* popsané v příkladu 1, *in vivo* myši destičkové revazebné syntézové stanovení, stanovení indukce antigenu buněčného povrchu destiček a měření antideštičkového stanovení

(anti-GPII_bIII_a) buněčné linii lidských leukemických megakaryoblastů (CMK) (viz Sato a kol., Brit. J. Haematol., 72: 184–190 [1989]) (viz také kapalné suspenzní megakaryocytopoetické stanovení popsané v příkladu 4), a indukci polyploidizace v megakaryoblastické buněčné linii (DAMI) (viz Ogura a kol., Blood, 72(1): 49–60 [1988]). Zrání megakaryocytů z nezralých, většinou DNA nesyntetizujících buněk, na morfologicky identifikovatelné megakaryocyty představuje proces, který zahrnuje objevení se cytoplazmických organel, získání membránových antigenů (GPII_bIII_a), endoreplikaci a uvolnění destiček, jak je popsáno v oddílu Dosavadní stav techniky. Očekává se, že kmenově specifický promotor (tj. ligand *mpl*) megakaryocytového zrání bude indukovat nejméně některé z těchto změn v nezralých megakaryocytech vedoucí k uvolnění destiček a zmírnění trombocytopenie. Zde byla tedy navržena stanovení pro měření změn těchto parametrů v nezralých megakaryocytových buněčných liniích, tj. CMK a DAMI buňkách. CMK stanovení (příklad 4) měří výskyt specifického destičkového markeru, GPII_bIII_a, a produkci destiček. DAMI stanovení (příklad 15) měří endoreplikaci protože zvýšení ploidity je znakem zralosti megakaryocytů. Rozpoznatelné megakaryocyty mají hodnoty ploidity 2N, 4N, 8N, 16N, 32N atd. Nakonec *in vivo* myši destičkové revazebné stanovení (příklad 16) je užitečné při demonstraci, že podávání testované sloučeniny (zde ligandu *mpl*) vede ke zvýšení počtu destiček.

Pro měření TPO aktivity byla vyvinuta dvě další *in vitro* stanovení. První je kinázová receptorová aktivační (KIRA) ELISA, kdy jsou CHO buňky transfekovány *mpl*-Rse chimérou a pomocí ELISA je měřena tyrosinová fosforylace Rse po působení *mpl* části chiméry na ligand *mpl* (viz příklad 17). Druhý je na receptoru založená ELISA, kde ELISA destička pokrytá králičím anti-lidským IgG zachycuje lidský chimérický receptor *mpl*-IgG, který váže *mpl* stanovovaný ligand. K detekci navázaného ligandu se používá biotinylovaná králičí protilátka k ligandu *mpl* (TPO₁₅₅) a měří se s použitím streptavidin-peroxidázy jak je popsáno v příkladu 18.

15. *In vivo* biologická odpověď normálních a subletálně ozářených myši léčených TPO

Normální a subletálně ozářené myši byly léčeny TPO plné délky a zkráceným TPO, izolovaným z buněk vaječníků čínských křečků (CHO), *E. coli* a buněk lidských zárodečných ledvin (293). Obě formy TPO produkované těmito třemi hostiteli stimulovaly produkci destiček u myši, avšak TPO plné délky izolovaný z CHO vykazoval největší *in vivo* odpověď. Tyto výsledky ukazují, že správná glykosylace karboxy-koncové domény může být nutná pro optimální *in vivo* aktivitu.

a) *E. coli*-rhTPO_(MET⁻¹, 153)

„Met“ forma EPO domény (Met v -1 poloze plus prvních 153 zbytků lidského TPO) produkovaná v *E. coli* (viz příklad 23) byla injektována denně do normální myši samice C57 B6 jak je popsáno v legendě k obr. 25A, 25B a 25C. Tyto obrázky ukazují, že neglykosylovaná zkrácená forma TPO produkovaná v *E. coli* a znovusvinutá jak je popsáno výše je schopná stimulovat dvojnásobné zvýšení produkce destiček u normální myši bez ovlivnění populací červených nebo bílých krevních buněk.

Stejná molekula injektovaná denně do subletálně ozářené (¹³⁷Cs) normální myši samice C57 B6 jak je popsáno v legendě k obr. 26a, 26B a 26C stimulovala regeneraci destiček a snížila spodní hranici, ale neměla vliv na erytrocyty nebo leukocyty.

b) CHO-rhTPO₃₃₂

TPO plné délky produkovaný v CHO a injektovaný denně do normální myši samice C57 B6 jak je popsáno v legendě k obr. 27A, 27B a 27C působí pětinašobné zvýšení produkce destiček u normální myši bez vlivu na populaci erytrocytů nebo leukocytů.

c) CHO–rhTPO₃₃₂; *E. coli*–rhTPO_(Met-1, 153); 293–rhTPO₃₃₂; a *E. coli*–rhTPO₁₅₅

5 Křivka dávkové odpovědi byla konstruována pro léčení normální myši rhTPO z různých buněčných linií (CHO–rhTPO₃₃₂; *E. coli*–rhTPO_(Met-1, 153); 293–rhTPO₃₃₂; a *E. coli*–rhTPO₁₅₅) jak je popsáno v legendě k obr. 28. Tento obrázek ukazuje, že všechny testované formy molekuly stimulují produkci destiček, avšak forma plné délky produkovaná v CHO vykazovala nejvyšší *in vivo* aktivitu.

10 d) CHO–rhTPO₁₅₃, CHO–rhTPO^{„zkrácený“} a CHO–rhTPO₃₃₂

15 Křivka dávkové odpovědi byla konstruována pro léčení normální myši rhTPO produkovaným v CHO (CHO–rhTPO₁₅₃, CHO–rhTPO^{„zkrácený“} a CHO–rhTPO₃₃₂) jak je popsáno v legendě obr. 29. Tento obrázek ukazuje, že všechny testované CHO formy molekuly stimulují produkci destiček, avšak forma plné délky 70 000 má největší *in vivo* aktivitu.

16. Obecná rekombinantní preparace ligandu *mpl* a variant

20 Výhodně je ligand *mpl* připraven standardními rekombinantními postupy, které zahrnují produkci ligandového polypeptidu *mpl* kultivací buněk transfekovaných aby exprimovaly nukleovou kyselinu ligandu *mpl* (obvykle transformací buněk s expresním vektorem) a získání polypeptidu z buněk. Avšak je nejasné, zda může být ligand *mpl* produkován homologní rekombinací, nebo produkcí rekombinantními metodami používajícími kontrolní prvky zavedené do buněk již obsahujících DNA kódující ligand *mpl*. Např. do genomu určené hostitelské buňky může být ve vhodné vzdálenosti a ve vhodné orientaci vložen silný promotor/urychlovací prvek, supresor nebo exogenní transkripci ovlivňující prvek pro ovlivnění transkripce DNA kódující požadovaný ligandový polypeptid *mpl*. Kontrolní prvek nekóduje ligand *mpl* a spíše než DNA je pro genom hostitelské buňky indigenní. Dále je třeba prozkoumat buňky produkující receptorový polypeptid podle předkládaného vynálezu, zda zvyšují nebo snižují úroveň exprese, jak je požadováno.

30 Vynález tedy diskutuje metodu produkce ligandu *mpl* zahrnující zavedení prvku ovlivňujícího transkripci do genomu buňky obsahující molekulu nukleové kyseliny ligandu *mpl* ve vhodné vzdálenosti a orientaci k molekule nukleové kyseliny, aby ovlivnila její transkripci, s nepovinným dalším krokem zahrnujícím kultivaci buněk obsahujících prvek ovlivňující transkripci a molekulu nukleové kyseliny. Vynález také diskutuje hostitelské buňky obsahující indigenní molekulu ligandu *mpl* oddělitelně navázanou na exogenní kontrolní sekvenci rozpoznanou hostitelskou buňkou.

40 A. izolace DNA kódující ligandový polypeptid *mpl*.

DNA kódující ligand *mpl* může být získána z jakékoliv cDNA knihovny připravené z tkáně o které se domníváme, že obsahuje ligandovou mRNA *mpl* a exprimuje ji v detekovatelné hladině. Gen ligandu *mpl* může být také získán z genomické DNA knihovny nebo *in vitro* oligonukleotidovou syntézou z kompletního nukleotidu nebo aminokyselinové sekvence.

45 Provádí se screening knihoven sondou, aby byl identifikován gen, který nás zajímá, nebo protein, který je jím kódován. Vhodnými sondami pro cDNA expresní knihovny jsou monoklonální nebo polyklonální protilátky, které rozpoznají a specificky se vážou na ligand *mpl*. Sondy vhodné pro cDNA knihovny zahrnují oligonukleotidy s délkou 20–80 bází, které kódují známé nebo předpokládané části cDNA ligandu *mpl* stejného nebo jiného druhu; a/nebo komplementární nebo homologní cDNA nebo jejich fragmenty, které kódují stejný nebo podobný gen. Vhodné sondy pro screening genomických DNA knihoven zahrnují, není to však limitující, oligonukleotidy, cDNA nebo jejich fragmenty, které kódují stejné nebo podobné geny, a/nebo homologní genomickou DNA nebo její fragmenty. Screening cDNA nebo genomické knihovny vybranou sondou

může být proveden s použitím standardních postupů, které jsou popsány v kapitolách 10–12 v Sambrook a kol., viz výše.

5 Alternativním způsobem izolace genu kódujícího ligand *mpl* je použití PCR metodologie jak je popsáno v sekci 14 v Sambrook a kol., viz výše. Tato metoda vyžaduje použití oligonukleotidových sond, které budou hybridizovat do DNA kódující ligand *mpl*. Strategie výběru oligonukleotidů je popsána níže.

10 Výhodnou metodou provedení podle tohoto vynálezu je použití pečlivě vybraných oligonukleotidových sekvencí ke screeningu cDNA knihoven z různých tkání, výhodněji lidských nebo vepřových ledvin (dospělých nebo zárodečných) nebo buněčných linií jater. Např. screening cDNA knihovny buněčné linie lidských zárodečných jater je prováděn oligonukleotidovou sondou. Nebo může být prováděn screening lidské genomické knihovny oligonukleotidovou sondou.

15 Oligonukleotidové sekvence vybrané jako sondy by měly být dostatečně dlouhé a dostatečně jednoznačné, aby byly minimalizovány falešně pozitivní výsledky. Aktuální nukleotidová sekvence je obvykle zkonstruována na základě oblastí ligandu *mpl*, které mají nejméně přebytečných kodonů. Oligonukleotidy mohou být degenerované v jedné nebo více polohách. Použití degenerovaných oligonukleotidů je zvláště důležité pokud je zkoumána knihovna druhu u kterého není
20 známa preference použití kodonů.

Oligonukleotidy musí být značené, aby mohly být detekovány po hybridizaci do DNA v knihovně, kde je prováděn screening. Výhodnou metodou značení je použití ATP (tj. $g^{32}P$) a polynukleotid kináza pro značení 5 konce oligonukleotidu. Ovšem mohou být použity další metody značení oligonukleotidu, zahrnující, není to však omezující, biotinylnaci nebo enzymatické značení.
25

Zvláště zajímavá je nukleová kyselina ligandu *mpl*, která kóduje ligandový polypeptid *mpl* plné délky. V některých výhodných provedeních zahrnuje sekvence nukleové kyseliny nativní ligandovou signální sekvencí *mpl*. Screeningem vybrané cDNA nebo genomické knihovny s použitím
30 vyvozené aminokyselinové sekvence je získána nukleová kyselina, která má celou protein kódující sekvenci.

B. Aminokyselinové sekvenční varianty nativního ligandu *mpl*.

35 Aminokyselinové sekvenční varianty ligandu *mpl* jsou připraveny zavedením vhodné nukleotidové změny do DNA ligandu *mpl*, nebo *in vitro* syntézou požadovaného ligandového polypeptidu *mpl*. Tyto varianty zahrnují, např. delece, inserce nebo substituce zbytků aminokyselinové sekvence vepřového ligandu *mpl*. Např. karboxy–koncová část zralého ligandu *mpl* plné délky může být odstraněna proteolytickým štěpením, buď *in vivo* nebo *in vitro*, nebo klonováním a expresí
40 fragmentu nebo DNA kódující ligand *mpl* plné délky za produkce biologicky aktivní varianty. Může být provedena jakákoli kombinace delece, inserce a substituce pokud povede k finálnímu konstrukt, za předpokladu, že finální konstrukt vykazuje požadovanou biologickou aktivitu. Aminokyselinové změny také mohou upravovat glykosylační místa. U konstrukce aminokyselinové sekvence variant ligandu *mpl* bude lokalizace mutačních míst a povaha mutací záviset na
45 ligandové charakteristice *mpl*, která má být modifikována. Místa mutací mohou být modifikována jednotlivě nebo v sériích, např. 1) substituce první s konzervativní aminokyselinovou volbou a poté radikální výběry v závislosti na požadovaném cíli, 2) delece cílového zbytku nebo 3) inserce zbytků stejné nebo jiné třídy sousedící s lokalizovaným místem, nebo kombinace možností 1–3.

50 Užitečná metoda identifikace některých zbytků nebo oblastí ligandového polypeptidu *mpl*, která je preferovanou lokalizací pro mutagenezi je nazývána „alanine scanning mutagenesis“, jak popsali Cunningham a Wells, Science, 244: 1081–1085 [1989]. Zde je identifikován zbytek nebo skupina cílových zbytků (např. zbytky s nábojem jako je arg, asp, his, lys a glu) a jsou nahrazeny
55 jakoukoli, ale výhodněji neutrální nebo negativně nabitou aminokyselinou (nejvýhodněji alani-

nem nebo polyalaninem) kvůli ovlivnění interakcí aminokyseliny s okolním vodným prostředím uvnitř nebo vně buňky. Tyto domény vykazují funkční citlivost na substituce, když jsou upraveny zavedením další nebo jiné varianty do místa substituce. Tedy zatímco místa pro zavedení variant aminokyselinové sekvence jsou předem stanovena, povaha mutace *per se* nemusí být předem stanovena. Např. pro optimalizaci provedení mutace na daném místě je proveden „ala screening“ nebo náhodná mutagenese na cílovém kodonu nebo oblasti a exprimovaná ligandová varianta *mpl* je testována na optimální kombinaci požadované aktivity.

Existují dvě hlavní proměnné při konstrukci variant aminokyselinové sekvence; lokalizace mutačního místa a povaha mutace. Např. varianty ligandového polypeptidu *mpl* zahrnují varianty ligandové sekvence *mpl*, a mohou představovat přirozeně se vyskytující alely (u kterých nebude nutná manipulace DNA ligandu *mpl*) nebo předem určené mutantní formy připravené mutací DNA, aby bylo dosaženo alely nebo varianty, která se přirozeně nevyskytuje. Obecné umístění a povaha zvolené mutace budou záviset na charakteristice ligandu *mpl*, která má být modifikována.

Delece aminokyselinové sekvence jsou obvykle v rámci 1 až 30 zbytků, výhodněji 1 – 10 zbytků a obvykle navazují. Eventuálně mohou aminokyselinové sekvenční delece pro ligand *mpl* zahrnovat část nebo celou karboxy–koncovou glykoproteinovou doménu. Aminokyselinové sekvenční delece mohou také zahrnovat jeden nebo více z prvních 6 amino–koncových zbytků zralého proteinu. Nepovinně aminokyselinové delece zahrnují jeden nebo více zbytků v jedné nebo více oblastech smyčky, která existuje mezi „helikálním svazkem“. Navazující delece jsou obvyčejně provedeny u sudých počtů zbytků, ale jednotlivé delece nebo delece lichých počtů jsou v tomto rozsahu. Delece mohou být zavedeny do oblastí s nízkou homologií mezi ligandy *mpl*, které mají největší sekvenční identitu, aby modifikovaly aktivitu ligandu *mpl*. Nebo delece mohou být zavedeny do oblastí nízké homologie mezi lidským ligandem a dalšími savčími ligandovými polypeptidy *mpl*, které mají největší sekvenční identitu s lidským ligandem *mpl*. U delece savčího ligandového polypeptidu *mpl* v oblasti substanční homologie s dalšími savčími ligandy *mpl* bude více pravděpodobné, že bude modifikovat biologickou aktivitu ligandu *mpl* signifikantněji. Počet následných delecí bude vybrán tak, aby byla zachována terciární struktura ligandů *mpl* v účinné doméně, tj. beta–listového hřbetu nebo alfa helixu.

Inzerty aminokyselinových sekvencí zahrnují amino– a/nebo karboxy–koncové fúze s délkou od jednoho zbytku po polypeptid obsahující sto nebo více zbytků, stejně jako intrasekvenční inzerty jednotlivých nebo násobných aminokyselinových zbytků. Intrasekvenční inzerty (tj. inzerty uvnitř sekvence zralého ligandu *mpl*) mohou být v rozsahu obecně od 1 do 10 zbytků, výhodněji od 1 do 5, nejvýhodněji 1 až 3. Zvláště výhodnou fúzí je fúze ligandu *mpl* nebo jeho fragmentu a dalšího cytokinu nebo jeho fragmentu. Příklady terminálních inzertů zahrnují zralý ligand *mpl* s N–koncovým methionylovým zbytkem, artefakt s přímou expresí zralého ligandu *mpl* v rekombinantní buněčné kultuře, a fúzi heterologní N–koncové signální sekvence do N–konce molekuly zralého ligandu *mpl* pro usnadnění sekrece zralého ligandu *mpl* z rekombinantního hostitele. Takovéto signální sekvence jsou obecně získány z určitých druhů hostitelských buněk nebo jsou k nim homologní. Vhodné sekvence zahrnují STII nebo IPP pro *E. coli*, alfa faktor pro kvasinky, virální signály jako je herpes gD pro savčí buňky.

Další inzertovatelné varianty molekuly ligand *mpl* zahrnují fúzi iminogenního polypeptidu do N– nebo C–konce ligandu *mpl* (tj. neendogenního k hostitelské buňce do které je fúze provedena), např. bakteriální polypeptidy jako je betalaktamáza nebo enzym kódující *E. coli trp* locus, nebo kvasinkový protein, C–koncové terminální fúze s proteiny majícími dlouhý poločas jako je imunoglobulinová konstantní oblast (nebo další imunoglobulinové oblasti), albumin, nebo ferritin, jak je popsáno v WO 89/02922 publikovaném 6. dubna 1989.

Třetí skupinou variant jsou aminokyselinové substituované varianty. Tyto varianty mají nejméně jeden aminokyselinový zbytek v ligandové molekule *mpl* odstraněný a na toto místo je vložen jiný zbytek. Místa největšího zájmu pro substituční mutagenesi zahrnují místa identická s aktiv-

ními místy ligandu *mpl* a místa, kde aminokyselina vyskytující se v jiných analozích je prakticky odlišného charakteru co se týče rozměru postranního řetězce, náboje nebo hydrofobicity, ale kde existuje také vysoký stupeň sekvenční identity na vybraných místech mezi ligandy *mpl* různých druhů a/nebo mezi analogy jednoho člena ligandu *mpl* různých zvířat.

5

Další místa, která nás zajímají, jsou místa, u kterých jednotlivé zbytky ligandu *mpl* získané z různých druhů orgánů a/nebo zvířecích druhů v rámci jednoho orgánu jsou identické. Tato místa, zvláště pokud spadají do rámce sekvence nejméně tří dalších identicky zachovaných míst, jsou substituována relativně konzervativním způsobem. Takovéto konzervativní substituce jsou uká-
zány v tab. 3 s uvedením výhodných substitucí. Pokud substituce mají za následek změny biologické aktivity, potom jsou zavedeny další substanciální změny, označené v tab. 3. Příklady substitucí, nebo další změny jsou popsány dále níže v referencích k aminokyselinovým třídám, a produkt je prozkoumán.

15

Tabulka 3

Původní zbytek	Příklady substitucí	Výhodné substituce
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; norleucin	Leu
Leu (L)	norleucin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucin	Leu

20

Substanciální modifikace ve funkci nebo imunologické identitě ligandu *mpl* je provedena selekcí substitucí, které se významně liší ve svém efektu na udržení (a) struktury polypeptidové páteře v oblasti substituce, např. hřbetu nebo helikální formace, (b) náboje nebo hydrofobicity molekuly

na cílovém místě, nebo (c) rozměru postranního řetězce. Přirozeně se vyskytující zbytky jsou rozděleny do skupin na základě obecných vlastností postranních řetězců;

- 1) hydrofobní: norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 5 2) neutrální hydrofilní: Cys, Ser, Thr;
- 3) kyselé: Asp, Glu;
- 4) bazické: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) zbytky které ovlivňují orientaci řetězce: Gly, Pro; a
- 6) aromatické: Trp, Tyr a Phe.

10 Nekonkervativní substituce budou mít za následek výměnu členů jedné třídy za druhou. Takovéto substituované zbytky mohou být také zavedeny do konzervativních substitučních míst nebo, výhodněji, do zbývajících (nekonkervovaných) míst.

15 V jednom provedení podle tohoto vynálezu je žádoucí inaktivace jednoho nebo více proteázových štěpných míst, které jsou přítomny v molekule. Tato místa jsou identifikována kontrolou kódující aminokyselinové sekvence, v případě trypsinu, např. na arginyl nebo lysinyl. Když jsou proteázová štěpná místa identifikována, potom je provedena inaktivace proteolytického štěpení substitucí cílových zbytků dalšími zbytky, výhodněji bazickým zbytkem jako je glutamin nebo
20 hydrofobním zbytkem jako je serin; delecí zbytku; nebo inzercí prolylového zbytku ihned za zbytek.

V dalším provedení je každý methionylový zbytek kromě úvodního methionylového zbytku signální sekvence, nebo každý zbytek lokalizovaný ve třech zbytcích N- nebo C-koncových u každého takového methionylového zbytku, substituován jiným zbytkem (výhodněji podle tab. 3) nebo je vypuštěn. Eventuálně jsou do sousedství těchto míst inzerovány 1-3 zbytky.

30 Jakékoli cysteinové zbytky nepatřící do zachovávané správné konformace ligandu *mpl* mohou být také substituovány, obecně serinem, za zlepšení oxidační stability molekuly a jako prevence chybných křížových vazeb. Bylo zjištěno, že první a čtvrtý cystein v doméně epo, číslováno od amino-konce, jsou nezbytné pro zachování správné konformace, ale druhý a třetí nejsou. Na základě toho tedy druhý a třetí cystein v doméně epo mohou být substituovány.

35 Molekuly nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci variant ligandu *mpl* jsou připraveny různými metodami, které jsou v daném oboru dobře známy. Tyto metody zahrnují, není to však omezující, izolaci z přirozeného zdroje (v případě přirozeně se vyskytujících variant aminokyselin) nebo preparační oligonukleotidem zprostředkovanou (nebo místně-cílenou) mutagenезi, PCR mutagenезi, kazetovou mutagenезi dříve připravené varianty nebo non-variantní verze ligandového polypeptidu *mpl*.

40 Oligonukleotidem zprostředkovaná mutagenезe je výhodnou metodou pro přípravu substitučních, delecčních a inzertních variant ligandové DNA *mpl*. Tato technika je v dané oblasti velmi dobře známa, je popsána Adelmanem a kol., DNA, 2: 183 [1983]. Krátce, ligandová DNA *mpl* je pozměněna hybridizací oligonukleotidu kódujícího požadovanou mutaci na DNA šablonu, kde
45 šablona je jednovláknová forma plazmidu nebo bakteriofágu obsahujícího nepozměněné nebo nativní DNA sekvence ligandu *mpl*. Po hybridizaci je použita DNA polymeráza k syntéze celého druhého komplementárního vlákna šablony, která takto bude inkorporovat oligonukleotidový primer, a bude kódovat vybranou změnu v ligandové DNA *mpl*.

50 Obecně, byly použity nukleotidy s délkou nejméně 25 nukleotidů. Optimální oligonukleotid bude mít 12 až 15 nukleotidů, které jsou zcela komplementární k šabloně na druhé straně nukleotidu (nukleotidů) kódujícího mutaci. To zajišťuje, že oligonukleotid bude hybridizován správně k jed-

novláknové DNA šablonové molekule. Oligonukleotidy jsou snadno syntetizovány s použitím technik, které jsou v dané oblasti dobře známé a které jsou popsány v Crea a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 5765 [1978].

- 5 DNA šablona může být vytvořena takovýmito vektory, které jsou buď odvozeny z bakteriofá-
gových M13 vektorů (vhodné jsou komerčně dostupné M13mp18 a M13mp19 vektory) nebo
vektory obsahujícími jednovláknový zdroj replikace jak je popsáno ve Viera a kol., Meth. Enzy-
mol., 153: 3 [1987]. Tedy DNA, která má být mutována, může být vložena do jednoho z těchto
10 vektorů za vzniku jednovláknové šablony. Produkce jednovláknové šablony je popsána v sekcích
4.21–4.41 Sambrook a kol., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor
Laboratory Press, NY 1989).

Eventuálně může být jednovláknová DNA šablona připravena denurací dvouvláknové plazmi-
dové (nebo jiné) DNA s použitím standardních technik.

- 15 Pro úpravy nativní DNA sekvence (např. aby vznikla aminokyselinové sekvenční varianta) je
oligonukleotid hybridizován na jednovláknovou šablonu za vhodných hybridizačních podmínek.
Poté je přidán DNA polymerizující enzym, obvykle známý jako Klenowův fragment DNA poly-
merázy I, aby se syntetizovalo komplementární vlákno šablony s použitím nukleotidu jako prime-
20 ru pro syntézu. Vznikne tedy heteroduplexní molekula, takže jedno vlákno DNA kóduje mutova-
nou formu ligandu *mpl*, a další vlákno (originální šablona) kóduje nativní, nezměněnou sekvenci
ligandu *mpl*. Tato heteroduplexní molekula je poté transformována do vhodné hostitelské buňky,
obvykle prokaryoty jako je *E. coli* JM101. Po vypěstování jsou buňky naneseny na agarózové
plotny a zkoumány pomocí oligonukleotidového primeru radioznačeného 32–fosfátem, aby byly
25 identifikovány bakteriální kolonie obsahující mutovanou DNA. Mutované oblasti jsou poté odeb-
rány a umístěny do vhodného vektoru pro produkci proteinů, obecně expresního vektoru obvykle
používaného typu pro transformaci vhodného hostitele.

- Metoda popsaná bezprostředně výše může být modifikována tak, že homoduplexní molekula je
30 vytvořena na obou vláknech plazmidu obsahujícího mutaci (mutace). Modifikace jsou následující:
jednořetězcový oligonukleotid je zesílený vzhledem k jednořetězcové šabloně popsané výše.
Směs tří deoxyribonukleotidů, deoxyriboadenosinu (dATP), deoxyriboguanosinu (dGTP) a de-
oxyribothymidinu (dTTP) je kombinována s modifikovaným thio–deoxyribocytosinem nazýva-
ným dCTP–(aS) (který může být získán od Amersham Corporation). Tato směs je přidána do
35 komplexu šablona–oligonukleotid. Při přidání DNA polymerázy do této směsi vznikne vlákno
DNA identické k šabloně, kromě mutovaných bází. Navíc nové vlákno DNA bude obsahovat
dCTP–(aS) místo dCTP, což slouží k jeho ochraně proti digesci restričními endonukleázami.

- Po odštěpení šablonového vlákna dvouvláknového heteroduplexu pomocí vhodného restričního
40 enzymu může být šablonové vlákno digestováno *ExoIII* nukleázou nebo jinou vhodnou nukleá-
zou mimo oblasti, které obsahují místo (místa), na kterých má probíhat mutageneze. Reakce je
poté ukončena, aby zůstala molekula, která je pouze částečně jednovláknová. Kompletní
dvouvláknový DNA homoduplex je poté vytvořen pomocí DNA polymerázy v přítomnosti všech
čtyř deoxyribonukleotidtrifosfátů, ATP, a DNA ligázy. Tato homoduplexní molekula může být
45 poté transformována do vhodné hostitelské buňky jako je *E. coli* JM101, jak je popsáno výše.

- DNA kódující ligandové mutanty *mpl* s více než jednou aminokyselinou, která má být substituo-
vána, mohou být připraveny jednou z několika cest. Pokud jsou aminokyseliny lokalizovány blíz-
ko u sebe v polypeptidovém řetězci, mohou být mutovány simultánně s použitím jednoho oligo-
nukleotidu, který kóduje všechny požadované aminokyselinové substituce. Pokud ovšem jsou
50 aminokyseliny umístěny v určitých vzdálenostech od sebe navzájem (odděleny více než deseti
aminokyselinami), je mnohem složitější připravit jeden oligonukleotid, který kóduje všechny
požadované změny. Místo toho může být použita jedna nebo dvě alternativní metody.

U první metody je připraven pro každou aminokyselinu, která má být substituována, samostatný oligonukleotid. Oligonukleotidy jsou poté simultánně zavedeny do jednořetězcové DNA šablony, a druhé vlákno DNA, které je syntetizováno z šablony, bude kódovat všechny požadované aminokyselinové substituce.

5

Alternativní metoda zahrnuje dva nebo více cyklů mutagenese za vzniku požadovaného mutantu. První cyklus je popsán pro jednotlivé mutace: pro šablonu je použit „divoký“ (wild) typ DNA, oligonukleotid kódující první požadovanou aminokyselinovou substituci (substituce) je zaveden do této šablony a poté je generována heteroduplexní DNA molekula. Druhý cyklus mutagenese používá mutovanou DNA připravenou v prvním cyklu mutagenese jako šablonu. Tato šablona tedy již obsahuje jednu nebo více mutací. Oligonukleotid kódující další požadované aminokyselinové substituce je poté zaveden do této šablony a výsledné vlákno DNA nyní kóduje mutace z prvního i druhého cyklu mutagenese. Výsledná DNA může být použita jako šablona v třetím cyklu mutagenese a tak dále.

15

PCR mutagenese je také vhodná pro přípravu aminokyselinových variant ligandového polypeptidu *mpl*. I když v následujícím textu je uváděna DNA, je samozřejmé, že tato technika má uplatnění i u RNA. PCR technika obsahuje následující postup (viz Erlich, viz výše, kapitola od R. Higuchi, str. 61–70): Když použijeme jako výchozí látku pro PCR malá množství šablon DNA, může být s použitím primerů, které se mírně liší v sekvenci z odpovídající oblasti v šabloně DNA, připraveno poměrně velké množství specifických DNA fragmentů, které se liší od šablonové sekvence pouze v polohách, kde se primery liší od šablony. Pro zavedení mutací do plazmidu DNA je jeden z primerů určující k překryvu polohy mutace a obsahuje mutaci; sekvence dalších primerů musí být identická k natažení sekvence protějščího vlákna plazmidu, ale sekvence druhého primeru je lokalizována uvnitř 200 nukleotidů z toho prvního, tak aby mohly být snadněji sekvenovány primery navázané na konci celé rozšířené oblasti DNA. PCR rozšíření používající primerový pár jež bylo právě popsáno má za výsledek populaci DNA fragmentů lišících se v poloze mutace specifikované primerem, a možno i v dalších polohách, ačkoliv kopírování šablony je poněkud náchylné k chybám.

Poměr šablony k produktu je extrémně nízký, velká většina vyprodukovaných DNA fragmentů zavádí požadované mutace. Tento výsledný materiál je použit k nahrazení odpovídající oblasti plazmidu, který slouží jako PCR šablona s použitím standardní DNA technologie. Mutace v separovaných polohách mohou být zavedeny simultánně buď použitím mutantního druhého primeru, nebo provedením druhé PCR s jinými mutantními primery a ligací dvou výsledných PCR fragmentů simultánně na vektorový fragment v tří-(nebo více)-dílné ligaci.

Ve specifickém příkladu PCR mutagenese je šablonová plazmidová DNA (1 mg) linearizována digescí restriční endonukleázou, která má specifické rozpoznávací místo v plazmidové DNA vně oblasti, která má být amplifikována. Z tohoto materiálu je 100 ng přidáno do PCR směsi obsahující PCR pufr, který obsahuje čtyři deoxynukleotidové trifosfatázy a je obsažen v Gene-Amp soupřavách (získaných od Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT a Emeryville, CA), a 25 pmol každého nukleotidového primeru, do celkového objemu 50 ml. Reakční směs byla převrstvena 35 ml minerálního oleje. Reakční směs je denaturována pět minut při 100 °C, umístěna krátce na led a poté je pod vrstvu minerálního oleje přidán 1 ml *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polymerázy (5 jednotek/ml, získané od Perkin-Elmer Cetus). Reakční směs je poté vložena do DNA Thermal Cycler (získaného od Perkin-Elmer Cetus) naprogramovaného následovně:

2 min 55 °C
30 s 72 °C, potom 19 cyklů následujících:
30 s 94 °C
30 s 55 °C, a
30 s 72 °C.

55

Na konci programu je reakční zkumavky vyjmuta z Termal Cycleru a vodná fáze převedena do nové zkumavky, extrahována fenol/chloroformem (50:50 obj.), a precipitována ethanolem, a DNA je získána standardními postupy. Tento materiál je následně podroben vhodnému zpracování pro inzerci do vektoru.

5

Další metodou pro přípravu variant, kazetová mutagenese, je založena na technice popsané v Wells a kol., Gene, 34: 315 [1985]. Výchozím materiálem je plazmid (nebo jiný vektor) obsahující ligandovou DNA *mpl*, která má být mutována. Jsou identifikovány kodony ligandové DNA *mpl*, které mají být mutovány. Na každém identifikovaném mutačním místě musí být specifické restriční endonukleázové místo. Pokud takováto restriční místa neexistují, musí být vytvořena s použitím výše popsaných, oligonukleotidy zprostředkovaných mutagenizačních metod, a zavedena na vhodná místa v ligandové DNA *mpl*. Po zavedení restričních míst do plazmidu je plazmid v těchto místech rozdělen, aby byl linearizovaný. Je syntetizován dvouvláknový nukleotid kódující sekvenci DNA mezi restričními místy ale obsahující požadovanou mutaci s použitím standardních postupů. Dvě vlákna jsou syntetizována odděleně a poté hybridizována dohromady s použitím standardních technik. Tento dvouvláknový oligonukleotid je označen jako kazeta. Tato kazeta je konstruována tak, aby měla 3 a 5 konce, které jsou kompatibilní s konci linearizovaného plazmidu, a tak může být přímo ligována do plazmidu. Tento plazmid nyní obsahuje mutovanou ligandovou DNA sekvenci *mpl*.

15

C. Zavedení nukleové kyseliny do replikabilního vektoru

Nukleová kyselina (např. cDNA nebo genomická DNA) kódující nativní nebo variantní ligandový polypeptid *mpl* je vložena do replikabilního vektoru pro další klonování (amplifikaci DNA) nebo pro expresi. Je vhodných mnoho vektorů, a výběr vhodného vektoru bude záviset (1) na tom, zda bude použit pro DNA amplifikaci nebo pro DNA expresi, (2) na velikosti nukleové kyseliny, která má být vložena do vektoru, a (3) na hostitelské buňce, která má být vektorem transformována. Každý vektor obsahuje různé složky v závislosti na jeho funkci (amplifikaci DNA nebo exprese DNA) v závislosti na hostitelské buňce, s kterou je kompatibilní. Vektorové složky obecně zahrnují, ale není to omezující, jednu nebo více následujících položek: signální sekvence, zdroj replikace, jeden nebo více markerových genů, urychlující prvek (enhancer), promotor a transkripční terminační sekvenci.

30

(i) Složka signální sekvence

35

Ligand *mpl* podle tohoto vynálezu může být exprimován ne pouze přímo, ale také jako fúze s heterologním polypeptidem, výhodněji signální sekvencí nebo dalším polypeptidem, který má specifické štěpné místo na N-konci zralého proteinu nebo polypeptidu. Obecně, signální sekvence může být složkou vektoru, nebo může být částí ligandové DNA *mpl*, která je zavedena do vektoru. Měla by být vybrána taková heterologní signální sekvence, která je rozpoznána a zpracována (tj. štěpena signální peptidázou) hostitelskou buňkou. Pro prokaryotické hostitelské buňky, které nerozpoznávají a nezpracovávají nativní ligandovou signální sekvenci *mpl*, je signální sekvence nahrazena prokaryotickou signální sekvencí, vybranou např. ze skupiny: alkalická fosfatáza, penicilináza, Ipp nebo tepelně stabilní enterotoxinové II leadery. Pro kvasinky může být sekrece nativní signální sekvence nahrazena např. kvasinkovou invertázou, alfa faktorem nebo kyselými fosfatázovými leadery, glukamylázovým leaderem *C. albicans* (EP 362, 179 publikovaný 4. dubna 1990), nebo signálem popsaným v WO 90/13646 publikovaným 15. listopadu 1990. U savčích buněk je exprese nativní signální sekvence (tj. ligandová presekvence *mpl*, která normálně řídí sekreci ligandu *mpl* ze svých nativních savčích buněk *in vivo*) uspokojivá, ačkoliv mohou být vhodné další savčí signální sekvence, jako je signální sekvence z dalších ligandových polypeptidů *mpl* nebo ze stejného ligandu *mpl* z jiného živočišného druhu, signální sekvence z ligandu *mpl*, a signální sekvence ze sekretovaných polypeptidů stejného nebo podobného druhu, stejně jako virální sekretorické leadery, např. herpes simplex gD signál.

40

45

50

(ii) Zdroj replikační složky

Expresní i klonovací vektor obsahuje sekvenci nukleové kyseliny, která umožňuje vektoru replikovat v jedné nebo více vybraných hostitelských buňkách. Obecně v klonovacím vektoru je tato sekvence jediná, která umožňuje vektoru replikovat nezávisle na hostitelské chromozomální DNA, a zahrnuje zdroje replikace nebo autonomně replikující sekvence. Tyto sekvence jsou dobře známé u různých bakterií, kvasinek a virů. Zdroj replikace z plazmidu pBR322 je vhodný pro většinu gram-negativních bakterií, 2 m plazmidový zdroj je vhodný pro kvasinky a různé virální zdroje (SV40, polyom, adenovirus, VSV nebo BPV) jsou použitelné pro klonovací vektory v savčích buňkách. Obecně zdroj replikační složky není nutný pro savčí expresní vektory (SV40 zdroj může být obvykle použit jedině z toho důvodu, že obsahuje časný promotor).

Většina expresních vektorů jsou „kyvadlové“ („shuttle“) vektory, tj. jsou schopné replikace v nejméně jedné třídě organismů, ale mohou být transfekovány do jiných organismů kvůli expresi. Např. vektor je klonován v *E. coli* a poté je stejný vektor transfekován do kvasinkových nebo savčích buněk pro expresi přestože není schopný replikace nezávisle na chromozomu hostitelské buňky.

DNA může být také amplifikována inzercí do hostitelského genomu. Je to snadno proveditelné s použitím druhu *Bacillus* jako hostitele, např., ve vektoru je zahrnuta DNA sekvence, která je komplementární k sekvenci nalezené v genomické DNA v *Bacillus*. Výsledkem transfekce *Bacillus* s tímto vektorem je homologní rekombinace s genomem a inserce ligandové DNA *mpl*. Ovšem získání genomické DNA kódující *mpl* je komplexnější než s exogenním replikačním vektorem, protože k odstranění ligandové DNA *mpl* je třeba restriční enzymová digesce.

(iii) Výběr genové složky

Expresní a klonovací vektory by měly obsahovat selekční gen, také označovaný jako selektovatelný marker. Tento gen kóduje protein nezbytný pro přežití nebo růst transformovaných hostitelských buněk pěstovaných v selektivním kultivačním médiu. Hostitelské buňky netransformované vektorem obsahujícím selekční gen v kultivačním médiu přežít nebudou. Typické selekční geny kódují proteiny které (a) poskytují rezistenci k antibiotikům nebo jiným toxinům, např. ampicilinu, neomycinu, methotrexátu nebo tetracyklinu, (b) doplňují auxotrofní deficiencie, nebo (c) dodávají kritické živiny, které nejsou dostupné z komplexního média, např. gen kódující D-alanin racemázu pro *Bacilli*.

Jeden příklad selekčního schématu používá k zastavení růstu hostitelských buněk léky. Tyto buňky jsou pak transformovány heterologním genem exprimujícím protein poskytující lékovou rezistenci a tedy přežití vybrané skupiny. Příkladem léků použitých k takovéto dominantní selekci je neomycin (Southern a kol., *J. Molec. Appl. Genet.*, 1: 327 [1982]), kyselina mykofenolová (Mulligan a kol., *Science*, 209: 1422 [1980]) nebo hygromycin (Sugden a kol., *Mol. Cell. Biol.*, 5: 410–413 [1985]). Tři výše uvedené příklady používají bakteriální geny pod eukaryotickou kontrolou k předání rezistence na vhodný lék G418 nebo neomycin (geneticin), xgpt (kyselina mykofenolová) nebo hygromycin, respektive.

Příklady dalších vhodných selektovatelných markerů pro savčí buňky jsou markery schopné identifikovat buňky odpovědné za převzetí nukleové kyseliny ligandu *mpl*, jako je dihydrofolát-reduktáza (DHFR) nebo thymidinkináza. Savčí buněčné transformanty jsou umístěny do selekčního tlaku, protože pouze transformanty jsou specificky adaptovány aby přežily, protože mají převzaté markery. Selektivní tlak je využit při kultivaci transformantů za podmínek, v kterých koncentrace selekčního agens v médiu je postupně měněna, což vede k amplifikaci selekčního genu i DNA kódující ligandový polypeptid *mpl*. Amplifikace je postup, při kterém se geny s větší potřebou produkce proteinů kritických pro růst opakují jeden za druhým v chromozomech následujících generací rekombinantních buněk. Z amplifikované DNA jsou syntetizována stoupající množství ligandu *mpl*.

Např. buňky transformované s DHFR selekčním genem jsou nejprve identifikovány kultivací všech transformantů v kultivačním médiu, které obsahuje methotrexát (Mtx), kompetitivního antagonistu DHFR. Když je použit DHFR „divokého“ typu, je vhodná hostitelská buněčná linie buněk z vaječníků čínských křečků (CHO) deficientní v DHFR aktivitě, připravená a namnožená jak je popsáno v Urlaub a Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 [1980]. Transformované buňky jsou poté vystaveny stoupajícím hladinám Mtx. To vede k syntéze násobných kopií DHFR genu a jako průvodní jev i k syntéze násobných kopií další DNA obsahující expresní vektory, jako je DNA kódující ligand *mpl*. Tato amplifikační technika může být použita s jakýmkoliv jiným vhodným hostitelem, např. ATCC č. CCL61 CHO-K1, přes přítomnost endogenního DHFR, pokud je použit např. mutantní DHFR gen, který má vysokou rezistenci k Mtx. (EP 117,060). Eventuálně, hostitelské buňky [zejména hostitelé divokého typu obsahující endogenní DHFR] transformované nebo ko-transformované s DNA sekvencemi kódujícími ligand *mpl*, divoký typ DHFR proteinu a další selektovatelné markery jako je aminoglykosid-3-fosfo-transferáza (APH), mohou být vybrány pěstováním v médiu obsahujícím selekční agens pro selektovatelný marker jako je aminoglykosidické antibiotikum, např. kanamycin, neomycin, nebo G418. Viz US 4 965 199.

Vhodným selekčním genem pro použití u kvasinek je gen *trp1* přítomný v kvasinkovém plazmidu YRp7 (Stinchcomb a kol., Nature, 282: 39 [1979]; Kinsman a kol., Gene, 7: 141 [1979]; nebo Tschemper a kol., Gene, 10: 157 [1980]). Gen *trp1* poskytuje selekční marker pro mutantní druh kvasinek postrádající schopnost růstu v tryptofanu, např. ATCC č. 44076 nebo PEP4-1 (Jones, Genetics, 85: 12 [1977]). Přítomnost *trp1* nedostatku v genomu kvasinkových hostitelských buněk potom poskytuje účinné prostředí pro detekci transformace růstem v nepřítomnosti tryptofanu. Podobně Leu2-deficientní kvasinkové druhy (ATCC č. 20,622 nebo 38,626) jsou doplněny známými plazmidy nesoucími Leu2 gen.

(iv) Promotorová složka

Expresní a klonovací vektory obvykle obsahují promotor, který je rozpoznán hostitelským organizmem a je oddělitelně navázán na ligandovou nukleovou kyselinu *mpl*. Promotory jsou netranslatované sekvence umístěné protisměrně (5) ke spouštěcímu kodonu strukturálního genu (obecně v 100 až 1000 bp), které kontrolují transkripci a translaci specifické sekvence nukleové kyseliny, jako je sekvence nukleové kyseliny ligandu *mpl*, na kterou jsou oddělitelně navázány. Takovéto promotory obvykle spadají do dvou tříd, indukční a konstitutivní. Indukční promotory jsou promotory, které iniciují zvýšené hladiny transkripce z DNA za jejich kontroly, jako odpověď na některé změny kultivačního prostředí, např. přítomnost nebo nepřítomnost výživy nebo teplotní změny. Dnes je dobře známé velké množství promotorů rozpoznávaných různými potenciálními hostitelskými buňkami. Tyto promotory jsou oddělitelně navázané na DNA kódující ligand *mpl* odstraněním promotoru ze zdrojové DNA digescí restriktivním enzymem a vložením izolované promotorové sekvence do vektoru. Nativní ligandová promotorová sekvence *mpl* i mnoho heterologních promotorů může být použito k přímé amplifikaci a/nebo expresi ligandové DNA *mpl*. Ovšem preferovány jsou heterologní promotory, protože obecně dovolují větší transkripci a vyšší výtěžek exprimovaného ligandu *mpl* ve srovnání s nativním ligandovým promotorem *mpl*.

Promotory vhodné pro použití v prokaryotických hostitelích zahrnují b-laktamázový a laktózoový promotorový systém (Chang a kol., Nature, 275: 615 [1978]; Goeddel a kol., Nature, 281: 544 [1979], alkalický fosfatázový, tryptofanový (*trp*) promotorový systém (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 [1980] a EP 36,776) a hybridní promotory jako je tac promotor (deBoer a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 [1983]). Ovšem je možné použít i další známé bakteriální promotory. Jejich nukleotidové sekvence byly publikovány, což umožňuje zkušenému pracovníkovi oddělitelně je ligovat na DNA kódující ligand *mpl* (Siebenlist a kol., Cell, 20: 369 [1980]) s použitím linkerů nebo adaptorů za získání jakéhokoliv restriktivního místa. Promotory pro použití v bakteriálních systémech také budou obsahovat Shine-Dalgarno (S.D.) sekvenci oddělitelně navázanou na DNA kódující ligandový polypeptid *mpl*.

Promotorové sekvence pro eukaryota jsou známé. Potenciálně všechny eukaryotické geny mají AT-bohatou oblast umístěnou 25 až 30 bází protisměrně od místa, kde je iniciována transkripce. Další sekvence mnoha genů nalézající se 70 až 80 bází protisměrně od začátku transkripce je
 5 CXCAAT oblast, kde X může být jakýkoliv nukleotid. 3' konec většiny eukaryotických genů je AATAAA sekvence, která může být signálem pro přidání poly A zakončení na 3' konec kódující sekvence. Všechny tyto sekvence jsou vhodně inzertovány do eukaryotických expresních vektorů.

10 Příklady vhodných promotorických sekvencí pro použití u kvasinkových hostitelů zahrnují promotory pro 3-fosfoglycerátkinázu (Hitzeman a kol., J. Biol. Chem., 255: 2073 [1980] nebo další glykolytické enzymy (Hess a kol., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 [1968]; Holland, Biochemistry, 17: 4900 [1978]), stejně jako enolázu, glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu, hexokinázu, 3-fosfoglycerátmutázu, pyruvátkinázu, triosafosfátizomerázu, fosfoglukosaizomerázu a glukokinázu.
 15 zu.

Další kvasinkové promotory, které jsou induktivními promotory majícími další výhodu transkripce kontrolované růstovými podmínkami, jsou promotorové oblasti pro alkoholdehydrogenázu 2, izocytochrom C, kyselou fosfatázu, degradativní enzymy spojené s metabolismem dusíku, metallothionein, glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza a enzymy odpovědné za utilizaci maltózy a galaktózy. Vhodné vektory a promotory pro použití při kvasinkové expresi jsou dále popsány v Hitzeman a kol., EP 73,657A. U kvasinkových promotorů jsou také výhodně používány kvasinkové enhancery.

25 Transkripce ligandu *mpl* z vektorů v savčích hostitelských buňkách je kontrolována, např., promotory získanými z genomů virů jako je virus obrny, virus slepičích neštovic (UK 2 211 504 publikovaný 5. července 1989), adenovirus (jako je Adenovirus 2), hovězí papilomový virus, virus ptačího sarkomu, cytomegalovirus, z heterologních savčích promotorů, např., aktinového promotoru nebo imunoglobulinového promotoru, z promotorů tepelného šoku, a z promotorů
 30 normálně spojených s ligandovou sekvencí *mpl*, za předpokladu, že tyto promotory jsou kompatibilní s hostitelským buněčným systémem.

Časná a pozdní promotory SV40 viru jsou obvykle získány jako SV40 restriční fragment, který také obsahuje SV40 virální původ replikace. Fiers a kol., Nature, 273, 273: 113 [1978]; Mulligan a Berg, Science 209: 1422-1427 [1980]; Pavlakis a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 7398-7402 [1981]). Přímý časný promotor lidského cytomegaloviru je obvykle získán jako *Hind*III E restriční fragment. Greenaway a kol., Gene, 18: 355-360 [1982]. Systém pro expresi DNA v savčích buňkách používající hovězí papilomový virus jako vektor je popsán v patentu US 4 419 446. Modifikace tohoto systému je popsána v US 4 601 978. Viz také v Gray a kol.,
 40 Nature, 295: 503-508 [1982] exprese cDNA kódující imunitní interferon v opičích buňkách; Rexes a kol., Nature, 296: 598-601 [1982] exprese lidské b-interferonové cDNA v myšičí buňce pod kontrolou thymidinkinázového promotoru z herpes simplex viru; Cannani a Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 5166-5170 [1982] exprese lidského interferonu b1 genu v kultivovaných myšičích a králíčích buňkách; a Gorman a kol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6777-6781
 45 [1982] exprese bakteriálních CAT sekvencí v CV-1 buňkách opičích ledvin, kuřecích zárodečných fibroblastů, buňkách vaječníků čínských křečků, HeLa buněk, a myšičích NIH-3T3 buněk s použitím dlouhého terminálního opakování viru Rousova sarkomu jako promotoru.

(v) Složky enhancerového prvku

50 Transkripce DNA kódující ligand *mpl* podle tohoto vynálezu vyššímu eukaryoty je často zvýšena vložением enhancerové sekvence do vektoru. Enhancery jsou cis-působící prvky DNA, obvykle 10 až 300 bp, které působí na promotor a zvyšují jeho transkripci. Enhancery jsou poměrně orientačně a polohově závislé, nalézají se 5 (Laimins a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 993
 55 [1981]) a 3 (Lusky a kol., Mol Cell Bio.; 3: 1108 [1983]) k transkripční jednotce, v intronu

(Benerji a kol., Cell, 33: 729 [1983]), i ve vlastní kódující sekvenci (Osborne a kol., Mol. Cell Bio., 4: 1293 [1984]). Nyní je známo mnoho enhancerových sekvencí za savčích genů (globin, elektáza, albumin, a-fetoprotein a inzulin). Obvykle ovšem bude použit enhancer z viru eukaryotické buňky. Příklady zahrnují SV40 enhancer z pozdější strany replikačního zdroje (bp 100–270), cytomegalovirový časný promotorový enhancer, enhancer obrny z pozdější strany replikačního zdroje, a adenovirový enhance. Viz také Yaniv, Nature, 297, 17–18 [1982] urychlující prvky pro aktivaci eukaryotických promotorů. Enhancery mohou být navázány do vektoru v poloze 5 nebo 3 k sekvenci kódující ligand *mpl*, ale výhodněji jsou lokalizovány na straně 5 od promotoru.

10 (vi) Transkripce terminační složky

Expresní vektory používané v eukaryotických hostitelských buňkách (buňky kvasinek, hub, hmyzu, rostlin, zvířat, lidí nebo nukleované buňky z jiných mnohobuněčných organismů) budou také obsahovat sekvence nezbytné pro terminaci transkripce a pro stabilizaci mRNA. Takovéto sekvence jsou obvykle dostupné z 5, příležitostně 3 netranslatovaných oblastí eukaryotických nebo virálních DNA nebo cDNA. Tyto oblasti obsahují nukleotidové segmenty transkribované jako polyadenylované fragmenty v netranslatovaném podílu mRNA kódující ligand *mpl*.

20 (vii) Konstrukce a analýzy vektorů

Konstrukce vhodných vektorů obsahujících jednu nebo více výše uvedených složek se provádí standardními technikami. Izolované plazmidy nebo DNA fragmenty jsou štěpeny, upraveny a znovunavázány ve formě potřebné pro vznik požadovaného plazmidu.

25 Pro potvrzení správnosti sekvencí ve zkonstruovaných plazmidech je použita ligační směs pro transformaci *E. coli* K12 kmen 294 (ATCC č. 31,446) a úspěšné transformanty jsou vybrány ampicilinovou nebo tetracyklinovou rezistencí, podle vhodnosti. Z transformantů jsou připraveny plazmidy, analyzovány restrikcí endonukleázovou digescí, a/nebo sekvenovány metodou podle Messinga a kol., Nucleic Acids Res., 9: 309 [1981] nebo metodou podle Maxama a kol., Methods in Enzymology, 65: 499 [1980].

30 (viii) Dočasné expresní vektory

Zvláště užitečné při provedení podle tohoto vynálezu jsou expresní vektory, které slouží pro dočasnou expresi DNA kódující ligandový polypeptid *mpl* v savčích buňkách. Obecně dočasná exprese zahrnuje použití expresního vektoru, který je schopen dobře replikovat v hostitelské buňce, takže hostitelská buňka akumuluje kopie expresního vektoru, a naopak, syntetizuje vysoké hladiny požadovaného polypeptidu kódovaného expresním vektorem. Sambrook a kol., viz výše, str. 16.17 – 16.22. Dočasné expresní systémy, zahrnující vhodný expresní vektor a hostitelskou buňku, poskytují pozitivní identifikaci polypeptidů kódovaných klonovanými DNA, stejně jako rychlý screening takových polypeptidů na požadované biologické nebo fyziologické vlastnosti. Dočasné expresní systémy jsou tedy zvláště vhodné v tomto vynálezu pro účely identifikace analogů a variant ligandových polypeptidů *mpl*, které mají biologickou aktivitu ligandového polypeptidu.

45 (ix) Vhodné příklady buněčných vektorů obratlovců

Další metody, vektory a hostitelské buňky vhodné pro adaptaci na syntézu ligandu *mpl* v rekombinantní buněčné kultuře obratlovců jsou popsány v Gething a kol., Nature, 293: 620–625 [1981]; Mentel a kol., Nature, 281 40–46 [1979]; Levinson a kol.; EP 117,060 a EP 117,058. Zvláště užitečný plazmid pro savčí buněčnou expresi ligandu *mpl* je pRK5 (EP 307 247, US 5 258 287) nebo pSVI6B (PCT Publikace WO 91/08291).

D. Výběr a transformace hostitelských buněk

Vhodné hostitelské buňky pro klonování a expresi vektorů jsou prokaryota, kvasinky nebo výše uvedené vyšší eukaryotické buňky. Vhodná prokaryota jsou eubakteria, jako gram-negativní nebo gram-pozitivní organismy, např. *E. coli*, *Bacilli* jako je *B. subtilis*, druh *Pseudomonas* jako *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* nebo *Serratia marcescans*. Jedním výhodným klonujícím hostitelem *E. coli* je *E. coli* 294 (ATCC č. 31,446), ačkoliv i další kmeny jako je *E. coli* B, *E. coli* X 1776 (ATCC č. 31,537) a *E. coli* W3110 (ATCC č. 27,325) jsou vhodné. Příklady jsou pouze ilustrativní, nejsou omezující. Výhodněji by měla hostitelská buňka vylučovat minimální množství proteolytických enzymů. Eventuálně jsou vhodné *in vitro* metody klonování, např. PCR nebo jiné reakce polymerázy nukleové kyseliny.

Dále jsou vhodnými hostiteli pro vektory kódující ligand *mpl* prokaryota, eukaryotičtí mikrobi jako jsou vláknité houby nebo kvasinky. Z nižších eukaryotických hostitelských mikroorganismů jsou nejčastěji používány *Saccharomyces cerevisiae* nebo běžné pekařské kvasinky. Ovšem je zde možné použít množství dalších druhů, odrůd a linií, jako je *Schizosaccharomyces pombe* (Beach a Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139 383 publikovaný 2. května 1985), *Kluyveromyces* (US 943 529) jako je např. *K. lactis* (Louvencourt a kol., *J. bacterio.*, 727 [1983]) *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. thermotolerans*, a *K. marxianus*, *Yarrowia* [EP 420 226], *Pichia pastoris* (EP 183 070); Sreekrishna a kol., *J. Bacteriol. Microbiol.*, 28: 265–278 [1988]), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP 244 234), *Neurospora crassa* (Case a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259–5263 [1979]), a vláknité houby jako např. *Neurospora*, *Penicillium*, *Tylopocladium* (WO 91/00357 publikovaný 10. ledna 1991), a *Aspergillus* jako *A. nidulans* (Ballance a kol., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284–289 [1983]; Tilburn a kol., *Gene*, 26: 205–221 [1983]; Yelton a kol., *Procl. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470–1474 [1984]) a *A. niger* (Kelly a Hynes, *EMBo J.*, 4: 475–479 [1985]).

Vhodné hostitelské buňky pro expresi glykosylovaného ligandu *mpl* jsou buňky odvozené od mnohobuněčných organismů. Takovéto hostitelské buňky jsou schopné komplexního zpracování a glykosylačních procesů. V podstatě je použitelná jakákoliv vyšší eukaryotická buněčná kultura, ať už z kultury obratlovců nebo bezobratlých. Příklady buněk bezobratlých zahrnují rostlinné a hmyzí buňky. Bylo identifikováno množství hostitelských buněk z tyčkovitých druhů a variant virů a vhodných hmyzích hostitelů jako jsou *Spodoptera frugiperda* (housenka), *Aedes aegypti* (komár), *Aedes albopictus* (komár), *Drosophila melanogaster* (ovocná muška), a *Bombus mori*. Viz. např. Luckow a kol., *Bio/Techlogy*, 6: 47–55 [1988]; Miller a kol., *Genetic Engineering*, Wetlow a kol., editoři, Vol. 8 Plenum Publishing, 1986), str. 277–279; a Maeda a kol., *Nature*, 315: 592–594 [1985]. Různé virální druhy pro transfekci jsou veřejně dostupné, např., L-1 varianta *Autographa californica* NPV a Bm-5 dru *Bombus mori* NPV, a tyto viry mohou být použity jako viry zde uvedené v předkládaném vynálezu, zvláště pro transfekci buněk *Stodoptera frugiperda*.

Jako hostitelé buňky mohou být použity buňky rostlinných kultur bavlny, kukuřice, brambor, sójových bobů, petunií, rajčat a tabáku. Obvykle jsou rostlinné buňky transfekovány inkubací s některým druhem bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, který byl předtím upraven aby obsahoval ligandovou DNA *mpl*. Během inkubace rostlinné buněčné kultury s *A. tumefaciens* je DNA kódující ligand *mpl* přenesena do rostlinné hostitelské buňky, takže je transfekována a bude, za vhodných podmínek, exprimovat ligandovou DNA *mpl*. Navíc jsou dostupné regulační a signální sekvence kompatibilní s rostlinnými buňkami, jako je syntazový promotor z opuncie a polyadenylační signální sekvence. Depicker a kol., *J. Mol. Appl. Gen.*; 1:561 [1982]. Navíc DNA segmenty izolované z protisměrné oblasti T-DNA 780 genu jsou schopné aktivovat nebo zvyšovat transkripční hladiny rostlinné exprimovatelných genů v rekombinantní DNA-obsahující rostlinné tkáni. EP 321 196 publikovaný 21. června 1989.

Avšak největšímu zájmu se těší buňky obratlovců, a množení buněk obratlovců v kultuře (tkáňové kultuře) se stalo v posledních letech běžným postupem (Tissue Culture, Academic Press, Kruse a Patterson, editoři [1973]). Příkladem používané savčí hostitelsko buněčné linie je linie opičích jater CV1 transformovaná SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linie lidských zárodečných ledvin (293 nebo 293 buňky) subklonované pro růst v suspenzní kultuře, (Graham, a kol, J. Gen Virol, 36: 59 [1977]), buňky jater křeččích mláďat (BHK, ATCC CCL 10); buňky vaječníků čínských křečků/DHFR (CHO, Urlaub a Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 [1980]); myši sertolické buňky (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 [1980]); buňky opičích ledvin (CV 1 ATCC CCL 70), buňky ledvin afrických zelených opic (VERO-76, ATCC ARL-1587); buňky lidského krčního karcinomu (HALA, ATCC CCL 2); buňky psích ledvin (MDCK, ATCC CCL 34); buňky jater obojživelných krys (buffalo rat) (BRL 3A, ATCC CRL 1442); lidské plicní buňky (W138, ATCC CCL 75); lidské jaterní buňky (Hep G2, HB 8065); tumor myši prsní žlázy (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI buňky (Mather a kol., Anals, N.Y. Acad. Sci. 383. 44-68 [1982]); MRC 5 buňky; FS4 buňky a lidská hepatomická linie (Hep G2).

Hostitelské buňky jsou transfekovány a výhodněji transformovány výše uvedenými expresními nebo klonovacími vektory podle tohoto vynálezu a kultivovány v obvyklém živném médiu modifikovaném tak, jak je vhodné pro indukci promotorů, vybraných transformací nebo amplifikaci genů kódujících požadované sekvence.

Transfekce označuje navázání expresního vektoru hostitelskou buňkou. Člověku běžně známému s danou problematikou bude známo mnoho metod transfekce, např., CaPO₄ a elektroporace. Úspěšná transfekce je obecně rozpoznána pokud se v hostitelské buňce objeví jakýkoliv projev činnosti tohoto vektoru.

Transformace znamená zavedení DNA do organismu tak, že DNA je replikabilní, buď jako extrachromozomální složka nebo jako chromozomální integrát. V závislosti na použití hostitelské buňky je transformace provedena standardními technikami vhodnými pro tuto buňku. Kalciové působení prováděné chloridem vápenatých, jak je popsáno v sekci 1.82 Sambrook a kol., viz výše, je obecně používáno pro prokaryota nebo další buňky obsahující substanciální bariéry buněčné stěny. Infekce s Agrobakteriem tumefaciens je použita pro transformaci některých rostlinných buněk, jak je popsáno v Shaw a kol., Gene, 23: 315 [1983] a WO 89/05858 publikovaném 29. července 1989. Navíc rostliny mohou být transfekovány s použitím ultrazvukového působení jak je popsáno v WO 91/00358 publikovaném 10. ledna 1991. Pro savčí buňky bez těchto buněčných stěn je preferována precipitace fosfátem vápenatým – metoda podle Grahama a van der Eba, Virology, 52: 456-457 [1978]. Obecné aspekty transformací systémů savčích hostitelských buněk jsou popsány Alexem v patentu US 4 399 216 vydaném 16. srpna 1983. Transformace do kvasinek jsou obvykle provedeny podle metody ven Solingena a kol., J. Bact., 130: 946 [1977] a Hsiao a kol, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 3829 [1979]. Ovšem mohou být také použity další metody pro zavedení DNA do buněk, jako je nukleární injektace, elektroporace, nebo protoplazmová fúze.

E. Kultivace hostitelských buněk

Prokaryotické buňky použité k produkci ligandového polypeptidu *mpl* podle tohoto vynálezu jsou kultivovány ve vhodném médiu jak je obecně popsáno v Sambrook a kol., viz výše.

Savčí hostitelské buňky použité k produkci ligandu *mpl* podle tohoto vynálezu mohou být kultivovány v různých médiích. Pro kultivaci hostitelských buněk jsou vhodná komerčně dostupná média jak je Ham s F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), a Sulbecco s Modified Eagle s Medium ([DMEM], Sigma). Navíc mohou být jako kultivační média pro hostitelské buňky použita jakákoliv média popsána v Ham a Wallace, Meth. Enz. 58: 44 [1979], Barnes a Sato, Anal. biochem. 102: 255 [1980], US 4 767 704, 4 657 866; 4 927 762; nebo 4 560 655; WO 90/03430; WO 87/00195; US Re. 30 985; nebo společně podané

USSN 07/592 107 nebo 07/592 141, oba zaregistrované 3. října 1990. Kterékoliv z těchto médií může být doplněno v případě potřeby hormony a/nebo dalšími růstovými faktory (jako je inzulin, transferrin nebo epidermální růstový faktor), solemi (jako je chlorid sodný, vápník, hořčík a fosfát), pufrů (jako je HEPES), nukleosidy (jak je adenosin a thymicin), antibiotiky (jako GentamycinTM léčivo), stopovými prvky (definovanými jako anorganické sloučeniny obvykle přítomné v celkových koncentracích v mikromolárním rozmezí), a glukózou nebo ekvivalentním zdrojem energie. Jaké doplňky budou třeba a v jakých koncentracích by mělo být dobře známo osobě vzdělané v dané problematice. Kultivační podmínky, jako je teplota, pH a podobně, jsou podmínky dříve použité u hostitelských buněk vybraných pro expresi, a pro osobu běžně vzdělanou v dané oblasti budou zřejmé.

Hostitelské buňky vztahující se k tomuto vynálezu zahrnují buňky kultury *in vitro* stejně jako buňky, které jsou v živočišném hostiteli.

15 F. Detekce genové amplifikace/exprese

Genová amplifikace a/nebo exprese může být měřena ve vzorku přímo, například obvyklým southern blotem, northern blotem, aby byla kvantifikována transkripce mRNA (Thomas, proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77. 5101–5205 [1980], bodovým (dot) blotem (DNA analýza) nebo hybridizací *in situ*, s použitím hodně značeného vzorku, na základě zde získaných sekvencí. Mohou být použita různá značení, nejběžnější jsou radioizotopy, zvláště ³²P. Ovšem mohou být také použity další techniky, jako je použití biotinem modifikovaných nukleotidů pro zavedení do nukleotidu. Biotin pak slouží jako místo pro vazbu na avidin nebo protilátky, které mohou být značené různými značkami, jako jsou radionuklidy, fluorescency, enzymy atd. Eventuálně mohou být použity protilátky, které mohou rozpoznat specifické duplexy, včetně DNA duplexů, DNA duplexů, a DNA–RNA hybridních duplexů neo DNA–protein duplexů. Naopak mohou být značeny protilátky a stanovení může být provedeno když duplex je navázán na povrch tak, že u formace duplexu na povrchu může být detekována přítomnost protilátky navázané na duplexu.

30 Exprese genu může být eventuálně měřena imunologickými metodami, jako je imunohistochemické barvení části tkáně a stanovení buněčné kultury nebo tkáňových tekutin, aby byla přímo kvantifikována exprese genového produktu. U imunohistochemických barvicích technik je buněčný vzorek preparován, obvykle dehydratací a fixací, pak následuje reakce se značenými protilátkami specifickými pro sdruženou reakci genového produktu, kde je značení obvykle detekováno vizuálně, např. enzymatickým značením, fluorescentním značením, luminiscenčním značením atd. Zvláště citlivá barvicí technika vhodná pro použití v předkládaném vynálezu je popsána v Hsu a kol., Am. J. Clin. Path. 75: 734–738 [1980].

40 Protilátka použitelná pro imunohistochemické barvení a/nebo stanovení vzorku tekutiny může být monoklonální nebo polyklonální, a může být připravena v jakémkoliv savci. Obvykle mohou být protilátky připraveny proti nativnímu ligandovému polypeptidu *mpl* nebo proti syntetickému polypeptidu na bázi DNA sekvence získané jak je zde popsáno dále níže.

45 G. Purifikace ligandového polypeptidu *mpl*

Ligand *mpl* je přednostně získán z kultivačního média jako sekretovaný polypeptid, ačkoliv může být také získán z lyzátu hostitelské buňky, když je exprimován přímo bez sekretorického signálu.

50 Když je ligand *mpl* exprimován v rekombinantní buňce jiného než lidského původu je ligand *mpl* zcela prostý proteinů nebo polypeptidů lidského původu. Avšak je stále nutné purifikovat *mpl* od dalších rekombinantních buněčných proteinů nebo polypeptidů, aby byl získán preparát, který je prakticky homogenní na ligand *mpl*. Jako první krok je kultivační médium nebo lyzáty centrifugovány, aby byly odstraněny rozrušené buňky. Membrána a rozpustné proteinové frakce jsou poté separovány. Eventuálně může být použit komerčně dostupný proteinový koncentrační filtr (nap. Amicon nebo Millipore Pellicon ultrafiltrační jednotka). *Mpl* může být poté purifikován z frakce

rozpuštěných proteinů nebo z membránové frakce lyzátů kultury, v závislosti na tom, zde je *mpl* membránově vázaný. *Mpl* je poté purifikován od kontaminujících rozpustných proteinů a polypeptidů vysolením a výměnnými nebo chromatografickými postupy s použitím různých gelových matic. Tyto matrice zahrnují: akrylamid, agarózu, dextran, celulózu a další obvyklé matrice pro purifikaci proteinů. Příkladem chromatografických postupů vhodných pro purifikaci proteinu jsou: imunoafinitní (např., anti-*hmpl* ligandová Mab), receptoafinitní (např. *mpl*-IgG neprotein A Sepharose), hydrofobní interakční chromatografie (HIC) (např., ether, butyl nebo fenyl Toyopearl), lektinová chromatografie (např., Con A-Sepharose, lentil-lectin-Sepharose), exkluze podle velikosti (např. Sephadex G-75), kation- a anion-výměnné kolony (např., DEAE nebo karboxymethyl- a sulfopropyl-celulóza), a vysokotlaká kapalinná chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) (viz např. Urdal a kol., J. Chromatog., 296: 171 [1984] kde jsou použity dva následné Rp-HPLC kroky k purifikaci rekombinantního lidského IL-2). Další purifikační kroky nepovinně zahrnují: ethanolovou precipitaci, precipitaci sulfátem amonným, chromatofokusaci, preparativní SDS-PAGE a další.

Variety ligandu *mpl*, ve kterých byly zbytky podrobeny deleci, inzertovány nebo substituovány, a byly navráceny do stejného tvaru jako nativní ligand *mpl*, se počítá s tím, že variace mohou být příčinou jakékoliv substanciální změny ve vlastnostech. Např. preparace ligandové fúze *mpl* s jiným proteinem nebo polypeptidem, např. bakteriálním nebo virálním antigenem, usnadňuje purifikaci; k adsorpci fúzního polypeptidu může být použita imunoafinitní kolona obsahující protilátku k antigenu. Imunoafinitní kolony jako je králičí anti-*mpl* kolona mohou být použity k absorpci variant ligandu *mpl* jejich vazbou na nejméně jeden zbývající imunitní epitop. Eventuálně může být ligand *mpl* purifikován afinitní chromatografií s použitím purifikovaného *mpl*-IgG navázaného na (výhodněji) imobilizovanou pryskyřici jako je Affi-Gel 10 (Bio-Rad, Richmond, CA), nebo jiný, pomocí postupů v dané oblasti dobře známých. Pro inhibici proteolytické degradace během purifikace mohou být také použity proteázové inhibitory jako je fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), a antibiotika mohou být zahrnuta kvůli prevenci růstu doprovodných kontaminací. Osoba vzdělaná v dané problematice bude moci posoudit, zda purifikační metody vhodné pro nativní ligand *mpl* budou vyžadovat modifikaci a jaký charakter budou mít změny ligandu *mpl* nebo jeho variant po expresi v rekombinantní buněčné kultuře.

H. Kovalentní modifikace ligandového polypeptidu *mpl*

Kovalentní modifikace ligandových polypeptidů *mpl* jsou zahrnuty v rámci tohoto vynálezu. Nativní ligand *mpl* i variety aminokyselinové sekvence ligandu *mpl* mohou být kovalentně modifikovány. Jedním typem kovalentní modifikace zahrnuté v rámci tohoto vynálezu je ligandový fragment *mpl*. Varianta ligandových fragmentů *mpl* mající maximálně 40 aminokyselinových zbytků může být obvykle připravena chemickou syntézou nebo enzymatickým nebo chemickým štěpením ligandového polypeptidu *mpl* plné délky nebo jeho variant. Další typy kovalentních modifikací ligandu *mpl* nebo jeho fragmentů jsou zavedeny do molekuly reakcí cíleného aminokyselinového zbytku ligandu *mpl* jeho fragmentu s organickým derivatizujícím agens, které je schopné reagovat s vybranou stranou řetězce nebo N- nebo C-koncových zbytků.

Cysteinylové zbytky jsou nejběžněji ponechány reagovat s α -haloacetáty (a odpovídajícími aminy), jako kyselina chloroctová nebo chloracetamid, na vzniku karboxymethyl nebo karboxyamidomethyl derivátů. Cysteinové zbytky jsou také derivatizovány reakcí s bromtrifluoroacetonem, α -brom- β -(5-imidazolyl)propionovou kyselinou, chloracetylfosfátem, N-alkylmaleinimidem, 3-nitro-2-pyridyldisulfidem, methyl 2-pyridyldisulfidem, p-chlormerkuribenzoátem, 2-chlormerkuri-4-nitrofenolem a chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolem.

Hystidylové zbytky jsou derivatizovány reakcí s diethylpyrokarbonátem při pH 5,5-7,0, protože toto agens je relativně specifické pro hystidylový postranní řetězec. Lze použít také bromfenacylbromid, reakce je výhodněji provedena v 0,1M kakodylátu sodném při pH 6,0.

Lysinylové a amino koncové zbytky reagují s sukcinimickými nebo karboxylickými kyselinami anhydridy. Derivatizace těchto agens mají efekt převrácení náboje lysinových zbytků.

5 Dalšími vhodnými reagenty pro derivatizaci zbytků obsahujících amid jsou imidoestery jako je methylpikolinimidát, piridoxafosfát, piridoxal, chlorborohydrid, trinitrobenzensulfonová kyselina, O-methylizomochovina, 2,4-pentandion a transminázou katalyzovaná reakce s glyoxylátem.

10 Arginylové zbytky jsou modifikovány reakcí s jedním nebo několika obvyklými reagenty, jsou to fenylglyoxal, 2,3-butandion, 1,2-cyklohexandion a ninhydrid. Derivatizace argininových zbytků vyžaduje, aby reakce byla provedena za alkalických podmínek kvůli vysoké pK_a guanidinové funkční skupiny. Dále tyto reagens mohou reagovat se skupinami lysinu stejně dobře jako argininovou epsilon-amino skupinou.

15 Specifická modifikace tyrosilových zbytků může být provedena se zvláštní pozorností k zavedení spektrálních značek do tyrosilových zbytků reakcí s aromatickými diazoniovými sloučeninami nebo tetraaminomethanem. Nejčastěji je používán N-acetylimidazol a tetranitromethan za vzniku O-acetyltyrosilových druhů a 3-nitroderivátů, respektive. Tyrosilové zbytky jsou jodovány s použitím ^{125}I nebo ^{131}I za vzniku značených proteinů pro použití při radioimunostanovení, vhodná chloramin T metoda je popsána výše.

20 Karboxylové postranní skupiny (aspartyl nebo glutamyl) jsou selektivně modifikovány reakcí s karbodiimidem ($R-N=C=N-R$), kde R a R jsou různé alkylové skupiny, jako je 1-cyklohexyl-3-(2-morfolinyl-4-ethyl)karbodiimid nebo 1-ethyl-3-(4-azonia-4,4-dimethylpentyl)karbodiimid. Dále aspartylové a glutamylové zbytky jsou převedeny na asparaginylové a glutaminylové zbytky reakcí s amoniiovými ionty.

25 Derivatizace s bifunkčními agens je použitelná pro křížovou vazbu ligand *mpl* na ve vodě nerozpustnou pomocnou matrix nebo povrch pro použití v metodách pro purifikaci anti-*mpl* protilátek, a naopak. Obvykle používané křížové vazebné agens zahrnují, např. 1,1-bis(diazoacetyl)-2-fenylethan, glutaraldehyd, N-hydroxysukcinimidové estery, např. estery s kyselinovou 4-azidosalicylovou, homobifunkční imidoestery, včetně disukcinimidových esterů jako je 3,3-dithio-bis(sukcinimidylpropionát), a bifunkční maleimidy jako je bis-N-maleinimido-1,8-oktan. Derivatizační agens jako je methyl-3-[(p-azidofenyl)dithio]propioimidát poskytují fotoaktivovatelné meziprodukty, které jsou schopny vzniku křížové vazby v přítomnosti světla. Eventuálně jsou pro proteinovou imobilizaci použity reaktivní ve vodě nerozpustné matrice jako jsou kyanogenbromidem-aktivované uhlovodíky a reaktivní substráty popsané v US 3 969 287; 3 691 016, 4 195 128; 4 229 537 a 4 330 440.

30 Glutaminylové a asparaginylové zbytky jsou často deaminovány a odpovídající glutamyl a aspartyl zbytek, respektive. Tyto zbytky jsou deaminovány za neutrálních nebo bazických podmínek. Deaminované formy těchto zbytků spadají do rámce vynálezu.

45 Další modifikace zahrnují hydroxylaci prolinu a lysinu, fosforylaci hydroxylových skupin serylových nebo threonylových zbytků, methylaci α -amino skupin lysinových, argininových a histidinových postranních řetězců (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Col, San Francisco, str. 79-86 [1983]), acetylaci N-koncového aminu a amidaci jakékoli C-koncové karboxylové skupiny.

50 Další typ kovalentní modifikace ligandového polypeptidu *mpl* zahrnutý v rámci tohoto vynálezu obsahuje změny nativního glykosylovaného modelu polypeptidu. Změnami jsou míněny delece jedné nebo více uhlovodíkových skupin, nalézajících se v nativním ligandu *mpl*, a/nebo přidání jednoho nebo více glykosylačních míst, které nejsou přítomny v nativním ligandu *mpl*.

55 Glykosylace polypeptidů je obvykle buď N-vazebná nebo O-vazebná. N-vazebná se týká vazby uhlohydrátové skupiny na postranní řetězec asparaginového zbytku. Tripeptidová sekvence aspa-

ragin-X-serin a asparagin-X-threonin, kde X je jakákoliv aminokyselina kromě prolinu, jsou rozpoznávacími sekvencemi pro enzymatickou vazbu uhlohydrátové skupiny na asparaginový postranní řetězec. Tedy přítomnost jedné z těchto tripeptidových sekvencí v polypeptidu tvoří potenciální glykosylační místo. O-vazebná glykosylace se týká vazby jednoho z cukrů N-acetyl-galaktosaminu, galaktózy nebo xylózy na hydroxyamino kyselinu, nejčastěji serin nebo threonin, ačkoliv může být použit i 5-hydroxyprolin nebo 5-hydroxylysin.

Přidání glykosylačních míst oproti ligandovému polypeptidu *mpl* je obvykle provedeno změnou aminokyselinové sekvence tak, že obsahuje jeden nebo více výše popsanych tripeptidových sekvencí (pro N-vazebná glykosylační místa). Změny mohou také být provedeny přidáním nebo substitucí jednoho nebo více serinových nebo threoninových zbytků oproti nativní ligandové sekvenci *mpl* (pro O-vazebná glykosylační místa). Pro usnadnění je ligandová aminokyselinová sekvence *mpl* výhodněji změněna během změn na úrovni DNA, nepovinně mutací DNA kódující ligandový polypeptid *mpl* za předvolené báze, takže kodony jsou generovány tak že budou translatovat do požadovaných aminokyselin. DNA mutace může být provedena metodami popsanými výše pod nadpisem „Varianty aminokyselinové sekvence ligandu *mpl*“.

Dalšími způsoby zvýšení počtu uhlohydrátových skupin v ligandu *mpl* je chemická nebo enzymatická vazba glykosidů na polypeptid. Tyto postupy jsou vhodné pokud není požadovaná produkce polypeptidu v hostitelské buňce, která má glykosylační schopnost pro N- nebo O-vazebnou glykosylaci. V závislosti na použité vazebné technice, mohou být cukry navázány na (a) arginin a histidin (b) vodné karboxylové skupiny, (c) volné sulhydrikové skupiny jako jsou u cysteinu (d) volné hydroxylové skupiny jako jsou u serinu, threoninu nebo hydroxyprolinu, (e) aromatické zbytky jsou u fenylalaninu, tyrosinu nebo tryptofanu, nebo (f) amidovou skupinu glutaminu. Tyto metody jsou popsány v WO 87/05330 publikované 11. září 1987, a v Aplin a Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp, 259-306 [1981].

Odstranění uhlohydrátových skupin přítomných v ligandovém polypeptidu *mpl* může být provedeno chemicky nebo enzymaticky. Chemická deglykosylace zahrnuje vystavení polypeptidů působení kyseliny trifluormethansulfonové, nebo ekvivalentní sloučeniny. Toto působení způsobí štěpení většiny nebo všech cukrů kromě spojených cukrů (N-acetylglukosamin nebo N-acetyl-galaktosamin), zatímco polypeptid zůstane nedotčený. Chemická deglykosylace je popsána v Hakimuddin, a kol., Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 [1987] a Edge a kol., Anal., Biochem., 118: 131 [1981]. Enzymatické štěpení uhlohydrátových skupin na polypeptidu může být provedeno různými endo- a exo-glykosidázami jak je popsáno v Thotakura a kol., Meth. Enzymol., 138: 350 [1987].

Glykosylaci potenciálních glykosylačních míst může být zabráněno použitím sloučeniny tunicamycinu jak je popsáno v Duskin a kol., J. Biol., Chem. 257: 3105 [1982]. Tunicamycin blokuje vznik vazeb protein-N-glykosid.

Další typ kovalentních modifikací ligandu *mpl* zahrnuje vazbu ligandového polypeptidu *mpl* na jeden z různých neproteinových polymerů, např. polyethylenglykol, polypropylenglykol, nebo polyoxyalkyleny, způsobem, který je uveden v US 4 640 835; 4 496 689; 4 301 14; 4 670 417; 4 791 192 nebo 4 179 337. Ligandové polypeptidy *mpl* navázané na předcházející polymery jsou zde označeny jako pegylované ligandové polypeptidy *mpl*.

Bude posouzeno jaký screening získaných ligandových variant *mpl* bude třeba k výběru optimálních variant pro vazbu na *mpl* za zachování imunologické a/nebo biologické aktivity definované výše. Je možné testovat stabilitu v rekombinantní buněčné kultuře nebo v plamě (např. po proteolytickém štěpení), stupeň afinity k *mpl* členům, oxidativní stabilitu, schopnost být vylučován s vysokým výtěžkem, atd. Např., změna v imunologickém charakteru ligandového polypeptidu *mpl*, jako je afinita pro danou protilátku, je měřitelná imunostanovením kompetitivního typu. Další potenciální modifikace proteinových nebo polypeptidových vlastností jako redoxní nebo

tepelná stabilita, hydrofobicita, nebo citlivost k proteolytické degradaci jsou stanovitelné metodami v oboru dobře známými.

17. Obecné metody přípravy protilátek k ligandu *mpl*

5

Příprava protilátek

(i) Polyklonální protilátky

10 Polyklonální protilátky k ligandovým polypeptidům *mpl* nebo fragmentům jsou obecně produkovány ve zvířatech vícenásobnými subkutánními (sc) nebo intraperitoneálními (ip) injekcemi ligandu *mpl* a adjuvans. Může se použít ke konjugaci ligandu *mpl* nebo fragmentů obsahujících cílovou aminokyselinovou sekvenci na protein, který je imunogenický v druhu, kde má být imunizován, např. hemocyanin z přílepky (keyhole limpet hemocyanin), sérový albumin, hovězí thyroglobulin nebo trypsinový inhibitor ze sójových bobů používající bifunkční nebo derivatizující agens, např. maleimidobenzoylsulfosukcinimidester (konjugace přes cysteinový zbytek), N-hydroxysukcinimid (přes lysinové zbytky), glytaraldehyd, sukcinanhydrid, SOCl_2 nebo $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, kde R a R^1 jsou různé alkylové skupiny.

20 Zvířata jsou imunizována proti ligandovému polypeptidu *mpl* nebo fragmentu, imunogenním konjugátům nebo derivátům kombinací 1 mg peptidu nebo konjugátu (pro králíky nebo myši, respektive) s 3 objemy Freudova kompletního adjuvans s antidermálně injektovaná roztokem na mnoha místech. O měsíc později jsou zvířata povzbuzena 1/5 až 1/10 původního množství peptidu na konjugátu v Freundově kompletním adjuvand subkutánní injekcí na mnoha místech. O sedm až čtrnáct dní později je zvířatům odebrána krev a v séru je stanoven titer ligandových protilátek *mpl*. Zvířata jsou povzbuzována dokud se titer neustálí. Výhodněji zvířata jsou povzbuzována konjugátem se stejným ligandem *mpl*, ale konjugovaným s jiným proteinem a/nebo přes jiný křížově reagující reagent. Konjugáty mohou být také připraveny v rekombinantní buněčné kultuře jako proteinové fúze. Pro zvýšení imunitní odpovědi jsou také použity agregační agens jako ledek.

30

(ii) Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou získány z populace prakticky homogenních protilátek tj. individuální protilátky obsažené v populaci jsou identické kromě možných přirozeně se vyskytujících mutací, které mohou být přítomny v menšinovém množství. Tedy slovo „monoklonální“ označující charakter protilátek znamená, že protilátka není směsí samostatných protilátek.

35

Např. ligandové monoklonální protilátky *mpl* podle tohoto vynálezu mohou být připraveny použitím hydridomové metody poprvé popsané v Kohle & Milstein, Nature, 256: 495 [1975], nebo mohou být připraveny rekombinantními DNA metodami (US 816 567 [Cabily a kol.]).

40

V hydridomové metodě je myš nebo jiné vhodné hostitelské zvíře, jako je křeček, imunizováno jak je popsáno výše, aby byly vyvolány lymfocyty, které produkují nebo jsou schopné produkovat protilátky, které se budou specificky vázat na protein použitý pro imunizaci. Eventuálně mohou být lymfocyty imunizovány in vitro. Lymfocyty poté fúzí s myelomovými buňkami za použití vhodného fúzního agens, jako je polyethylenglykol, za vzniku hydridomové buňky (Goding, Monoklonal Antigodie: Principles and Practise, str. 59–103 [Academic press, 1986]).

45

Hybridomové buňky takto připravené jsou pěstovány ve vhodném kultivačním médiu, které výhodněji obsahuje jednu nebo více látek, které inhibují růst nebo přežití nefúzovaných, parentálních myelomových buněk. Např. pokud parentální myelomové buňky postrádají enzym hypoxanthinuaninfosforybosltransferázu (HGPRT nebo HPRT), kultivační médium pro hybridomy obvykle bude zahrnovat hypoxantin, aminopterin a thymidin (HAT médium), které substančně zabraňují růstu HGPRT-deficientních buněk.

50

55

Výhodné myelomové buňky jsou takové, které fúzíjí snadno, podporují stabilně vysokou úroveň exprese protilátky selekcí protilátky–produkcujících buněk, a jsou senzitivní na médium jako je HAT médium. Mimo tyto výhodné myelomové buněčné linie patří myší myelomové linie, které jsou odvozeny z MOPC–21 a MPC–11 myších tumorů získané z Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, a SP–2 buňky získané z American Type Culture Collection Rockville Maryland USA. Produkce lidských monoklonálních protilátek byla popsána i pro lidské myelomové a myší–lidské hetero–lidské buněčné linie (Kozbor, J. Immunol, 133: 3001 [1984]; Brodeur a kol., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, str. 51–63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987).

Kultivační médium, ve kterém jsou buňky pěstovány, je stanoveno na produkci monoklonálních protilátek směřovaných proti ligandu *mpl*. Výhodněji je vazebná specifita monoklonálních protilátek produkovaných hybridomovými buňkami stanovena imunoprecipitací nebo *in vitro* vazebným stanovením, jako je radioimunostanovení (RIA) nebo enzym–linked imunoabsorpční stanovení (ELISA).

Vazebná afinita monoklonální protilátky může být, např., stanovena Scatchardovou analýzou podle Munson & Pollard, Anal. Biochem., 107:220 [1980].

Po zjištění, zda hybridomové buňky produkují protilátky požadované specifity, afinity, a/nebo aktivity, mohou být klony subklonovány postupem limitního ředění a pěstovány standardními metodami (Goding, viz výše). Vhodné kultivační médium pro tyto účely zahrnuje, např. Dulbecco s Modified Eagle s Medium nebo RPMI–1640 médium. Dále mohou být hybridomové buňky pěstovány *in vivo* jako ascitické tumory.

Monoklonální protilátky vylučované subklony jsou vhodně separovány z kultivačního média, ascitické tekutiny nebo séra běžnými imunoglobulinovými purifikačními postupy, jako jsou, např., protein A–Sephrose, hydroxylapatitová chromatografie, gelová elektroforéza, dialýza nebo afinitní chromatografie.

DNA kódující monoklonální protilátky podle tohoto vynálezu je snadno izolována a sekvenována s použitím běžných postupů (např. s použitím oligonukleotidových sond, které jsou schopné se specificky vázat na geny kódující těžké a lehké řetězce myších protilátek). Hybridomové buňky podle tohoto vynálezu slouží jako výhodný zdroj takového DNA. Když je izolována, může být DNA umístěna do expresních vektorů, které jsou poté transfekovány do hostitelských buněk jako jsou opičí COS buňky, buňky vaječníků čínských křečků (CHO), nebo myelomové buňky které jinak neprodukují imunoglobulinový protein, aby došlo k syntéze monoklonálních protilátek v rekombinantních hostitelských buňkách. DNA může být také modifikována, např. substitucí kódující sekvence pro těžký a lehký řetězec lidské konstantní domény namísto homologní myší homologní sekvence, (Cabilly a kol., viz výše; Morisson a kol., Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851 [1984]), nebo kovalentním připojením na celou imunoglobulin kódující sekvenci nebo části kódující sekvence pro non–imunoglobulinový polypeptid.

Obvykle jsou takové non–imunoglobulinové polypeptidy substituovány pro konstantní domény protilátky podle tohoto vynálezu, nebo jsou substituovány pro variabilní domény jednoho antigen–spojujícího místa majícího specifitu pro ligand *mpl* a dalšího antigen–spojujícího místa majícího specifitu pro jiný antigen.

Chimérické nebo hybridní protilátky také mohou být připraveny *in vitro* s použitím postupů známých v syntetické proteinové chemii, včetně zde zahrnutých křížově reakčních agens. Např., imunotoxiny mohou být sestrojeny s použitím disulfidové výměnné reakce nebo tvořením trietherových vazeb. Příkladem vhodného reagens pro tyto účely je imunothiolát a methyl–4–merkaptobutyrimidát.

Pro diagnostické aplikace jsou obvykle protilátky podle tohoto vynálezu značeny detekovatelnou skupinou. Detekovatelná skupina může být jakákoliv skupina, která je schopná produkovat, ať přímo nebo nepřímo, detekovatelný signál. Např. detekovatelná skupina může být radioisotop, jako je ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S nebo ^{125}I , fluorescenční nebo chemiluminiscenční sloučenina, jako je fluoresceinizothiokyanát, rhodamin nebo luciferin; radioaktivní izotopické značky, jako je např. ^{125}I , ^{32}P , ^{14}C nebo ^3H , nebo enzym, jako je alkalická fosfatáza, beta-galaktosidáza nebo křenová peroxidáza.

Může být použita jakákoliv v oboru známá metoda pro oddělenou konjugaci protilátky s detekovatelnou skupinou, včetně těch, které jsou popsány v Hunter a kol., *Nature*, 144: 945 [1962]; David, a kol., *Biochemistry*, 13: 1014 [1974]; Pain, a kol., *J. Immunol. Meth.*, 40: 219 [1981]; a Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407 [1982].

Protilátky podle předkládaného vynálezu mohou být použity v jakémkoliv známém stanovení, jako je kompetitivní vazebné stanovení, přímé a nepřímé sendvičové stanovení a imunoprecipitační stanovení. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, str. 147–158 (CRC Press, Inc. 1987).

Kompetitivní vazebné stanovení je založeno na schopnosti značeného standardu (kterým může být ligand *mpl* nebo jeho imunologicky reaktivní část) soutěžit s testovaným vzorkem analytu (ligand *mpl*) o vazbu s limitovaným množstvím protilátky. Množství ligandu *mpl* v testovaném vzorku je inverzně proporcionální množství standardu, který se navázal na protilátku. K usnadnění stanovení množství standardu, který se navázal, jsou protilátky obvykle insolubilizovány před nebo po kompetici, takže standard a analyt, které jsou vázány na protilátku, mohou být obvykle separovány od standardu a analytu, který zůstal nenavázán.

Sendvičové stanovení zahrnuje použití dvou protilátek, každá je schopná vázat různou imunogenní část nebo epitop proteinu (ligandu *mpl*) který má být stanoven. V sendvičovém stanovení je testovaný vzorek analytu vázán první protilátkou, která je imobilizována na pevný nosič, a poté je na analyt navázána druhá protilátka, která tvoří nerozpustný tříložkový komplex. David & Greene, *US 4 376 110*. Druhá protilátka může být značena detekovatelnou skupinou (přímá sendvičová analýza) nebo může být měřena pomocí anti-imunoglobulinové protilátky, která je značena detekovatelnou skupinou (nepřímé sendvičové stanovení). Např. jedním typem sendvičového stanovení je ELISA stanovení, v tom případě je detekovatelnou skupinou enzym (např. křenová peroxidáza).

(iii) Humanizované a lidské protilátky

Postupy pro humanizaci non-humánních protilátek jsou v oboru dobře známy. Obecně, humanizované protilátky mají v sobě zaveden jeden nebo více aminokyselinových zbytků ze zdroje, kterým je non-humánní. Toto non-humánní aminokyselinové zbytky jsou často označeny jako „importované“ zbytky, které jsou obvykle vzaty z „importních“ variabilních domén. Humanizace může být v podstatě provedena následující metodou podle Wintera a spolupracovníků (Jones a kol., *Nature*, 321: 522–525 1986]; Riechmann a kol., *Nature*, 332: 323–327 [1988]; Verhoeye a kol., *Science*, 239: 1534–1536 [1988]), substitucí hlodavčích CDRs nebo CDR sekvencí za odpovídající sekvence lidské protilátky. Takto „humanizované“ protilátky jsou chimérické protilátky (Cabilly a kol., viz výše), kde prakticky méně než celá lidská variabilní doména je substituována odpovídající sekvencí z non-humánního druhu. Prakticky, humanizované protilátky jsou obvykle lidské protilátky, ve který jsou některé CDR zbytky a možno některé FR zbytky substituovány zbytky z analogických míst z hlodavčích protilátek.

Volba lidské variabilní domény, lehké i těžké, která bude použita při přípravě humanizované protilátky, je velmi důležitá, aby byla redukována antigenicity. V souladu s takzvanou „best-fit“ metodou je prováděn screening sekvence variabilní domény hlodavčí protilátky proti celé knihovně známých sekvencí lidských variabilních domén. Lidská sekvence, která je nejbližší hlo-

5 davčí sekvenci, je přijatelná jako rámec (FR) pro humanizovanou protilátku (Sims a kol, J. Immunol., 151: 2296 [1993]; Chothia a Lesk, J. Mol Biol. 196: 901 [1987]). Další metoda užívá speciální rámec odvozený od shodné sekvence všech lidských protilátek speciální podskupiny lehlých nebo těžkých řetězců. Stejná kostra může být použita pro několik různých humanizovaných protilátek (Carter a kol., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:4285 [1992]; Presta a kol., J. Immunol, 151: 2623 [1993]).

10 Dále je významné, že protilátky jsou humanizovány se zachováním vysoké afinity k antigenu a dalších prospěšných biologických vlastností. K dosažení tohoto cíle, v souladu s výhodnými metodami, jsou humanizované protilátky připraveny metodou analýzy parenterálních sekvencí a různých koncepčních humanizovaných produktů s použitím třírozměrných modelů parenterálních a humanizovaných sekvencí. Třírozměrné imunoglobulinové modely jsou běžně dostupné a jsou známé osobám vzdělaným v oboru. Jsou dostupné počítačové programy, které vysvětlují a zobrazují možné třírozměrné konformační struktury vybraných kandidátů imunoglobulinových sekvencí. Prohlídka těchto zobrazení umožňuje analýzu pravděpodobné úlohy zbytků ve fungování potenciální imunoglobulinové sekvence, tj. analýzu zbytků, které ovlivňují schopnost potenciálního imunoglobulinu vázat jeho antigen. Tímto způsobem mohou být vybrány FR zbytky a kombinovány ze shodných a importních sekvencí aby byla získána požadovaná charakteristika, jako je zvýšená afinita pro cílový antigen (antigeny). Obecně, CDR zbytky jsou přímo a většinou prakticky zahrnuty do ovlivnění vazby antigenu. Další detaily viz US přihláška sér. č. 07/934 373 registrovaná 21. srpna 1992, která je částečným pokračováním přihlášky č. 07/715 272 registrované 14. července 1991.

25 Eventuálně je nyní možné připravit transgenní zvířata (např. myši), která jsou schopná, po imunizaci, produkovat celou škálu lidských protilátek bez přítomnosti endogenní imunoglobulinové produkce. Např. bylo popsáno, že homozygní delece genu napojovací oblasti (J_H) těžkého řetězce protilátky v chimérické a zárodečné linii mutantních myši vede k celkové inhibici endogenní produkce protilátek. Přenesení seskupení lidského genu imunoglobulinové zárodečné linie do mutantní zárodeční linie takovýchto myši bude vést k produkci lidských protilátek s vyloučením protilátky. Viz např. Jakobovits a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551255 [1993]; Jakobovits a kol., Nature, 362: 255-258 [1993]; Bruggermann a kol., Year in Immuno, 7: 33 [1993]. Lidské protilátky mohou být také produkovány ve fágem představovaných knihovnách (Hoogenboom a Winter, J. Mol. Biol. 227, 381 [1991]; Marks a kol., J. Mol. Biol. 222, 581 [1991]).

35 (iv) Bispecifické protilátky

Bispecifické protilátky jsou monoklonální výhodněji lidské nebo humanizované protilátky, které mají vazebnou specifitu pro nejméně dva různé antigeny. Metody pro přípravu bispecifických protilátek jsou v oboru dobře známy.

40 Obvykle je rekombinantní produkce bispecifických protilátek založena na koexpresi dvou imunoglobulinových párů těžký řetězec – lehký řetězec, kde mají dva těžké řetězce různé specifity (Millistein a Cuello, Nature, 305:537–539 [1983]). Kvůli náhodnému rozdělení imunoglobulinových těžkých a lehkých řetězců, tyto hybridomy (quadromy) produkují potenciální směs 10 různých protilátkových molekul, z kterých pouze jedna má správnou bispecifickou strukturu. Purifikace správné molekuly, která je obvykle prováděna kroky afinitní chromatografie, je poněkud těžkopádná, a výtěžek produktu je malý. Podobné postupy jsou popsány v PCT publikaci č. WO 93/08829 (publikována 13. května 1993), a Trauneker a kol., EMBO, 10: 3655–3659 [1991]).

50 V souladu s jinými a výhodnějšími postupy jsou protilátkové variabilní domény s požadovanou vazebnou specifitou (kombinujícím místem protilátka–antigen) fúzovány do imunoglobulinové konstantní doménové sekvence. Fúze je výhodnější s těžkým řetězcem konstantní domény imunoglobulinu, obsahujícím nejméně část stěžejního prvku, CH2 nebo CD3 oblasti. Je preferováno, aby první konstantní oblast těžkého řetězce (CH1) obsahovala místo nutné pro vazbu lehkého

řetězce, přítomné v nejméně jedné fúzi. DNA kódující fúze imunoglobulinového řetězce a, pokud je třeba, imunoglobulinový lehký řetězec, je vložena do zvláštních expresních vektorů, a je transfekována do vhodného hostitelského organismu. To zajišťuje větší flexibilitu v nastavení vzájemných poměrů tří polypeptidových fragmentů v provedeních pokud jsou použity nestejně poměry tří polypeptidových řetězců použitých při konstrukci zajišťující optimální výtěžky. Je ovšem možné vložit kódující sekvenci pro dva nebo všechny tři polypeptidové řetězce do jednoho expresního vektoru, pokud exprese nejméně dvou polypeptidových řetězců ve stejném poměru vede k vysokým výtěžkům nebo pokud poměry nemají zvláštní význam. Je preferováno provedení podle tohoto postupu, bispecifické protilátky jsou složeny z hybridního imunoglobulinového těžkého řetězce s první vazebnou specifitou na jednom rameni, a hybridním imunoglobulinovým párem těžký řetězec – lehký řetězec (poskytující druhou vazebnou specifitu) na druhém rameni. Bylo zjištěno, že tato asymetrická struktura usnadňuje separaci požadované bispecifické sloučeniny od nežádoucích kombinací imunoglobulinových řetězců, protože přítomnost imunoglobulinového lehkého řetězce v pouze jedné polovině bispecifické molekuly usnadňuje separaci. Tento postup je popsán v souběžně podané přihlášce sér. č. 07/931 811 registrované 17. srpna 1992.

Další detaily přípravy bispecifických protilátek viz. např. Suresh a kol., *Methods in Enzymology*, 121:210 [1986].

(v) Heterokonjugované protilátky

Heterokonjugované protilátky jsou složeny z dvou kovalentně navázaných protilátek. Takovéto protilátky mohou být např. použity k zacílení buněk imunitního systému na nežádoucí buňky (US 4 696980), a pro léčení HIV infekcí (PCT publikace č. WO 91/00360 a WO 92/00373; EP 03089). Heterokonjugátové protilátky mohou být připraveny jakýmikoliv běžnými křížově vazebnými metodami. Vhodná křížově vazebná agens jsou v obou dobře známa, a jsou uvedena v US 4676 980, spolu s množstvím technik křížové vazby.

IV. Terapeutické použití megakaryocytopoetického proteinu ligandu *mpl*

Biologicky aktivní ligand *mpl* mající heteropoetickou efektorovou funkci a označený zde jako megakaryocytopoetický nebo trombocytopoetický protein (TPO) může být použit ve sterilním farmaceutickém preparátu nebo prostředku ke stimulaci megakaryocytopoetické nebo trombocytopoetické aktivity u pacientů trpících trombocytopenií kvůli narušení produkci, sekvestraci, nebo zvýšené destrukci destiček. S trombocytopenií spojená hypoplazie kostní dřeně (např. aplastická anémie po chemoterapii nebo transplantaci kostní dřeně) může být účinně léčena sloučeninami podle tohoto vynálezu, stejně jako onemocnění jako roztroušená intravaskulární koagulace (DIC), imunitní trombocytopenie (včetně HIV-indukovaná ITP a non HIV-indukovaná ITP), chronická idiopatická trombocytopenie, kongenitální trombocytopenie, myelodysplazie a trombotická trombocytopenie. Navíc tyto megakaryocytopoetické proteiny mohou být použity k léčení myeloproliferativních trombocytolických onemocnění stejně jako trombocytózy za zánětlivých stavů a nedostatku železa.

Výhodná použití megakaryocytopoetického a trombocytopoetického proteinu (TPO) podle tohoto vynálezu je v: myelotoxické chemoterapii k léčení leukemie nebo pevného tumoru, myeloablativní chemoterapie k autologní nebo allogenicke transplantaci kostní dřeně, myelodysplazii, idiopatické aplastické anémii, kongenitální trombocytopenii a imunitní trombocytopenii.

I další onemocnění jsou s prospěchem léčena megakaryocytopoetickými proteiny podle tohoto vynálezu včetně defektů nebo zničení destiček jako následek účinku léků, jedů nebo aktivace na umělých površích. V těchto případech mohou být tyto sloučeniny použity ke stimulaci „zásoby“ nových „nezničených“ destiček. Kompletní seznam použitelných aplikací viz „Dosavadní stav techniky“ výše, zvláště sekce a)–f), a reference zde citované.

Megakaryopoetické proteiny podle tohoto vynálezu mohou být použity samostatně nebo v kombinaci s dalšími cytokiny, hematopoetiny, interleukiny, růstovými faktory nebo protilátkami, k léčení výše uvedených onemocnění a stavů. Tedy tyto sloučeniny mohou být použity v kombinaci s dalšími proteiny nebo peptidy, které mají trombopoetickou aktivitu, včetně: G-CSF, LIF, M-CSF, IF-1, IL-3, erythropoetinu (EPO), kit ligandu, IL-6 a IL-11.

Megakaryocytopoetické proteiny podle tohoto vynálezu jsou připraveny ve směsi s farmaceuticky přijatelným nosičem. Tento terapeutický prostředek může být podáván intravenózně nebo přes nos či plíce. Prostředek může být také podáván v případě potřeby parenterálně nebo subkutánně. Pokud je podáván soustavně, terapeutický prostředek by měl být bez pyrogenů a u parenterálně podávaného roztoku je třeba dbát na správné pH, izotonicitu a stabilitu. Tyto podmínky jsou známé každému, kdo je vzdělán v oboru. Krátce, dávkové směsi sloučenin podle předkládaného vynálezu jsou připraveny pro skladování nebo podávání směsi sloučeniny s požadovaným stupněm čistoty s fyziologicky přijatelným nosičem, excipienty nebo stabilizátory. Tyto materiály jsou netoxické pro příjemce při podávaných dávkách a koncentracích, a zahrnují pufrý jako je fosfátový, citrátový, acetátový, nebo pufr jiné organické soli, antioxidanty jako je kyselina askorbová, nízkomolekulární (méně než 10 zbytků) peptidy jako je polyarginin, proteiny, jako je sérový albumin, želatina nebo imunoglobuliny, hydrofilní polymery jako je polyvinylpyrrolidinon; aminokyseliny jako je glycin, kyselina glutamová, kyselina asparagová nebo arginin; monosacharidy, disacharidy a další uhlohydráty včetně celulózy nebo jejich derivátů, glukózy, mannózy nebo destrinů; chelatující činidla jako je EDTA, cukerné alkoholy jako je mannitol nebo sorbitol; protionty jako je sodík a/nebo neionické povrchově aktivní látky jako je Tween, Pluronic nebo polyethylenglykol.

0,5 až 500 mg sloučeniny nebo směsi megakaryocytopoetického proteinu ve formě volné kyselé nebo bazické formy jako je farmaceuticky přijatelná sůl, je smíšeno s fyziologicky přijatelnou přísadou, nosičem, excipientem, pojivem, konzervační látkou, stabilizátorem, aromatem, atd., jak je ve farmacii zvykem. Množství aktivní látky v tomto prostředku je takové, aby bylo získáno vhodné dávkování v požadovaném rozmezí.

Sterilní prostředky pro injekce mohou být upraveny podle běžné farmaceutické praxe. Např. roztok nebo suspenze aktivní sloučeniny v nosiči, kterým je voda nebo přirozeně se vyskytující rostlinný olej jako sezamový, arašídový, olej ze semen bavlníku nebo syntetické mastné nosiče jako je ethyl oleát atd. Pufrý, konzervační látky, antioxidanty a podobně mohou být přidány podle obvyklé farmaceutické praxe.

Vhodné příklady preparátů se zadržovaným uvolňováním zahrnují semipermeabilní matrice pevných hydrofobních polymerů obsahující polypeptidy, jejichž matice je tvořena z tvarových částic, např. filmů nebo mikrokapslí. Příklady maticí se zadržovaným uvolňováním zahrnují polyestery, hydrogely [např. poly(2-hydroxyethylmethakrylát) jako je popsáno v Langer a kol., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 [1981] a Langer, Chem. Tech., 12, 98-105 [1982] nebo poly(vinylalkohol)], polylaktidy (US 3 773 919, EP 58 481), kopolymery L-glutamové kyseliny a gama ethyl-L-glutamátu (Sidman a kol., biopolymery, 22: 547-556 [1983]), nedegradovatelný ethylvinylacetát (Langer a kol., viz výše), degradabilní kopolymer kyseliny mléčné octové-glykolové jako je Lupron DepotTM (injikovatelné makrosféry složené z kopolymery kyseliny mléčno octové-glykolové a leuprolidacetátu) a poly-D(-)-3-hydroxybutyrová kyselina (EP 133,988).

Zatímco polymery jako je ethylen-vinyl acetát a kopolymer kyseliny mléčno octové-glykolové umožňují uvolňovat molekuly přes 100 dní, některé hydrogely uvolňují proteiny po mnohem kratší dobu. Pokud zůstávají kapsulované proteiny v těle dlouhou dobu, mohou denarovat nebo se shlukovat následkem vlhkosti při 37 °C, což vede ke ztrátě biologické aktivity a možným změnám imunogenicity. Pro protein mohou být navrženy racionální strategie pro stabilizaci proteinu v závislosti na mechanismu. Například pokud je zjištěno, že agregační mechanismus je vznik intermolekulární S-S vazebné formy přes disulfidovou vzájemnou výměnu, stabilizace může být

provedena modifikací sulfhydrolových zbytků, lyofylizací z kyselého roztoku, kontrolou obsahu vlhkosti, použitím vhodných aditiv, a odhalením specifického složení polymeru matrix.

5 Megakaryocytopoetické proteinové prostředky se zadržovaným uvolňováním také zahrnují megakaryocytopoetický protein uzavřený liposomech. Liposomy obsahující megakaryocytopoetický protein jsou připraveny metodami známými *per se*: DE 3 218 121; Epstein a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3600–3692 [1985]; Hwang a kol., Proc. natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030–4034 [1980], EP 52 322; EP 36 676; EP 88 046; EP 143 949; EP 142 641; Japonská patentová přihláška 83–118008; US 4 485 045 a 4 544 545; a EP 102 324. Obvykle jsou liposomy malé (200–800 Angstromů) unilamelárního typu, kde je lipidový obsah větší než 30 % mol. cholesterolu, vybrané míry jsou nastaveny pro optimální megakaryocytopoetickou proteinovou terapii.

Dávkování bude stanoveno ošetřujícím lékařem s přihlédnutím k různým známým faktorům, které mohou mít vliv na účinek léčiv včetně závažnosti a typu onemocnění, tělesné hmotnosti, pohlaví, diety, doby a typu podávání, dalších léků a dalších závažných klinických faktorů. Obvykle bude denní dávka v rozmezí 0,1–100 mg/kg tělesné váhy. Výhodněji bude dávka v rozmezí 0,1–50 mg/kg/den. Nejvýhodněji bude počáteční dávka v rozmezí 1–5 mg/kg/den. Nepovinně bude dávkování stejné jako u dalších cytokinů, zvláště G-CSF, GM-CSF a EPO. Terapeuticky účinné dávky mohou být stanoveny *in vitro* i *in vivo* metodami.

Příklady

Bez dalšího popisu se předpokládá, že osoba běžně vzdělaná v dané oblasti může, s použitím přecházejícího popisu a ilustrativních příkladů, provést a využít předkládaný vynález v plném rozsahu. Následující pracovní příklady tedy specificky ukazují výhodná provedení předkládaného vynálezu, a nejsou chápány jako omezující v žádném spektru oprávnění vynálezu.

30 Příklad 1

Parciální purifikace vepřového ligandu *mpl*

35 Z normálních nebo aplaztických anemických vepřů byla odebrána na destičky chudá plazma. Aplazticita vepřů byla způsobena ozářením 900 cGy celkového tělesného záření s použitím 4mEV lineárního urychlovače. Ozáření vepři dostávali 6–8 dní intramuskulárně injektovaný cefazolin. Následně byl odebrán jejich celkový objem krve za celkové anestezie, heparinizován, a centrifugován při 1800xg 30 min. za vzniku plazmy chudé na destičky. Bylo zjištěno, že megakaryocytová stimulační aktivita měla vrchol 6 dní po ozáření.

40 Aplastická vepřová plazma získaná z ozářených vepřů byla upravena 4M NaCl a míchána 30 min. při laboratorní teplotě. Výsledné precipitáty byly odděleny centrifugací při 3800 ot/min v Sorvall RC3B a supernatant nanesen na Phenyl-Toyopearl kolonu (220 ml) ekvilibrovanou 10 mM NaPO₄ obsahujícím 4M NaCl. Kolona byla promyta tímto pufrem až A₂₈₀ bylo < 0,05 a eluována dH₂O. Eluovaný proteinový pík byl naředěn dH₂O na konduktivitu 15mS a nanesen na Blue-Sepharose kolonu ekvilibrovanou (240 ml) PBS. Následně byla kolona promyta, 5 objemy kolony každého, PBS a 10 mM NaPO₄ (pH 7,4) obsahujícího 2M močoviny. Proteiny byly eluovány z kolony 10 mM NaPO₄ (pH 7,4) obsahujícího 2M močoviny a 1M NaCl. Eluovaný proteinový pík je upraven na 0,01 % oktylglykosid(n-oktyl β-D-glukopiranosidu) a 1mM každého z EDTA a Pefabloc (Boehinger Mannheim) a nanesen přímo na za sebou zařazené CD4-IgG (Capon, D.J. a kol., Nature 37:525–531 [1989] a *mpl*-IgG Ultralink (Pierce) kolony (viz níže). CD4-IgG (2 ml) je odstraněna po projití vzorku a *mpl*-IgG (4 ml) kolona je promyta, čtyřmi objemy kolony každého, PBS a PBS obsahujícím 2M NaCl a eluována 0,1M glycín-HCl pH 2,25. Frakce jsou shromážděny do 1/10 objemu 1M Tris-HCl (pH 8,0).

55

Analýza eluovaných frakcí z *mpl*-afinitní kolony pomocí SDS-PAGE (4–20%, Novex gel) probíhající za redukčních podmínek ukázala přítomnost několika proteinů (obr. 5), Proteiny které byly barveny stříbrem s největší intenzitou se rozdělily s MR 66000, 5500, 30000, 28000 a 14000. Pro stanovení, které z těchto proteinů stimulují proliferaci Ba/F3 buněčných kultur, byly proteiny eluovány z gelu jak je popsáno v příkladu 2 níže.

Ultralink afinitní kolony

10–20 mg *mpl*-IgG nebo CD4-IgG v PBS jsou navázány na 0,5 gramů Ultralink pryskyřice (Pierce) jak je opsáno v komerčních instrukcích.

Konstrukce a exprese *mpl*-IgG

Chimérické molekuly obsahující úplnou extracelulární doménu lidského *mpl* (aminokyseliny 1–491) a Fc oblast lidské IgG1 molekuly byly exprimovány v 293 buňkách. cDNA fragment kódující aminokyseliny 1–491 lidské *mpl* byl získán pomocí PCR z lidské megakaryocytické CMK buněčné cDNA knihovny a sekvenován. Clal místo bylo vloženo na 5' konec a BstEII na 3' konec. Tento fragment byl klonován protisměrně k IgG1 Fc kódující oblasti v Bluescript vektoru mezi Clal a BstEII místa po parciální digesci PCR produktu s BstEII, kvůli dvěma BstEII místům přítomným v DNA kódující extracelulární doménu *mpl*. BstEII místo zavedené na 3' konci *mpl* PCR produktu bylo sestrojeno tak, aby mělo Fc oblasti dohromady s *mpl* extracelulární doménou. Konstrukt byl subklonován do pRD5-tkneo vektoru mezi Clal a XbaI místa a transfekován do 293 lidských zárodečných ledvinových buněk kalciumfosfátovou metodou. Buňky byly selektovány v 0,4 mg/ml G418 a byla izolovány jednotlivé klony. *Mpl* exprese z izolovaných klonů byla stanovena s použitím lidské Fc specifické ELISA. Klon s nejlepší expresí měl hladinu exprese 1–2 mg/ml *mpl*-IgG.

Ba/F3 *mpl* P expresní buňky

cDNA odpovídající úplné kódující oblasti lidského *mpl* P byla klonována do pRK5-tkneo, který byl následně linearizován s NotI a tranfekován do IL-3 dependentní buněčné linie Ba/F3 elektroporací (1×10^7 buněk, 9605F, 250 voltů). O tři dny později byla započata selekce v přítomnosti 2 mg/ml G418). Buňky byly selektovány a smíšené nebo individuální klony byly získány limitním ředěním na destičkách s 96 jamkami. Vybrané buňky byly pěstovány v RPMI obsahující 15% FBS, 1 mg/ml G418, 20mM glutaminu, 10mM HEPES a 10 mg/ml Pen Strep. Exprese *mpl* P v selektovaných klonech byla stanovena FACS analýza s použitím anti-*mpl* P králičí polyklonální protilátky.

Ligandové stanovení *mpl* Ba/F3

Ligandové stanovení *Mpl* bylo provedeno, jak je ukázáno na obr. 2. Ke stanovení přítomnosti ligandu *mpl* z různých zdrojů byly *mpl* P Ba/F3 buňky vyhledovány IL-3 po dobu 24 hod. při buněčné hustotě 5×10^5 buněk/ml ve zvlhčovaném inkubátoru při 37 °C v 5 % CO₂ a vzduchu. Po IL-3 vyhledování byly buňky naneseny na 96-jamkovou kultivační misku s hustotou 50000 buněk v 200 ml média s nebo bez rozpuštěných vzorků a kultivovány 24 hod. v inkubátoru buněčných kultur. Na posledních 6–8 hodin bylo do každé jamky přidáno 20 ml sérum-prostého RPMI média obsahujícího 1 cC ³H-thymidinu. Buňky byly poté odebrány na GF/C filtrační destičku a promyty pětkrát vodou. Filtrát byl odečten v přítomnosti 40 ml scintilační tekutiny (Mikroscint 20) na čítači packard Top Count.

Příklad 2

Vysoce purifikovaný vepřový ligand

5

Postup gelové eluce

Bylo smíšeno stejné množství afinitně purifikovaného ligandu *mpl* (frakce 6 eluovaná z *mpl*IgG kolony) a 2X Laemmliho vzorkového pufru při laboratorní teplotě bez redukčního činidla a naneseno na Novex 4–20% polyakryamidový gel tak rychle jak je to možné. Vzorek nebyl zahřátý. Gelem probíhalo při 4–6 °C 15 voltů přibližně 2 1/4 hod. Průběhový pufr měl na začátku laboratorní teplotu. Bel byl poté vyjmut z gelového boxu a odstraněn plát na stranách.

Replikační gel byl připraven na nitrocelulóze následovně: Kus nitrocelulózy byl zvlhčen destilovanou vodou a opatrně položen na vrch exponované strany gelu s vyloučením vzduchových bublinek. Na nitrocelulózu a na plát gelu byly umístěny výchozí značky, aby mohla být přesně stanovena poloha kopie po barvení. Po dvou minutách byla nitrocelulóza odebrána, a gel byl zabalen do plastického obalu a umístěn v lednici. Nitrocelulóza byla obarvena Biorad zlatým celkovým proteinovým barvením (Biorad s gold total protein stain nejprve mícháním v 3x10 ml 0,1 Tween 20 + 0,5M NaCl + 0,1M Tris-HCl pH 7,5 přibližně 45 min. a následně 3x10 ml purifikována vodou 5 min. Potom byla přidáno zlaté barvivo a prováděno barvení, dokud nebyly vidět pásy standardů. Kopie byla poté promyta vodou, umístěna na plastický obal na gelu a opatrně byly vyrovnány výchozí značky. Polohy Novex standardů byly označeny na plátu gelu a byly označeny pásy, aby bylo vidět, které je třeba vyříznout. Nitrocelulóza a plastický obal byly poté odstraněny a gen byl rozřezán podél označených linií ostrou holicí čepelkou. Řezy byly vedeny přes linie vzorku, který byl použit ke stanovení polohy plátu při barvení gelu. Po odstranění plátků byl zbývající gel obarven byly měřeny polohy standardů počátečních značek. Molekulární hmotnosti odpovídající polohám řezu byly stanoveny Novex standardy.

12 plátů gelu bylo umístěno do cel dvou Biorad 422 elektroelutorů. V buňkách byly použity membránové čepičky s vylučovací molekulární hmotností 12–14 K. Eluční pufr byl 50 mM hydrogenuhličitan amonný + 0,05% SDS (přibližně pH 7,8). Jeden litr pufru byl před použitím chlazen přibližně 1 hod. v chladicím boxu při 4–6 °C. Gelové pláty byly eluovány v 10 ma//celu (40 v původně) při 4–6 °C v chladicím boxu. Eluce probíhala přibližně 4 hod. Cely byly poté opatrně vyjmuty a tekutina nad fritou odebrána pipetou. Tekutina v membránové čepičce byla odebrána Pipetmanem a uschována. Do čepičky bylo poté umístěno padesát ml alikvotů purifikované vody, zamícháno a odebráno po rozpuštění všech SDS krystalů. Tato promytí byla zkombinována s uschovanou výše uvedenou kapalinou. Celkový eluční objem byl 300–500 ml na plát gelu. Vzorky byly umístěny do 10 mm Spektrapor 4 dialyzační trubice s vylučovací hodnotou 12–14K, která byla namočená několik hodin v ultračisté vodě. Byly dialyzovány přes noc při 4–6 °C proti 600 ml fosfátem pufrovaného solného roztoku (PBS je přibližně 4 mM v draslíku) v 6 vzorcích. Pufr byl vyměněn následující ráno a dialýza pokračovala 2,5 hodiny. Vzorky byly odebrány z dialyzačních trubic a umístěny do mikrofugačních kyvet. Kyvety byly umístěny 1 hod. na led, mikrofugovány při 14K ot/min 3 min. a supernatanty byly opatrně odebrány od precipitovaného SDS. Supernatanty byly umístěny na 1 hod. na led a znovu mikrofugovány 4 min. Supernatanty byly rozpuštěny ve fosfátem pufrovaném solném roztoku a podrobeny stanovení aktivity. Zbývající vzorky byly zmrazeny na –70 °C.

50 Příklad 3

Mikrosekvenování vepřového ligandu *mpl*

Frakce 6 (2,6 ml) z *mpl*-IgG afinitní kolony byla koncentrována na Micocon-10 (Amicon). Aby se předešlo absorpci ligandu *mpl* na Microcon, byla membrána promyta 1% SDS a do frakce 6

bylo přidáno 5 ml 10% SDS. Do frakce č. 6 po Microcon zakoncentrování (20 ml) byl přidán vzorkový pufr (20 ml) 2X a celkový objem (40 ml) byl nanesen na jeden pás 4–20% gradientového akrylamidového gelu (Novex). Gel byl poté vyvíjen podle Novex postupu. Gel byl poté ekvilibrován 5 min. před elektroblotací v 10mM 3-(cyklohexylamino)-1-propansulfonové kyselině (CAPS), pH 11,0 obsahující 10 % methanolu. Elektroblotace na Immobilon-PSQ membrány (Millipore) byla prováděna 45 min. při 250 mA s konstantním průběhem v BioRad Trans-Blot přenosové cele (32). PVDF membrána byla barvena 0,1% Coomasse Blue R-250 v 40%, methanolu, 0,1 kyselině octové 1 mina odbarvována 2–3 min. 10% kyselinovou octovou v 50% methanolu. Jediné proteiny, které byly viditelné v Mr 18000–35000 oblasti blotu měly MR 30000, 28000 a 22000.

Pásky s 30, 28 a 22 000 byly podrobeny proteinovému sekvenování. Automatické proteinové sekvenování bylo provedeno na modelu 470A Applied Biosystem sekvenátoru vybaveném on-line PTH analyzátozem. Sekvenátor byl upraven na injektaci 80–90% vzorku (Rodriguez, J. chromatogr., 350: 217–225 [1985]). K vyrovnání UV absorbance byl do rozpouštědla A přidán aceton (12 ml/ml). Elektroblotované proteiny byly sekvenovány v Blott zásobníku. Píky byly integrovány softwarem Justice Innovation s použitím Nelson Analytical 970 interfaces. Interpretace sekvencí byla provedena na VAX 59000 (Henzel a kol., J. Chromatogr. 404: 41–52 [1987]). N-koncové sekvence (s použitím jednopísmenných kódů s nezaručenými zbytky v závorkách) a kvantifikace získaného materiálu (v závorkách) jsou uvedeny v tab. 2.

Příklad 4

25 Kapalně suspenzní megakaryocytopoetické stanovení

Lidské periferální kmenová buňky (PSC)(získané od souhlasících pacientů) byly naředěny 5 násobně v IMDM médiu (Gibco) a centrifugovány 15 min. při laboratorní teplotě při 800x g. Pelety destiček byly resuspendovány v IMDM a nanesený na 60% Percoll (hustota 1,077 gm/ml) (Pharmacia) a centrifugovány při 800 x g 30 min. Na rozhraní byly odsáty jednojaderné buňky s nízkou hustotou a byly promyty 2x IMDM a nanesený při 1–2 x 10⁶ buněk/ml v IMDM obsahujícím 30 % FBS (1 ml celkový objem) do 24 jamek a shluky buněčné kultury (Costar). APP nebo APP zbavená ligandu *mpl* byly přidány v 10% a kultury byly pěstovány 12–14 dní ve zvlhčeném inkubátoru při 37 °C v 5% CO₂ a vzduchu. Kultury byly také pěstovány v přítomnosti 10% APP s 0,5 mg *mpl*-IgG přidávaného ve dnech 0,2 a 4. APP byla zbavena ligandu *mpl* průchodem APP přes *mpl*-IgG afinitní kolonu.

Při kvantifikaci megakaryocytopoézy v těchto kapalných suspenzních kulturách byla použita modifikace podle Solberga a kol, a byla použita radioznačený myší IgG monoklonální protilátka (HJ1-1D) a GPIIb/IIIa (získána od Dr. Nicholse, Mayo Clinic). 100 mg HP1-1D (viz Grant, B. a kol. Blood 69: 1334–1339 [1987]) bylo radioznačeno 1mCi Na ¹²⁵I s použitím Enzymobeads (Biorad, Richmond, CA) podle komerčních instrukcí. Radioznačený HP1-1D byl skladován při -70 °C v PBS obsahujícím 0,01 % oktyl-glukosidu. Obvyklé specifické aktivity byly 1–2 x 10⁶ cpm/mg (>95% precipitovalo 12,5% kyselinou trichloroctovou).

Kapalně suspenzní kultury byly použity pro každý pokus triplicitně. Po 12–14 dnech kultivace byl 1 ml kultur převeden do 1,5 ml eppendorfových zkumavek a centrifugován při 800xg 10 min. při laboratorní teplotě a výsledné pelety byly resuspendovány v 100 ml PBS obsahujícího 0,02 % PBS a 20 % telecího séra. Do resuspendovaných kultur bylo přidáno 10 ng ¹²⁵I-HP1-1D v 50 ml stanovovacího pufru a byly inkubovány 60 min. při laboratorní teplotě (RT) s občasným protřepáním. Následně byly buňky shromážděny centrifugací při 800xg 10 min. Při RT a promyty 2x stanovovacím pufrém. Pelety byly odečítány 1 min. v gama čítači (Packard). Nespecifické vazby byly stanoveny přidáním 1 ml neznačeného HP1-1D na 60 minut při přidání značeného HP1-1D. Specifické vazby byly stanoveny jako celková ¹²⁵I-HP1-1D vazba minus tyto vazby v přítomnosti přebytku neznačeného HP1-1D.

Příklad 5

Oligonukleotidové PCR primery

5 Na základě amino-koncových aminokyselinových sekvencí získaných z 30 000, 28 000 a 18–
22 000 proteinů, byly navrženy degenerované oligonukleotidy pro použití jako primery polyme-
rázové řetězové reakce (PCR) (viz Tab 4). Byly syntetizovány dva pooly primerů, pool 20merů
10 se souhlasným směrem kódující aminokyselinové zbytky 2–8 (*mpl* 1) a pool protisměrných 21–
merů komplementární k sekvencím kódujících aminokyseliny 18–24 (*mpl* 2).

Tabulka 4

15 Pooly degenerovaných oligonukleotidových primerů

<i>mpl</i> 1:5'CCN GCN CCN CCN GCN TGY GA 3' (2,048-násob.degener.)	(SEQ ID NO: 35)
<i>mpl</i> 2:5'NCC RTG NAR NAC RTG RTC RTC 3'(2,048-násob.degener.)	(SEQ ID NO: 36)

20 Vepřová genomická DNA, izolovaná z vepřových periferních krevních lymfocytů, byla použita
jako šablona pro PCR. 50 ml reakční směsi zahrnovalo: 0,8 mg vepřové genomické DNA
v 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3mM MgCl₂, 100 mg/ml BSA, 400 mM dNTPs, 1mM
každého primerového poolu a 2,5 jednotek *Taq* polymerázy. Počáteční denaturace šablony byla
při 94 °C 8 min a následovalo 35 cyklů 45 s při 94 °C, 1 min. při 55 °C a 1 min. při 72 °C. Pos-
lední cyklus byl prodloužen na 10 min při 72 °C. PCR produkty byly separovány elektroforézou
25 na 12% polyakryamidovém gelu a vizualizovány barvením ethidium bromidem. Lze předpoklá-
dat, že pokud aminokoncová aminokyselinová sekvence kódovala jeden exon, tak správný PCR
produkt bude 69bp. DNA fragment této velikosti byl eluován z gelu subklonován do pGEMT
(Promega). Sekvence tří klonů jsou uvedeny dole v tab. 5.

Tabulka 5

30 69 bp fragmenty vepřové genomické DNA

<p>gem T3 5'<u>CCAGCGCCGC CAGCCTGTGA</u> CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCCTCGTGA 3'<u>GGTCGCGGCG GTCGGACACT GGGGGCTGAG GATTTATTTG ACGGAGCACT</u> <u>TGACCACGTT CAGCACGGC [69 bp]</u> (SEQ ID NO: 37) <u>ACTGGTGCAA GTCGTGCCG</u> (SEQ ID NO: 38)</p>
<p>gem T7 5'<u>CCAGCACCTC CGGCATGTGA</u> CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCTTCGTGA 3'<u>GGTCGTGGAG GCCGTACACT GGGGGCTGAG GATTTATTTG ACGAAGCACT</u> <u>GCACCACGTC CATCACGGC [69 bp]</u> (SEQ ID NO: 39) <u>GCTGGTGCA GTAGTGCCG</u> (SEQ ID NO: 40)</p>

gem T9

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

5'CCAGCACCGC CGGCATGTGACCCCGACTCCTAAATAAACTGCTTCGTGACG3'GGTTCGTGGCGGCCGTACACTGGGGGCTGAGGATTTATTTGACGAAGCACTGC

ATCATGTCTATCACGGT 3' (SEQ ID NO: 41)

TAGTACAGATAGTGCCA 5' (SEQ ID NO: 42)

Polohy PCR primerů jsou označen podtržením bází. Tyto výsledky potvrzují N-koncovou sekvenci získanou pro aminokyseliny 9–18 pro 30 000, 28 000 a 18–22 000 proteiny a znamenají, že tato sekvence je kódována jedním exonem vepřové DNA.

5

Příklad 6

Gen lidského ligandu *mpl*

10

Na základě výsledků v příkladu 5, byl 45–merový deoxyoligonukleotid, nazvaný pR45, popsán a syntetizován, aby mohl být proveden screening genetické knihovny. 45–mer měl následující sekvenci:

15

5 GCC–GTT–AAG–GAC–GTG–GTC–ACG–AAG–CAG–TTT–ATT–TAG–GAG–TCG 3
(SEQ ID NO: 28)

20

Tento oligonukleotid byl ³²P–značen s (g³²P)–ATP a T4 kinázou a použit ke screeningu lidské genomické DNA knihovny v Igel12 za slabě náročných hybridizačních a promývacích podmínek (viz příklad 7). Byly shromážděny pozitivní klony, plak byl purifikován a analyzován restričním mapováním a southern blotováním. Pro další analýzu byl vybrán klon č. 4.

25

2,8 kb fragment *bam*HI–*Xba*I, který hybridizoval na 45–mer, byl subklonován do pBluescript SK–. Parciální sekvenování DNA tohoto klonu bylo provedeno s použitím primerů oligonukleotidů specifických k vepřové ligandové DNA sekvenci DNA *mpl*. Získaná sekvence potvrdila, že byla izolována DNA kódující lidský homolog vepřového ligandu *mpl*. V sekvenci bylo detekováno *Eco*RI restriční místo, což nám umožnilo izolovat 390 bp *Eco*RI–*Xba*I fragment z 2.8 kb *Bam*HI–*Xba*I a subklonovat ho do pBluescript SK–.

30

Byla sekvenována obě vlákna tohoto fragmentu. Lidská DNA sekvence a vyvozená aminokyselinová sekvence jsou zobrazeny na obr. 9 (SEQ ID NO:3 a 4). Vyvozené polohy intronů v genomické sekvenci jsou také označeny šipkami, a definují předkládaný exon („exon 3“).

35

Prozkoumání vyvozené aminokyselinové sekvence potvrzuje, že serinový zbytek je první aminokyselinou zralého ligandu *mpl*, jak bylo stanoveno přímou aminokyselinovou sekvenční analýzou. Vyvozená aminokyselinová sekvence bezprostředně proti směru od tohoto kodonu velice připomíná signální sekvenci zapojenou v sekreci zralého ligandu *mpl*. Oblast kódující signální oblast je pravděpodobně přerušena na nukleotidové pozici 68 intronem.

40

Bylo objeveno, že v 3 směru exon končí na nukleotidu 196. tento exon tedy kóduje sekvenci 42 aminokyselin, 16 z nich je pravděpodobně součástí signální sekvence z 26 z nich je součástí zralého lidského ligandu *mpl*.

Příklad 7

cDNA lidského ligandu mpl plné délky

5

Na základě lidské „exonové 3“ sekvence (příklad 6) byly syntetizovány dvě nedegenerované sekvence odpovídající 3 a 5 koncům „exonu 3“ (tab. 6).

10 Tabulka 6

Lidské cDNA nedegenerované PCR oligonukleotidové primery

Fwd primer: 5' GCT ACG TCT AGA AAT TCG TCC TCG TGG TCA TGC TTC T 3'	(SEQ ID NO:43)
Rvs primer: 5' CAG TCT GCC GTG AAG GAC ATG G 3'	(SEQ ID NO. 44)

15 Tyto dva primery byly použity v PCR reakcích sloužily jako šablony DNA z různých lidských cDNA knihoven nebo 1 ng Quick Clone CDNA (Clonotech) z různých tkání za podmínek použití v příkladu 5. Očekávaná velikost správného PCR produktu byla 140 bp. Po analýze PCR produktů na 12% polyakrylamidovém gelu byl DNA fragment očekávané velikosti detekován v cDNA knihovnách připravených z dospělých ledvinných buněk, 293 zárodečných ledvinných buněk a cDNA připravené z lidských zárodečných jater (Clonotech cat č. 7171-1).

20

Byl proveden screening cDNA knihovny zárodečných jater v I CR2 (Clonotech cat č. HL1151x) se stejným 45-merovým oligonukleotidem, který byl použit ke screeningu lidské genomické knihovny. Oligonukleotid byl značen (³²P)-ATP s použitím T4 polynukleotidkinázy. Byl proveden screening knihovny za slabě náročných hybridizačních podmínek. Filtráty byly prehybridizovány 2 hod., pak hybridizovány se vzorkem přes noc při 42 °C a 20% formamidu, 5xSSC, 1xDenhardt s, 0,05 fosfátu sodného (pH 6,5), 0,1 % pyrofosfátu sodném, 50 mg/ml sonizované DNA z lososího spermatu 16 hod. Filtráty byly poté promyty v 2xSSC a poté jednou promyty v 0,5xSSC, 0,1% SDS při 42 °C. Filtráty byly exponovány přes noc na Kodak rentgenový film. Pozitivní klony byly shromážděny, plak byl purifikován a velikost inzertu byla stanovena PCR používající oligonukleotidy lemující BamHI-XbaI klonující v I DR2 (Clonotech cat. č. 6475-1). 5 ml fágového materiálu bylo použito jako zdroj šablony. Počáteční denaturace byla 7 min. při 94 °C a následovalo 30 cyklů amplifikace (1 min. 94 °C, 1 min. 52 °C a 1,5 min. 72 °C). Konečným stupněm bylo 15 min. při 72 °C. Klon č. FL2b měl 1.8 kb inzert a byl vybrán pro další analýzu.

35

Plazmid pDR2 (Clonotech, IDR2 & pDR2 Cloning and Expression System Library Protocol Handbook, str. 42) obsahující v IDR2 fágové rameno, byl uvolněn podle komerčního návodu (Clonotech, Clonotech, IDR2 & pDR2 Cloning and Expression System Library Protocol Handbook, str. 29-30). Restrikční analýza plazmidu pDR2-FL2b s BamHI a XbaI ukázala přítomnost interního BamHI restrikčního místa v inzertu přibližně v poloze 650. Digeste plazmidu s BamHI-XbaI rozdělila inzert na dva fragmenty, jeden 0,65 kb a jeden 1,15 kb. DNA sekvence byla stanovena s třemi různými třídami šablony odvozenými z plazmidu pDR2-FL2b. DNA sekvenování dvouvláknového plazmidu DNA bylo provedeno s ABI373 (Applied biosystems, Foster City, California) automatizovaným fluorescenčním DNA sekvenátorem s použitím standardních postupů pro barevně značené dideoxynukleosidtrifosfátterminátory (barvivové-terminátory) a běžně syntetizované „walking“ primery (Sanger a kol., proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467 [1977]; Smith a kol., Nature, 321: 674-679 [1986]). Přímé sekvenování polymerázovou řetězovou reakcí amplifikovaných fragmentů z plazmidu bylo provedeno ABI373 sekvenátorem s použitím běžných primerů a barvivově-terminátorových reakcí. Jednovláknová šablona by-

45

la generována s M13 Janus vektorem (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin) (Buland a kol., Nucl. Acids Res., 21: 3385–3390 [1993]). BamHI–XbaI (1,15 kb) a BamHI (0,65 kb) fragmenty byly izolovány z plazmidu pDR2–FL2b, konce doplněny s T4 DNA polymerázou v přítomnosti deoxynukleotidů, a poté subklonovány na SmaI místo M13 Janus. Sekvenování bylo provedeno podle standardních postupů pro barevně značené M13 univerzální a reverzní primery, nebo „walking“ primery a barvivové–terminátory. Manuální rekvenační reakce byly provedeny na jednořetězcové M13 DNA s použitím „walking“ primerů a standardní dideoxyterminátorové chemie (Sanger a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463–5467 [1977]), a za použití ³³P–značené d–ATP a Sequenase (United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio). Sekvenční složení DNA bylo provedeno s Sequencherem V2.1b12 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan). Nukleotidová sekvence a vyozené sekvence hML jsou uvedeny na obr. 1 (SEQ ID NO: 1).

Příklad 8

15

Izolace genu lidského ligandu mpl (TPO)

Lidské genomické DNA klony TPO genu bylo izolováno screeningem lidské genomické knihovny v I–Gem12 s pR45, výše popsána oligonukleotidová zkouška ze slabě náročných podmínek (viz příklad 7) nebo za vysoce náročných podmínek s fragmentem odpovídajícím 3 polovině lidské cDNA kódující ligand *mpl* (do BamHI do 3 konce). Byly izolovány dva překrývající se lambda klony s rozpětím 35 kb. Dva překrývající se fragmenty (BamHI a EcoRI) obsahující úplný TPO gen byly subklonovány a sekvenovány. Struktura lidského genu je složena ze 6 exonů se 7 kb genomické DNA (obr. 14A, B a C). Hranice všech spojení exon/intron jsou shodné s odpovídajícím prvky potvrzenými u savčích genů (Shapiro, M.B., a kol., Nucl. Acids Res. 15: 7155 [1987]). Exon 1 a exon 2 obsahuje 5 netranslatovanou sekvenci a úroveň čtyři aminokyseliny signálního peptidu. Zbytek sekretorického signálu a první 26 aminokyselin zralého proteinu je kódováno v exonu 3. Úplná karboxylová doména a 3 netranslatovaná oblast stejně jako asi 50 aminokyselin domény erythropoetického typu jsou kódovány v exonu 6. Čtyři aminokyseliny zahrnuté v deleci pozorované v hML–2 (hTPO–2) jsou kódovány v 5 konci exonu 6.

30

Příklad 9

Přechodná exprese lidského ligandu mpl (hML)

Aby byl subklonován inzert plné délky obsažený v pDR2–FL2B, byl plazmid kompletně digestován XbaI a poté parciálně digestován BamHI. DNA fragment odpovídající 1,8 kb inzertu byl gelově purifikován a subklonován v pRK5 (pRK5–*hmpl* I) (viz US 5 258 287 konstrukce pRK5) za kontroly cytomegalovirového přímého časného promotoru. DNA z konstrukce pRK5–*hmpl* I byla připravena PEG metodou a transfekována do 293 buněk lidských zárodečných ledvin udržovaných v Dulbeccosem modifikovaném Eaglově médiu (EMEM) obohaceném F–12 výživovou směsí, 20mM Hepes (pH 7,4) a 10 % zárodečného hovězího séra. Buňky byly transfekovány metodou fosfátu vápenatého jak je popsáno v (Gorman, C. [1985] DNA Cloning: A Practical Approach (Glover, D.M., editoři) Vol. II, str. 143–190, IRL Press, Washington, D.C.). 36 hod. po transfekci byla v supernatantu transfekovaných buněk stanovena aktivita proliferativním stanovením (Viz příklad 1). Supernatant 293 buněk transfekovaných pouze s pRK vektorem nevykazoval žádnou stimulaci Ba/F3 nebo Ba/F3–*mpl* buněk (obr. 12A). Supernatant buněk transfekovaný s pRK5–*hmpl* I neměl žádný efekt na Ba/F3 buňky, ale výrazně stimuloval proliferaci Ba/F3–*mpl* buněk (obr. 12A), což znamená, že tato cDNA kóduje funkčně aktivní lidský ligand *mpl*.

50

Příklad 10

Lidské ligandové izoformy *mpl*: hML2, hML3 a hML4

- 5 Aby byly identifikovány alternativně spojené formy hML, byly syntetizovány primery odpovídající každému konci kódující sekvence hML. Tyto primery byly použity v RT-PCR k amplifikaci RNA lidských dospělých jater. Navíc byly konstruovány a podobně použity interní primery lemující vybrané oblasti, které nás zajímají (viz níže). Produkt přímého sekvenování konců pomocí PCR ukázal jednu sekvenci odpovídající přesně sekvenci cDNA izolované z knihovny lidských
- 10 zárodečných jater (viz obr. 1 [SEQ ID NO: 1]). Ovšem oblast blízko C-konce EPO-domény (ve středu PCR produktu) vykazuje komplex sekvencí charakterem naznačující existenci možných vazebných variant v této oblasti. Aby mohly být izolovány tyto vazebné varianty, byly primery uvedené v tab. 7 lemující oblast našeho zájmu použity v PCR jako šablona pro cDNA lidských
- 15 dospělých jater.

Tabulka 7

PCR primery lidské ML izoformy

phmplicdna.3e1: 5'TGGGGACTTTACGTTGGGAGAATG3'	(SEQ ID NO: 45)
pbx4.f2: 5'GGTCCAGGGACCTGGAGGTTTG3'	(SEQ ID NO: 46)

20

- PCR produkty byly subklonovány do M13. Sekvenování individuálních subklonů ukázalo existenci nejméně 3 ml izoform. Jedna z nich hML (také označovaná jako hML₃₃₂), je nejdelší formou a odpovídá přesně sekvenci izolované z knihovny zárodečných jater. Sekvence čtyř lidských ligandových izoform *mpl* uvedených od nejdelší (hML) po nejkratší (hML-4) jsou uvedeny na obr. 11 [SEQ ID NO: 6,8,9 a 10]).
- 25

Příklad 11

- 30 Konstrukce a přechodná exprese izoform a substitučních variant lidského ligandu *mpl* (hML2, hML3, a hML(R153A, R154A))

- Izoformy hML2 a hML3 a substituční varianta hML(R153A, R154A) byly znovuvytvořeny z hML s použitím rekombinantní PCR techniky popsané v Russell a Higuchi, v PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Acad. Press, M.A. Innis, D.H. Gelfland, J.J.Sninsky & T.J. White Editors.
- 35

Použité „vnější“ primery a jsou ukázány v tab. 8 a „překrývající se“ (overlapping) primery v tab. 9.

40

Tabulka 8

Vnější primery

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

45

Tabulka 9

Překrývající se primery

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

Všechna PCR rozšíření byla provedena s klonovanou Pfu DNA polymerázou (Stratagene) s použitím následujících podmínek: počáteční denaturace šablony byla 94 °C 7 min., následovalo 30 cyklů 1 min 94 °C, 1 min. 55 °C a 1,5 min 72 °C. Konečný cyklus byl prodloužen na 10 min 72 °C. Konečný PCR produkt byl digestován ClaI–Sbal, gelově purifikován a klonován v pRK5tkneo. 293 buňky byly transfekovány různými konstrukty jak je popsáno výše a supernatant byl stanoven s použitím Ba/F3–*mpl* proliferativního stanovení, ovšem aktivity hML(R153A, R154A) byly podobné jako u hML, což znamená, že procesy na tomto dibazickém místě nejsou nutné pro aktivitu (viz obr. 13).

Příklad 12

cDNA myšního ligandu *mpl* mML, mML–2 a mML–3

Izolace cDNA mML

DNA fragment odpovídající úplné kódující oblasti lidského ligandu *mpl* získán pomocí PCR, gelově purifikován a náhodně značen napojením v přítomnosti ³²Pd–ATP a ³²P–dCTP. Tento vzorek byl použit pro screening 10⁶ klonů cDNA knihovny myších jater v IGT10 (Clontech kat. č. ml1001a). Duplikátní filtráty byly hybridizovány v 35% formamidu, 5xSSC, 10xDenhardt s, 0,1 % SDS, 0,05M fosfátu sodném (pH 6,5), 0,1% pyrofosfátu sodném, 10 mg/ml sonizované lososí spermatické DNA přes noc v přítomnosti vzorku. Filtráty byly promyty 2xSSC a poté promyty jednou v 0,5xSSC, 0,1 % SDS při 42 °C. Hybridizující fágy byly plak–purifikovány a cDNA inzerty byly subklonovány do Eco R1 místa Bluescript SD–plazmidu. Klon „LD“ s 1,5 kb inzertem byl vybrán pro další analýzu a obě vlákna byla sekvenována jak je popsáno výše pro lidskou ml cDNA. Nukleotidová a vyvozená aminokyselinová sekvence z LD klonu jsou uvedeny na obr. 14 (SEQ ID NO: 1 a 11). Vyvozená sekvence zralého ml z tohoto klonu byla 331 aminokyselinových zbytků dlouhá a byla identifikována jako mML₃₃₁ (nebo mML–2 z důvodů popsaných níže). Značená identita obou nukleotidů a vyvozených aminokyselinových sekvencí byla pozorována u domén EPO–typu těchto ml. Ovšem když byly sekvence lidské a myši HL položeny vedle sebe, myši sekvence vykazuje tetrapeptidovou delecí mezi lidskými zbytky 111–114 odpovídajícími 12 nukleotidové delecí následující nukleotidovou pozici 618 vyskytující se u lidské (viz výše) i prasečí (viz níže) cDNA. Tedy byly testovány další klony k detekci možných ml izoform. Jeden klon, „L7“, měl 1,4 kb inzert s 335 aminokyselinovou vyvozenou sekvencí obsahující „chybějící“ tetrapeptid LPLQ. Předpokládá se, že tato forma je

myší ml plné délky a je označena jako mML nebo mML₃₃₅. Nukleotidová a vyvozená aminokyselinová sekvence mML je znázorněna na obr. 18 (SEQ ID NO: 12 a 13). Nakonec, byl izolován a sekvenován klon „L2“. Tento klon má 116 nukleotidovou delecí odpovídající hML3 a je tedy označen mML-3. Srovnání vyvozených aminokyselinových sekvencí těchto dvou izoform je ukázáno na obr. 16.

Expresí rekombinantního mML.

Expresní vektor pro myší ml byl připraven v podstatě tak jak je popsáno v příkladu 8. Klony kódující mML a mML-2 byly subklonovány do pRK5neo, savčího expresního vektoru, který poskytuje expresi za kontroly CMV promotoru a SV40 polyadenylačního signálu. Výsledné expresní vektory, mMLpRKtkneo a mML2pRKtkneo byly přechodně transfekovány do 293 buněk s použitím kalciumfosfátové metody. Po transfekci bylo médium sledováno pět dní. Buňky byly udržovány ve vysoce glukózovém DMEM médiu obohaceném 10% zárodečným telecím sérem.

Expresí myšího-*mpl* (*mmpl*) v Ba/F3 buňkách.

Stabilní buněčné linie exprimující c-*mpl* byly získány transfekcí *mmpl* p RKtkneo, v podstatě tak jak je opsáno pro lidský *mpl* v příkladu 1. Krátce, expresní vektor (20 mg; linearizovaný) obsahující úplnou kódující sekvenci myšího *mpl* (Skoda, R.C., a kol., EMBO J. 12: 2645–2653 [1993]) byl transfekován do Ba/F3 buněk elektroporací (5×10^6 buněk, 250 voltů, 960 mF) s následující selekcí na neomycinovou rezistenci s 2 mg/ml G418. Expresí *mpl* byla stanovena průtokovou cytometrickou analýzou s použitím králičího anti-myšího *mpl*-IgG antiséra. Ba/F3 buňky byly udržovány v RPMI 1640 médiu z WEHI-3B buněk jako zdroje IL-3. Supernatanty z 293 buněk přechodně transfekovaných mML i mML-2 byly stanoveny v Ba/F3 buňkách transfekovaných *mmpl* i *hmpl* jak je popsáno v příkladu 1.

Příklad 13

cDNA vepřového ligandu *mpl*: pML a pML-2

cDNA vepřového ml (pML) ligandu byla izolována pomocí RACE PCR. Krátce, oligo-dT primer a 2 specifické primery byly sestrojeny na základě sekvence exonu vepřového ml genu kódujícího aminokonec ml purifikovaného z aplastického vepřového séra. cDNA připravená z různých aplastických vepřových tkání byla získána a amplifikována. PCR cDNA produkt s 1342 bp byl nalezen v ledvinách a subklonován. Některé klony byly sekvenovány a bylo zjištěno, že kódující zralý ligand *mpl* (nezahrnující kompletní sekreční signál). Bylo zjištěno, že cDNA kóduje 332 aminokyselinový zralý protein (pML₃₃₂), který má sekvenci zobrazenou na obr. 18 (SEQ ID NO: 9 a 16).

Postup:

izolace pML genu a cDNA. Genomické klony vepřového ml genu byly izolovány screeningem v podstatě tak jak je popsáno v příkladu 7. Některé klony byly izolovány a byl sekvenován exon kódující aminokyselinovou sekvenci identickou se sekvencí získanou purifikovaného ml. Vepřová ml cDNA byla získána použitím modifikace RACE PCR postupu. Byly sestrojeny dva specifické ml primery založené na sekvenci vepřového ml genu. Polyadenylovaná mRNA byla izolována z ledvin aplastických vepřů v podstatě tak jak bylo dříve popsáno. cDNA byla připravena pomocí reverzní transkripce s BamdT primerem

(BamdT: 5 GACTCGAGGATCCATCCGATTTTTTTTTTTTTTTT3) (SEQ ID NO: 55)

přímo proti polyacenosinovanému prodloužení mRNA. Úvodní cyklus PCR amplifikace (28 cyklů 95 °C 60 s, 58 °C 90 s) byl proveden s použitím ml specifického h-předsunutého-1 primeru

(h-předsunutý-1:5 GCTAGCTCTAGAAATTGCTCCTCGTGGTCATGCTTCT 3)
(SEQ ID NO: 43)

5 a BAMAD primeru

(BAMAD: 5 GACTCGAGGATCCATCG3) (SEQ ID NO: 56)

10 v 100 ml reakční směsi (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10mM tris pH 8,0, 0,2 mM dNTPs, 0,05 U/ml Amplitaq polymerázy [Perkin Elmer Inc.]). Produkt PCR byl poté digesterován ClaI, extrahován fenol-chloroformem (1:1), vysrážen ethanolem, a libován na 0,1 mg Bluescript SK-vektor (Stratagene Inc.), který byl štěpen ClaI a KpnI. Po inkubaci dvě hodiny při laboratorní teplotě byla čtvrtina liguční směsi přidána přímo do druhé cyklu PCR (22 cyklů jak je popsáno výše) s použitím druhého ml specifického předsunutého – 1 primeru

15

(předsunutý-1:5 GCTAGCTCTAGAAGCCCGGCTCCTCCTGCCTG 3) (SEQ ID NO: 57)

a T3-21 (oligonukleotid, který se váže na sekvenci sousední k násobné klonovací oblasti v Bluescript SK-vektoru):

20

(5 CGAAATTAACCCTCACTAAAG 3) (SEQ ID NO: 58).

Výsledné PCR produkty byly digestovány pomocí XbaI a ClaI a subklonovány na Bluescript SK-. Některé klony z nezávislých PCR reakcí byly sekvenovány.

25

Opět byla identifikována druhá forma, označena jako pML-2, kódující protein s delecí čtyři aminokyselinových zbytků (328 aminokyselinové zbytky) (viz obr. 21 [SEQ ID NO: 21]). Srovnání pML a pML-2 aminokyselinových sekvencí ukazuje, že pML-2 je identická kromě tetrapeptidu QLPP odpovídajícího zbytkům 111-114 včetně, které podléhají delecí (viz obr. 22 [SEQ ID NO: 18 a 21]). Čtyři aminokyselinové delece pozorované v myši, lidské a vepřové ml cDNA se objevují na přesně stejném místě ve vyvozeném proteinu.

30

Příklad 14

35

CMK stanovení trombopoetinové (TPO) indukce exprese destičkového antigenu GPIIb/IIIa

CMK buňky byly udržovány v RMPI 1640 médium (Sigma) obohaceném 10% zárodečným vepřovým sérem a 10mM glutaminem. Při přípravě stanovení byly buňky shromážděny, promyty a resuspendovány při 5x10⁵ buněk/ml v GIF médiu bez séra obohaceným 5mg/l hovězím inzulinem, 10mg/l a po-transferinem, 1 X stopovými prvky. Do 96 jamkové destičky s jamkami s plochým dnem byl přidán TPO standard nebo experimentální vzorky do každé jamky s příslušným ředěním v 100ml objemu. Do každé jamky je přidáno 100 ml CMK buněčné suspenze a destičky jsou inkubovány při 37 °C, v 5% CO₂ inkubátoru 48 hodin. Po inkubaci byly destičky odstředěny při 1000 ot/min při 4 °C 5 min. Supernatant byl odstraněn a do každé jamky bylo přidáno 100 ml FITC-konjugované GPIIb/IIIa monoklonální 2D2 protilátky. Následovala inkubace při 4 °C 1 hod., destičky byly znovu odstředěny při 1000 ot/min 5 min. Supernatanty obsahující nenavázanou protilátku byly odstraněny a do každé jamky bylo přidáno 0,1% BSA-PBS promývacího roztoku. 0,1 % BSA-PBS promývací krok byl třikrát zopakován. Buňky byly poté analyzovány na FASCAN s použitím jednoparametrové analýzy měřící intenzitu relativní fluorescence.

50

Příklad 15

5 DAMI stanovení trombopoetinu (TPO) měřením endomitotické aktivity DAMI buněk na 96 jamkové mikrotitrační destičce

10 DAMI buňky byly uchovávány v IMDM + 10 % koňského séra (Gibco) obohaceném 10mM glutaminem, 100 ng/ml Penicilinem G, a 50 mg/ml streptomycinem. Při přípravě a stanovení byly buňky shromážděny, promyty a resuspendovány při 1×10^6 buněk/ml v IMDM + 1 % koňského séra. Na 96-jamkovou destičku s kulatým dnem bylo do DAMI buněčné suspenze přidáno 100 ml TPO standardu nebo experimentálních vzorků. Buňky byly poté inkubovány 48 hodin při 37 °C v 5% CO₂ inkubátoru. Po inkubaci byly destičky odstředěny v Solvall 600B centrifuze při 1000 ot/min 5 min. při 4 °C. Supernatanty byly odebrány a bylo opakováno promytí 200 ml PBS-0, 1 % BSA. Buňky byly fixovány přidáním 200 ml ledově chladného 70% ethanol-PBS 15 a resuspendovány aspirací. Po inkubaci při 4 °C 15 min. byly destičky odstředěny při 2000 ot/min 5 min. a do každé jamky bylo přidáno 150 ml 1 mg/ml RNAzy obsahující 0,1 mg/ml propidium-jodidu a 0,05 % Tweenu-20. Po 1 hod. inkubaci při 37 °C byly změřeny změny obsahu DNA průtokovou cytometrií. Polyploidita je měřena a kvantifikována následovně:

$$20 \quad \text{Normalizovaný polyploidní poměr (NPR)} = \frac{(\% \text{ buněk v } >G2+M / \% \text{ buněk v } <G2+M) \text{ s TPO}}{(\% \text{ buněk v } >G2+M / \% \text{ buněk v } <G2+M) \text{ v kontrole}}$$

25 Příklad 16

Trombopoetinové (TPO) in vivo stanovení

(Myší destičkové revazebné stanovení)

30 In vivo stanovení pro ³⁵S stanovení produkce destiček

35 Myši C57BL6 (získané od Charlesa Rivera) byly intraperitonálně (IP) injektovány 1 ml kozího anti-myšího destičkového séra (6 amps) v den 1, aby vznikla trombocytopenie. Ve dnech 5 a 6 myši dostaly dvě IP injekce faktoru nebo PBS jako kontroly. V den 7 bylo intravenózně injektováno 30 mCi Na₂³⁵SO₄ v 0,1 ml solného roztoku a bylo měřeno procento ³⁵S inkorporace z injikované dávky do cirkulujících destiček ve vzorcích krve získaných z léčených i kontrolních myší. Odečet destiček a leukocytů byl proveden ihned po získání krve z retro-orbitálního sinusu.

40 Příklad 17

KIRA ELISA pro trombopoetin (TPO) měřením fosforylace mpl-Rse.gD chimérického receptoru

45 Lidský *mpl* receptor byl objeven Vigonem a kol., PNAS, USA 89: 5640–5644 (1992). Chimérický receptor obsahující extracelulární doménu (EDC) *mpl* receptoru a transmembránovou (TM) a intracelulární doménu (ICD) Rse (Mark a kol., J. of Biol. Chem. 269 (14): 10720–10728 [1994]) s karboxyl-koncovým praporcovým polypeptidem (tj. Rse.gD) byl připraven pro zde popsané KIRA ELISA stanovení. Viz obr. 30 a 31, kde je uvedeno schéma stanovení.

50 (a) Postup získání agens

Monoklonální anti-gD (klon 5B6) byl připraven proti peptidu z Herpes simplex virového glykoproteinu D (Paraborsky a kol., Protein Engineering 3(6): 547–553 [1990]). Purifikovaný zásobní

materiál byl upraven na 3,0 mg/ml ve fosfátem pufovaném solném roztoku (PBS), pH 7,4 a 1,0 ml alikvoty byly uchovávány při -20 °C.

(b) Příprava anti-fosfotyrosinové protilátky

5

Monoklonální anti-fosfotyrosin, klon 4G10, byl získán v UBI (Lake Placid, NY) a byotinylován s použitím dlouhoramenného biotin-N-hydroxysukcinimidu (Biotin-X-NHS, Research Organics, Cleveland, OH).

10 (c) Ligand

Ligand *mpl* byl připraven zde popsanými rekombinantními technikami. Purifikovaný ligand *mpl* byl uchováván při 4 °C jako zásobní roztok.

15 (d) Příprava Rse.gD nukleové kyseliny

20 Syntetické dvouvláknové oligonukleotidy byly použity pro přetvoření kódující sekvence pro C-koncový 10 aminokyselin (880–890) lidské Rse a přidání dalších 21 aminokyselin obsahujících epitop pro protilátku 5B6 a stop kodon. Tabulka 10 ukazuje výslednou sekvenci syntetické části fúzního genu.

Tabulka 10

25 Syntetická dvouvláknová část lidského Rse fúzního genu

Kódující vlákno: 5'TGCACGAAGGGCTACTGCCACACTCGAGCTGCGCAGATGCTAGCCTCAAGA TGGCTGATCCAAATCGAATCCGCGGCAAAGATCTTCCGGTCCTGTAGAAGCT3'	(SEQ ID NO: 59)
Nekódující (protisměrné) vlákno 5'AGCTTCTACAGGACCGGAAGATCTTTGCCGCGGAATCGATTTGGATCAGCCA TCTTGAGGCTAGCATCTGCGCAGCTCGAGTGTGGCAGTAGCCCTTGCTGCA3'	(SEQ ID NO: 60)

30 Syntetická DNA byla ligována s cDNA kódující aminokyseliny 1–880 lidského Rse na PstI místě začínajícím na nukleotidu 2644 publikované lidské Rse cDNA kódující sekvence (Mark a kol., Journal of Biological Chemistry 269(14); 10720–10728 [1994]) a HindIII místech v polylinkeru expresního vektoru pSV17.ID.LL (viz ob.r. 32 A–L, SEQ ID NO: 22) za vzniku expresního plazmidu pSV.ID.Rse.gD. Krátce, expresní plazmid obsahuje dicistronický primární transkript, který obsahuje sekvenci kódující DHFR vázaný 5 spojovacím donorem a 3 spojovacím akceptorem intronových spojovacích míst, následovaný sekvencí donorem a 3 spojovacím akceptorem intronových spojovacích míst, následovaný sekvencí která kóduje Rse.gD. Message plné délky (nezkrácený) obsahuje DHFR jako první čtecí rámec a tedy generuje DHFR protein, což umožňuje selekci stabilních transformantů.

40 (e) Příprava *mpl*-Rse.gD nukleové kyseliny

40

45 Expresní plazmid pSV.ID.Rse.gD připravený jak je popsáno výše byl modifikován za vzniku plazmidu pSV.ID.M.tmRd6, který obsahuje kódující sekvence ECD lidského *mpl* (aminokyseliny 1–491) fúzované do transmembránové domény a intracelulární domény Rse.gD (aminokyseliny 429–911). K navázání kódující sekvence části extracelulární domény lidského *mpl* na část Rse kódující sekvence ve druhém kroku PCR klonující reakce byly použity syntetické oligonukleoti-

dy, jak popsal Mark a kol., J. Biol. Chem. 267: 26166–26171 [1992]. V první reakci PCR byly použity primery M1

(5'-TCTCGCTACCGTTTACAG-3') (SEQ ID NO: 61)

a M2

(5'-CAGGTACCCACCAGGCGGTCTCGGT-3') (SEQ ID NO: 62)

s *mpl* cDNA šablonou a R1

(5'-GGGCCATGACACTGTCAA-3') (SEQ ID NO: 63)

a R2

(5'-GACCGCCACCGAGACCGCCTGGTGGGTACCCTGTGGTCCTT-3')

(SEQ ID NO: 64)

5 s Rse cDNA šablonou. PvuII–SmaI část tohoto fúzního spojení byla použita pro konstrukci chimerního receptoru plné délky.

(f) Buněčná transformace

10 DP12.CHO buňky (EP 307 247 publikovaný 15. března 1989) byly elektroporovány s pSV.ID.M.tmRd6, který byl linearizován na specifickém NotI místě v páteři plazmidu. DNA byla vysrážena ethanolem po fenol/chloroform extrakci a resuspendována v 20 ml 1/10 Tris EDTA. Potom bylo 10 ml DNA inkubováno s 10^7 CHO DP12 buněk v 1 ml PBS na ledu 10 minut před elektroporací při 400 voltech a 330mf. Buňky byly vráceny na 10 minut na led před nanesením na neselektivní médium. Po 24 hodinách byly buňky živeny médiem bez nukleosidů,
15 aby byly selektovány stabilní DHFR+ klony.

(g) Selekcce transformovaných buněk pro použití v KIRA ELISA

20 Klony exprimující MPL/Rse.gD byly identifikovány Western blotem celého buněčného lyzátu po frakcionaci SDS–PAGE s použitím protilátky 5B6, která detekuje gD epitopový praporek.

(h) Médium

25 Buňky byly pěstovány v F12/DMEM 50:50 (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, NY). Médium byly obohaceny 10 % diafiltrovaného FBS (GyClone, Logan, Utah), 25mM HEPES a 2mM L–glutaminem.

(i) KIRA ELISA

30 *Mpl*–Rse.gD transformované DP12.CHO buňky byly naočkovány (3×10^4 na jamku) do jamek 96–jamkové kultivační destičky s plochým dnem v 100 ml média a kultivovány přes noc při 37 °C v 5 % CO₂. Následující ráno byly jamkové supernatanty dekantovány, a destičky byly lehce osušeny papírovým ručníkem. Do každé jamky bylo přidáno 50 ml média obsahujícího buď
35 experimentální vzorky nebo 200, 50, 12,5, 3.12, 0.78, 0,19, 0.0048 nebo 0 ng/ml ligandu *mpl*. Buňky byly stimulovány při 37 °C 30 min., supernatanty byly dekantovány a destičky bylo znovu ještě jednou sušeny na papírovém ručníku. Do každé jamky bylo přidáno 100 ml lýzního pufru, aby byly buňky lýzovány a solubilizovány chimérické receptory. Lýzní pufr se skládá ze 150mM NaCl obsahující mM HEPES (Gibco), 0,5% Tritonu–X (Gibro), 0,01 % thimerosalu, 30 KIU/ml aprotinu (ICN Biochemicals, Aurora, OH), 1mM hydro–chloridu 4–(2–aminoethyl)–benzen–sulfonylfluoridu (AEBSF; ICN Biochemicals), 50 M leupeptinu (ICN Biochemicals), a 2 mM orthovanadičnanu sodného (Na₃VO₄; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), pH 7,5. Destička byla
40

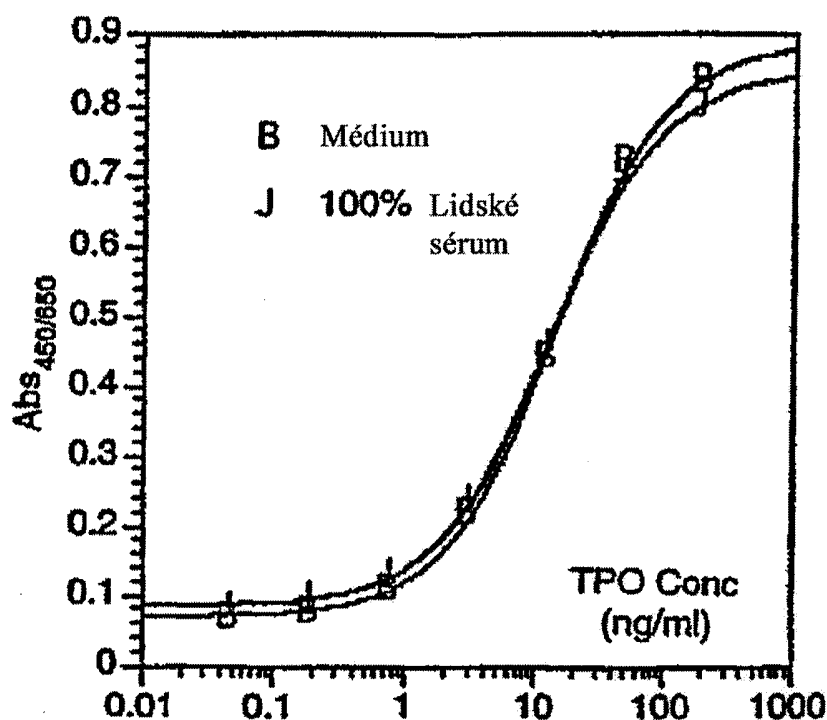
mírně protřepána na destičkové třepače (Bellco Instruments, Vineland, NJ) 60 min. při laboratorní teplotě.

5 Zátímco byly buňky solubilizovány, ELISA mikrotitrační destička (Nunc Maxisorp, Iner Med, Denmark) byl pokryta přes noc při 4 °C 5B5 monoklonální anti-gD protilátkou (5,0 mg/ml v 50 mM karbonátovém pufru, pH 9,6, 10 ml/jamku), byla dekantována, usušena na papírovém ručníku a blokována s 150 ml/jamku blokovacího pufru [PBS obsahující 0,5 % BSA (Intergen Company, Purchase, NY) a 0,01 % thimerosalu] 60 minut při laboratorní teplotě za mírného třepání. Po 60 min. byla anti-gD 5d6 pokrytá destička promyta 6 krát promývacím pufrem (PBS obsahující 0,05% Tween-20 a 0,01 % thimerosal) s použitím automatizovaného destičkového promývače (ScanWasher 300, Skatron Instruments, Inc, Sterling, VA).

15 Lyzát obsahující solubilizovaný MPL/Rse.gD z buněčné kultury mikrotitrační destičky byl nanesen (85 ml/jamku) do anti-dD 5B6 pokrytou a blokovanou ELISA jamku a inkubován 2 hod. při laboratorní teplotě s mírným třepáním. Nenavázaný *mpl*-Rse.gD byl odstraněn promytím promývacím pufrem a 100 ml biotinylovaného 4G10 (anti-fosfotyrosinu) naředěného 1:180000 v ředícím pufru (PBS obsahujícím 0,5% BSA, 0,05% Tween-20, 5 mM EDTA a 0,01 % thimerosalu), tj. na každou misku 56 ng/ml. Destička byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě při mírném třepání. Volné avidin-konjugáty byly odstraněny promytím a do každé misky bylo přidáno 20 100 ml čerstvě připraveného substrátového roztoku (tetramethylbenzidin [TMB]; 2-složkový substrátový kit, Kirkegaard a perry, gaithersburt, MD). Reakce probíhala 10 min. a potom bylo vyvíjení barvy ukončeno přidáním 1,0 M H₃PO₄ 100 ml/jamku. Byla odečtena absorbance při 450 nm s referenční vlnovou délkou 650 nm (ABS_{450/650}), s použitím v_{max} destičkového odečítače (Molecular Devices, Palo Alto, CA) za kontroly Macintosh Centris 650 (Apple Computers, Cupertino, CA) a DeltaSoft software (BioMetallics, Ing, Princeton, NJ).

30 Standardní křivka byla generována stimulací dp12.trkA, B nebo C.gD buněk s 200, 50, 12,5, 3,12, 0,78,0,19, 0,048 nebo 0 ng/ml ligandu *mpl* a prezentovaná jako koncentrace které byly získány interpolací jejich absorbance na standardní křivce a byly exprimovány v rozsahu ng/ml TPO aktivity.

35 Bylo zjištěno, že ligand *mpl* je schopen aktivovat chimérický receptor *mpl*-Rse.gD v koncentračně závislým a ligandově specifickým způsobem. Dále bylo zjištěno, že *mpl*-Rse.gD KIRA-ELISA snáší až 100% lidské sérum (je uvedeno) nebo 100% plazmu (není uvedeno), což umožňuje snadný screening pacientů a pK vzorků.

Křivka 293–produkovaného TPO₃₃₂

Shrnutí TPO EC50

TPO forma (buňky)	EC50 (hm/obj)	EC50 (molarita)
Hu TPO 332 (293)	2,56 ng/ml	67,4 pM
Mu TPO 332 (293)	3,69 ng/ml	97,1 pM
Hu TPO 153 (293)	-41 ng/ml	-1,08 nM
Hu TPO 155 (<i>E. coli</i>)	0,44 ng/ml	11,6 pM
Hu TPO 153met (<i>E. coli</i>)	0,829 ng/ml	21,8 pM

5

Příklad 18

Na receptoru založená ELISA pro Trombopoetin (TPO)

10

ELISA destičky byly potaženy králičím F(ab)₂ anti-lidským IgG (Fc) v pH 9,6 karbonátového pufru při 4 °C přes noc. Destičky byly blokovány 0,5 % hovězího sérového albuminu v PBS při laboratorní teplotě jednu hodinu. Produkt fermentace obsahující chimérický receptor, *mpl*-IgG, byl přidán na destičky a inkubován 2 hod. Dvojnásobné sériové řešení (0,39–25) standardu (TPO332) produkovaného v 293 buňkách s koncentrací stanovenou kvantitativní aminokyselinovou analýzou) a sériově naředěné vzorky v 0,5% hovězím sérovém albuminu, a 0,05% Tween 20 byly přidány na destičky a destičky byly inkubovány 2 hodiny. Navázaný TPO byl detekován proteinem A purifikovaných, bionylinovaných králičích protilátek k TPO₁₅₅, které byly produkovány v *E. coli* (1 hod inkubace), a následovala streptavidinperoxidáza (30 min. inkubace) a 3,3,5,5-tetramethylbenzidin jako substrát. Absorbance byla odečtena při 450 nm. Destičky byly mezi jednotlivými kroky promyty. Byla sestrojena standardní křivkas použitím čtyř-parametrové křivky podle programu Kaleidagraph. Koncentrace vzorků byly vypočítány ze standardní křivky.

20

Příklad 19

Expres a purifikace TPO z 293 buněk

5

1. Příprava 293 buněčných expresních vektorů

cDNA odpovídající TPO úplnému otevřenému čtecímu rámci byla získána pomocí PCR s použitím následujících oligonukleotidů jako primerů:

10

Tabulka 11

293 PCR Primery

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 AGA 3'	(SEQ ID NO: 48)

15

PRK5-h *mpl* (popsaný v příkladu 9) byl použit jako šablona pro reakci v přítomnosti pfu DNA polymerázy (Stratagene). Počáteční denaturace byla provedena 7 min. 94 °C a následovalo 25 cyklů amplifikace (1 min. 94 °C, 1 min. 55 °C a 1 min. 72 °C). Nakonec následovalo 15 min. 72 °C. PCR produkt byl purifikován a klonován mezi restrikční míst Clal a Xbal plazmidu pRK5tkneo, pRD5 odvozeného vektoru modifikovaného pro expresi genu neomycinové rezistence za kontroly thymidinkinázovým promotorem, aby byl získán vektor kpRK5tkneo.ORF. Sekundární konstrukt odpovídající epo homologní doméně byl generován stejným způsobem s použitím Cla.FL.F jako úvodní primeru a následujícího reverzního primeru:

20

Arg.STOP.Xba: 5'TCT AGA TCT AGA TCA CCT GAC GCA GAG GGT GGA CC 3'
(SEQ ID NO: 66)

25 Konečný konstrukt se nazývá pRK5-tkneoEPO-D. Sekvence obou konstruktů byla ověřena jak je popsáno v příkladu 7.

2. Transfekce lidských zárodečných ledvinových buněk

30 Tyto dva konstrukty byly transfekovány do lidských zárodečných ledvinových buněk CaPO₄ metodou jak je popsáno v příkladu 9.24 hodin po transfekci byla započata selekce na neomycin rezistentních klonů v přítomnosti 0,4 % mg/ml G418.0 10 až 15 dní později byly jednotlivé kolonie přeneseny do 96jamkových destiček a ponechány růst do shluků. Expres ml₁₅₃ nebo ml₃₃₂ z těchto klonů v obohaceném médiu byla stanovena s použitím Ba/F3-*mpl* proliferativního stanovení (popsaného v příkladu 1).

35

3. Purifikace rhML₃₃₂

40 293-rhML₃₃₂ obohacené médium bylo nanášeno na Blue-Sepharose (Pharmacia) kolonu, která byla ekvilibrována v 10mM fosfátem sodným pH 7,4 (pufr A). Kolona byla následně promyta pufr A a pufr A obsahujícím 2M močovinu, 10 objemy kolony každým. Kolona byla eluována pufr A obsahujícím 2M močovinu a 1M NaCl. Eluát z BlueSepharose byl přímo nanášen na WGA-Sepharose kolonu ekvilibrovanou pufr A. AHA-Sepharose kolona byla poté promyta 10 objemy kolony pufru A obsahujícího 2M močovinu a 1M NaCl a eluována stejným pufr A obsahujícím 0,5% N-acetyl-D-glukosamin. WGA-Sepharose eluát byl nanášen na C4-

45

HPLC kolonu (Synchrom, Inc.) ekvilibrovanou, 0,1% TFA. C4-HPLC kolona byla eluována diskontinuálním propanolovým gradientem (0–25%, 25–35%, 35–70%). Bylo zjištěno, že rhML₃₃₂ je eluován v 28–30% oblasti gradientu propanolu. Při SDS-PAGE migroval purifikovaný rhML₃₃₂ jako široký pás v 68–80 oblasti gelu (viz obr. 15).

5

4. Purifikace rhML₁₅₃

293-rhML₁₅₃ obohacené médium bylo rozděleno na Blue-Sepharose jako je uvedeno pro rhML₃₃₂. Blue Sepharose eluát byl přímo nanesen na *mpl*-afinitní kolonu jako je popsáno výše. RhML₁₅₃ eluovaný z *mpl*-afinitní kolony byl purifikován do homogenity s použitím C4-HPLC kolony za stejných podmínek, které jsou popsány pro rhML₃₃₂. Při SDS-PAGE se rhML₁₅₃ dělil do dvou hlavních a dvou menšinových pásů s Mr 18000–21000 (viz obr. 15).

10

15 Příklad 20

Expres a purifikace TPO z CHO

1. Popis CHO expresních vektorů

20

Expresní vektory použité v elektroporačních postupech popsaných níže byly označeny:

pSV15.ID.LL.MLORF (plná délka nebo hTPO₃₃₂) a

pSV15.ID.LL.MLEPO-D (zkrácený nebo hTPO₁₅₃).

25

Významné rysy těchto plazmidů jsou uvedeny na obr. 23 a 24.

2. Příprava CHO expresních vektorů

30

cDNA odpovídající TPO úplného otevřenému čtecímu rámci byla získána pomocí PCR s použitím oligonukleotidových primerů podle tab. 12.

Tabulka 12

35

CHO expresní vektorové PCR primery

Cla.FL.F2 5'ATC GAT ATC GAT AGC CAG ACA CCC CGG CCA G 3'	(SEQ ID NO: 47)
ORF.Sal 5' AGT CGA CGT CGA CGT CGG CAG TGT CTG AGA ACC3'	(SEQ ID NO: 67)

PRK5-*hmpl* I (popsaný v příkladu 7 a 9) byl použit jako šablona pro reakci v přítomnosti pfu DNA polymerázy (Stratagene). Počáteční denaturace byla provedena 7 min. 94 °C a následovalo 25 cyklů amplifikace (1 min. 94 °C, 1 min. 55 °C a 1 min. 72 °C). Nakonec následovalo 15 min. 72 °C. PCR produkt byl purifikován a klonován mezi restrikční místa ClaI a Sall plazmidu pSV15.ID.LL za získání vektoru pSV15.ID.LL.MLORF. Sekundární konstrukt odpovídající epo homologní doméně byl generován stejným způsobem s použitím Cla.FL.F2 jako úvodního primeru a následujícího reverzního primeru:

40

45

EPOD.Sal 5'AGT CGA CGT CGA CTC ACC TGA CGC AGA GGG TGG ACC 3'
(SEQ ID NO: 68)

50

Konečný konstrukt se nazývá pSV11.ID.LL.MLEPO-D. Sekvence obou konstruktů byla ověřena jak je popsáno v příkladu 7 a 9.

Stručně, kódující sekvence pro plnou a zkrácenou délku ligandu byla zavedena do násobného klonovacího místa CHO expresního vektoru pSV15.ID.LL. Tento vektor obsahuje SV40 časnou promotor/enhancer oblast, modifikovanou spojovací jednotku obsahující myší DHFR cDNA, násobné klonovací místo pro zavedení sledovaného genu (v tomto případě popsané TPO sekvence), libovolného SV40 polyadenylačního signálu a zahajovače replikace a beta laktamázového genu pro plazmidovou selekci a amplifikaci v bakterii.

3. Metodologie pro zajištění stabilních CHO buněčných linií exprimujících rekombinantní lidský TPO₃₃₂ a TPO₁₅₃

a. Popis CHO rodičovské buněčné linie

Hostitelské CHO (Chinese Hamster Ovary) buňky použité pro zde popsanou expresi TPO molekul jsou známy jako CHO-DP12 (viz EP 307 247 publikovaný 15. března 1989). Tato savčí buněčná linie byla klonově selektována z transfekční rodičovské linie (CHO-K1 DUX-B11(CHFR-)- získané od Dr. Franka Lea z Stanford University s povolením Dr. L. Chasina) s vektorem exprimujícím preproinzulin za získání klonů s redukovanou potřebou inzulínu. Tyto buňky byly také DHFR minus a klony byly vybrány pro přítomnost CHFR cDNA vektorových sekvencí růstem na médiu bez nukleosidových zdrojů (glycin, hypoxanthin a thymidin). Selektivní systém pro stabilně exprimující CHO buněčné linie je běžně používán.

b. Transfekční metoda (elektroporace)

TPO₃₃₂ a TPO₁₅₃ exprimující buněčné linie byly připraveny transfekcí DP12 buněk elektroporací (viz např. Andeaso, G.L. J. Tiss. Cult, Meth 15,16 [1993]) s linearizovaným pSV15.ID.LL.-MLORF nebo pSV15.ID.LL.MLEPO-D plazmidem, respektive. Tři reakční směsi restričních enzymů byly připraveny pro každé plazmidové štěpení; 10 mg, 25 mg a 50 mg vektoru s enzymem NOTI podle standardních metod molekulární biologie. Tato restriční místa se nalézají ve vektoru pouze jednou v linearizační oblasti 3 a mimo ligandovou transkripční jednotku TPO (viz obr. 23). 100 ml reakční směsi reagovalo přes nos při 37 °C. Následující den byla směs jednou extrahována fenol-chloroform-isoamylalkoholem (50:49:1) a vysrážena ethanolem na suchém ledu jednu hodinu. Precipitát byl poté 15 minut centrifugován a vysušen. Linearizovaná DNA byla resuspendována v 50 ml Ham s DMEMF12 1:1 média obohaceného standardními antibiotiky a 2mM glutaminu.

V suspenzi rostoucí DP12 buňky byly shromážděny, jednou promyty v médiu popsaném pro resuspendaci DNA a nakonec resuspendovány ve stejném médiu při koncentraci 10⁷ buněk na 750 ml. Alikvoty buněk (750 ml) a každá linearizovaná směs DNA byly inkubovány dohromady při laboratorní teplotě jednu hod. a poté převedeny do BRL elektroporační komory. Každá reakční směs byla poté elektroporována v standardním BRL elektroporačním přístroji při 360 V a 330 mF a nízké kapacitanci. Po elektroporaci byly buňky ponechány v přístroji 5 minut a poté byly ponechány na ledu dalších 10 min. Elektroporované buňky byly převedeny do 60mm buněčných kultivačních misek obsahujících 5 ml standardního kompletního růstového média pro CHO buňky (vysoce glukózové DMEM-F12 50:50 za glycinu obohacené 1X GHT, 2mM glutaminu, 5 % zárodečného telecího séra) a ponechána růst přes noc při 5 % CO₂ v buněčném kultivačním inkubátoru.

c. Selektivní a screeningové metody

Následující den byly buňky trypsinem odstraněny z destiček standardními metodami a převedeny do 150 mm tkáňových kultivačních misek obsahujících DHFR selektivní médium (Ham s DMEM-F12, 1:1 médium popsané výše obohacené 2% nebo 5% dialyzovaným telecím zárodečným sérem ale neobsahujícím glycin, hypoxanthin a thymidin). Buňky z každé 60mm misky byly přemístěny na 5/150 mm misku. Buňky byly poté inkubovány 10 až 15 dní (s jednou výmě-

nou média) při 37 °C/5 % CO₂ dokud se nezačaly objevovat klony a postačující velikost k přenosu do 96jamkových misek. Po periodě 4–5 dní byly buněčné linie přeneseny do 96 jamkových misek sterilními žlutými špičkami. Pipettmanem 50 ml. Buňky byly ponechány růst do shluků (obvykle 3–5 dní) a poté byly misky trypsinizovány a byly reprodukovány 2 kopie originální misky. Dvě z těchto kopií byly krátkodobě skladovány v mrazicím boxu s buňkami v každé jamce rozpuštěnými v 50 ml 10% FCS v DMSO. 5 dní kondicionované bez sérové vzorky média byly stanoveny u splývajících jamek v třetí misce na TPO expresi přes stanovení aktivity na bázi Ba/F buněk. Klony s největší expresí na základě tohoto stanovení byly vyjmuty ze zásobníku a přeneseny do 2 spojených 150mm T–buněk pro převedení skupiny buněčné kultury do suspenzní adaptace, re–stanovení a uložení.

d. Postup amplifikace

Některé z buněčných linií z nejvyšším titrem z výběru popsaného výše byly následně podrobeny standardnímu amplifikačnímu postupu za vzniku klonů s vyšším titrem. CHO buněčné klony byly rozšířeny a naneseny na 10cm misky při 4 koncentracích methotrexátu (tj. 50nM, 100nM, 200nM a 400nM) a při dvou nebo třech různých množstvích buněk (10⁵, 5x10⁵ a 10⁶ buněk na misku). Tyto kultury byly poté inkubovány při 37 °C/5 % CO₂ dokud se neobjevily klony a byly schopné přenosu do 96jamkových misek pro další stanovení. Některé klony s vysokým titrem z tohoto výběru byly opět vystaveny vyšším koncentracím methotrexátu (např. 600nM, 800nM, 1000nM a 1200nM) a jako předtím bylo vyčkáno objevení rezistentních klonů a pak byly přeneseny do 96jamkových misek a stanoveny.

4. Kultivace stabilních CHO buněčných linií exprimujících rekombinantní lidský TPO₃₃₂ a TPO₁₅₃

Skladované buňky byly ponechány roztát a buněčná populace byla rozmnožena standardními metodami buněčného růstu v médiu se sérem nebo bez séra. Po namnožení do potřebné buněčné hustoty byly buňky promyty, aby bylo odstraněno natrávené buněčné kultivační médium. Buňky byly poté kultivovány jakoukoliv standardní metodou zahrnující: dávkovou, vsádkovou nebo kontinuální kultivaci při 25–40 °C, neutrální pH, obsah rozpuštěného O₂ nejméně 5 % pokud byl akumulován významně vylučovaný TPO. Buněčná tekutá kultura je poté separována od buněk např. centrifugací.

5. Purifikace rekombinantního lidského TPO z CHO kultivační tekutiny

Získaná tekutina buněčné kultury (HCCF) je přímo nanesena na Blue Sepharose 6 Fast Flow kolonu (Pharmacia) ekvilibrovanou 0,01M Na fosfátem pH 7,4, 0,15M NaCl v poměru 100L HCCF na litr pryskyřice a při lineárním průtoku přibližně 300 ml/hod/cm². Kolona byla poté promyta 3 až 5 objemy ekvilibračního pufu a následně 3 až 5 objemy kolony 0,01M Na fosfátu pH 7,4, 2,0 M močoviny. TPO je poté eluován 3 až 5 objemy kolony 0,01M Na fosfátu pH 7,4, 2,0M močoviny, 1,0M NaCl.

Blue Sepharose eluát obsahující TPO je poté nanesen na Wheat Germ Lectin Sepharose 6MB kolonu (Pharmacia) ekvilibrovanou 0,01M Na fosfátu pH 7,4, 2,0 M močoviny a 1,0 NaCl v poměru 8 až 16 ml Blue Sepharose–eluátu na ml pryskyřice při průtoku 50 ml/hod/cm². Kolona je poté promyta 2 až 3 objemy kolony ekvilibračního pufu. TPO je poté eluován 2 až 5 objemy kolony 0,01M Na fosfátu pH 7,4, 2,0 M močoviny, 0,5 M N–acetyl–d–glukosaminu.

Wheat Germ Lectin eluát je poté upraven na celkovou koncentraci 0,04% C₁₂E₈ a 0,1 % kyseliny trifluorooctové (TFA). Výsledná směs je poté nanesena na C4 kolonu s reverzní fází (Vydac 214TP1022) ekvilibrovanou v 0,1 TFA, 0,04% C₁₂E₈ při zatížení 0,2 až 0,5 mg proteinu na ml pryskyřice při průtoku 157 ml/hod/cm².

Protein je eluován dvoufázovým lineárním gradientem acetonitrilu obsahujícího 0,1% TFA, 0,04% C₁₂E₈. První fáze se skládá z lineárního gradientu od 0 do 30 % acetonitrilu v 15 min. Druhá fáze se skládá z lineárního gradientu od 30 do 60 % acetonitrilu v 60 min. TPO eluuje při 50 % acetonitrilu. Je provedena SDS-PAGE eluátu.

5

C4 eluát je poté rozpuštěn ve 2 objemech 0,01 M Na fosfátu pH 7,4, 0,15M NaCl a diafiltrován proti přibližně 6 objemům 0,01 M na fosfátu pH 7,4, 0,15M NaCl na Amicon YM nebo podobné ultrafiltrační membráně s vylučovací hranicí molekulové hmotnosti 10000 až 30000. Výsledný diafiltrát může být poté přímo zpracován nebo dále ultrafiltrován. Diafiltrát/koncentrát je upraven na výslednou koncentraci 0,01 % Tweenu-80.

10

Celý nebo část diafiltrátu/koncentrátu odpovídající 2 až 5 % vypočítaného objemu kolony je poté nanesen na Sephacryl S-300 HR kolonu (Pharmacia) ekvilibrovanou 0,01 M Na fosfátem pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,01% Tween-80 a chromatografován malým průtokem přibližně 17 ml/hod/cm². Frakce obsahující TPO, které neobsahují agregáty a produkty proteolytické degradace jsou rozděleny pomocí SDS-PAGE. Výsledný eluát je filtrován na 0,22m filtru, Millex-GV nebo podobném a skladován při 2-8 °C.

15

20 Příklad 21

Transformace a indukce TPO proteinové syntézy v *E. coli*

1. Konstrukce *E. coli* TPO expresních vektorů.

25

Plazmidy pMP21, pMP15, pMP41, pMP57 a pMP202 byly všechny zkonstruovány pro expresi prvních 155 aminokyselin TPO po směru malého leaderu, který se liší mezi různými konstrukty. Leadery jsou nezbytné pro vysokou hladinu iniciace translace a rychlou purifikaci. Plazmidy pMP210-1, -T8, -21, -22, 24-25 jsou zkonstruovány pro expresi prvních 153 aminokyselin TPO po směru iniciačního methioninu a liší se pouze v použitém kodonu pro prvních 6 aminokyselin TPO, zatímco plazmid pMIP251 je odvozen od pMP210-1 kde karboxykonec TPO je prodlouženo dvěma aminokyselinami. Všechny výše uvedené plazmidy budou vykazovat vysoké hladiny intracelulární exprese TPO v *E. coli* za indukce tryptofenového promotoru (Yansura, D.G. a kol. *Methods in Enzymology* (Goeddel, D.V., Editor) 185:54-60, Academic Press, San Diego [1990]). Plazmidy pMP1 a pMP172 jsou meziprodukty konstrukce výše uvedených TPO intracelulárních expresních plazmidů.

30

35

(a) Plazmid pMP1

Plazmid pMP1 je sekreční vektor pro prvních 155 aminokyselin TPO, a byl konstruován vzájemnou ligací 5 fragmentů DNA jak ukazuje obr. 33. První z nich byl vektor pPho21 v kterém byl odstraněn malý mluI-BamHI fragment. pPho21 je odvozen od phGH1 (Chang, C.N. a kol., *Gene* 55. 189-196 [1987]) v kterém je gen lidského růstového hormonu nahrazen *E. coli* phoA genem, a MluI restrikční místo bylo vloženo do kódující sekvence pro STII signální sekvenci aminokyselin 20-21.

45

Následující dva fragmenty, Hinfl-PstI část DNA o délce 258 párů bází z pRK5-*hmpII* (příklad 9) kódující TPO aminokyseliny 19-103, a následující syntetická DNA kódující aminokyseliny 1-18

5'CGCGTATGCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGTGACCTCCGAGTCCTCAGTAACTGTTT
GTG (SEQ ID NO: 69)

ATACGGTCGGGCCGAGGAGGAACGAACACTGGAGGCTCAGGAGTCATTTGACGAAGCA
CTGA-5' (SEQ ID NO: 70)

byly nejprve ligovány T4-DNA ligázou, a druhý byl štěpen PstI. Čtvrtý byl fragment PstI-
HaeIII fragment o délce 152 párů bází z pRK5hmpII kódující aminokyseliny 104-155 TPO.
Poslední byl StuI-BamHI fragment o délce 412 párů bází z pdh108 obsahující lambda k trans-
kripčnímu terminátoru jak bylo popsáno (Scholtissek, S. a kol., NAR 15: 3185 [1987]).

5

(b) Plazmid pMP21

Plazmid pMP21 byl konstruován po expresi prvních 155 aminokyselin TPO s pomocí 13 amino-
kyselinového leaderu obsahujícího STII signální sekvenci. Byl sestaven vzájemnou ligací tří
10 DNA fragmentů jak ukazuje obr. 34, první z nich je vektor pVEG31 ve kterém byl odstraněn ma-
lý XbaI-SphI fragment. Vektor pVEG31 je odvozen od pHGH207-1 (de Boer, H.A. a kol.,
Promoter Structure and Function (Rodriguez, R.L. a Chamberlain, M.JK., Editors), 462, Praeger,
New York [1982]) v kterém byl gen lidského růstového hormonu nahrazen genem pro vaskulární
endoteliální růstový faktor (tento identický vektorový fragment může být získán z tohoto druhého
15 plazmidu).

Druhou částí při ligaci byl syntetický DNA duplex s následující sekvencí:

5'-CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCCATTTCTTCTTAA (SEQ ID NO: 71)

TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGAAGAATTTGCG-5' (SEQ ID NO: 72)

20 Poslední část byl fragment MluI-SphI o délce 1072 párů bází z pMP1 kódující 155 aminokyselin
TPO.

(c) Plazmid pMP151

25 Plazmid pMP151 je konstruován pro expresi prvních 155 aminokyselin TPO po směru leaderu
obsahujícího 7 aminokyselin STII signální sekvence, 8 histidinů a faktor Xa štěpné místo. Jak
ukazuje obr. 35, pMP151 byl konstruován vzájemnou ligací tří DNA fragmentů, první z nich je
dříve popsáný vektor pVEG31 ve kterém je odstraněn malý XbaI-SphI fragment. Druhý je syn-
tetický DNA duplex s následující sekvencí:

5'CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTCATCACCATCACCATCACCATCACATCGGA
AGGTCGTAGCC (SEQ ID NO: 73)

TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGTAGTGGTAGTGGTAGTGGTAGTGGTAGCTTCCAGC
AT-5' (SEQ ID NO: 74)

30 Poslední je BglI-SphI fragment z pMP11 s délkou 1064 párů bází z pMP11 kódující 154 amino-
kyseliny TPO. Plazmid pMP11 je identický s pMP1 kromě několika změn kodonů v STII signální
sekvenci (tento fragment můžeme získat z pMP1).

(d) Plazmid pMO202

35

Plazmid pMP202 je velmi podobný expresnímu vektoru pMP151 kromě toho, faktor Xa štěpné
místo v leaderu bylo nahrazeno trombinovým štěpným místem. Jak ukazuje obr. 36, pMP202 byl
konstruován vzájemnou ligací tří DNA fragmentů. První z nich je dříve popsáný pVEG31 ve kte-
rém je odstraněn malý XbaI-SphI fragment. Druhý je syntetický DNA duplex s následující
40 sekvencí:

5'-GTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTTCATCACCATCACCATCACCATCACATCGA
ACCACGTAGCC (SEQ ID NO: 75)

TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGTAGTGGTAGTGGTAGTGGTAGCTTGGTG
AT-5' (SEQ ID NO: 76)

Poslední část je BglI–SphI fragment o délce 1064 párů bází z dříve popsáního plazmidu pMP11

(e) Plazmid pMP172

5

Plazmid pMP172 je sekreční vektor pro prvních 153 aminokyselin TPO a je meziproduktem konstrukce pMP210. Jak ukazuje obr. 37, pMP172 byl připraven vzájemnou ligací tří DNA fragmentů, první z nich je vektor pLS32lamB ve kterém je odstraněna malá EcoRI–HindIII oblast. Druhý je ExoRI–HgaI fragment o délce 946 párů bází z dříve popsáního plazmidu pMP11. Poslední část je syntetický DNA duplex s následující sekvencí.

10

5'-TCCACCCTCTGCGTCAGGT (SEQ ID NO: 77)

GGAGACGCAGTCCATCGA-5' (SEQ ID NO: 78)

(f) Plazmid pMP210

15

Plazmid pMP210 je konstruován pro expresi prvních 153 aminokyselin TPO po methioninu iniciujícím translaci. Tento plazmid je ve skutečnosti připraven jako banka plazmidu u kterých prvních 6 kodonů TPO bylo náhodně změněno v třetí poloze každého kodonu, a byly konstruovány jak je uvedeno na obr. 38 ligací tří DNA fragmentů. První z nich byl dříve opsaný vektor pVEG31 v kterém je odstraněn malý XbaI–SphI fragment. Druhý je syntetický DNA duplex zobrazený níže který byl podroben nejprve působení DNA polymerázy (Klenow) a následně digesci XbaI a HinfI, a kódující iniciační methionin a náhodně měnící prvních 6 kodonů TPO.

20

Třetí je HinfI–SphI fragment o délce 890 párů bází z pMP172 kódující aminokyseliny 19–153 TPO.

25

Banka plazmidů pMP210 o 37000 klonech byla netransformována na silně tetracyklinové (50 mg/ml) LB destičky, aby byly vyselektovány klony s vysokou translační iniciací (Yansura, D.G. a kol., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 4: 151–158 [1992]). Z 8 kolonií které se objevily na silně tetracyklinových miskách bylo pět nejlepších z hlediska TPO exprese podrobena DNA sekvenování a výsledky jsou ukázány na obr. 39 (SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 a 28).

30

(g) Plazmid pMP41

35

Plazmid pMP41 je konstruován pro expresi prvních 155 aminokyselin TPO fúzových do leuderu skládajícího se z 7 aminokyselin STII signální sekvence následované faktory Xa štěpným místem. Plazmid byl konstruován jak ukazuje obr. 40 vzájemnou ligací tří částí DNA, první z nich byl dříve popsaný vektor pVEG31 ve kterém je odstraněn malý XbaI–SphI fragment. Druhý je následující syntetický DNA duplex:

5'-CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTTATCGAAGGTCGTAGCC (SEQ ID NO: 81)

TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAATAGCTTCCAGCAT-5' (SEQ ID NO: 82)

Poslední součástí ligace je BtlI–SphI fragment o délce 1064 párů bází z dříve popsaného plazmidu pMP11.

(h) Plazmid pMP57

5

Plazmid pMP57 exprimuje prvních 155 aminokyselin TPO po směru leuderu skládajícího se z 9 aminokyselin STII signální sekvence a dibazického místa Lys–Arg. Toto dibazické místo slouží při odstranění leuderu proteázou ArgC. Tento plazmid byl konstruován jak je na obr. 41 vzájemnou ligací tří DNA částí. První z nich je dříve popsaný vektor pVEG31 ve kterém je odstraněn malý XbaI–SphI fragment. Druhý je následující syntetický DNA duplex.

10

5'CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTAAACGTAGCC (SEQ ID NO: 83)

TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGAAGAATTTGCAT-5' (SEQ ID NO: 84)

Poslední část ligace je BglI–SphI fragment o délce 1064 bází z dříve popsaného pMP11.

15

(i) Plazmid pMP251

Plazmid pMP251 je odvozen od pMP210–1 ve kterém jsou na karboxykonci zahrnuty další dvě aminokyseliny TPO. Jak ukazuje obr. 42, tento plazmid byl konstruován vzájemnou ligací dvou částí DNA, první z nich je dříve popsaný pMP21 ve kterém je odstraněn malý XbaI–ApaI fragment. Druhá část ligace je XbaI–ApaI fragment o délce 316 párů bází z pMP210–1.

20

2. Transformace a indukce E. coli TPO expresními vektory

Výše uvedené TPO expresní plazmidy byly použity k transformaci E. coli kmenu (44C6) w3110 tonA_D rpoH_{ts} lon_D clpP_D galE) s použitím CaCl₂ metody tepelného šoku (Mandel, M. a kol, J. Mol. Biol., 53: 159–162, [1970]). Transformované buňky byly pěstovány nejprve při 37 °C v LB médiu obsahujícím 50 mg/ml karbenicilizu za optické hustoty (60 nm) kultury přibližně 2–3. LB kultura byla poté naředěna 20x v M9 médiu obsahujícím 0,49 % casamino kyselin (hm./obj.) v 50 mg/ml karbenicilinu. Po 1. hod růstu se vzdušněním při 30 °C byla přidána indol–3–akrylová kyselina a celkovou koncentrací 50 mg/ml. Kultura byla poté kontinuálně pěstována při 30 °C se vzdušněním dalších 15 hodin a poté byly buňky shromážděny centrifugací.

30

35 Příklad 22

Produkce biologicky aktivního TPO (Met⁻¹ 1–153) v E. coli

Postupy uvedené níže pro produkci biologicky aktivního, znovu svinutého TPO (Met⁻¹ 1–153) mohou být analogicky aplikovány pro získání dalších TPO variant včetně N a C koncově prodloužených forem (viz příklad 23).

40

A. Získání nerozpustného TPO (Met⁻¹ 1–153)

Buňky E. coli exprimující TPO (Met⁻¹ 1–153) kódovaný plazmidem pMP210–1 byly fermentovány jak je popsáno výše. Obvykle je 1000 g buněk resuspendováno v 1 l (10 objemů) buněčného lýžního pufu (10 mM Tris, 5mM EDTA, pH 8) s Polytron homogenizérem a buňky jsou centrifugovány při 5000xg 30 min. Promyté buněčné pelety jsou znovu resuspendovány v 1 l buněčného lýžního pufu s Polytron homogenizérem a buněčná suspenze je protlačena přes LH Cell Disrupter (LH Inceltech, Inc.) nebo přes Microfluidizer (Microfluidics International) podle komerčních instrukcí. Suspenze je centrifugována při 5000g 30 min. a resuspendována a centrifugována podruhé za vzniku promyté pelet refraktilních částic. Promyté pelety jsou ihned použity nebo jsou skladovány zmrazené při –70 °C.

50

B. Solubilizace a purifikace monomerního TPO (Met¹ 1–153)

Výše uvedené pelety jsou resuspendovány v 5 objemech hmotnosti 20 mM Tris, pH 8, s 6–8 M guanidinu a 25 mM DTT (dithiotreitol) a míchány 1–3 hod, nebo přes noc, při 4 °C, aby byla zlepšena solubilizace TPO proteinu. Vysoké koncentrace močoviny (6–8M) jsou také obecně použitelné ale ve srovnání s guanidinem jsou nižší výtěžky. Po solubilizaci je roztok centrifugován 30 min. při 30000xg za vzniku čirého supernatantu obsahujícího denaturovaný monomerní TPO protein. Supernatant je poté chromatografován na Superdex 200 gelové filtrační koloně (Pharmacia, 2,6 x 60 cm) při průtoku 2 ml/min. a protein je eluován 20 mM Na fosfátem, pH 6,0, s 10 mM DTT. Byly shromážděny frakce obsahující monomerní denaturovaný TPO protein eluovaný mezi 160 a 200 ml. TPO protein je dále purifikován na semipreparativní C4 koloně s reverzní fází (2x20 cm VYDAC). Vzorek je nanesen při 5 ml/min na kolonu ekvilibrovanou 0,1% TFA (trifluoroctová kyselina) s 30 % acetonitrilu. Protein je eluován lineárním gradientem acetonitrilu (30–60 % v 60 min). Purifikovaný redukovaný protein eluoval při přibližně 50 % acetonitrilu. Tento materiál byl použit pro znovusvinování za vzniku biologicky aktivní TPO varianty.

C. Příprava biologicky aktivního TPO (Met¹ 1–153)

Přibližně 20 mg monomerního redukovaného a denaturovaného TPO proteinu v 40 ml 0,1 % TFA/50% acetonitrilu je naředěna na 360 ml znovusvinovacím pufrem obsahujícím následující reagenty: 50mM Tris, 0,3M NaCl, 5 mM EDTA, 2% CHAPS detergent, 25% glycerol, 5 mM oxidovaný glutathion, 1 mM redukovaný glutathion, pH nastaveno na 8,3.

Po smíchání byl znovusvinovací pufr jemně míchán při 4 °C 12–48 hodin kvůli maximálnímu výtěžku správně svinutého TPO se správnými disulfidickými vazbami (viz níže). Roztok byl poté okyselen TFA na celkovou koncentraci 0,2 %, zfiltrován přes 0,45 nebo 0,22 mikronový filtr, a přidáno 1/10 objemu acetonitrilu. Roztok byl poté nanesen na C4 kolonu s reverzní fází a purifikovaný znovusvinutý TPO (Met¹ 1–153) eluován stejným gradientem jak je uvedeno výše. Znovusvinutý biologicky aktivní TPO je eluován při 45 % acetonitril za těchto podmínek. TPO verze s nesprávnými disulfidickými vazbami eluují dříve. Výsledný purifikovaný TPO (Met¹ 1–153) je čistý více jak 95 %, jak bylo stanoveno SDS gelem a analytickou C4 chromatografií s reverzní fází. Pro výzkum na zvířatech byl C4 purifikovaný materiál dialyzován do fyziologicky kompatibilních pufrů. Byly použity izotonické pufrы (10 mM Na acetát, pH 5,5, 10 mM sukcinát, pH 5,5 nebo 10 mM Na fosfát, pH 7,4) obsahující 150 mM NaCl a 0,01 % Tweenu 80.

Z důvodu vysoké účinnosti TPO (polovina maximální stimulace v Ba/F3 vazebném stanovení je dosažena při 3 pg/ml) je možné k získání biologicky aktivního materiálu použít mnoho různých pufrů, detergentů a redoxních podmínek. Ovšem za mnoha podmínek je získáno velmi malé množství správně svinutého materiálu (<10 %). Pro komerční průmyslové způsoby přípravy je požadován výtěžek znovusvinutí nejméně 10 %, výhodněji 30–50 % a nejvýhodněji >50 %. Pro produkci nejméně takto svinutého materiálu bylo nalezeno mnoho různých detergentů zahrnujících Triton X–100, dodecyl–beta–maltosid, CHAPS, CHAPSO, SDS, sarkosyl, TWEEN 20 a Tween 80, Zwittergent 3–14 a další. Z těchto detergentů byly ovšem nejvýhodnější detergenty ze skupiny CHAPS (CHAPS a CHAPSO), u kterých bylo zjištěno, že znovusvinovací reakce probíhá nejlépe a omezuje proteinovou agregaci a nevhodné disulfidické formulace. Nejvýhodnější je hladina CHAPS vyšší než 1 %. Pro lepší výtěžek byl potřebný chlorid sodný, s optimální hladinou mezi 0,1M a 0,5M. V redoxním pufru byla preferována přítomnost EDTA (1–5mM) kvůli omezení rozsahu kovem katalyzované oxidace (a agregace), která byla pozorována u některých preparací. Optimální podmínky pro znovusvinutí jsou při koncentraci glycerolu větší než 15 %. Pro maximální výtěžek je nezbytné mít jako redoxní pár oxidovaný a redukovaný glutathion nebo oxidovaný a redukovaný cystein. Obecně vyšší výtěžek je pozorován pokud molární poměr oxidovaného členu redoxního páru je stejný nebo v přebytku proti redukovanému členu redoxního páru. Pro znovusvinutí této varianty TPO jsou optimální pH hodnoty mezi 7,5 a 9. Organic-

ké rozpouštědlo (např. ethanol, acetonitril, methanol) bylo tolerováno v koncentracích 10–15% nebo nižších. Vyšší hladiny organických rozpouštědel zvyšují množství nesprávně svinutých forem. Tris a fosfátové pufrы byly obecně použitelné. Inkubace při 4 také zvyšuje hladiny správně svinutého TPO.

5

Výtěžek znovusvinutí 40–60 % (na základě množství redukováného a denaturovaného TPO použitého v znovusvinovací reakci) je typický pro preparace TPO, kde purifikace probíhá přes první C4 krok. Aktivní materiál může být získán i při omezení purifikační preparace (např. přímo pro Superdex 200 koloně nebo po úvodní extrakci refraktilních částic), ovšem výtěžky jsou nižší kvůli rozsáhlé precipitaci a interferenci s non-TPO proteiny během TPO znovusvinovacího procesu.

10

Zatímco TPO obsahuje 4 cysteinové zbytky, je možné připravit tři různé disulfidické verze tohoto proteinu:

15

verze 1: disulfidy mezi cysteinovými zbytky 1–4 a 2–3,

verze 2: disulfidy mezi cysteinovými zbytky 1–2 a 3–4,

verze 3: disulfidy mezi cystainovými zbytky 1–3 a 2–4.

Během počátečních pokusů při stanovení podmínek znovusvinovací reakce, bylo C4 chromatografií s reverzní fází separováno několik různých píků obsahujících TPO protein. Pouze jeden z těchto píků měl signifikantní biologickou aktivitu, jak bylo stanoveno Ba/F3 stanovením. Následně byly svinovací podmínky optimalizovány za přednostního zisku této verze. Za těchto podmínek bylo v solubilizačním kroku získáno méně než 10–20 % chybně svinutého TPO z celkového monomerního TPO.

25

Hmotností spektrometrií a sekvenováním proteinu byl jako desulfidický vzor pro biologicky aktivní TPO stanoven 1–4 a 2–3 (tj. verze 1). Digesce směsi byla analyzována laserovou desorpční hmotnostní spektrometrií s pomocí matrix přes a po redukcii s DTT. Po redukcii byly detekovány hmotnosti odpovídající největším tryptickým peptidům TP. V neredukovaných vzorcích chyběly některé hmotnosti a objevily se nové. Hmotnost nových píků odpovídala součtu jednotlivých tryptických peptidů zahrnutých v disulfidických párech. Tedy je možné jednoznačně označit, že jednotlivé disulfidové vzory znovusvinutého rekombinantního biologicky aktivního TPO budou 1–4 a 2–3. To je v souladu se známými disulfidickými vzory odpovídajícími molekule erythropoetinu.

35

D. Biologická aktivita rekombinantního, znovusvinutého TPO (met 1–153)

Znovusvinutý a purifikovaný TPO má aktivitu ve stanoveních *in vitro* i *in vivo*. Např. v Ba/F3 stanovení, byla polovina maximální stimulace thymidinové inkorporace do Ba/F3 buněk pro TPO (Met¹ 1–153) zjištěna při 3,3 pg/ml (0,3 pM). V testu ELISA založeném na *mpl*-receptoru byla polovina maximální aktivity pozorována při 1,9 ng/ml (120 pM). U normálních a myelosuprimovaných zvířat připravených téměř letární X–radiaci, byla znovusvinutá TPO (Met¹ 1–153) vysoce účinná (aktivita byla pozorována při dávce nižší než 30 ng/myš) při stimulaci produkce nových destiček.

45

Příklad 23

50 Produkce dalších biologicky aktivních TPO variant v *E. coli*

Níže byly získány tři různé TPO varianty produkované v *E. coli*, purifikované a znovusvinuté do biologické aktivity.

(1) mIF – 13 zbytků z bakterií odvozené signální sekvence STILL je fúzováno do N–koncové domény TPO (zbytky 1–155). Výsledná sekvence je

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

kde leaderová sekvence je podtržena a C...C představuje Cys⁷ až Cys¹⁵¹. Tato varianta byla konstruována kvůli získání tyrosinu pro radiojodaci TPO pro receptorové a biologické studie.

(2) H8MLF –7 zbytků z STII sekvence, 8 histidinových zbytků a enzymová štěpná sekvence Faktoru Xa IEGR jsou fúzovány do N–koncové domény (zbytky 1–155) TPO. Sekvence je

MKKNIAFH...HHHHHHHIEGRSPAPPAC.....CVRRA (SEQ ID NO: 86)

kde leaderová sekvence je podtržena a C...C představuje Cys⁷ až Cys¹⁵¹. Tato varianta, purifikovaná a znovusvinutá, může být upravena pomocí enzymu Faktor Xa, který bude štěpit za argininovým zbytkem sekvence IEGR za vzniku TPO varianty o délce 155 zbytků s přirozenou serinovou N–koncovou aminokyselinou.

(3) T–H8MLF– je připraven jak je opsáno výše pro variantu (2), pouze do N–koncové domény TPO je fúzována na trombin senzitivní sekvence IEPR. Výsledná sekvence je

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

kde leaderová sekvence je podtržena a C...C představuje Cys⁷ až Cys¹⁵¹. Tato varianta, purifikovaná a znovusvinutá, může být upravena pomocí enzymu trombinu za vzniku TPO varianty o délce 155 zbytků s přirozenou serinovou N–koncovou aminokyselinou.

A. Získání, solubilizace purifikace monomerních biologických aktivních TPO variant (1), (2) a (3)

Všechny varianty byly exprimovány v E. coli. Všechna variant byla nalezena v refraktilních částicích, jak je pozorováno v příkladu 22 pro TPO (Met¹ 1–153). Identické znovusvinovací podmínky, které byly použity pro TPO (Met¹ 1–153 byly použity s celkovým výtěžkem 30–50%. Po svinutí byly TPO varianty purifikovány C4 chromatografií s reverzní fází v 0,1% TFA s použitím acetonitrilového gradientu jak je popsáno dříve. Všechny TPO varianty (ve své neproteolyzované formě) měly biologickou aktivitu, což bylo stanoveno Ba/F3 stanovením, s poloviční maximální aktivitou 2–5 pM.

B. Proteolytické postupy pro varianty (2) a (3) za vzniku pravého N–koncového TPO (1–153) TPO varianty (2) a (3) výše byly zkonstruovány s enzymaticky–štěpným leaderovým peptidem před normálním N–koncovým aminokyselinovým zbytkem TPO. Po znovusvinutí a purifikaci variant (2) a (3) jak je popsáno výše byla každá varianta podrobena digesci vhodným enzymem. Pro každou variantu byl odstraněn acetonitril z kroku C4 reverzní fáze průtokem mírného proudu dusíku roztokem. Poté byly obě varianty upraveny faktorem Xa nebo trombinem jak je popsáno níže.

Pro TPO variantu (2) byl do roztoku bez acetonitrilu přidán 1 M Tris pufr, pH 8 do celkové koncentrace 50 mM, v případě potřeby bylo stanoveno pH na 8. NaCl a CaCl₂ byly přidány v 0, 1 M a 2 mM, respektive. Byl přidán Faktor Xa (New England Biolabs) aby byl dosažen molární poměr enzymu k variantám od 1: 25 do 1:100. Vzorek byl inkubován 1–2 hod. při laboratorní teplotě až došlo k maximálnímu štěpení což se projevilo změnou v migraci na SDS gelech a znamenalo to ztrátu leaderové sekvence. Poté byla reakční směs purifikována C4 chromatografií s reverzní fází s použitím stejného gradientu a podmínek které jsou popsány od štěpené varianty (2) za těchto podmínek. Ukázalo se, že N–koncové aminokyseliny jsou SPAPP, což znamená, že odstranění N–koncové leaderové sekvence bylo úspěšné. Působením Faktoru Xa také vzniklo

variabilní množství vnitřních štěpení uvnitř TPO domény, štěpení bylo pozorováno za arginino-
 vým zbytkem v poloze 118 za vzniku další N-koncové sekvence TTAHKDP (SEQ ID NO: 88).
 Pro variantu štěpenou Faktorem Xa byl na neredukujících SDS gelech pozorován jeden pás ma-
 jící 17000, na redukcujících gelech byly pozorována dva pásy s molekulovou hmotností 12000
 5 a 5000, obsahující štěpení na argininu 118. Toto pozorování potvrdilo, že dvě části molekuly jsou
 vzájemně spojeny disulfidickou vazbou mezi prvním a čtvrtým cysteinovým zbytkem, jak bylo
 vyvozeno z digesce trypsinem ve výši popsaných pokusech. V Ba/F3 biologickém stanovením
 měla purifikovaná TPO (1-155) varianta po odstranění N-koncové leaderové sekvence a vnitř-
 ním štěpení polovinu maximální aktivity 0,2 až 0,3 pikomolární. Intaktní varianta s leaderovou
 10 sekvencí měla polovinu maximální rychlosti 2-4 pikomolární.

Pro variantu (3) obsahoval digestivní pufr 50 mM Tris, pH 8, 2% CHAPS, 0,3 M NaCl, 5 mM
 EDTA a lidský nebo hovězí trombin (Calbiochem) při 1:25 až 1:50 hmotnosti enzymu k TPO
 variantnímu proteinu. Digestce byla prováděna při laboratorní teplotě 2-6 hodin. Postup digesce
 15 byl sledován na SDS gelech jak je popsáno výše pro digestci Faktorem Xa. Obecně bylo za tuto
 dobu odštěpeno více než 90 % leaderových sekvencí. Výsledný TPO byl purifikován na C4 kolo-
 nách s reverzní fází jak je popsáno výše a zjistilo se, že má požadovanou N-koncovou aminoky-
 selinovou sekvenci. Bylo získáno velmi malé množství (<5 %) interních štěpů stejné arginin-
 threonin vazby jak bylo pozorováno výše u Faktora Xa. Výsledný TPO protein měl vysokou
 20 biologickou aktivitu s polovinou maximální odpovědi v Ba/F3 stanovení při 0,2-0,4 pikomolech
 proteinu. V stanovení ELISA založeném na mpl receptoru měl tento protein polovinu maximální
 odpovědi 2-4 ng/ml purifikovaného proteinu (120-240 pikomol) zatímco intaktní varianta obsa-
 hující leaderovou sekvenci aktivitu 5 až 10 krát nižší. Pro studie na zvířatech byl HPLC purifiko-
 vaný štěpený protein dialyzován do fyziologicky přijatelných pufrů, s 150 mM NaCl, 0,01 %
 25 Tweenu 80 a 10 mM sukcinátu sodného, pH 5,5, nebo 10 mM acetátu sodného, pH 5,5, nebo
 10 mM fosfátu sodného, pH 7,4. Bylo stanoveno HPLC a SDS gely, že purifikovaný protein byl
 stabilní několik týdnů při uchování při 4 °C. U normálních a myelosuprimovaných myší byl tento
 TPO se skutečnou N-koncovou sekvencí vysoce aktivní, stimuloval produkci destiček při dáv-
 kách tak nízkých jako 30 mg/myš.

30

Příklad 24

Syntetický ligand *mpl*

35

Ačkoliv lidský ligand *mpl* (hML) je obvykle připraven rekombinantními metodami, může být
 také syntetizován enzymatickou ligací syntetických peptidových fragmentů s použitím níže pop-
 saných metod. Syntetická produkce hML umožňuje inkorporaci nepřírodních aminokyselin
 nebo syntetických funkčních skupin jak oje polyethylenglykol. Zvláště mutant serinové proteázy
 40 subtilisinu BPN, subtiligáza (S2221C/P225A), byl použit k účinné ligaci peptidových esterů ve
 vodném roztoku (Abrahmsen a kol., Bkochem., 30: 4151-4159 [1991]). Bylo nyní zjištěno, že
 syntetické peptidy mohou být enzymaticky ligovány v sekvenční oblasti v produkci enzymaticky
 aktivních dlouhých peptidů a proteinů jako je ribonukleáza A (Jackson a kol, Science, [1994]).
 Tato technologie, popsána podrobněji níže, umožňuje chemicky syntetizovat dlouhé proteiny kte-
 ré mohou být dříve připraveny pouze rekombinantní DNA technologií.

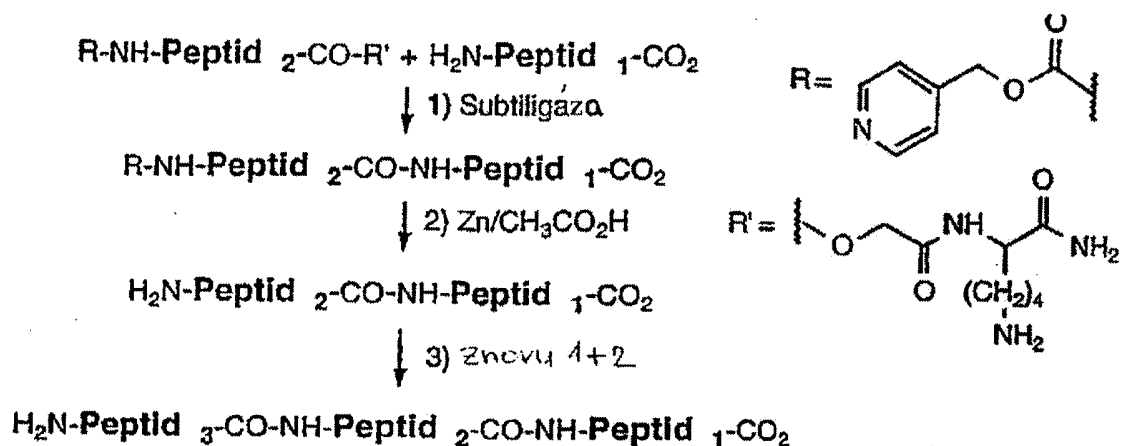
45

Obecný postup syntézy hML153 používající subtiligázu je ukázán na schématu 1. Výchozí je plně
 nechráněný peptid odpovídající C-koncovému fragmentu proteinu, N-koncový chráněný a C-
 koncový aktivovaný esterový peptid je poté přidán spolu se subtiligázou. Po dokončení reakce je
 50 produkt izolován HPLC s reverzní fází a z N-konce je odstraněna chránicí skupina.

Je ligován následující peptidový fragment, odstraněna chránicí skupina a postup se opakuje
 s použitím následujících peptidů dokud není získán protein plné délky. Postup je podobný jako
 postup v pevné fázi, při které je N-koncově chráněný C-koncově aktivovaný peptid ligován na
 55 N-konec předcházejícího peptidu a protein je syntetizován ve směru C→N. Ovšem protože kaž-

dým navázáním se může navázat až 50 zbytků a produkt je izolován po každé ligaci, mohou být syntetizovány vysoce čisté proteiny s přiměřenými výtěžky.

- 5 Schéma 1. Princip syntézy hML s použitím subtiligázy



- Na základě našich znalostí sekvenční specificky subtiligázy stejně jako aminokyselinové sekvence biologicky aktivní „epo-domény“ hML, rozdělili jsme hML 153 do sedmi fragmentů o délce 18–25 zbytků. Byly syntetizovány testovací ligační terapeptidy ke stanovení vhodných ligačních spojení pro 18–25mery. Tab. 13 ukazuje výsledky těchto ligačních testů.

Tabulka 13: hML testovací ligace.

- 15 Donorové a nukleofilní peptidy byly rozpuštěny při 10 mM v 100 mM tricinu (pH 7,8) při 22 °C. Ligáza byla přidána do celkové koncentrace 10 mM z 1,6 mg/ml zásobního roztoku (přibližně m70 M) a ligace probíhala přes noc. Výtěžek jsou % ligace versus hydrolyza donorových peptidů.

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

Na základě těchto experimentů mohly být ligační peptidy podle Tab. 14 účinně ligovány subtiligázou. Vhodná chránicí skupina pro N-konec každého donorového esterového peptidu je nutná kvůli zachránění vzájemné samoligace. Zvolili jsme izonikotinylovou (iNOC) chránicí skupinu (Veber a kol., J. Org. Chem., 42: 3286–3289 [1979]), protože je rozpustná ve vodě, může být vložena v posledním kroku peptidové syntézy v pevné fázi a je stabilní vůči bezvodému HF použitému k odstranění ochrany a štěpení peptidů pryskyřice – pevné fáze. Navíc může být po každé ligaci z peptidu odstraněna za mírných redukčních podmínek (Zn/CH₃CO₂H) za získání volného N-konce pro další ligace. Po C-koncovou aktivaci byl zvolen glykolát-lysyl-amid (glc-K-NH₂) ester na základě předchozích experiment, které ukázaly, že je účinně acylován subtiligázou (Abrahmsen a kol., Biochem., 30: 4151–4159 [1991]). iNOC-chráněné, glc-K-amid aktivované peptidy mohou být syntetizovány s použitím standardních metod na pevné fázi (viz schéma 2). Peptidy jsou poté sekvenčně ligovány až vznikne celý protein a konečný produkt je znovusvinut *in vitro*. Na základě homologie s EPO se předpokládá, že disulfidové páry jsou tvořeny mezi cysteinovými zbytky 7 až 151 a mezi 28 a 85. Oxidace disulfidů může být provedena jednoduše mícháním redukovaného materiálu v atmosféře kyslíku po několik hodin. Znovusvinutý materiál může být poté purifikován HPLC a frakce obsahující aktivní protein jsou shromážděny a lyofilizovány. Jako alternativa mohou být disulfidy chráněny, kvůli kontrole sekvenční oxidace mezi specifickými disulfidovými páry. Ochrana cysteinů 7 a 151 acetamidomethyl (acm) skupinami může zajistit oxidaci 28 a 85. Acm skupiny mohou být poté odstraněny zbytky 7 a 151 oxidovány. Naopak mohou být chráněny acm zbytky 28 a 85 a oxidovány v případě sekvenční oxidace, která je požadována pro správné svinutí. Nepovinně mohou být cysteiny 28 a 85 substituovány jiným přirozeným nebo nepřirozeným zbytkem jiným než Cas k zajištění vhodné oxidace cysteinů 7 a 151.

25

Tabulka 14

Peptidové fragmenty použité pro celkovou syntézu h-ML s použitím subtiligázy

30

Fragment

Sekvence

1 (SEQ ID NO: 110)

iNOC-HN-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVL-glc-K-NH₂ (1-22)

2 (SEQ ID NO: 111)

iNOC-HN-HSRLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDF-glc-K-NH₂ (26-43)

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)

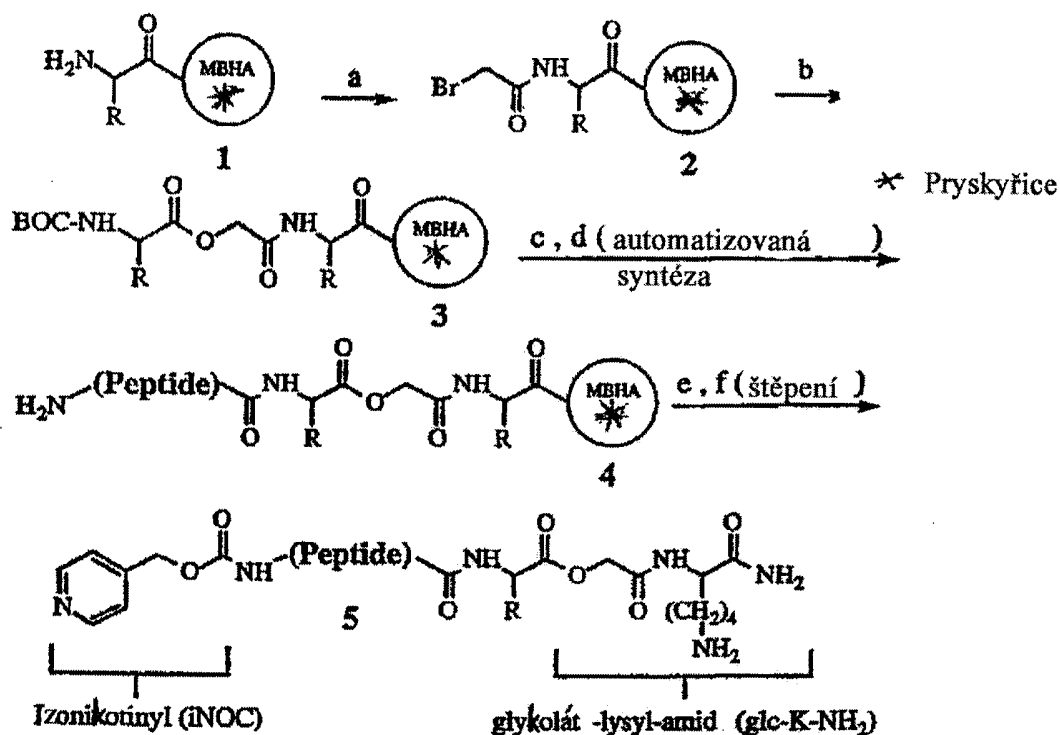
iNOC-HN-LLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIF-glc-K-NH₂ (107-128)

7 (SEQ ID NO: 116)

H₂N-LSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVR-CO₂ (129-153)

- Peptidové ligace byly provedeny při 25 °C v 100 mM tricinu, pH 8 (čerstvě připraveném a s plyny odstraněnými vakuovou filtrací přes 5 mM filtr). Obvykle je C-koncový fragment rozpuštěn v pufru (2–5 mM peptidu) a je přidán 10x zásobního roztoku subtiligázy (1 mg/ml v 100 mM tricinu, pH 8) za získání koncentrace enzymu 5mM. Poté je předán 3–5 molární nadbytek clc-K-NH₂ pevného aktivovaného donorového peptidu, je rozpuštěn a směs se nechá stát při 25 °C. Ligace je monitorována analytickou C18 HPLC s reverzní fází (CH₃CN/H₂O gradient s 0,1 % TFA). Produkty ligace jsou purifikovány preparativní HPLC a lyofilizovány. Odstranění ochranného izonikotinylu (iNOC) je provedeno mícháním HCl aktivovaným zinkovým práškem s chráněným peptidem v kyselině octové. Zinkový prášek je odstraněn filtrací a kyselina octová odpařena ve vakuu. Výsledný peptid může být použit přímo v další ligaci a proces se opakuje. Syntetický hML₁₅₃ může být ligován analogickými postupy, které jsou výše popsány pro syntetický nebo rekombinantní hML₁₅₄₋₃₃₂ k přípravě syntetického nebo polosyntetického hML plné délky.
- 15 Syntetický hML má mnoho předností oproti rekombinantnímu. Mohou být zavedeny nepřírodní postranní řetězce, ab byla zlepšena účinnost nebo specifita. Polymerové funkční skupiny jako je polyethylen glykol mohou být zavedeny kvůli zlepšení délky působení. Např. polyethylen glykol může být navázán na lysinové zbytky individuálních fragmentů (tab. 14) před provedením jednoho nebo více ligačních kroků. Na proteázu citlivé peptidové vazby mohou být odstraněny nebo
- 20 nahrazeny kvůli zlepšení *in vivo* stability. Navíc mohou být syntetizovány deriváty s těžkými atomy, což pomůže při stanovení struktury.

Schéma 2: Syntéza na pevné fázi použitá k přípravě peptidových fragmentů pro segmentovou ligaci



- a) Lysyl-paramethylbenzhydrylamin (MBHA) pryskyřice 1 (0,63 mekv./gm., Advanced Chem Tech) je míchána s bromoacetylou kyselinou (5 ekv.) a diizopropylkarbodiimidem (5 ekv.) 1 hod. při 25 °C v dimethylacetamidu (DMA), což poskytuje bromoacetyl derivát 2. b) Pryskyřice je dobře promyta DMA a jednotlivé Boc-chráněné aminokyseliny (3 eq., Bachem) jsou esterifikovány mícháním s hydrouhličitanem sodným (6 ekv.) v dimethylforamidu (DMF) 24 hod. při 50 °C za míchání odpovídající glykolát-fenylalanyl-amid-pryskyřice 3. Aminoacetylovaná pryskyřice 3 je promyta DMF (3x) a dichlormethanem (CH₂Cl₂) (3x) a může být skladována při laboratorní teplotě několik měsíců. Pryskyřice 3 může být nanesena do automatického peptidového syntetizéru (Applied Biosystems 430A) a peptidy prodlouženy s použitím standardních postupů na pevné fázi (5) c) N-a-Boc skupina je odstraněna roztokem 45% trifluoroctové kyseliny v CH₂Cl₂. d) Následující Boc-chráněné aminokyseliny (5ekv.) jsou nejprve aktivovány s použitím benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)fosfoniumhexafluorofosfátu (BOP, 4 ekv.) a N-methylmorfolinu (NMM, 10 ekv.) v DMA a navazovány 1-2 hod. e) Výsledná N-a-Boc skupina je odstraněna (TFAPCH₂Cl₂) za vzniku 4 a je zavedena izonikotinyl (iNOC) chránicí skupina jak je popsáno dříve (4) mícháním s 4-izonikotinyl-2-4-dinylfenylkarbonátem (3 ekv.) a nMM (6 ekv.) v DMA při 25 °C 24 hod. f) Štěpení a odstranění ochrany peptidu působením bezvodého HF (5% anisol/5% ethylmethylsulfid) při 0 °C 1 hod. za vzniku iNOC-chráněného, glykolát-lys-amid aktivovaného peptidu 5, který je purifikován C18 HPLC s reverzní fází (CH₃CN/H₂O gradient, 0,1% TFA). Identifikace všech substrátů byla potvrzena hmotností spektrometrií.

25 Dodatek

Předkládaný vynález, jak je uvedeno v patentových nárocích, byl uskutečněn v souladu s výše uvedenými specifikacemi a snadno dostupnými referencemi a výchozími materiály. Předkladatelé uložili níže uvedené buněčné linie v American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA (ATCC):

30

Escherichia coli, CH10B-pBSK-hmpl 1 1.8, ATCC č. CRL 69575, uložené 24. února 1994. Plazmid pSV15.ID.LL.MLORF, ATCC č. CRL 75958, uloženy 2. prosince, 1994; a CHO DP-12 buňky, ml 1/50 MCB (značení č. 1594), ATCC č. CRL 11770, uložené 6. prosince 1994.

- 5 Toto uložení bylo provedeno pod záštitou Budapešťské dohody o Mezinárodním uznávání uložení mikroorganismů pro účely patentových řízení (Budapest Treaty). Ta zjišťuje uchování životaschopné kultury 30 let od data uložení. Organismy budou dostupné s pomocí ATCC za podmínek Budapešťské dohody, a budou podléhat dohody mezi předkladateli a ATCC umožňující neomezenou dostupnost po vydání patentu. Dostupnost uvedených kmenů není povolením k provedení
10 vynálezu s porušením práv udělených jakoukoliv vládou v souladu s patentovými právy.

Vynález byl popsán ve spojení s výhodnými provedeními a specifickými pracovními příklady, osoba vzdělaná v dané problematice však může být po přečtení aplikací schopná provést různé změny, substituce nebo ekvivalenty a další změny, aniž by došlo k odchýlení z oblasti a rámce
15 vynálezu. Proto může být vynález proveden jinými způsoby než těmi, které jsou zde popsány. Je tedy určeno, že právní ochrana poskytnutá písemným zněním tohoto patentu je omezena pouze příloženými patentovými nároky a jejich ekvivalenty.

Všechny reference zde použité jsou uvedeny jako reference.

20

PATENTOVÉ NÁROKY

25

1. Izolovaný ligand mpl, který:

(a) stimuluje inkorporaci značených nukleotidů (³H-thymidin) do DNA IL-3 dependentních
30 buněk Ba/F3 transfekovaných lidským mpl P; a

(b) obsahující aminokyselinovou sekvenci polypeptidu

SPAPPACDPRLLNKLLRDDHVLHGR, nebo

35 SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRL.

2. Izolovaný lidský ligand mpl podle nároku 1, obsahující aminokyselinovou sekvenci SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRL a který vykazuje trombopoetickou biologickou aktivitu.

40 3. Izolovaný ligand mpl podle nároku 1, kódovaný nukleovou kyselinou mající sekvenci, která hybridizuje za středně přísných podmínek na nukleovou kyselinu mající sekvenci od nukleotidu 119 až po nukleotid 196 uvedenou na obr. 9 (ID NO: 4 nebo ID NO: 5).

45 4. Izolovaný ligand mpl podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 3, který může aktivovat mpl.

5. Ligand mpl, který má nejméně 70% identitu sekvencí s polypeptidem podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 3 a který vykazuje trombopoetickou biologickou aktivitu.

50 6. Ligand mpl, který je variantou polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, a který může aktivovat mpl a který vykazuje trombopoetickou biologickou aktivitu.

7. Ligand mpl podle nároku 6, kde jedno nebo více potenciálních míst pro proteázové štěpení je modifikováno tak, aby bylo odolné vůči štěpení.

8. Ligand mpl podle nároku 7, kde potenciální místo pro proteázové štěpení na aminokyselinové pozici ligandu mpl 153 až 154 a/nebo 245 až 246, jak je uvedeno na obr. 14.
- 5 9. Ligand mpl podle nároku 8, kde místo štěpení na pozici 153 až 154 je inaktivováno substitucí.
- 10 10. Ligand mpl podle nároku 9, kde zbytky Arg-Arg na pozici 153 až 154 jsou substituovány zbytky Ala.
11. Varianta ligandu mpl podle nároku 6, která zahrnuje fúzi k heterolognímu polypeptidu.
12. Ligand mpl podle nároku 6 nebo 11, který zahrnuje fúzi k jednomu nebo více aminokyselinovým zbytkům na amino- nebo karboxykonci.
- 15 13. Ligand mpl podle nároku 12, který má N-koncový methionin.
14. Ligand mpl podle nároků 1 až 13, kde ligand mpl je odvozen od lidského druhu.
- 20 15. Ligand mpl podle nároků 1 a 3 až 13, kde ligand mpl je odvozen od jiného než lidského druhu.
16. Ligand mpl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15, který je neglykosylovaný.
- 25 17. Ligand mpl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 16, který je připojen k neproteinovému polymeru.
18. Ligand mpl podle nároku 17, kde neproteinový polymer je polyetylenglykol, polypropylen-glykol nebo polyoxyalkylen.
- 30 19. Izolovaná molekula nukleové kyseliny kódující ligand mpl podle nároků 1 až 16.
20. Izolovaná nukleová kyselina mající sekvenci, která hybridizuje za středně přísných podmínek na nukleovou kyselinu mající sekvenci od nukleotidu 119 do nukleotidu 196 na obr. 9 (ID NO: 4 nebo ID NO: 5) a kódující ligand mpl.
- 35 21. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 20, která hybridizuje na nukleotidy 119 až 196 na obr. 9 (SEQ ID NO: 4 nebo SEQ ID NO: 5) a kóduje ligand mpl nebo jeho fragment, který má trombopoietickou aktivitu.
- 40 22. Genomická DNA nebo cDNA shodující se alespoň s částí genu ligandu mpl, a hybridizující za středně až vysoce přísných podmínek s přirozeně se vyskytující molekulou nukleové kyseliny, která má sekvenci kódující ligand mpl, kde ligand mpl je definován podle kteréhokoliv nároku 1 až 3.
- 45 23. Nukleová kyselina podle kteréhokoliv z nároků 19 až 22, která je operativně připojena k promotoru.
- 50 24. Expresní vektor obsahující nukleovou kyselinu podle kteréhokoliv z nároků 19 až 23, který je operativně připojen ke kontrolním sekvencím rozpoznávaným hostitelskou buňkou.
25. Hostitelská buňka transformovaná nukleovou kyselinou podle kteréhokoliv z nároků 19 až 23 tak, aby byla schopná exprese nukleové kyseliny produkovat ligand mpl.

26. Způsob přípravy ligandu mpl, **vyznačující se tím**, že se exprimuje rekombinantní nukleová kyselina podle kteréhokoliv z nároků 19 až 23 ve vhodné hostitelské buňce za produkce ligandového polypeptidu mpl.
- 5 27. Způsob podle nároku 26, **vyznačující se tím**, že ligand mpl se získává z hostitelské buňky nebo kultivačního média hostitelských buněk.
28. Způsob podle nároku 26 nebo 27, **vyznačující se tím**, že hostitelskou buňkou je buněčná linie CHO.
- 10 29. Způsob podle nároků 26 až 28, **vyznačující se tím**, že se v buňce exprimuje indigenní gen ligandu mpl za kontroly promotorem/zesilujícím prvkem, supresorem nebo exogenním transkripčním modulačním prvkem, který se vložil do genomu buňky ve vzdálenosti a orientaci dostačující k ovlivnění transkripce DNA kódující ligand mpl.
- 15 30. Farmaceutický prostředek pro léčení trombocytopenie, **vyznačující se tím**, že obsahuje ligand mpl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18 a farmaceuticky přijatelný nosič.
31. Farmaceutický prostředek podle nároku 30, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje terapeuticky účinné množství činidla vybraného ze skupiny sestávající z cytokinů, faktorů stimulujících kolonie a interleukinů.
- 20 32. Farmaceutický prostředek podle nároku 31, **vyznačující se tím**, že činidlo je vybráno ze skupiny sestávající z LIF, G-CSF, M-CSF, Epo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-7, IL-8, IL-9 a IL-11.
- 25 33. Způsob amplifikace testovaného vzorku nukleové kyseliny, **vyznačující se tím**, že se zahájí reakce polymerázy nukleové kyseliny s nukleovou kyselinou odpovídající genomické nebo cDNA podle nároku 22.
- 30 34. Způsob stanovení přítomnosti ligandu mpl in vitro, **vyznačující se tím**, že se hybridizuje nukleová kyselina podle nároku 22 k testovanému vzorku nukleové kyseliny a určí se přítomnost nukleové kyseliny polypeptidu ligandu mpl.
- 35 35. Způsob přípravy protilátky specifické pro ligand mpl in vitro, **vyznačující se tím**, že se použije ligand mpl podle nároků 1 až 18 jako antigen.
36. Způsob podle nároku 35, **vyznačující se tím**, že se připraví monoklonální protilátka.
- 40 37. Protilátka, která je schopná vázat ligand mpl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18.
38. Protilátka podle nároku 37, která je monoklonální protilátkou.
- 45 39. Hybridomová buněčná linie produkující protilátku podle nároku 38.
40. Ligand mpl obsahující aminokyselinovou sekvenci
 SPAPPACDPRLLNKLLRDDHVLHGR, nebo
 SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRL, a který vykazuje trombopoetickou biologickou aktivitu.
- 50 41. Izolovaná DNA kódující polypeptid podle nároku 40.
- 55

42. Izolovaný ligand mpl podle nároku 1, který dále

(a) stimuluje zavedení ^{35}S do obíhajících krevních destiček při testu znovunavázání krevních destiček;

5

(b) je stabilní do pH 2,5, SDS při 0,1 % a 2M močoviny;

43. Použití ligandu mpl podle nároku 1 při výrobě léčiva pro léčení savců s trombocytopenií.

10

85 výkresů

+

71 stran sekvencí

15

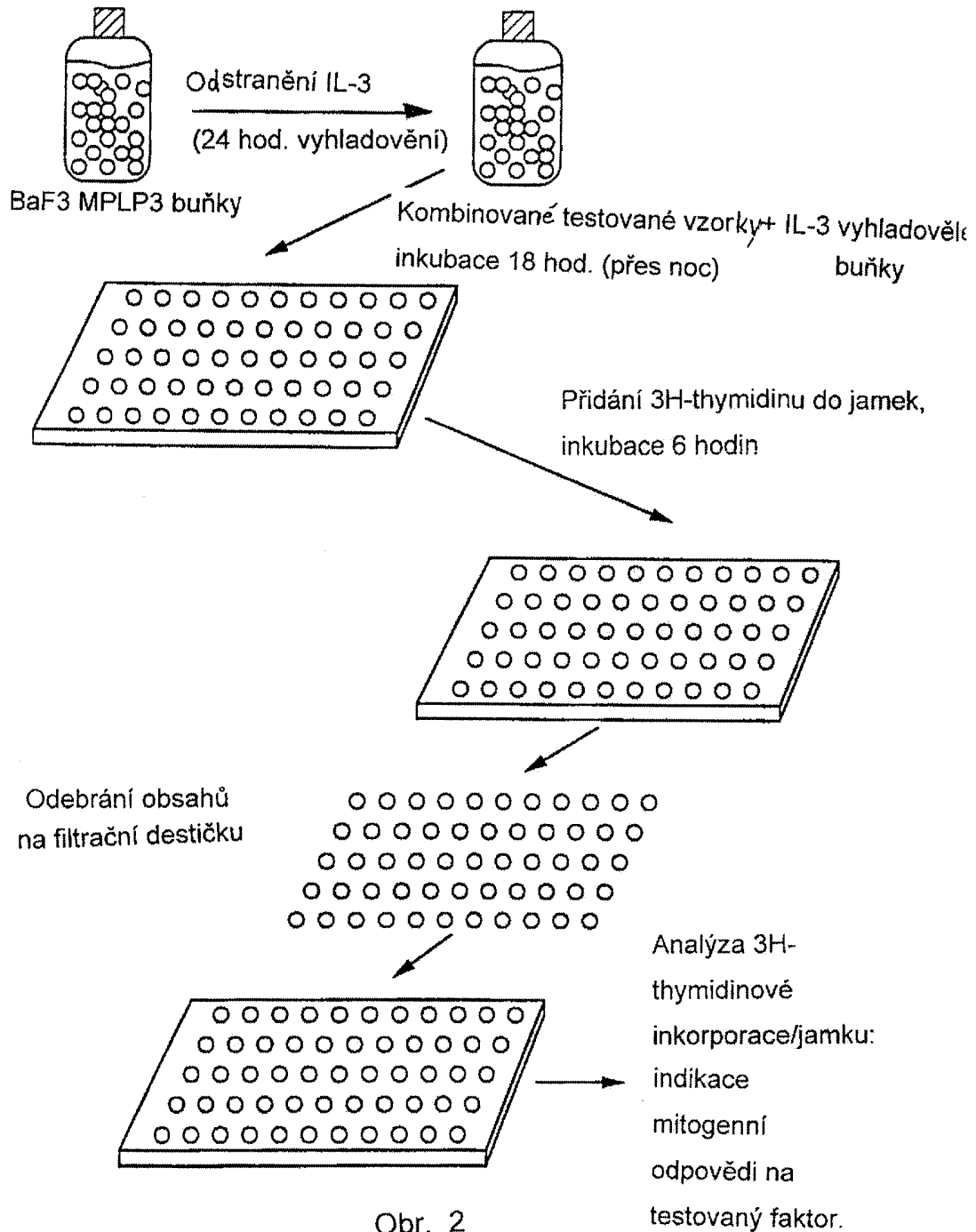
1 tcttcctaccatctgctccccagaggctgcctgctgtgcaacttgggtcctggagcccttctccaccggatagattcctcacccttggccccgcctttg
 101 cccccccctactctgccccagaagtgaagagcctcaagcgcctccatggccccaggaagattcaggggagagggcccccaaacagggagccacgcagcca
 201 gacacccccggccagaATGGAGTGAATGGCTCCTCGTGGTCAATGCTTCTCCTAACTGAAGGCTAAAGCTGTCCAGCCGGCTCCTCTGCTGTGTG
 301 ACCTCCGAGTCTCAGTAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCTTCCACAGCAGACTGAGCCAGTGCACCAGAGGTTACCCCTTTGCTTACACCTGTCTGCT
 401 GCCTGCTGTGGACTTTAGCTTGGAGNATGGAAACCCAGATGGAGGAGACCAAGCCACAGGACATTTCTGGAGCAGTGAACCTTTCTGCTGGAGGGGAGTG
 501 ATGCCAGCACGGGACAACCTGGACCCTTGCCTTCCATCCCTGCTGGGCAGCTTTCTGGACAGGTCCTGCTCCTCCTCCTCCTGAGGCTGCAGAGCCTCC
 601 TTGGAACCCAGCTTCCACAGGGCAGGACCCACAGCTCACAAAGGATCCCAATGCCATCTTCTGTAGCTTCCACACACCTGCTCCGAGGAAAGGTGCGGTTT
 701 CCTGATGCTTGTAGGAGGTCCACCCTCTGCGTCAGGGGGCCCCACCACAGCTGTCCCCAGCAGAACCTCTCTAGTCCCTCACACTGAACGAGCTC
 801 CCAAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAAACTTCACTGCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAAGTGGCAGCAGGGGATTCACAGCCCAAGA

-20 ▼ -10 ▼ 30 40
 MetGluLeuThrGluLeuLeuLeuValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProProAlaCysAsp
 10 20 30 40
 LeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSerGlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeu
 50 60 70
 ProAlaValAspPheSerLeuGlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaValThrLeuLeuGluGlyVal
 80 90 100
 MetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSerSerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeuLeu
 110 120 130 140
 GlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIlePheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysValArgPhe
 150 160 170
 LeuMetLeuValGlyGlySerThrLeuCysValArgArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeuValLeuThrLeuAsnGluLeu
 180 190 200
 ProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThrAlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGlyPheArgAlaLysIle
 201 CCAAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAAACTTCACTGCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAAGTGGCAGCAGGGGATTCACAGCCCAAGA

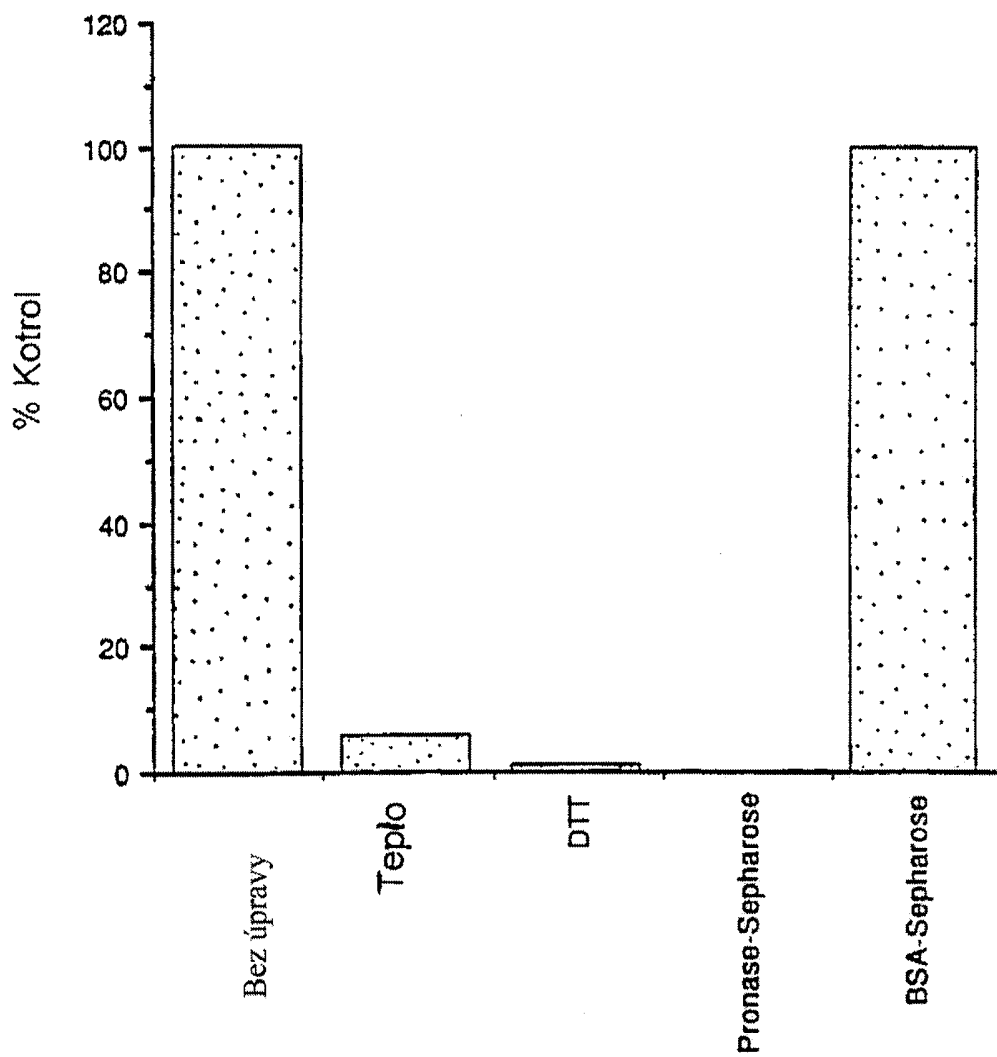
Obr. 1A

210
 ProGlyLeuLeu[AsnGlnThr]SerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsnArgIleHisGluLeuLeu[AsnGlyThr]ArgGlyLeuPhePro
 901 TTCCCTGGTCTGCTGAACCAACCTCCAGGTCCTGGACCAAAATCCCGGATACCTGAACAGGATACACGAACCTTTGAATGGAACCTCGTGGACTCTTTCC
 220
 230
 240
 250
 GlyProSerArgArgThrLeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeuGlnProGlyTyrSerProSer
 1001 TGGACCCCTCAGCGAGGACCCTAGGAGCCCCGGACATTTCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCCCAACCTCCAGCCTGGATATTTCTCCTTCC
 260
 270
 280
 ProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPheProLeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeuProAspProSerAla
 1101 CCAACCCATCCTCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCTCTTCCACCCACCTTGCGTCCAGCTCCACCCCTGCTTCTTGACCCCTTCTG
 290
 300
 310
 ProThrProThrProThrSerProLeuLeu[AsnThrSer]TyrThrHisSerGln[AsnLeuSer]GlnGluGly
 1201 CTCCAACGCCACCCCTACCAGCCCTCTTCTAAACACATCTTACACCCACTCCAGAACTGTCTCAGGAAGGTAAGgttctcagacactgccgacatc
 320
 330
 1301 agcattgtctcatgtacagctcccttccctgcaggcgccctggagacaactggacaagatttctacttctcctgaaacccaaagccctggtaaaa
 1401 gggatacacaggactgaaaagggaatcatttttccactgtacattataaaccttcagaagctattttttaagctatcagcaataactcatcagagcgacta
 1501 gctctttggctctattttctgcagaaaatttgcaactcactgatttctctacatgctcttttctgtgataactctgcaaggcctgggctggcctggcagtt
 1601 gaacagagggagagactaaccttgagtcagaaaaacagagaaagggtaatttcccttggcttcaaatcaaggccttccaacgcccccatcccccttactat
 1701 cattctcagtgaggactctgatcccatattcttcaacagatcttactcttgagaaatgaataagcttctctcagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

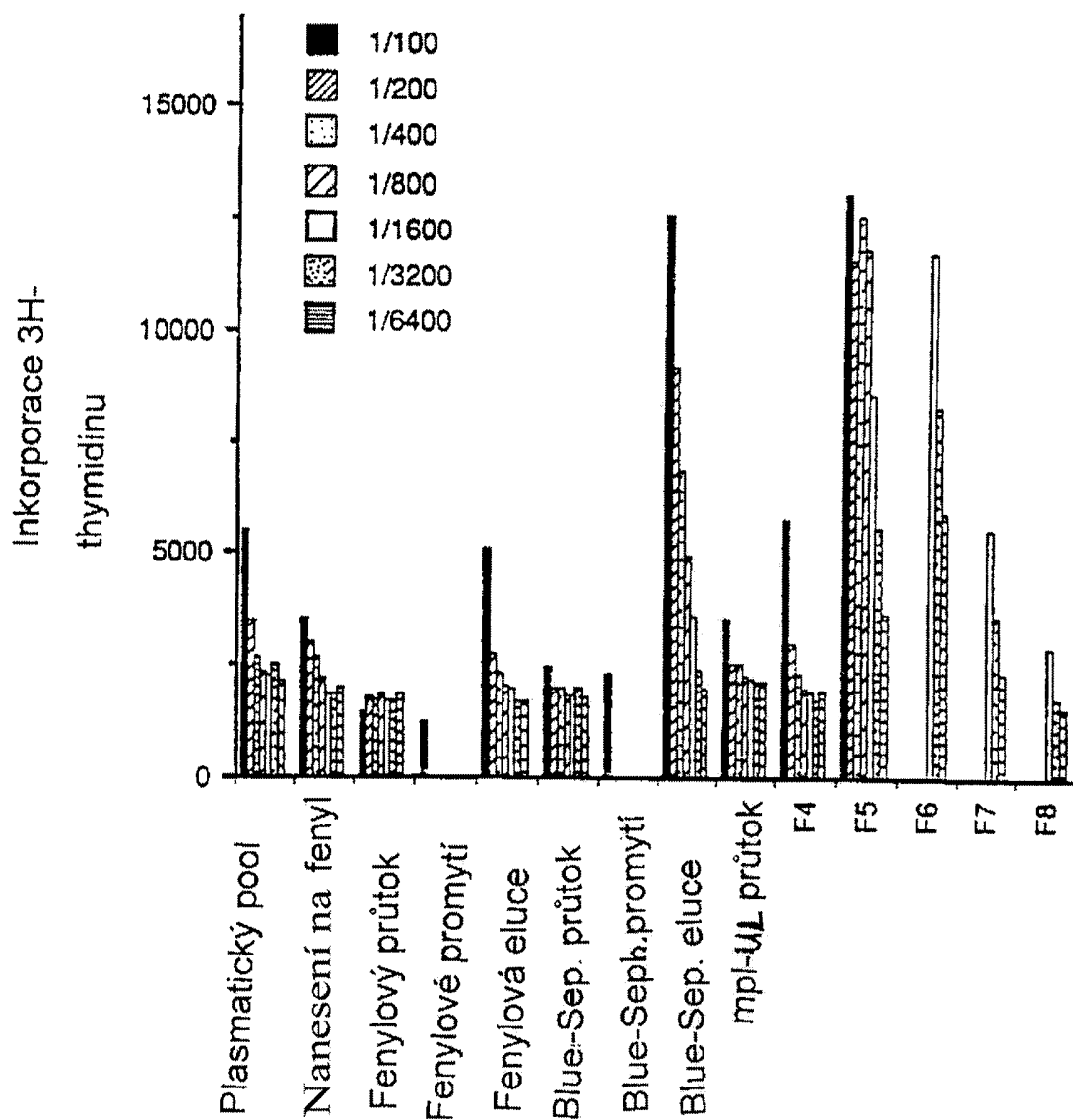
Obr. 1B



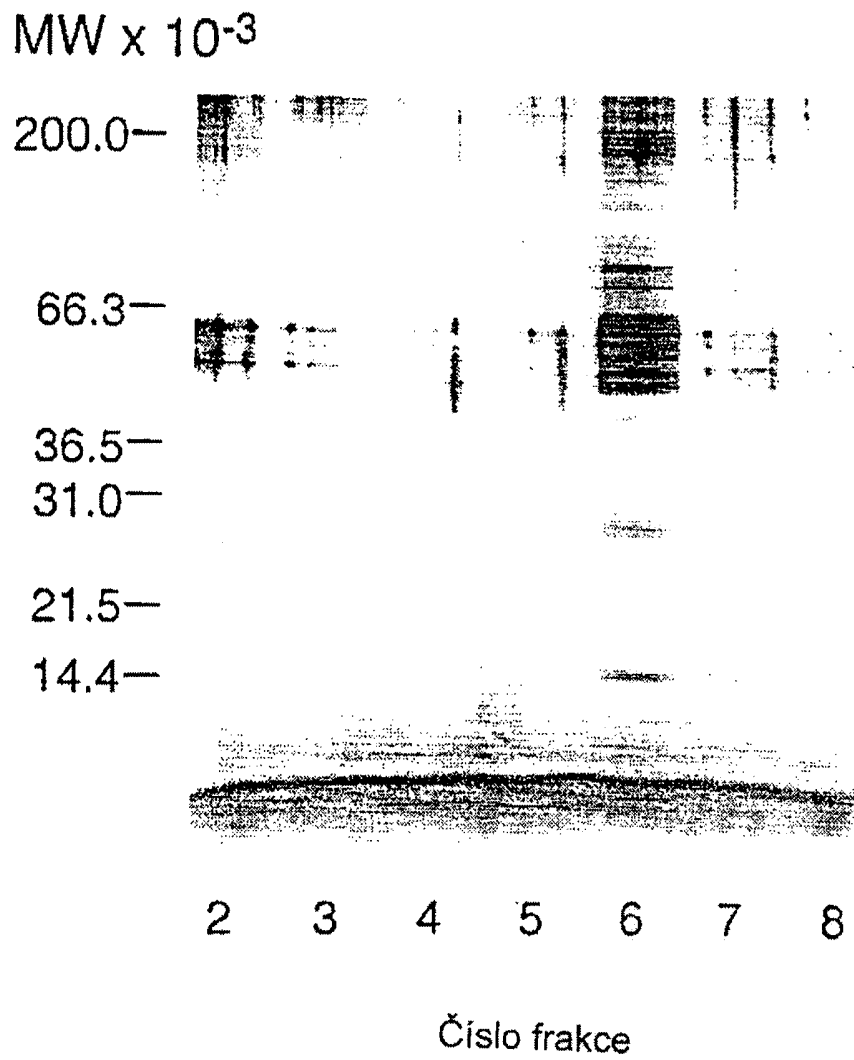
Obr. 2



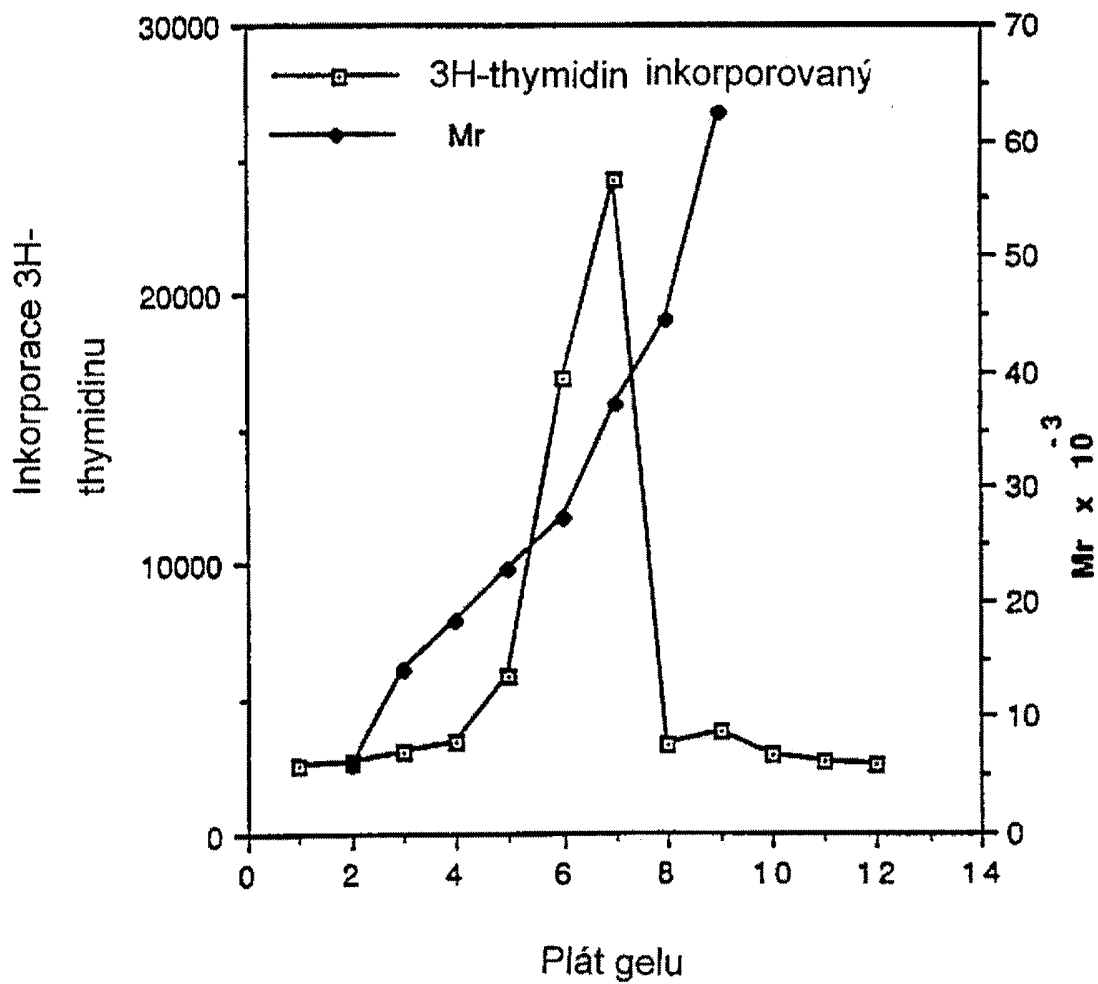
Obr. 3



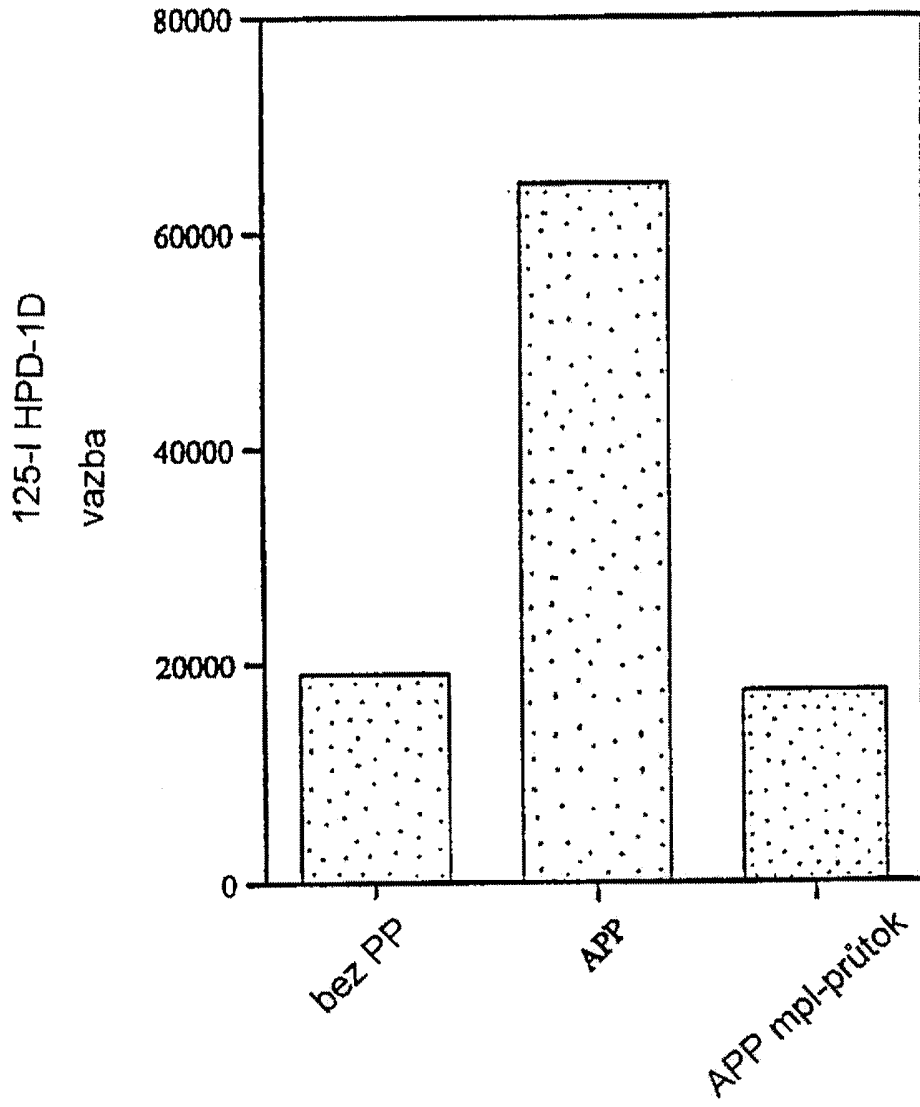
Obr. 4



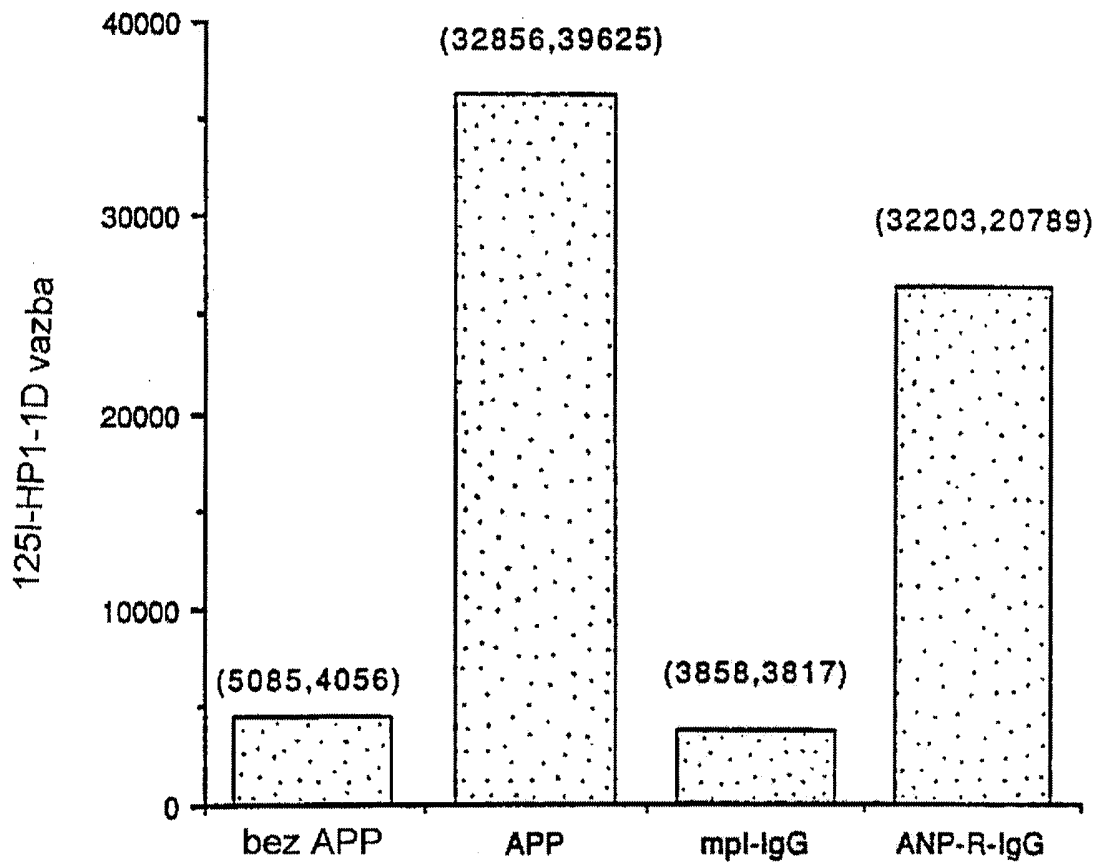
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8

-10

↓ L L L V V M L L L L F
 1 GAATTCCTGG AATACCAGCT GACAATGATT TCCTCCTCAT CTTCAACCT CACCTCTCCT CATCTAAGAA TTGCTCCTCG TGGTCATGCT TCTCCTAACT
 CTTAAGGACC TTATGGTCCA CTGTTACTAA AGGAGGAGTA GAAAGTTGGA GAAAGTTGGA GTGGAGAGGA GTAGATTCTT AACGAGGAGC ACCAGTACGA AGAGGATTGA

20

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 S H V L H S R L ↓
 101 GCAAGGCTAA CGCTGTCAG CCGGCTCCT CCTGCTTGTG ACCTCCGAGT CCTCAGTAAA CTGCTTCGTG ACTCCCATGT CCTTCACAGC AGACTGGTGA
 CGTTCCGATT GCGACAGGTC GGGCCGAGGA GGACGAACAC TGGAGGCTCA GGAGTCATTT GACGAAGCAC TGAGGGTACA GGAAGTGTG TCTGACCACT

201 GAACTCCCAA CATTATCCC TTTATCCGG TAACTGGTAA GACACCCATA CTCCCAGGAA GACACCATCA CTTCCTCTAA CTCCTTGACC CAATGACTAT
 CTTGAGGGTT GTAATAGGG AATAGGGC AATGACCATT CTGTGGGTAT GAGGGTCTTT CTGTGGTAGT GAGGAGATT GAGGACTGG GTTACTGATA

301 TCTTCCATA TTGTCCCCAC CTACTGATCA CACTCTCTGA CAAGAATTAT TCTTCACAAT ACAGCCCGCA TTTAAAAGCT CTCGTCTAGA
 AGAAGGGTAT AACAGGGGTG GATGACTAGT GTGAGAGACT GTTCTTAATA AGAAGTGTTA TGTCCGGCCGT AATTTTCCA GAGCAGATCT

Obr. 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 Q G L A L L S E A V L R G Q A L L V N S S O 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 I Q - - L P P Q G R I 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 M F L R

h-ML 143 - - M L V G G S T L L C V R R A P P T T A V P S R T S L V L I 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 I G S L P P N L Q P G Y S P S P T H P P T G O 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 O N L S O E G

Obr. 10

hML 1 SPAPPACDLRVL SKLLRDSHV LHSR L SQCP EVHPLPTPVLLPAVDFSLGE
 hML2 1 SPAPPACDLRVL SKLLRDSHV LHSR L SQCP EVHPLPTPVLLPAVDFSLGE
 hML3 1 SPAPPACDLRVL SKLLRDSHV LHSR L SQCP EVHPLPTPVLLPAVDFSLGE
 hML4 1 SPAPPACDLRVL SKLLRDSHV LHSR L SQCP EVHPLPTPVLLPAVDFSLGE

hML 51 WK TQMEETKAQD ILGAV TLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRL L
 hML2 51 WK TQMEETKAQD ILGAV TLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRL L
 hML3 51 WK TQMEETKAQD ILGAV TLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRL L
 hML4 51 WK TQMEETKAQD ILGAV TLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRL L

hML 101 LGALQSLLGTQLPPQGR TTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTL
 hML2 101 LGALQSLLGT . . . QGR TTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTL
 hML3 101 LGALQSLLGTQLPPQGR TTAHKDPNAIFLSFQHLLRGK . DFW . I VGD KLH
 hML4 101 LGALQSLLGT . . . QGR TTAHKDPNAIFLSFQHLLRGK . DFW . I VGD KLH

hML 151 CVRRAPPTTAVPSRTSLVLT LNELPNRTSGLLE TNFTASARTTGSGLLKW
 hML2 147 CVRRAPPTTAVPSRTSLVLT LNELPNRTSGLLE TNFTASARTTGSGLLKW
 hML3 149 CLSQ NYWL WAS EVAAGIQSQDSWSAEPNLQ . . .
 hML4 145 CLSQ NYWL WAS EVAAGIQSQDSWSAEPNLQ . . .

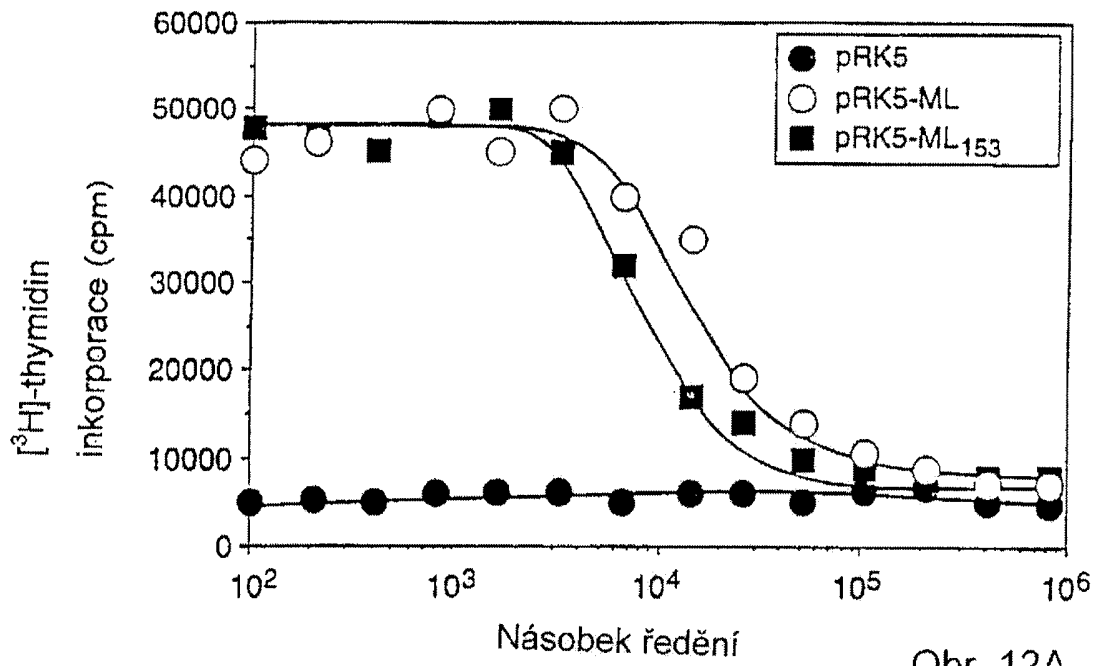
Obr. 11A

hML 201 QGGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLNGTRGLFPGPSRRTLGA
 hML2 197 QGGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLNGTRGLFPGPSRRTLGA
 hML3 179 VPGPNRIP...EQDTRTLEWNSWTL SWTLLTQDPRSPPGHFLRNIRHRLPA
 hML4 175 VPGPNRIP...EQDTRTLEWNSWTL SWTLLTQDPRSPPGHFLRNIRHRLPA

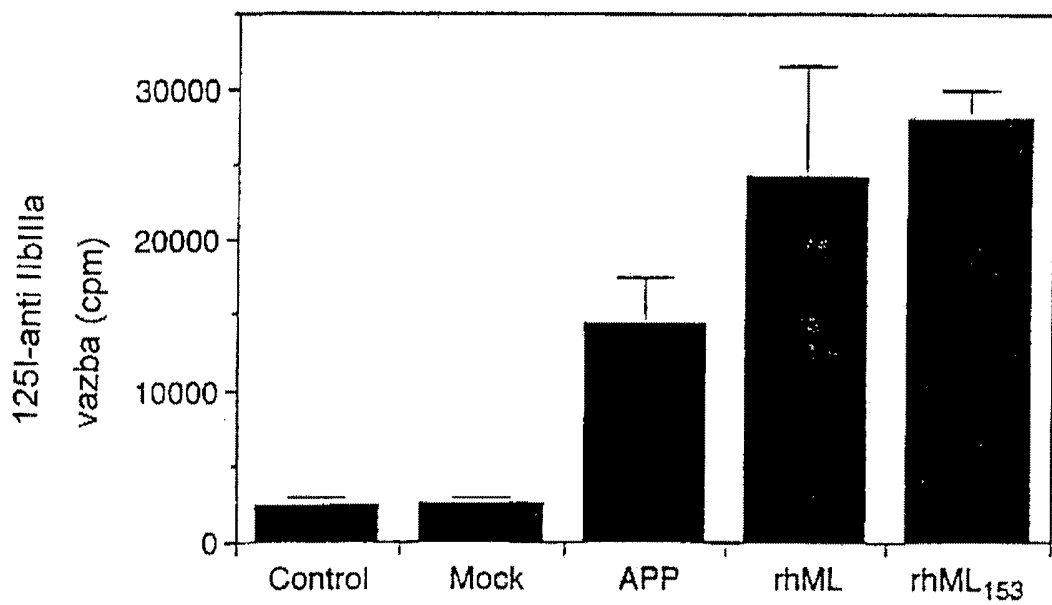
hML 251 PDISSGTSDTGSLPPNLPQGYSPSPTHPPTGQYTLFPLPPTLPTPVVQLH
 hML2 247 PDISSGTSDTGSLPPNLPQGYSPSPTHPPTGQYTLFPLPPTLPTPVVQLH
 hML3 226 TQ...PPAWIFSFP...NPSSYWTVYALPSS...
 hML4 222 TQ...PPAWIFSFP...NPSSYWTVYALPSS...

hML 301 PLLPDPSAPTPTPTSPLLNTSYTHSQNLSQEG
 hML2 297 PLLPDPSAPTPTPTSPLLNTSYTHSQNLSQEG
 hML3 251 THLAPCGPAPPPAS...
 hML4 247 THLAPCGPAPPPAS...

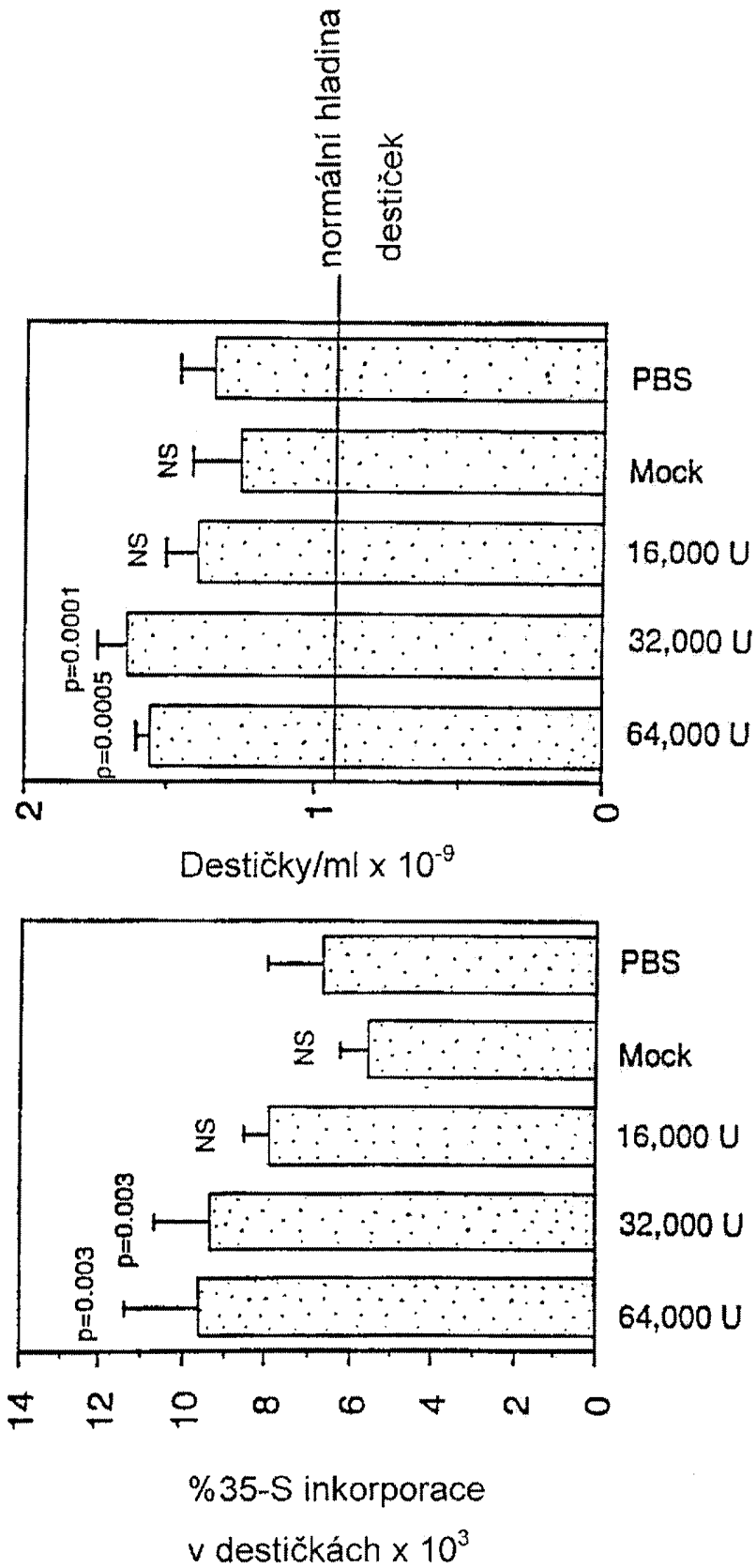
Obr. 11B



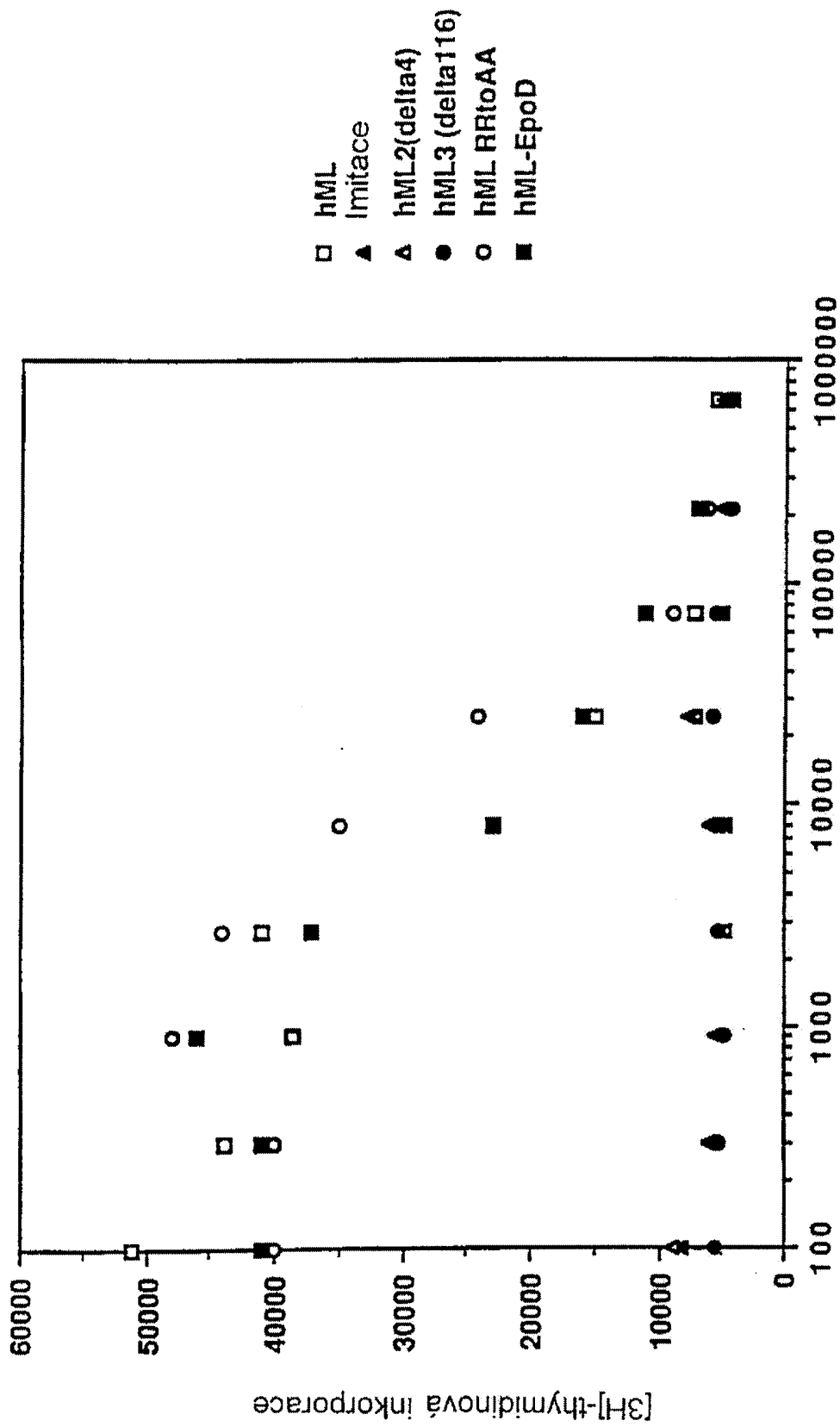
Obr. 12A



Obr. 12B



Obr. 12C



Obr. 13

Násobek ředění

1 ccagcctccttctctgttccctgggtcatgcctcctcctcctgctctcctgctctcctccacacacacccactatacctcccagctatccctacaccc
201 tccttccctaactcttgggagacatctcgtctggtggcgggaaatccaggatctagccacacttctcagcagacatgccctccttggggaggagga
301 acaggagagcctgaggaagtcttgggggacaggggatgatgggatcaaggtcaggccaggaaagccctgaggacagagactgtggggagactgggac
401 tgggaaagaaagggagctagagccagggccaaagggaaagggggccagcagggaggtatttgcggggaggtccagcagctgtcttccctaagaca
501 gggacacatgggcctggttattcctcttctcactgtggaacggtaggagatggaagacgggagacagaacaagggagggccctgggacagaggtc
601 tgtgtgttagccatccaagccactggaccaccagcagacgacctaagctcaggttaaccagtgcactggtgcaacatacatgtgccccgcacct
701 gacagtcactcaacccttcccaaaccttccccataacacacccataacaggagatctctctcatgtggcaatatacctggttccccacttcgaaaagg
801 gggaaatgacaagataggactcccttaggggttacagaaaagaaagcaggaaagcaagctcctgttggatttcagcagcaggtatgatgccaggggaaaa
901 gaaattggatagccagggtgaaaaccccaactcttaacaagacctctgtgcttctccccagcaacaacaatgtctcgtccagattcctcctgga
1001 aaaaaacttctgctcctcctcctcctccaggtcccaggtgcccattgtccagaaaagatggatccccctatacaaatcttctcgtggtgtgtgggtg
1101 gaggagtggaccctggtccagggcaggggtccagggaaagagagggcctcctccggggcctcaccagtgctgggtggctccccctctctgattgggca
1201 gaaatggcccaggcagggcgtatgacctgctgctgtgtgggggctgtgcccaccgccacatgtctTCTATCCCATCTGCTCCCCACAGGGCTGCCTGCTG
1301 TGCAC TTGGGTCC TGGAGCCCTTCTCCACCCGGTgagtgccagcaggggtgtgggttatgtgagggtagaaaaggacagcaaaagagaaatgggctccccag
1401 ctgggggaggggcaggaactggaacctacaggcactgacctttgtcgagaagagttagccttcccagaatggggaggagcagggcagagcaggggtag
1501 ggggtggggtgctggttctgagggactgataccttacttggtagaaatacagcacagccctggctggccctaaagaaaggggacatgagccccaggagaaa
1601 aataagagggagctgacttagggcttagcaaacacagtagtaagatggacacagcccccaatccccattcttagctggtcattcctcgttagcttaag
1701 gtctctgaatcgtgtgggaaagctggggccagggcaagggcagggggaagggggaaggggccccactcatgttgacagacctacaggaaa

< Start of cDNA sequence; Exon 1 >

Obr. 14A

9 ValValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProAlaCysAspLeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisVal
 3301 GTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCCGCTCCTCCTGCTGTGTGACCTCCGAGTCCCTCAGTAAACTGCTTCGTGACTCCCATG
 Konec signalinho peptidu

43 LeuHisSerArgLeu

3401 TCCTTCACAGCAGACTGGtgagaactcccaacattatcccccttataccgcgtaactggtaagacacccatactcccaggaagacacccatcacttcctctota
 3501 actccttgacccaatgactattcttcccataattgtccccaccactactgatcacactctctgacaagaattattcttcacaatacagcccgcatttaaaaagc
 3601 tctcgtctagagatagtagtactcatggaggactagcctgcttataggctaccatagctctctctatttcagctcccttctcccccccaactcttttttcaa
 < Exon 4 >

48 SerGlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSerLeuGlyLulrLysThrGlnMet

3701 cagAGCCAGTGCCAGAGGTTCACCCCTTGCCTACACCTGCTCCTGCTGCCTGTGGACTTTAGCTTGGGAGATGGAAAACCCAGATGGgtaagaaagc
 3801 catccctaacccttggcttcccctaagctcttccagtttcccactgcttcccattggattctccaacattcttggagcttttataaaaataatctcaccttca
 3901 gcttggccaccctaacccaattctacattcacctatgatgtagcctgtggataagatgatggcttgcaggtccaataatgtgaatagatttgaagctgaac
 4001 accatgaaaaagctggagagaaatcgctcatggccatttgacctattccygttccagttcttcttaaaattggcatgaagaagcaagactcaatgtcat
 4101 ccacagatgacacaaaagctgggaagtaccactaaaaatacaaaaagactgaatcaagattcaaaatcactgaaagactagggtcaaaaacaagggtgaaacaac
 4201 agagataataaacttctacatgtgtgtaaaatgaatgagtaaaatgtaaaatcccaagcacttctggaggcccgaggcagatcacctgagggcaggagtttgag
 4301 agcagcctggccacaatggcgaaacccccgtctctactaagaatacaaaaattagccgggcatggtagtgcctgtaatccccagctacttgggaaggctg
 4401 aagcaggagaaatcccttgaaccaggaggtggagggtttagtgagctgagatcatgccaatgcactccagcctgggtgacaagagcaaaaactccgtctca
 4501 aaaagaaaaaaaattctacatgtgtgtaaaatgaatgagtaaaatgtaaaatcccaagcacttccaggttccaggttccaggttccatcatttaagcctctggccct
 4601 agcacttccctacgaaaaggatctgagagaattaaattgcccccaacttaccatgtaacattactgaagctgctattcttaaaagctagtaattcttctgtct
 4701 gttttagttagcatccccattgtggaaatgctgtagagaactctattccgagtgtagctacacttaaatatactggcctgaacacccggacatccccct
 4801 gaaqacatatgctaaatttataagagggaccataattaactaacaatgtgtcttagaaaagcagcagcctgaacagaaaagagactagaagcattgtttttatggg

Obr. 14C

225 PheArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsnArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThr
 6401 GAFTCAGAGCCAAAGATTCCCTGGTCTGGTGAACCAACCTCCAGGTCCCTGGACCAAAATCCCGGATACCTGAAACAGGATACACGAACTCTTGAATGGAAC

 258 ArgGlyLeuPheProGlyProSerArgArgThrLeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeuGlnPro
 6501 TCGTGGACTCTTTCCCTGGACCCCTCAGCAGGACCCCTAGGAGCCCCGGACATTTCCACAGAAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCCACCTCCAGCCCT

 291 GlyTyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPheProLeuProProThrLeuProProVaIvalGlnLeuHisProLeuLeu
 6501 GGATAFTCTCTTCCCCAACCCATCCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCTCTCCACCCACCTTGGCCACCCCTGTGGTCCAGTCCACCCCTGTC

 325 ProAspProSerAlaProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsnLeuSerGlnGluGly: STOP
 6701 TTCCTGACCCCTTCTGCTCCAACGCCACCCCTACCAGCCCTCTTCTA AACACACATCCCTACACCCACTCCCAGAACTCTGTCTCAGGAAGGGTAAGGTTCTCA

 6801 GACACTGCCGACATCAGCATTTGTCATGTACAGCTCCCTTCCCTGCAGGGGCCCTGGGAGACAACTGGACAAGATTTCCCTACTTTCTCTCCTGAAACCCC

 6901 AAAGCCCTGGTAAAGGGATACACAGGACTGAAAAGGGAATCATTTTTCACTGTACTTATAAACCTTTCAGAAAGCTATTTTTTTAAAGCTATCAGCAATAC

 7001 TCATCAGAGCAGCTAGCTCTTTGGTCTATTTCTGCAGAAAATTTCCAACTCAGTGAATCTCTACATGCTCTTTTTCTGTGATAACTCTGCAAAAGGCCCTGG

 7101 GCTGGCCCTGGCAGTTGAACAGAGGGAGACTAACCTTGAGTCAGAAAACAGAGAAAGGGTAATTTCCCTTTCAAATTCAGAGGCCCTTCCAACGCCCCC

 7201 CATCCCCCTTACTATCATTTCTCAGTGGGACTCTCATCCCCATATTTCTTAACAGATCTTTACTCTTGAGAAATGAATAAGCTTTCTCTCAGAAAatgctgtcc
 ^PolyA site

 7301 ctatacactagacaaaactgagcctgtataaggaataaatgggagggccgaaaaagctccctaaaaagcaagggaaagatgttcttcgaggggtggcaatag

 7401 atccccctcaccctgcccccaaaaaagctaaacaggaagccttggagagcctcacaccccaggtaggctgttagacagttcagtaaaagacaggg

 7501 acctggatgtgacagctgagcaaacagctagagcttggcagctcagcaggaggcttctggccaggcaatggacgcctgcctccctctgtggagggtcaggag

 7601 gaagtgcaggaagtggcatgagtcaggctccttgagctcacacagcagggagaacaagtaacaagtcaagtaacaagttgaaggctcatttccccagttccccgc

 7701 aaatgcatctaaaaagcagctctgtgtgaccaccataaaactctgtctaggggatctctataaaaaggagtcaggccttatggggccttctgcaaaaataagtgctgcc

 7801 ttggtgctcaggaaaaagggttctgtgtgcaacaaacacaaaatctccactgc

Obr. 14E

ML332

ML153

— 200

— 116
— 97

— 66.3

— 55.4

— 36.5

— 31.1

— 21.5

Obr. 15

1 GAGTCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCCGA CTCTGCCGAA AGAGGACACAG AACCTCAAGC CGCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTTCAGGG GAGAGGCCCC
 101 ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCCT TAGCAGATG GAGCTGACTG GAGCTGACTG AATTGCTCCT GCGGGCCATG CTTCTTGCAG TGGCAAGACT AACTCTGTCC
 SerProVala laProAlaCy sAspProArg LeuLeuAsnL ysLeuLeuAr gAspSerHis LeuLeuHisS erArgLeuSe rGlnCysPro AspValAspPro
 201 AGCCCCGTAG CTCTGTGCTG TGACCCCAGA CTCTTAATA AACTGCTGG AACTGCTGG TACTTCCCAC CTCCTTACA GCCGACTGAG TCAGTGTCCC GACGTGCGACC
 LeuSerIl eProValLeu LeuProAlav alAspPheSe rLeuGlyGlu TrpLysThrg InThrGluGl nSerLysAla GlnAspIleL euGlyAlaVal
 301 CTTTGTCTAT CCTGTGCTG CTGCCTGCTG TGGACTTTAG CCTGGGAGAA TGGAAACCC AGACGGAACA GAGCAAGGCA CAGGACATTC TAGGGGCAGT
 SerLeuLeu LeuGluGlyV alMetAlaAl aArgGlyGln LeuGluProS erCysLeuSe rSerLeuLeu GlyGlnLeuS erGlyGlnVa lArgLeuLeu
 401 GTCCCTTCTA CTGGAGGGAG TGATGGCAGC ACGAGGACAG TGGAAACCCCT CCTGCCTCTC ATCCCTCCTG GGACAGCTTT CTGGGCAGGT TCGCCCTCCTC
 LeuGlyAlaL euGlnGlyLe uLeuGlyThr GlnGlyArgT hrThrAlaHi sLysAspPro AsnAlaLeuP heLeuSerLe uGlnGlnLeu LeuArgGlyLys
 501 TTGGGGGCC TGCAGGCCCT CCTAGGAACC CCTAGGAACC CAGGCAGGA CCACAGCTCA CAAGGACCCC AATGCCCTCT TCTTGAAGCTT GCAACAACCTG CTTCCGGGAA
 ValArgPh eLeuLeuLeu ValGluGlyP roThrLeuCy sValArgArg ThrLeuProT hrThrAlaVa lProSerSer ThrSerGlnL euLeuThrLeu
 601 AGGTGCGCTT CCTGTCTG GTAGAGGTC CCACCCCTCTG TGTCAGACCG ACCCTGCCAA CCACAGCTGT CCCAAGCAGT ACTTCTCAAC TCCTCACACT

-10

-10

-20

Met GluLeuThrA spLeuLeuLe uAlaAlaMet LeuLeuAlav alAlaArgLe uThrLeuSer

10

20

30

40

50

60

70

80

90

100

110

120

130

140

Obr.16A

170 AsnLysPhe ProAsnArgT hrSerGlyLe uLeuGluThr AsnPheSerV alThrAlaAr gThrAlaGly ProGlyLeuL euSerArgLe uGlnGlyPhe 200
 701 AAACAGTTC CCAAACAGGA CTTCTGGATT GTTGGAGACG AACTTCAGTG TCACAGCCAG AACTGCTGGC CCTGGACTTC TGAGCAGGCT TCAGGGATTTC
 210 ArgValLysI leThrProG1 yGlnLeuAsn GlnThrSera rgSerProVa IGlInIleSer GlyTyrLeuA snArgThrHi sGlyProVal AsnGlyThrHis
 801 AGAGTCRAGA TTRACTCTGG TCAGCTAAAT CAACCTCCA GGTCCCCAGT CCAAAATCTCT GGATACCTGA ACAGGGACACA CGGACCTGTG AATGGAATTC 230
 240 GlyLeuPh eAlaGlyThr SerLeuGlnT hrLeuGluAl aserAspIle SerProGlyA laPheAsnly sGlySerLeu AlaPheAsnL euGlnGlyGly
 901 ATGGGCTCTT TGCTGGAACC TCACCTCAGA CCCTGGAAGC CTCAGACATC TCGCCCGGAG CTTTCAACAA AGGCTCCCTG GCATTCACC TCCAGGGTGG 260
 270 LeuProPro SerProSerL euAlaProAs pGlyHisThr PropheProP roSerProAl aLeuProThr ThrHisGlys erProProG1 nLeuHisPro 300
 1001 ACTTCTCTCT TCTCCAAGCC TTGCTCTCTGA TGGACACACA CCGTCCCTC CTTACACCTGC CTTGCCACC ACCCATGGAT CTCCACCCCA GCTCCACCCC
 310 LeuPheProA spProSerTh rThrMetPro AsnSerThra laProHisPr ovalThrMet TyrProHisP roArgAsnLe uSerGlnGlu Thr 330
 1101 CTGTTTCTCTG ACCCTTCCAC CACCATGCGT AACTCTACCG CCGCTCATCC AGTCACAATG TACCCTCATC CCAGGAATTT GTCTCAGGAA ACATAGCGCG
 1201 GGCACCTGGCC CAGTGAGCGT CTGCAGCTTC TCTCGGGGAC AAGCTTCCCC AGGAGGCTG AGAGCCAGCT GCATCTGCTC CAGATGTTCT GCTTTCACCT
 1301 AAAAGGCCCT GGGGAAGGGA TACACAGCAC TGGAGATTGT AAAATTTTAG GAGCTATTTT TTTTAACTT ATCAGCAATA TTCATCAGAG CAGCTAGCGA
 1401 TCTTTGGTCT APTTTCGGTA TAAATTGAA AATCACTAAT TCT

Obr. 16B

1 gagtccttgcccacactctccccaccgactctgccgaaagaagcacagaagctcaagccgcctccatggccccaggaaagattcaggggagagccccc
 101 atacagggagccacttcagttagacaccctggccagatggagctgactgatttgcctccctggggccatgcttcttggcagtgccaaagactaacctctgtgcc
 MetGluLeuThrAspLeuLeuAlaAlaMetLeuLeuAlaValAlaArgLeuThrLeuSer
 -20 -10
 SerProValAlaProAlaCysAspProArgLeuLeuAsnLysLeuLeuArgAspSerHisLeuLeuHisSerArgLeuSerGlnCysProAspValAspPro
 201 AGCCCCGTAGCTCCTGCCCTGTGACCCACAGACTCCTAAATAAAGTGGTGGTACTCCACCTCCTCACAGCCGACTGAGTCAGTGTCCCGACGTCGACC
 LeuSerIleProValLeuLeuProAlaValAspPheSerLeuGluTrpLysThrGlnThrGluGlnSerLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaVal
 301 CTTTGTCTATCCCTGTCTGTCTGCCCTGTGACTTTAGCCCTGGGAGAAATGGAAACCAGAGCGGAAACAGAGCAAGGCACAGGACATTCCTAGGGGCAGT
 SerLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGluProSerCysLeuSerSerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeu
 401 GTCCCTTCTACTGGAGGAGTGTATGGCAGCCAGGACAGTTGGAAACCCTCCTGCTTCTCATCCCTCCTGGGACAGCTTCTGGGCAGGTTCCGCCTCCTC
 LeuGlyAlaLeuGlnGlyLeuLeuGlyThrGlnLeuProLeuGlnGlyArgThrThrAlaAlaHisLysAspProAsnAlaLeuPheLeuSerLeuGlnLeu
 501 TTGGGGCCCTGCAGGGCCTCCTAGGAACCCAGCTTCCCTCTACAGGGCAGGACCACAGCTCACAGGACCCCAATGCCCTCTTCTTGAGCTTGCACCAAC
 LeuArgGlyLysValArgPheLeuLeuValIleGlyProThrLeuCysValArgArgThrLeuProThrThrAlaValProSerSerThrSerGln
 601 TGCTTCGGGAAAGGTGCGCTTCTGCTTCTGGTAGAGGTCCACCCTCTGTGTAGAGGACCCCTGCCAACCCACAGCTGCCCAAGCAGTACTTCTCA
 LeuLeuThrLeuAsnLysPheProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheSerValThrAlaArgThrAlaGlyProGlyLeuLeuSerArg
 701 ACTCCTCACACTAACCAAGTCCCAACAGGACTTCTGGATTGTGGAGACGAACTTCAGTGTACAGGCCAGAACTGCTGGCCCTGGACTTCTGAGCAGG
 100 130 160
 110 140 170 200

Obr. 17A

210
 LeuGlnGlyPheArgValLysIleThrProGlyGlnLeuAsnGlnThrSerArgSerProValGlnIleSerGlyTyrLeuAsnArgThrHisGlyProVal
 801 CTTCAGGGATTCAAGATCAAGATTACTTCTGGTCAGCTAAATCAAAACCCTCCAGGTCCTCCAGTCCCAATCTCTGGATACCTGACAGGACACACGGACCTG
 230
 240
 AsnGlyThrHisGlyLeuPheAlaGlyThrSerLeuGlnThrLeuGluAlaSerAspIleSerProGlyAlaPheAsnLysGlySerLeuAlaPheAsn
 901 TGAATGGAACCTCATGGCTCTTTGCTGGAACCTCACTCAGACCCCTGGAGCCTCAGACATCTGCCCCGGAGCTTTCACAAAGGCTCCCTGGCATTTCAA
 260
 270
 LeuGlnGlyGlyLeuProProSerProSerLeuAlaProAspGlyHisThrProPheProSerProAlaLeuProThrThrHisGlySerProPro
 1001 CCTCCAGGGTGGACTTCTCTCCAAAGCCTTGCTCCTGATGGACACACACCCCTTCCCTCCTTCCCTGCTGCCCCACCCATGGATCTCCACCC
 290
 300
 GlnLeuHisProLeuPheProAspProSerThrThrMetProAsnSerThrAlaProHisProValIleThrMetTyrProHisProArgAsnLeuSerGlnGlu
 1101 CAGCTCCACCCCTGTCTCCAGACCTTCCACCACCATGCCTAACTCTACCCGCCCTCATCCAGTCACAATGTACCCCTCATCCAGGATTTGTCTCAGG
 310
 320
 330
 Thr
 1201 AAACATAGcgcgggcaactggcccagtgagcgtctgcagcttctcggggacaagcttccccaggaaggtgagaggcagctgcatctgctccagatggt
 1301 ctgctttcacctaaaaggccctggggaaggatcacagcactggagattgtaaaatttttaggagctatTTTTTTTaaacctatcagcaatattcatcag
 1401 agcagctagcgatctttgggtctattttcgggtataaaatttgaaaatcactaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
 1501 aa

Obr. 17B

hML3 1 SPAPACDLRVLSKLLRDSHV LHSRLSQCP E V H P L P T P V L L P A V D F S L G E
 mML3 1 SPVAPACDPRLLNKLRLSHL LHSRLSQCP D V D P L S I P V L L P A V D F S L G E

hML3 51 WKTQMEETKAQDILGAVT LLEGVMAARGQLGPT CLSSLLGQLSGQVRL L
 mML3 51 WKTQTEQSKAQDILGAVS LLEGVMAARGQLEPS CLSSLLGQLSGQVRL L

hML3 101 LGALQSL LGTQLPPOGRTTAHKDPNAIFLSFQH LLRGKDFWIVGDKLHCL
 mML3 101 LGALQGL LGTQLPLQGRTTAHKDPNALFLSLQL LRGKDFWIVGDE L QCH

hML3 151 SQNYWLWASEVAAGIQSQD SWSAEPNLQVPGPNPIPEQDTRTLEWNSW
 mML3 151 SQNCWPWTSEQASGIQSQDY SWSAKSNLQVSPNLWPIPEQDTRICEWNSW

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 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

Obr. 18

hML3 250 STHLAHPCGPAPPAS

m-ML 1 SPVAPACDPRLLNKLLRDSHLLHSRLSQCPDVIDP LSI PVLLPAVDFSLGE
 p-ML 1 SPAPPACDPRLLNKLLRDSHVHLHGRLSQC PDINPLSTPVLLPAVDFITLGE
 h-ML 1 SPAPPACDLRVLKLLRDSHV LHSRLSQCPEVHP LPI PVLLPAVDFSLGE

m-ML 51 WKTOIEQSKAQDILGAVS LLEGVMAARGQL EIP S CLSSLLGQLSGQV RLL
 p-ML 51 WKTOIEQTKAQDYLGAITL LLEAVM TARGQV GPP PCLSSLLVQLSGQV RLL
 h-ML 51 WKTOIEEETKAQDILGAVT LLEGVMAARGQL GPT I CLSSLLGQLSGQV RLL

m-ML 101 LGALQGLLGIQLPL QGRTIAHKDPNAL FLSL QQLLRGKVRFL L LVEGPTL
 p-ML 101 LGALQDLLGMQLPP QGRTIAHKDP SAIFFLN FQQLLRGKVRFL L L VVGPSL
 h-ML 101 LGALQSL L LGIQLPP QGRTIAHKDPNAIFLSFQH L LRGKVRFL M L VVGSTL

m-ML 151 CVRRITLPTIAVPSSTISQL LTLNKFPP N R L S G L L E T N E S V T A R T A G P G L L S R
 p-ML 151 CAKRAPP A IAVPSSTIS P F H T L N K L P N G D S G L L E T N I S I S I S A R T T G S G F L K R
 h-ML 151 CVRRAPP T IAVPSRTS L V L T L N E L P N R T S G L L E T N I F E T A S A R T T G S G L L K M

m-ML 201 LQGFRVYKI TP GQL N Q T S R S P V Q I S G Y L N R L H G P Y N G I T H G L F A I G I S L Q I L E
 p-ML 201 LQAFRAKI - P G L L L Q T S R S L D O I P G H Q N G T H G P L S G I H G L F P G P Q P G A L G
 h-ML 201 QGFRAKI - P G L L N Q T S R S L D O I P G Y L N R I M E L L N G T R G L F P G P S R R I L G

m-ML 251 ASDISP 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 I P F P S P A L P I T H G S P
 p-ML 250 APDI PPAITSGMGS R P T Y L Q P G E S P S P A H P S P G R Y T L F S P S T S P S - - P T
 h-ML 250 APDISSGTSDT G S L P P N L O P G Y S P S P T H P P T G O Y T L F P I P T I P T - - P Y

m-ML 300 PQLHPLFPDPSITMP N S T A P H P V I M Y P H P R N L S O E I T
 p-ML 297 VQLQPLLPDPSAITP N S T S P L L F A A H P H F D N S S Q E E
 h-ML 297 VQLHPLLPDPSA P T P T S P L L T S Y T H S Q N S S Q E G

Obr. 19

10 30
 SerProAlaProProAlaCysAspProArgLeuLeuAsnLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisGlyArgLeuSerGlnCysProAspIleAsnPro
 1 AGCCCCGGCTCCTCGCTGCCTGTGACCCCCCGACTCCTAAATAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCTTCACGGCAGACTGAGCCAGTGCCCGACATTAACC

 40 50 60
 LeuSerThrProValLeuLeuProAlaValAspPheThrLeuGlyGluTrpLysThrGlnThrGlnThrLysAlaGlnAspValLeuGlyAlaThr
 101 CTTTGTCCACACCTGTCTGTCTGTGCTGTGACTTCACCTTGGGAGATGGAAACCAGACGGAGCAGCAAGGCCACAGGATGTCTCTGGAGCCAC

 70 80 90 100
 ThrLeuLeuLeuGluAlaValMetThrAlaArgGlyGlnValGlyProProCysLeuSerLeuLeuValGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeu
 201 AACCCCTTCTGCTGGAGGCAGTGAATGACAGCACGGGGACAAGTGGACCCCTTGCCCTCATCCCTGCTGGTGCAGCTTCTGGACAGGTTCCCTCCTC

 110 120 130
 LeuGlyAlaLeuGlnAspLeuLeuGlyMetGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProSerAlaIlePheLeuAsnPheGlnGlnLeu
 301 CTCGGGGCCCTGCAGGACCTCCTTGGATGSCAGCTTCTCCACAGGGAGGACCCACAGCTCACAAAGGATCCCAGTGCCCATCTTCTGAACTTCCAACAAC

 140 150 160
 LeuArgGlyLysValArgPheLeuLeuLeuValValGlyProSerLeuCysAlaLysArgAlaProProAlaIleAlaValProSerSerThrSerPro
 401 TGCTCCGAGAAAGGTGCGTTTCCGTGCTTGTAGTGGGGCCCTCCCTCTGTGCCAAGAGGGCCCCACCCGGCCATAGCTGTCCCCGAGCAGCACCTCTCC

Obr. 20A

170
 PheHisThrLeuAsnLysLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnSerSerIleSerAlaArgThrThrGlySerGlyPheLeuLysArg 200
 501 ATCCACACACTGAACAAGCTCCCAACAGGACCTCTGGATTGTGGAGACAACCTCCAGTATCTCAGCCAGNACTACTGGCTCTGGATTCTCAAGAGG
 180
 190
 200
 LeuGlnAlaPheArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyHisGlnAsnGlyThrHisGlyProLeuSer 230
 601 CTGCAGGCATTCAGAGCCAGATTCTGGTCTCTGAAACCAACCTCCAGGTCCCTRAGACCAATCCCTGGACACCAGAAATGGGACACACGGACCCTTGA
 210
 220
 230
 240
 GlyIleHisGlyLeuPheProGlyProGlnProGlyAlaLeuGlyAlaProAspIleProProAlaThrSerGlyMetGlySerArgProThrTyrLeu 260
 701 GTGGAATTCATGGACTCTTTCTGGACCCCAACCCGGGCCCTCGGAGCTCCAGACATTCCTCCAGCAACTTCAGGCATGGGCTCCCGGCCAACCTACCT
 250
 260
 270
 GlnProGlyGluSerProSerProAlaHisProSerProGlyArgTyrThrLeuPheSerProSerProThrSerProThrValGlnLeuGln 300
 801 CCAGCCTGGAGAGTCTCCTTCCCAGCTCACCTTCTCCTGGACGATACACTCTCTCTCTCCCTTACCCACCTCGCCCTCCCCACAGTCCAGTCCAG
 280
 290
 300
 310
 ProLeuLeuProAspProSerAlaIleThrProAsnSerThrSerProLeuLeuPheAlaAlaHisProHisPheGlnAsnLeuSerGlnGluGlu 330
 901 CCTCTGCTTCCCTGACCCCTCTGGGATCACACCCAACTCTACCAGTCCCTCTTCTATTGTCAGCTCACCCCTCATTTCCAGAACCTGTCTCAGGAAGAGTAAG
 320
 330

Obr. 20B

1001 GTGCTCAGACCCCTGCCAACTTCAGCA

170
 AsnLysLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnSerSerIleSerAlaArgThrThrGlySerGlyPheLeuLysArgLeuGlnAlaPhe 200
 501 GAACAAGCTCCCAACAGGACCTTCGATTGTTGGAGCAAACTCCAGTATCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGATTCTCAAGAGGCTGCAGGCATTC 190

 210
 ArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyHisGlnAsnGlyThrHisGlyProLeuSerGlyIleHisGly 230
 601 AGAGCCAAGATTCTCGTCTGTGTAACCAAACTCCAGGTCCTAGACCAAAATCCCTGGACACCCAGAAATGGGACACACCGGACCCCTTGAGTGAATTCATG 220

 240
 LeuPheProGlyProGlnProGlyAlaLeuGlyAlaProAspIleProProAlaThrSerGlyMetGlySerArgProThrTyrLeuGlnProGlyGlu 260
 701 GACTCTTTCCCTGGACCCCAACCCGGGCCCTCGGAGCTCCAGACATTCCTCCAGCAACTTCAGGCAATGGGCTCCCGGCCAACCTACCTCCAGCCTGGAGA 250

 270
 SerProSerProAlaHisProSerProGlyArgTyrThrLeuPheSerProSerProThrSerProSerProThrValGlnLeuGlnProLeuLeuPro 300
 801 GTCTCCTTCCCCAGCTCACCTTCTCCTGGACGATACACTCTCTCTCTCCTTCACCCACCTCGCCCTCCCCCACAGTCCAGCTCCAGCCTCTGCTTCCCT 290

 310
 AspProSerAlaIleThrProAsnSerThrSerProLeuLeuPheAlaAlaHisProHisPheGlnAsnLeuSerGlnGlu 320
 901 GACCCCTCTGGGATCACACCCAACTTACCAGTCCCTTCTATTGTCAGCTCACCCCTCATTTCCAGAACTGTCTCAGGAAGAGTAGGTGCTCAGACCC 310

 1001 TGCCAACTTCAGCA

Obr. 21B

1001 TGCCAACTTCAGCA

pML 1 SPAPPACDPRLLNKLLRDSHV LHGRLSQC PDINPLSTPVLLPAVDFTLGE
 pML2 1 SPAPPACDPRLLNKLLRDSHV LHGRLSQC PDINPLSTPVLLPAVDFTLGE

pML 51 WKTQTEQTKAQDVLGATTLLEAVMTARGQVGP PCLSSLLVQLSGQVRL L
 pML2 51 WKTQTEQTKAQDVLGATTLLEAVMTARGQVGP PCLSSLLVQLSGQVRL L

pML 101 LGALQD L LGM QLP P QGR TTAHKDP SAIFLN FQQLLRGKVRFLLLVVGPSL
 pML2 101 LGALQD L LGM . . . QGR TTAHKDP SAIFLN FQQLLRGKVRFLLLVVGPSL

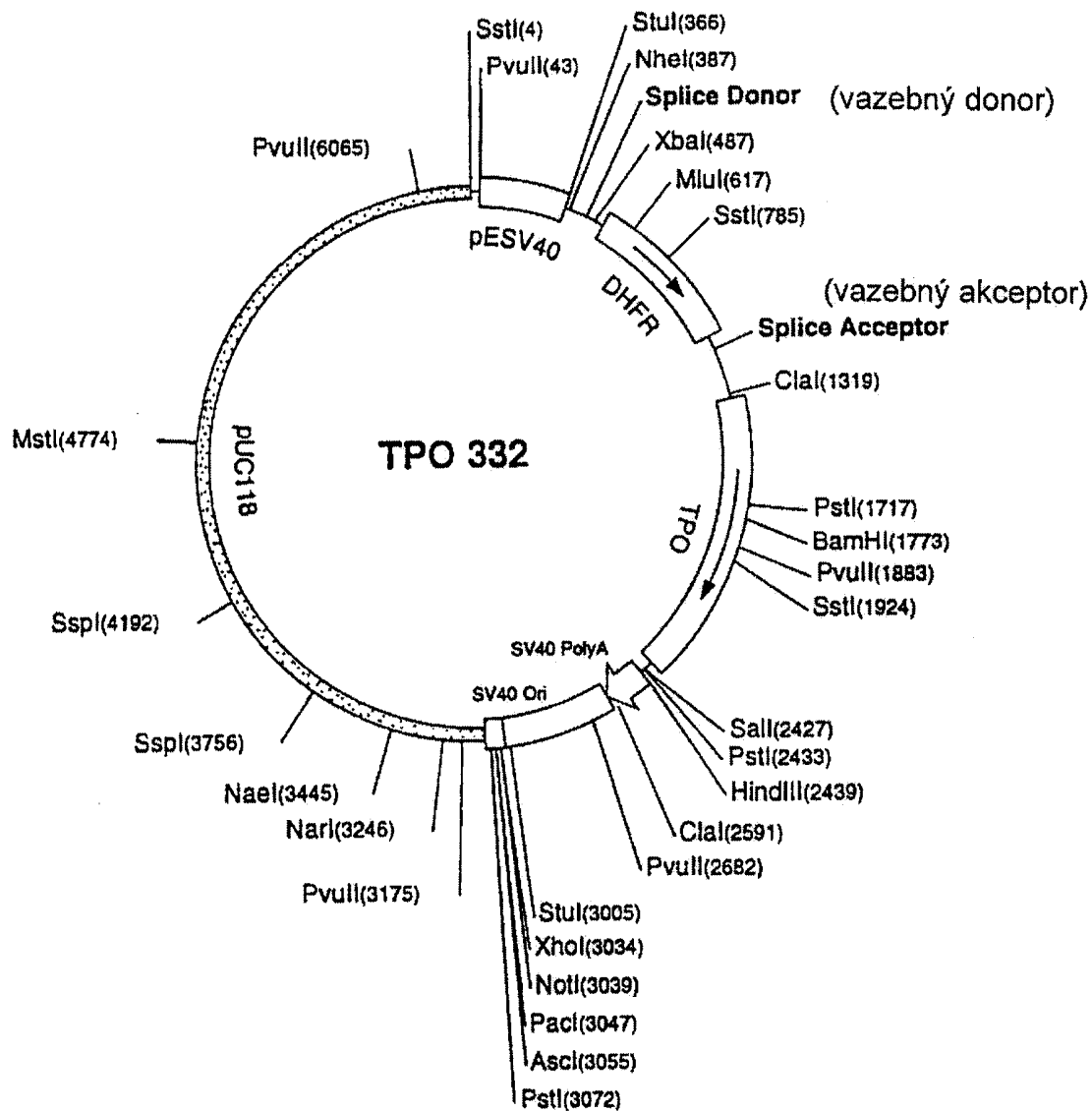
pML 151 CAKRAPP AIAVPSSTSPFFHTLNKLPNRTSGLLE TNSSISARTTGS GFLKR
 pML2 147 CAKRAPP AIAVPSSTSPFFHTLNKLPNRTSGLLE TNSSISARTTGS GFLKR

pML 201 LQAFRAKIPG L LNQTSRSLDQIPGHQNGTHG PLSG IHGLFPGPQPGALGA
 pML2 197 LQAFRAKIPG L LNQTSRSLDQIPGHQNGTHG PLSG IHGLFPGPQPGALGA

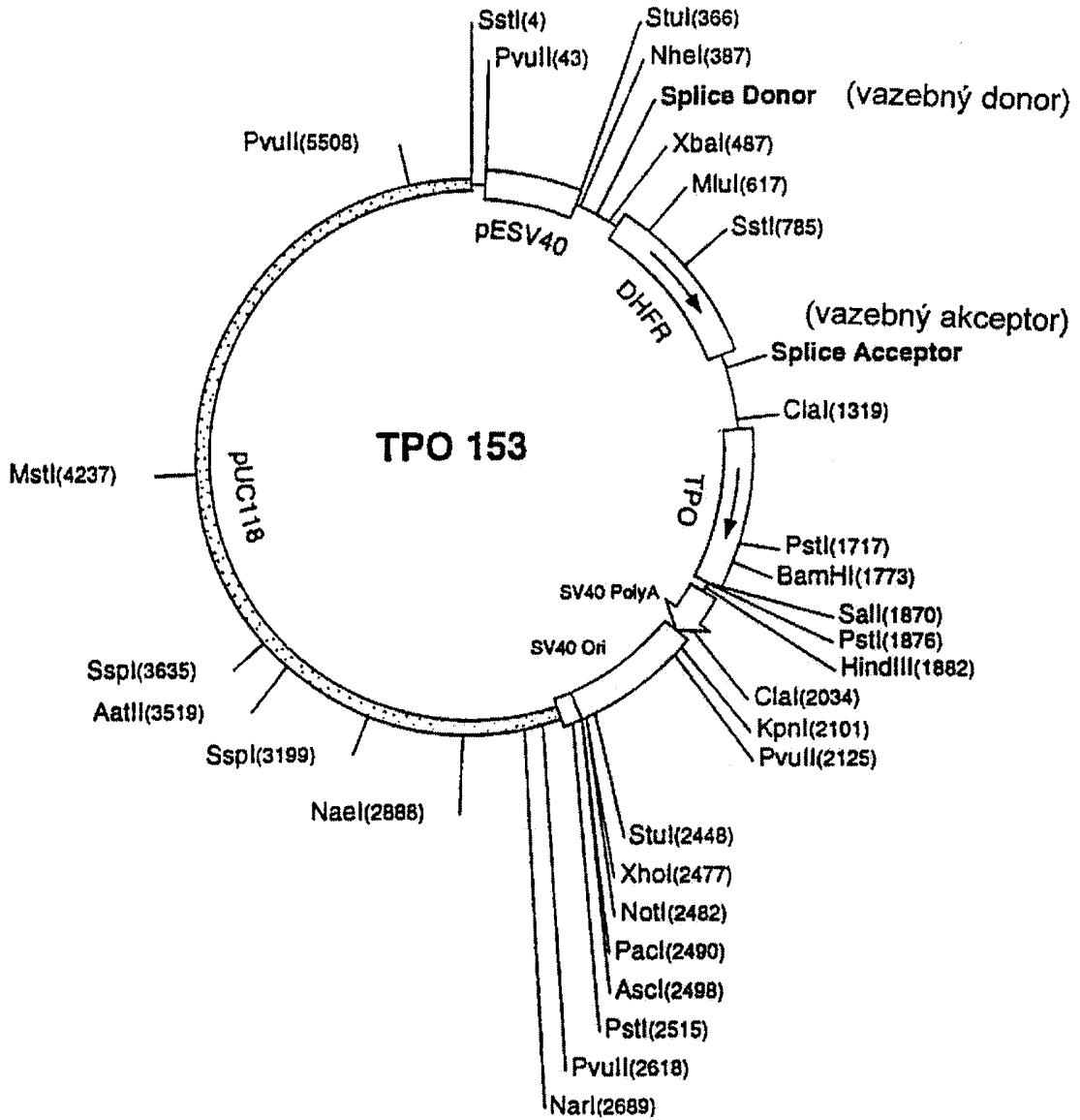
pML 251 PDIPPA TSGMGS RPTYLQPGESPSPAHPSPGRYTLFSPSPTSPSPTVQLQ
 pML2 247 PDIPPA TSGMGS RPTYLQPGESPSPAHPSPGRYTLFSPSPTSPSPTVQLQ

pML 301 PLLPDPSA ITPNSTSP L LFAAHPHFQNL SQEE
 pML2 297 PLLPDPSA ITPNSTSP L LFAAHPHFQNL SQEE

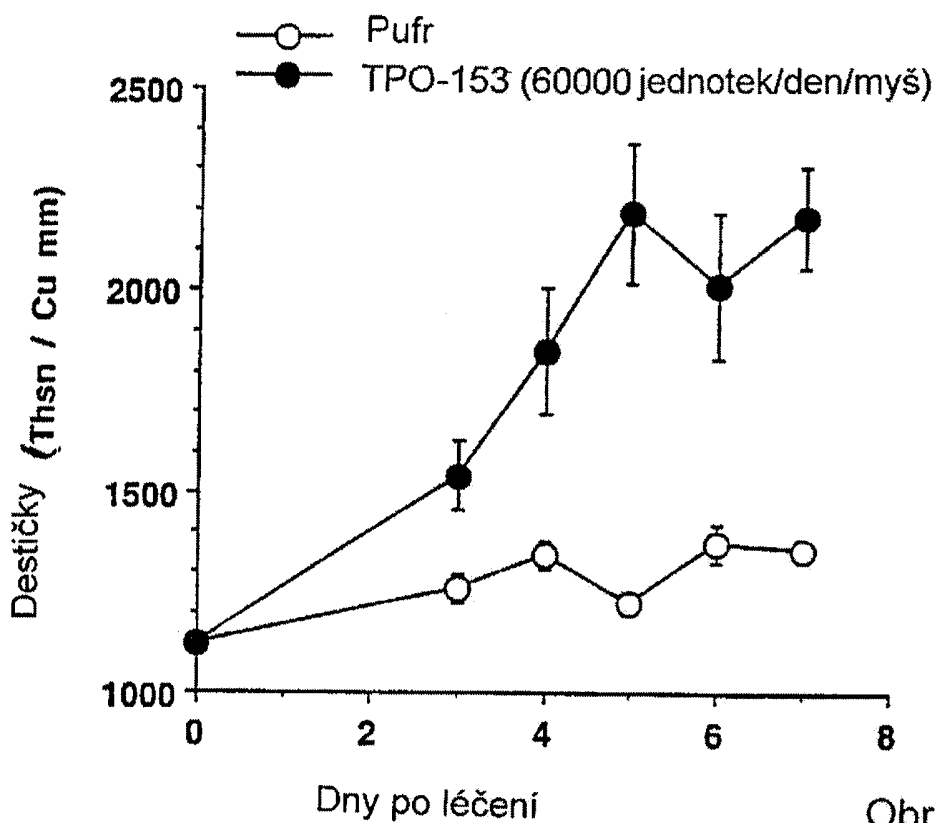
Obr. 22



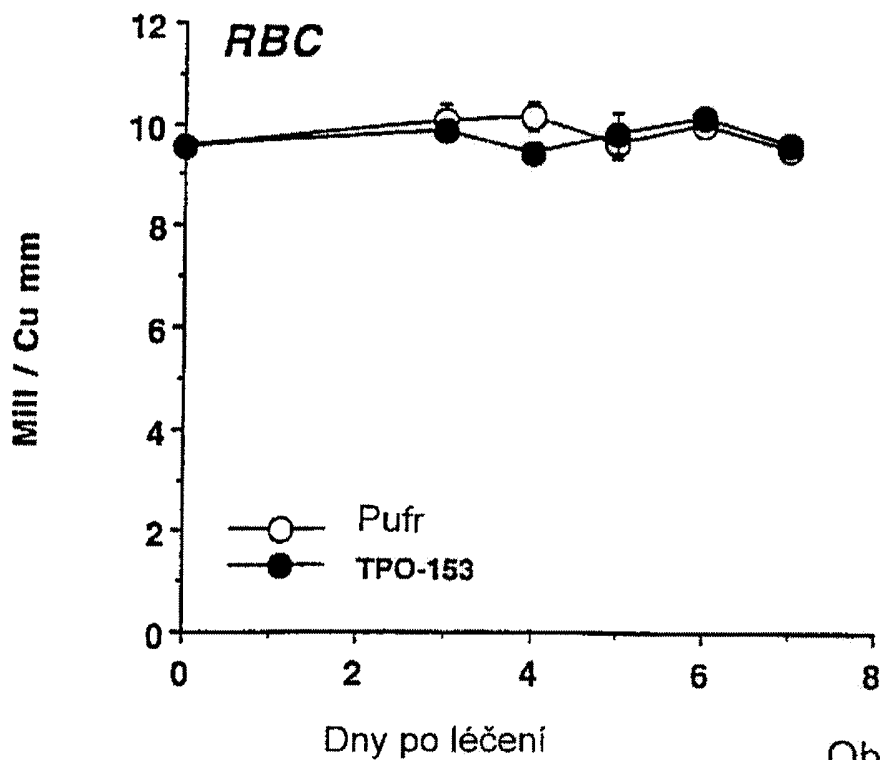
Obr. 23



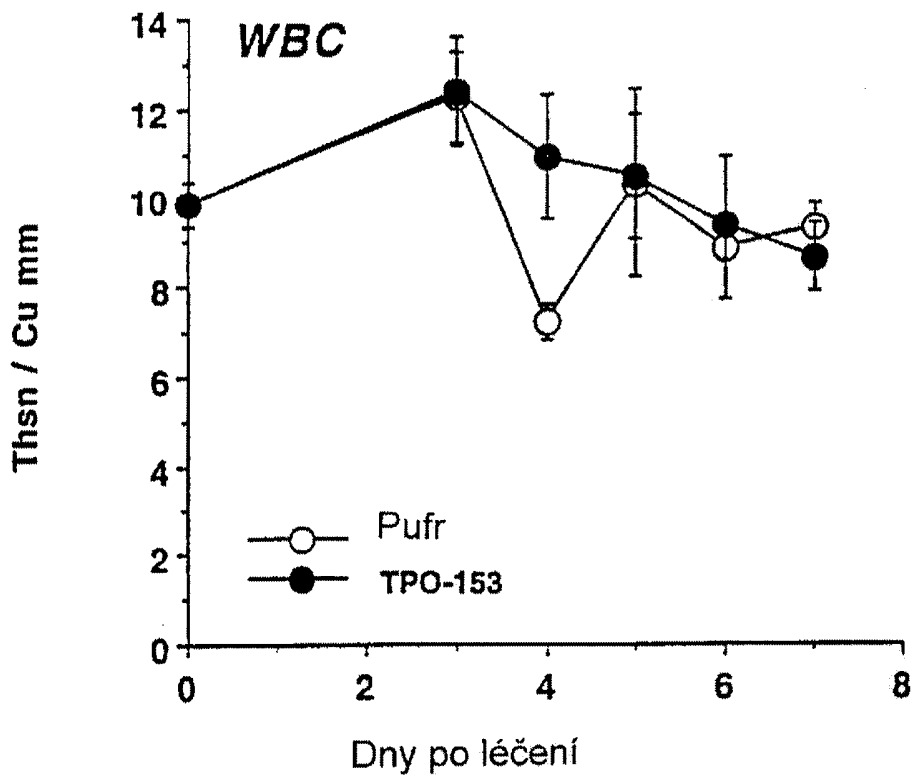
Obr. 24



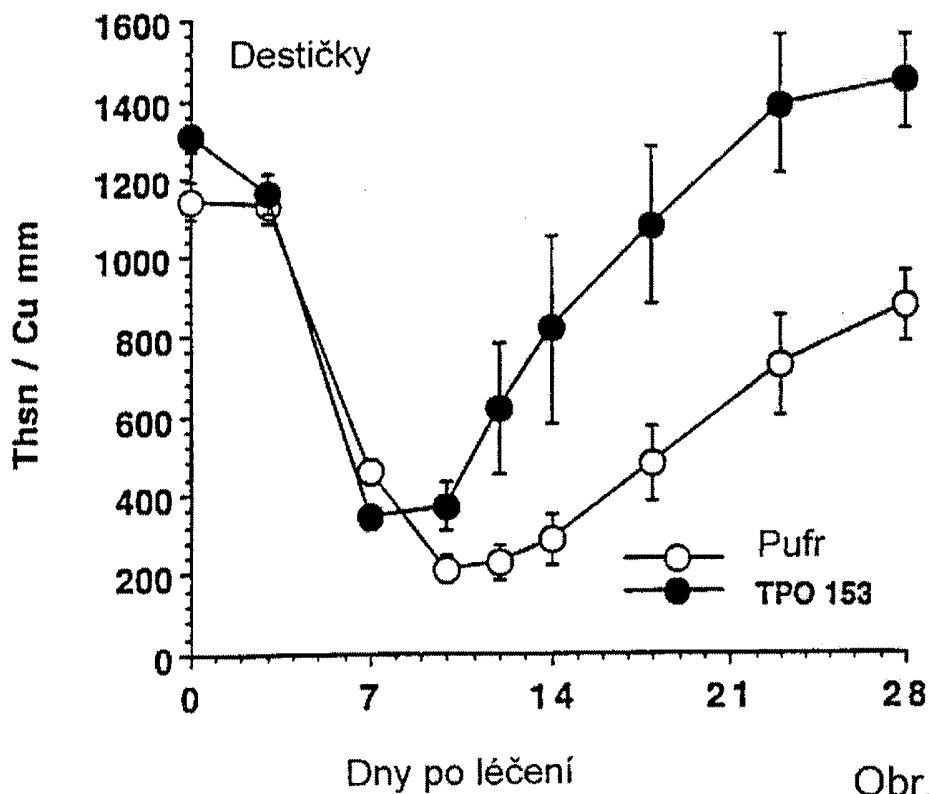
Obr. 25A



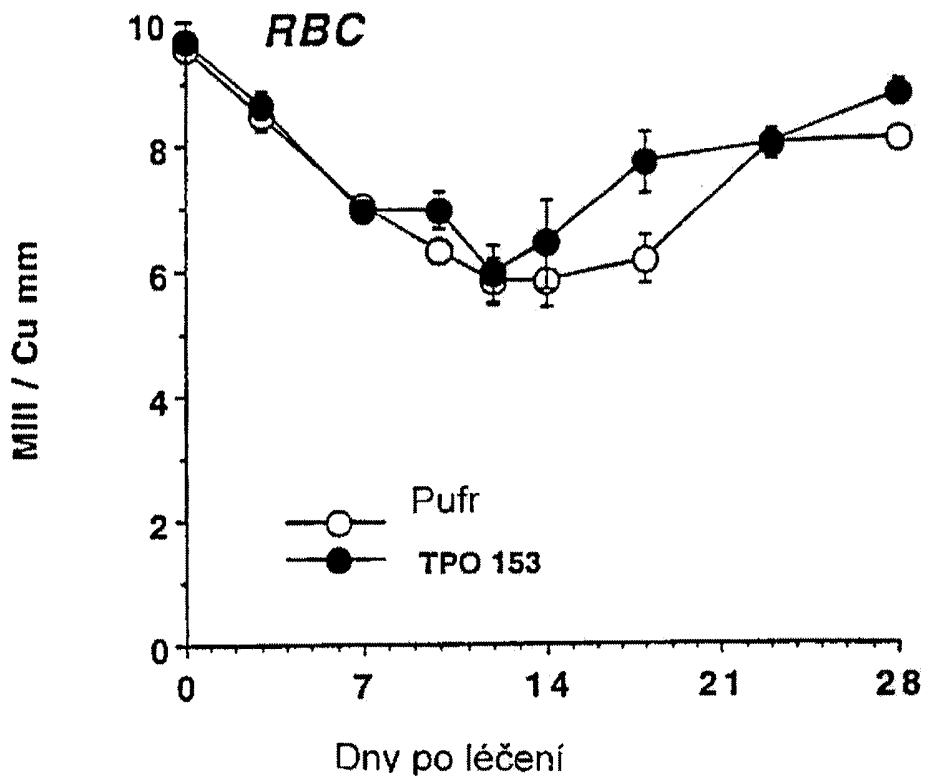
Obr. 25B



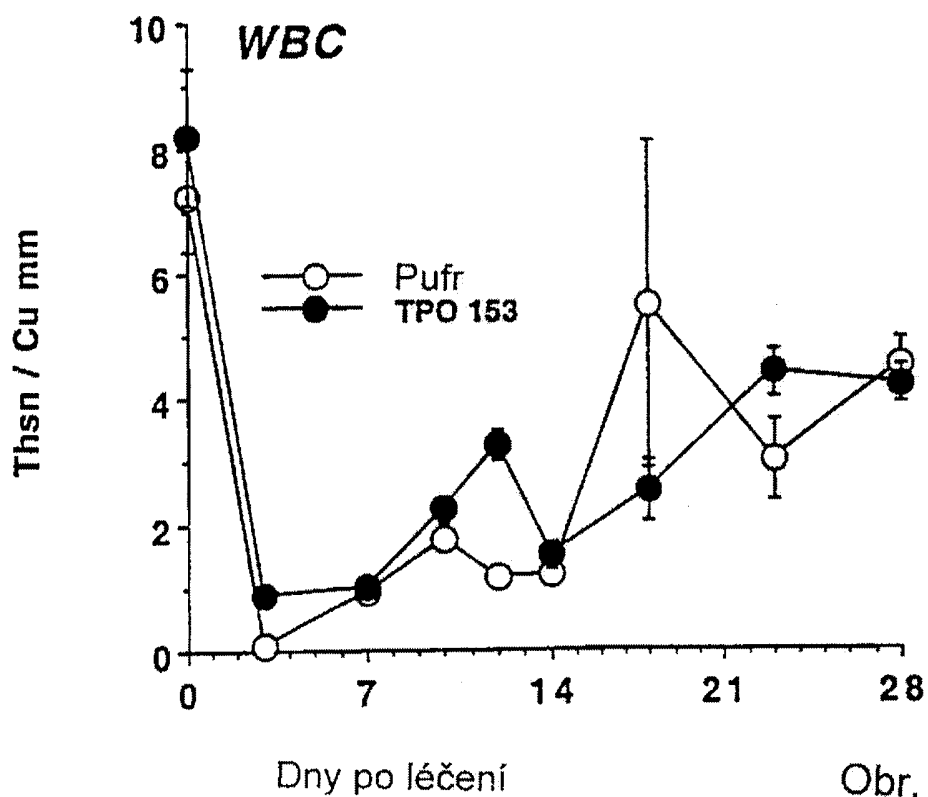
Obr. 25C



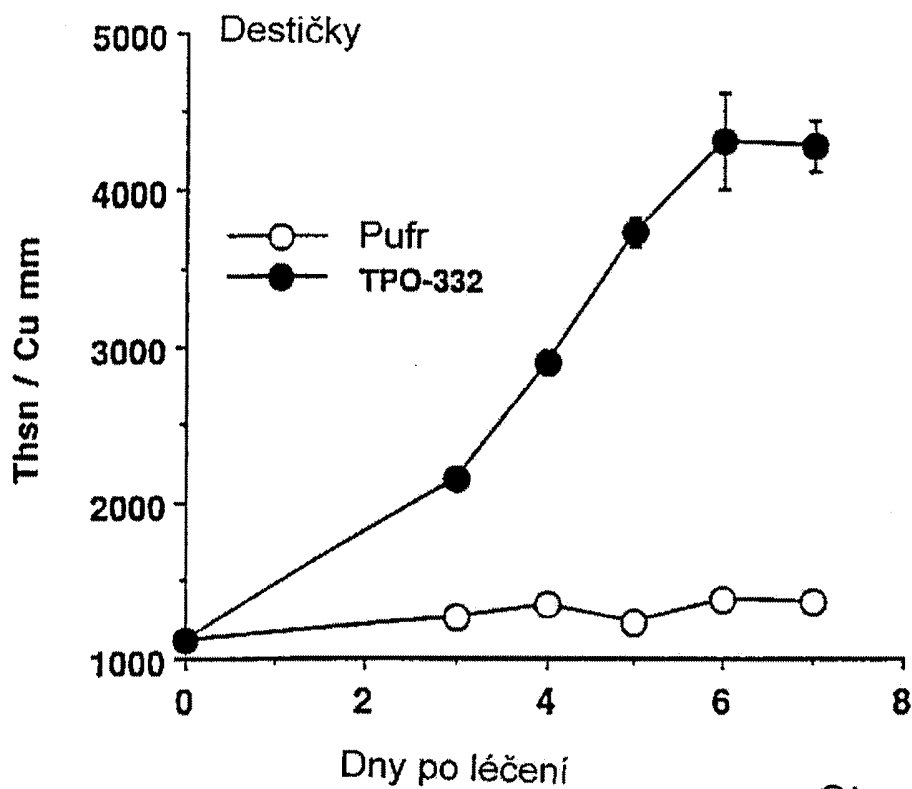
Obr. 26A



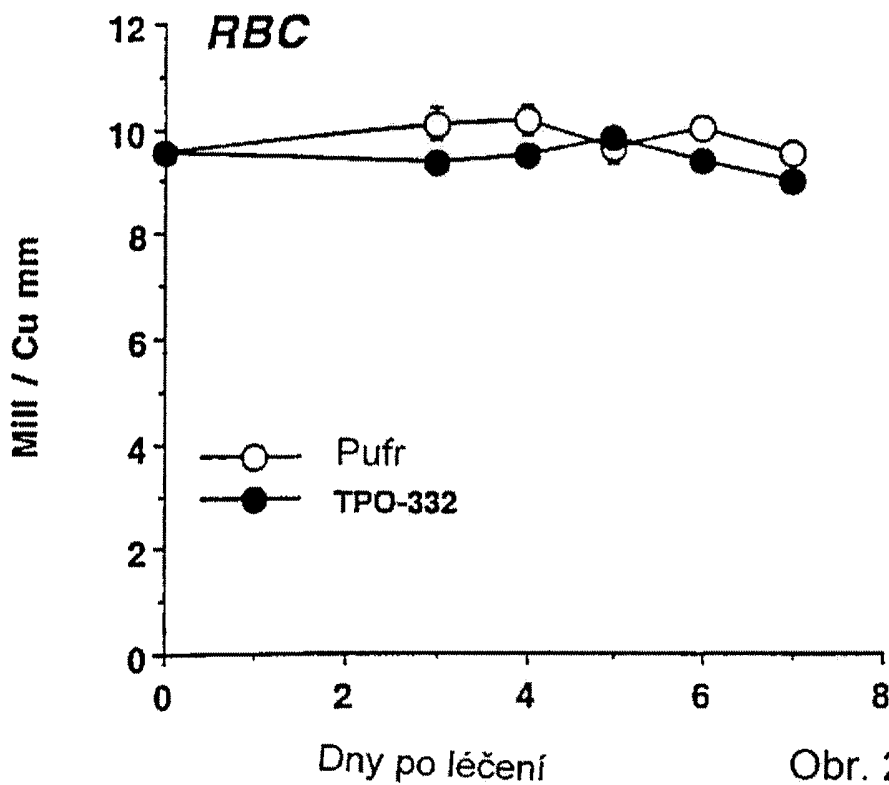
Obr. 26B



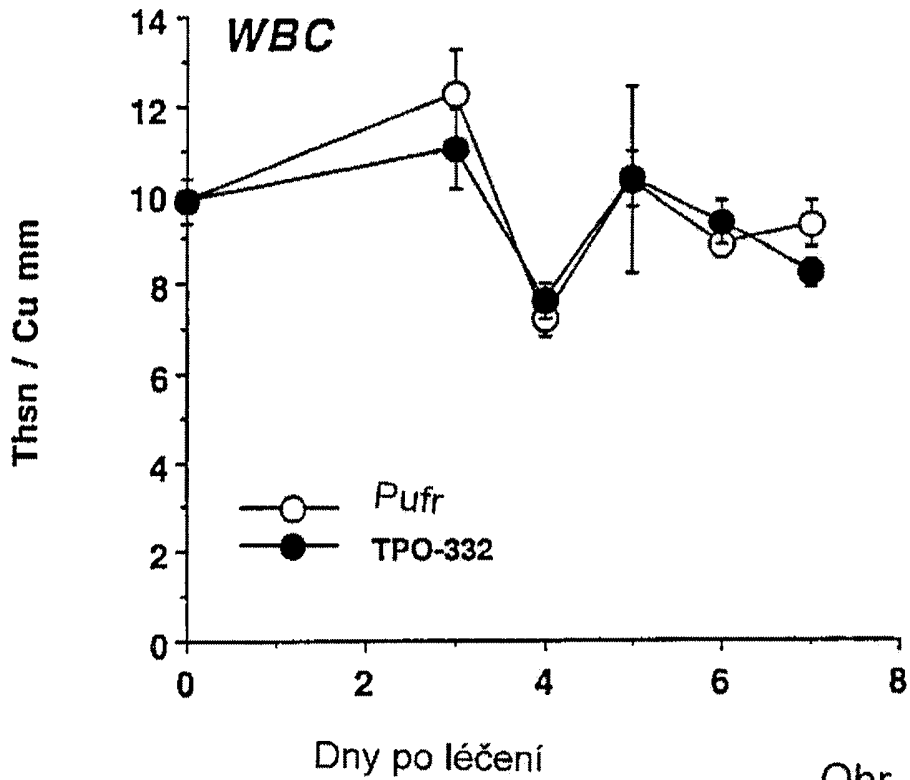
Obr. 26C



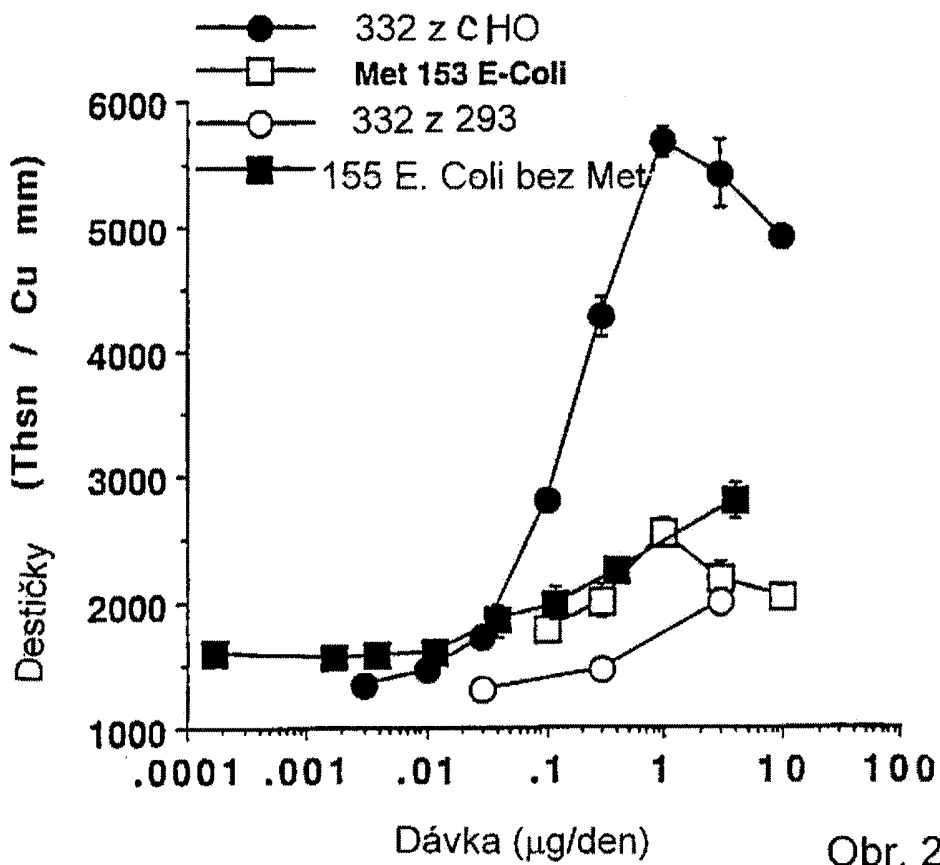
Obr. 27A



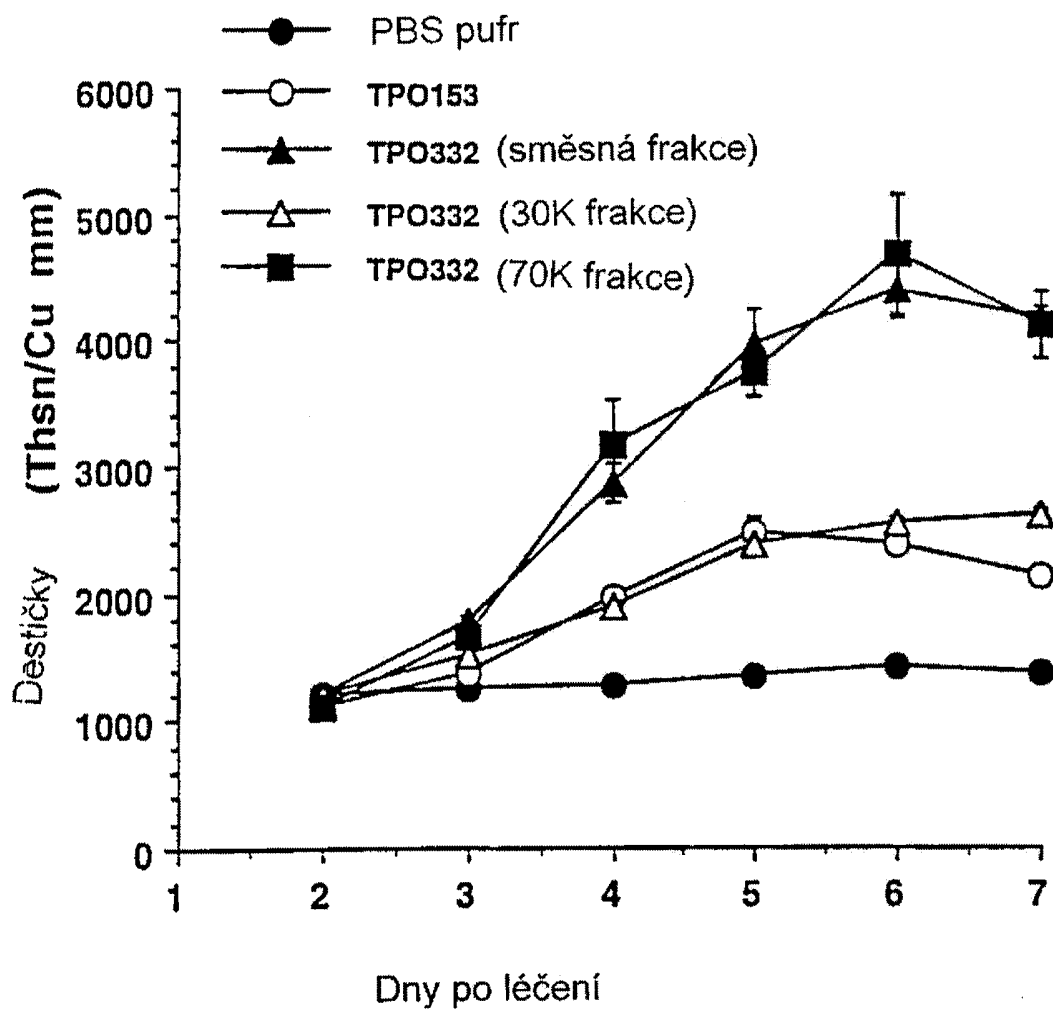
Obr. 27B



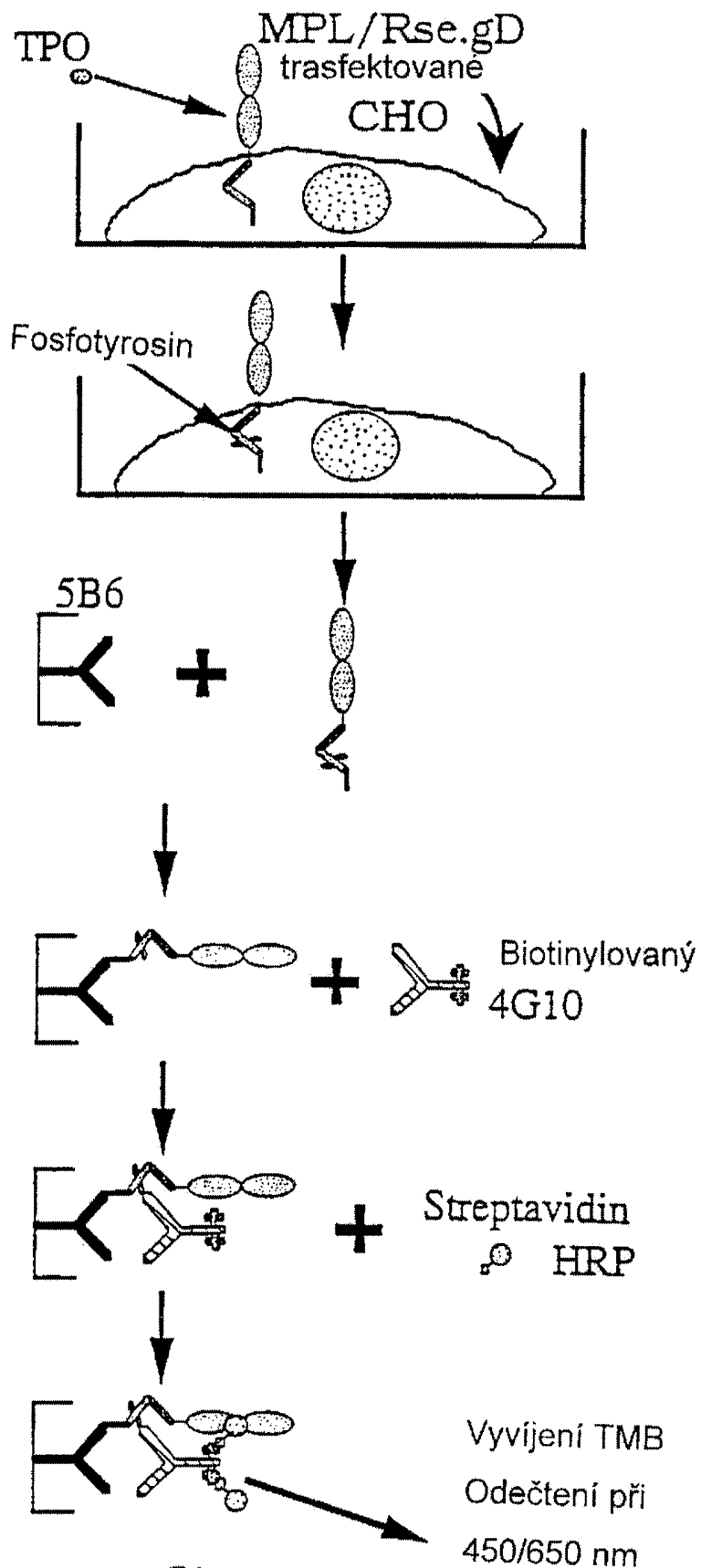
Obr. 27C



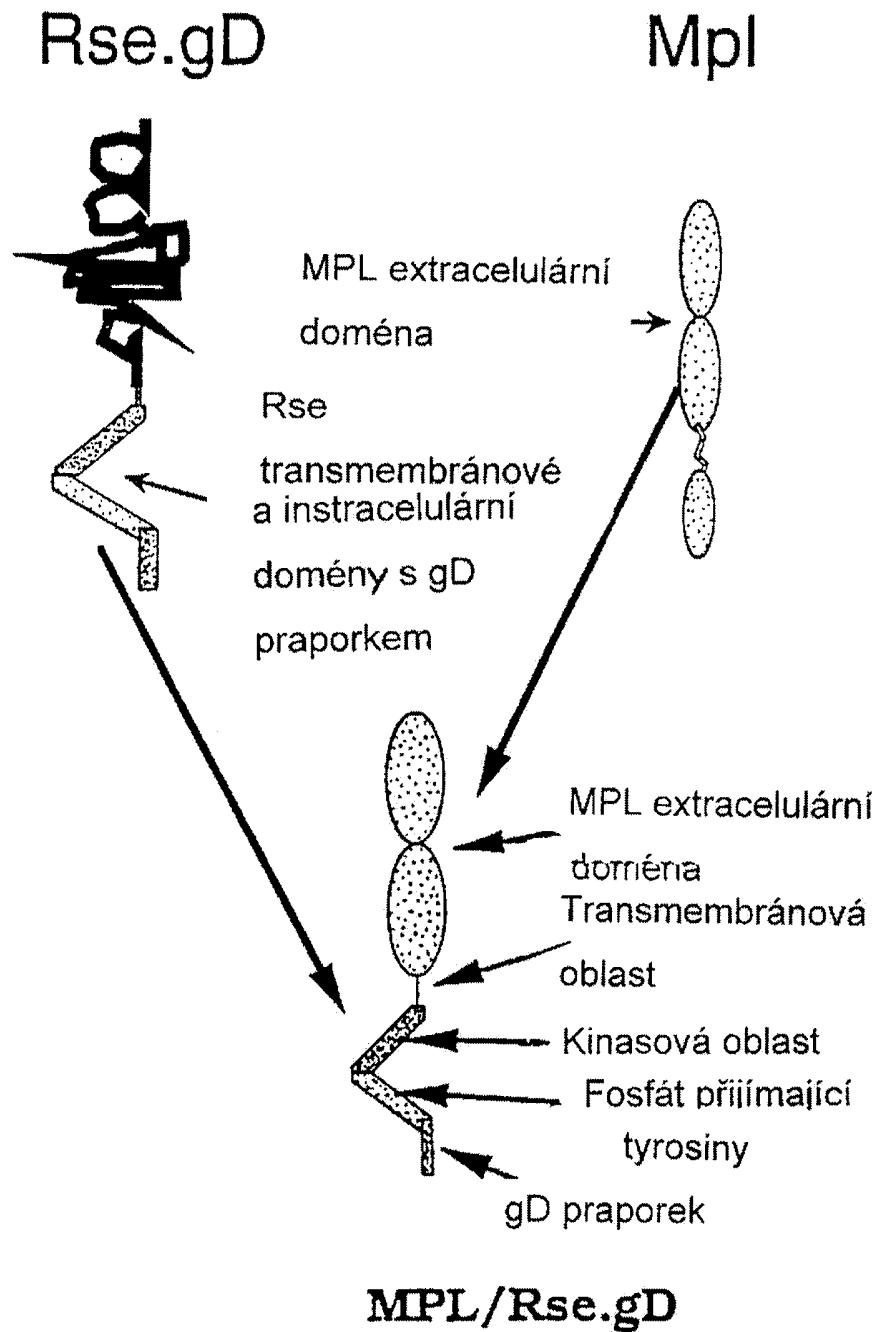
Obr. 28



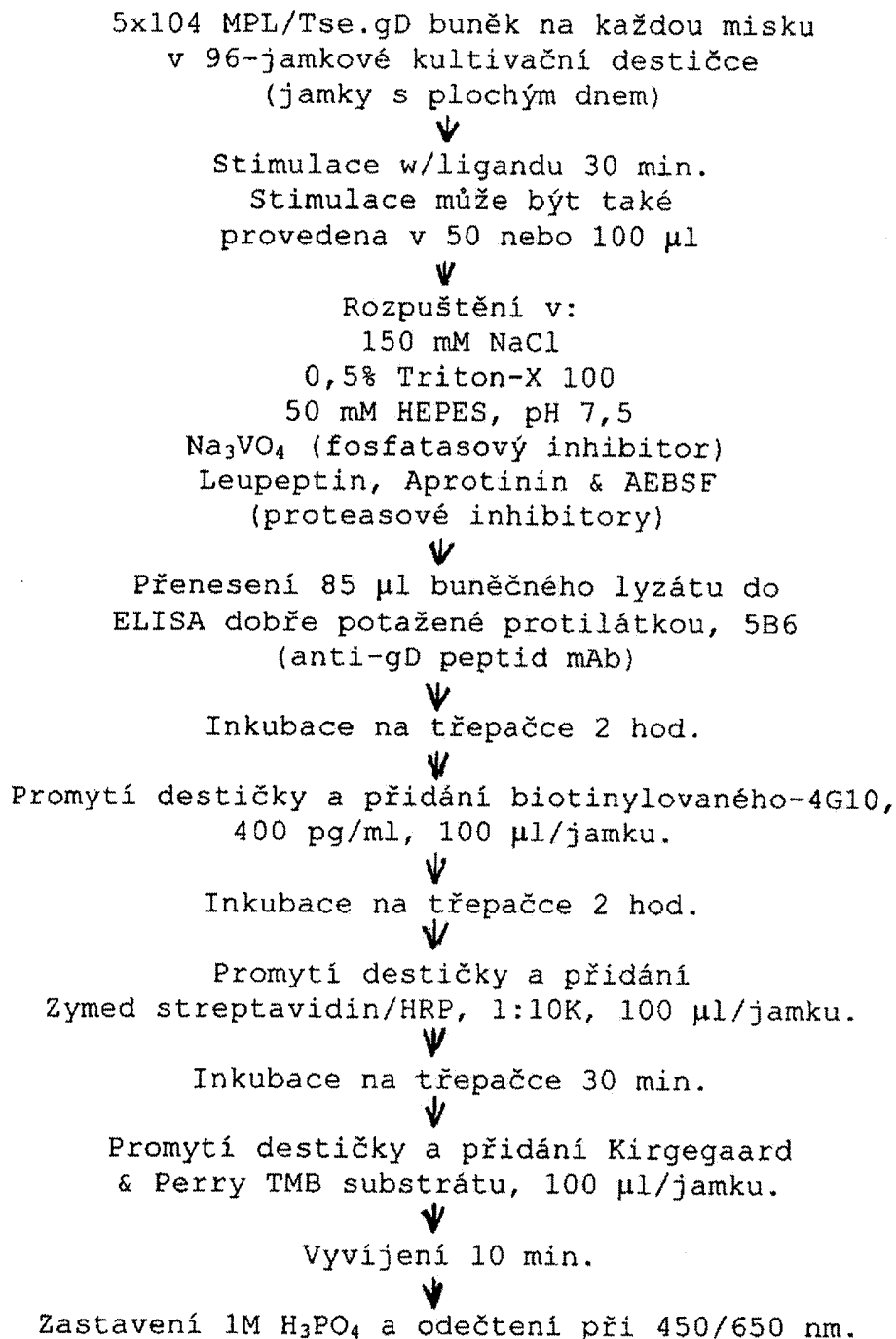
Obr. 29



Obr.30A



Obr. 30B



Obr. 31

```

aluI
sstI
sacI
hgiJII
hgiAI/aspHI
ec1136II
bsp1286
bsiHKAI
bmyI
baniI
    taqI
1  TTCGAGCTCG CCCGACATTG ATTATTGACT AGAGTCGATC GACAGCTGTG GAATGTGTGT CAGTTAGGGT
   AAGCTCGAGC GGGCTGTAAC TAATAACTGA TCTCAGCTAG CTGTCGACAC CTTACACACA GTC AATCCCA

                                   aluI
                                   sau3AI pvuII
                                   mboI/ndeII{dam-}
                                   dpnI{dam+}
                                   pvuI/bspCI
                                   pleI dpnII{dam-}
                                   hinfI taqI{dam-}
                                   rmaI mcrI nspBII
                                   maeI taqI{dam-}

nlaIV
scrFI
mvaI
ecorII
dsaV
bstNI
apyI{dcm+}
bsaJI

                                   nlaIII
                                   sphI
                                   nspI
                                   nspHI

                                   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 GGTCGTCGGT CTTCATACGT TTCGTACGTA GAGTTAATCA GTCGTTGGTC

```

Obr. 32A

```

nlaIV
scrFI          nlaIV          sfaNI          ppulOI
              mvaI          nsiI/avaIII   nspI
              ecorII         nlaIII        sphI
              dsav          bstNI         apyI{dcm+}   nspHI
              [dcm+]       bsaJI
141 GTGTGAAAG TCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC
CACACCTTC AGGGTCCGA GGGGTCGTCC GTCTTCATAC GTTTCGTACG TAGAGTTAAT CAGTCGTTGG
              aciI
211 ATAGTCCCGC CCCTAACTCC GCCCATCCCG CCCCTAACTC CGCCCAGTTC CGCCCATTCT CCGCCCCCATG
TATCAGGGCG GGGATTGAG CGGGTAGGC GGGGATTGAG GCGGGTCAAG GCGGGTAAGA GCGGGGGTAC
              fnu4HI
              bgli
              sfiI
              haeIII/palI
              mnlI mnlI ddeI
              haeIII/palI bsaJI mnlI aluI
              mnlI bsaJI aciI haeIII/palI
281 GCTGACTAAT TTTTTTATT TATGCAGAGG CCGAGGCCCG CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG
CGACTGATTA AAAAAAATAA ATACGTCTCC GGCTCCGGCG GAGCCGGAGA CTCGATAAGG TCTTCATCAC
              mnlI

```

Obr.32B

```

rmaI
styI
bsaJI
blnI
avrII
haeIII/palI
stuI
haeI
mnlI maeI
alul
rmaI
maeI
nheI
aluI
hpaII
haeIII/palI
mcri
eagI/xmaIII/ecIXI
eaeI
cfri
mspi
hpaII
351 AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG CAAAAGCTA GCTTATCCGG
TCCTCCGAAA AAACCTCCGG ATCCGAAAAC GTTTTTCGAT CGAATAGGCC

tfiI
hinFI
aciI
thaI
fnuIII/mvni
bstUI
bsh1236I
401 CCGGAACGG TGCATTGGAA CGGGATTCC CCGTGCCCAAG AGTGACGTAA GTACCCGCTA TAGAGCGATA
GGCCCTTGCC ACGTAACCTT GCGCCTAAGG GGCACGGTTC TCACCTGCATT CATGGCGGAT ATCTCGCTAT
^splice donor

fnu4HI
bbvI
nspBII
aciI
nlaIII taqI
sfanI
mnlI
471 AGAGGATTTT ATCCCGCTG CCATCATGGT TCGACCATTG AACTGCATCG TCGCCGCTGC CCAAATATG
TCTCCTAAAA TAGGGGGGAC GGTAGTACCA AGCTGGTAAC TTGACGTAGC AGCGGCACAG GGTTTTATAC
DHFRTAG^

pfIMI
bslI

```

Obr. 32C


```

sstI
sacI
hgiJII
hgiAI/aspHI
ec1136II
bsp1286
bsiHKAI
bmyI
banII
aluI
bstXI
751 GGAGCTCATT TTCTTGCCAA AAGTTTGGAT GATGCCCTTAA GACTTATTGA ACAACCGGAA TTGGCAAGTA
CCTCGAGTAA AAGAACGGTT TTCAAACCTA CTACGGAATT CTGAATAACT TGTTGGCCTT AACCGTTCAT

          foki sfaNI mseI
          afIII/bfrI
          mspl
          hpaII
          bsaWI

          bstNI nlaIII mnlI
          apyI|dcm+| hinfi apyI|dcm+|
          dsav tfiI dsav
          bstNI nlaIII
          scrFI
          mvaI
          ecorII
          dsav tfiI dsav
          bstNI nlaIII
          apyI|dcm+| hinfi apyI|dcm+|
          CCAGGAAGCC ATGAATCAAC CAGGCCACCT
          GATCCTCCGT CAAGACAAAT
          GGTCCCTCCG TACTTAGTIG GTCCGGTGA

          haeIII/palI
          haeI
          scrFI
          mvaI
          ecorII
          dsav tfiI dsav
          bstNI nlaIII
          apyI|dcm+| hinfi apyI|dcm+|
          CCAGGAAGCC ATGAATCAAC CAGGCCACCT
          GATCCTCCGT CAAGACAAAT
          GGTCCCTCCG TACTTAGTIG GTCCGGTGA
    
```

Obr. 32E

nlaIII
 sau3AI
 mboI/ndeII(dam-)
 dpnI(dam+)
 dpnII(dam-)
 pleI
 hinfI
 maeIII
 alwI(dam-)
 apoI
 maeIII
 afIII
 maeII
 891 TAGACTCTTT GTGACAAGGA TCATGCAGGA ATTTGAAAGT GACACGTTT TCCAGAAAT TGATTTGGGG
 ATCTGAGAAA CACTGTTCCCT AGTACGTCCT TAAACTTTCA CTGTGCAAAA AGGTCCTTA ACTAAACCCC

hgaI
 hinfI/acyI
 ahaII/bsaHI
 scrFI
 mvaI
 mnlI
 ecorII
 dsav
 bstNI
 econI
 apyI(dcm+)
 mnlI
 mnlI
 bsaJI
 bslI
 ddeI
 961 AAATATAAAC CTCTCCAGA ATACCCAGGC GTCCTCTCTG
 TTTATATTG GAGAGGTCT TATGGGTCCG CAGGAGAGAC

Obr. 32F

```

scrFI
mvaI
ecorII
dsaV
bstNI
apyI(dcm+)
sau96I
avaII
asuI  mnlI      sfaNI      accI      mboII
1001 AGGTCAGGA  GGAAAAGGC  ATCAAGTATA  AGTTGAAGT  CTACGAGAAG  AAAGACTAAC  AGGAAGATGC
TCCAGGTCCT  CCTTTTCCG  TAGTTCATAT  TCAAACTTCA  GATGCTCTTC  TTTCTGATTG  TCCTTCTACG
^END DHR

nlaIII
styI
ncol
dsaI
ppu10I
mnlI      aluI  nsiI/avaIII  bsaJI
1071 TTTCAAGTTC  TCTGCTCCCC  TCCTAAAGCT  ATGCATTTT  ATAAGACCAT  GGGACTTTTG
AAAGTTCAAG  AGACGAGGGG  AGGATTTTCCA  TACGTAAAAA  TATTCTGGTA  CCCTGAAAAC

```

Obr. 32G

```

styI
bsaJI
sau3AI
mboI/ndeII [dam-]
dpnI [dam+]
dpnII [dam-]
alwI [dam-]
bstYI/xhoII
fnu4HI
aciI
thaI
fnuDII/mvni tru9I
bstUI mseI
bsh1236I aseI/asnI/vspI
1131 CTGGCTTTAG ATCCCCTTGG CTTGGTTAGA ACGCGGCTAC AATTAATACA TAACCTTATG TATCATAACAC
GACCGAAATC TAGGGGAACC GAAGCAATCT TGCGCCGATG TTAATTATGT ATTGGAATAC ATAGTATGTC

```

```

sau96I
avaII
asuI
scrEI
mvaI
ecorII
dsaV
bstNI
apyI [dcm+]
maeIII
hphI scfI foki
bslI bsaJI
1201 ATACGATTTA GGTGACACTA TAGATAACAT CCACTTTGCC TTCTCTCCA CAGGTGTCCA CTCCCAGGTC
TATGCTAAAT CCACTGTGAT ATCTATTGTA GGTGAACCGG AAAGAGAGGT GTCCACAGGT GAGGGTCCAG

```

Obr. 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
taqI rmaI bamHI bsaJI
sali maeI alwI[dam-]
hincII/hindII alwI[dam-]
accI xbaI mnlI bsaJI
GTCGACTCTA GAGGATCCCC
CAGCTGAGAT CTCCTAGGGG

scfI
aluI pstI
hindIII bspMI
mnlI bsaJI ddeI bsgI
1271 CAACTGCACC TCGGTTCTAA GCTTCTGCAG
GTTGACGTGG AGCCAAGATT CGAAGACGTC

```

Obr. 32I

```

sau96I
    acII haeIII/palI
    fnu4HI asuI
    bgII nlaIII
    sfiI styI
    eaeI ncoI
    cfri dsai
    ecorI taqI haeIII/palI
    apoI clai/bsp106 bsaJI
    1321 GGGGAATTCA ATCGATGGCC GCCATGGCCC AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA
        CCCCTTAAGT TAGCTACCGG CGGTACCGG TTGAACAAT AACGTCGAAT ATTACCAATG TTTATTTTCGT
        ^sv40 early poly A
    maeIII

    apoI apoI
    sfaNI apoI
    1391 ATAGCATCAC AAATTTTACA AATAAAGCAT TTTTTCACCT GCATTCCTAGT TGTGGTTTGT CCAAACTCAT
        TATCGTAGTG TTTAAGTGT TTATTTTCGTA AAAAAAGTGA CGTAAGATCA ACACCAAACA GGTTTGAGTA
    rmaI
    bsmI maeI

```

Obr. 32J

```

sau3AI
mboI/ndeII(dam-)
dpnI(dam+)
dpnII(dam-)
pvuI/bspCI
mcrI
taqI(dam-) tru9I
clai/bsp106(dam-)
sau3AI mseI
mboI/ndeII(dam-)
dpnI(dam+) xmnI
dpnII(dam-) aseI/asnI/vspi
nlaIII alwI(dam-) asp700
1461 CAATGTATCT TATCATGTCT GGATCGATCG GGAATTAATT
GTTACATAGA ATAGTACAGA CCTAGCTAGC CCTTAATTAA
sv40 origin^

```

```

haeIII/palI
haeI
styI
fnu4HI ncoI
bbvI dsai
hinPI bsaJI
hhaI/cfoI nlaIII mnlI
1501 CGGCGCAGCA CCATGGCCTG AAATAACCTC TGAAGAGGA ACTTGGTTAG GFACCTTCTG AGGCGGAAAG
GCCGCGTCGT GGTACCGGAC TTTATTGGAG ACTTTCCTCT TGAACCAATC CATGGAAGAC TCCGCCTTTC
rsal
csp6I
nlaIV
kpnI
hgiCI
bani
asp718 mnlI
acc65I ddeI aciI

```

Obr. 32K

Obr. 32L

```

                    nlaIV
scrFI
mvaI
ecorII
dsaV
bstNI
apyI{dcm+}
bsaJI
                    nlaIV
1571 AACCAAGCTGT GGAATGTGTG TCAGTTAGG TGTTGAAAGT CCCAGGGTC CCCAGCAGGC AGAAGTATGC
TTGGTCGACA CCTTACACAC AGTCAATCCC ACACCTTTCA GGGTCCGAG GGGTCGTCCG TCTTCATACG

```

```

                    nlaIV
sfaNI
ppu10I
nsiI/avaIII
nlaIII
sphI
nspI
nspHI
                    scrFI
                    mvaI
                    mvaI
                    ecorII
                    dsaV
                    bstNI
                    apyI{dcm+}
                    sexAI
                    scrFI
                    ecorII
                    dsaV
                    bstNI
                    apyI{dcm+}
                    bsaJI
                    nlaIV
1641 AAAGCATGCA TCTCAATTAG TCAGCAACCA GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC TCCCAGCAG GCAGAAGTAT
TTTCGTACGT AGAGTTAATC AGTCGTTGGT CCACACCTTT CAGGGGTCCG AGGGGTCTGC CGTCTTCATA

```

```

sfaNI
ppu10I
nsiI/avaIII
nlaIII
sphI
nspI
nspHI
                    acil
                    acil
                    foki
                    acil
1711 GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CATAGTCCCG CCCCTAATC CGCCCATCCC GCCCTAACT
CGTTTCGTAC GTAGAGTTAA TCAGTCGTTG GTATCAGGGC GGGGATTGAG GCGGGTAGGG CCGGGATTGA

```

nlaIII

styI

ncOI

bslI dsal

aciI bsaJI

bsrI

asiI aciI

1781 CCGCCAGTT CCGCCATTCC TCCGCCCCAT GGCTGACTAA TTTTTTTTAT TTATGCAGAG mnlI
GGCGGTCAA GCGGGTAAG AGCGGGTA CCGACTGATT AAAAAAATA AATACGTCTC

styI

bsaJI

blnI

avrII

haeIII/palI

fnu4HI

bglI

sfiI

haeIII/palI

mnlI mnlI ddeI

haeIII/palI bsaJI mnlI aluI

bsaJI aciI haeIII/palI

mnlI

haeI

1841 GCCGAGGCC CCTCGCCTC TGAGCTATTC CAGAAGTAGT GAGGAGGCTT TTTTGGAGGC mnlI

CGGCTCCGGC GGAGCCGGAG ACTCGATAAG GTCTTCATCA CTCCTCCGAA AAAACCTCCG

Obr. 32M

```

          aciI      hinPI      haeIII/palI      hhaI/cfoI
          mcrI      eagI/xmaIII/ecI XI      fnuDII/mvni      thal
          taqI      eaeI      xhoI      notI      hinPI      bstUI      bspMI
          paeR7I      cfri      fnu4HI      tru9I      pacI      msei      tru9I      bsh1236I      mseI      scfI
          avai      fnu4HI      mnlI      aciI      msei      tru9I      bsh1236I      mseI      ahaIII/draI      pstI
          aluI      maeIII      bsrBI      fnu4HI      maeI      msei      tru9I      bsh1236I      mseI      sse8387I
          CTAGGCTTTT      GCAAAAAGCT      GTTACCTCGA      GCGCCGCTT      AATTAGCGC      CGCCATTAA      ATCCTGCAGG
          GATCCGAAA      CGTTTTTCGA      CAATGGAGCT      CGCCGGCGAA      TTAATTCCGC      GCGGTAATT      TAGGACGTCC
rmaI
maeI
1901
          ^start pUC118

```

^linearization linker inserted into HpaI site

```

          scrFI      mvaI      ecorII      dsav      bstNI
          maeIII      aluI      bsrI      maeIII      bsri      maeIII      bsri      maeIII      mseI
          haeIII/palI      eaeI      cfri
          maIII      aluI      bsrI      maeIII      bsri      maeIII      bsri      maeIII      mseI
          1971      TAAcAGCTTG      GcACTGgCCG      TCGTTTTACA      AcGTcGTgAc      TGGAAAcC      CTGGCGTTAc      CCAACTTAAT
          ATTGTCGAAC      CGTGACCCGC      AGCAAATGT      TGCAGCACTG      ACCCTTTGG      GACCCCAATG      GGTTGAATTA

```

Obr. 32N

sau3AI
 sau96I mboI/ndeII[dam-]
 haeIII/palI
 asuI dpnI[dam+]
 mnlI dpnII[dam-]
 mboII aciI pvuI/bspCI
 earI/ksp632I mcrI
 fnu4HI
 bbvI foki
 aluI
 pvuII
 nspBII
 2041 CGCCTTGCAG CACATCCCCC CTTCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCCGAT
 GCGGAACGTC GTGTAGGGGG GAAGCGGTCTG ACCGCATTAT CGCTTCTCCG GCGGTGGCTA

hinPI
 hhaI/cfoI
 nlaIV
 narI
 kasi
 hinII/acyI
 hgiCI
 haeII aciI
 bani sfaNI
 ahaII/bsaHI
 bgII
 2101 CGCCCTTCCC AACAGTTGG TAGCCTGAAT GGCGAATGG CCCTGATGG GTATTTTCTC CTTACGCATC
 GCGGGAAGGG TTGTCAACGC ATCGGACTTA CCGCTTACCG CGGACTACCG CATAAAGAG GAATGCGTAG

Obr. 320

hinPI
 thai
 fnuDII/mvni
 bstUI scfI
 bsh1236I
 rsal hhai/cfoI fnu4HI
 csp6I bsII aciI
 2171 TGTCGGTAT TTCACACCGC ATACGTCAA GCAACCATAG TACGGCCCT GTAGCGGCGC
 ACACGCCATA AAGTGTGGCG TATGCAGTTT CGTTGTATC ATGCGGGGA CATCGCCGCG
 aciI
 fnu4HI
 thai
 fnuDII/mvni
 bctUI
 hinPI aciI
 hhai/cfoI
 tru9I aciI
 mseI bsh1236I
 2231 ATTAAGCGG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
 TAATTGCGC CGCCACACC ACCAATGCGC GTCGCACTGG CGATGTGAAC GGTCGGGGA TCGCGGGCGA
 aciI
 maeIII bbvI maeIII
 bsh1236I
 bstUI
 fnuDII/mvni
 thai
 hhai/cfoI
 hinPI
 hhai/cfoI
 rmaI
 hinPI haeII
 hhai/cfoI bsrBI
 haeII maeI aciI
 CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
 GGTCGGGGA TCGCGGGCGA

fnu4HI
 hinPI
 hhai/cfoI
 hinPI
 hhai/cfoI
 rmaI
 hinPI haeII
 hhai/cfoI bsrBI
 haeII maeI aciI
 CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
 GGTCGGGGA TCGCGGGCGA

mspI
 hpaII
 naeI
 maeII cfr10I
 mboII
 2301 CCTTTCGCTT TCCTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTCCCGG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC
 GGAAAGCGAA AGAAGGGAAG GAAAGAGCGG TGCAAGCGGC CGAAAGGGGC AGTTCGAGAT TTAGCCCCCG
 nlaIV
 hgiJII
 bsp1286
 bmyI
 banII
 aluI

Obr. 32P

```

                mnlI
                nlaIV
                hgiCI
                bani   taqI
                nlaIV   hphI
2371 TCCCTTAGG GTTCCGATT AGTGCTTAC GGCACCTCGA CCCCAGAAA CTTGATTGG
    AGGAAATCC CAAGGCTAAA TCACGAAATG CCGTGGAGCT GGGGTTTTT GAACTAAACC

                maeII   haeIII/palI
                draIII  sau96I
                bsaAI   asuI
                maeII   haeII pleI
                drdI   hinfI maeII
2401 GTGATGGTTC ACGTAGTGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
    CACTACCAAG TGCATCACCC GGTAGCGGGA CTATCTGCCA AAAAGCGGGA AACTGCAACC TCAGGTGCAA

                tru9I   pleI
                mseI   hinfI
                bslI
                bslI   avai
2501 CTTTAAATAGT GGAATCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC AACCCATATCT CGGGCTATTC TTTTGATTTA
    GAAATTATCA CCTGAGAACA AGGTTTGACC TTGTTGTGAG TTGGGATAGA GCCCCGATAAG AAAACTAAAT

                tru9I
                tru9I   mseI
                haeIII/palI mseI   aluI   mseI   apoI
2571 TAAGGGATTT TGCCGATTTC GGCCTATTGG TTAATAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT
    ATTCCCTAAA ACGGCTAAAG CCGGATAACC AATTTTTTAC TCGACTAAAT TGTTTTTAAA

```

Obr. 32Q


```

scrFI          scrFI
nciI           nciI
mspI           mspI
hpaII          hpaII
dsav           dsav
                nspi
                nspHI
                fnu4HI
                bsmAI
                bslI
                cauII
                aluI
                nlaIII
                mnlI
                hphI
                hphI
2831 ACCGTCCTCCG GGAGCTGCAT GTGTCAGAGG TTTTCACCGT CATCACCGAA ACGCGCGAGG CAGTATTCIT
TGGCAGAGGC CCTCGACGTA CACAGTCTCC AAAAGTGGCA GTAGTGGCTT TGCGCGCTCC GTCATAAGAA

```

```

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
hhaI/cfoI
thai mnlI
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I

```

```

mnlI
haeIII/palI
sau96I
asuI
eco0109I/draII
2901 GAAGACGAAA GGCCTCGTG ATACGCCATAT TTTTATAGGT TAATGTCATG
CTTCTGCTTT CCCGGAGCAC TATGCGGATA AAAATATCCA ATTACAGTAC

```

```

nlaIII
tru9I
rcaI
mseI
bspHI

```

```

mboII
bpuAI
bbsI
2951 ATAATAATGG TTTCTTAGAC GTCAGGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTGGC
TATTATTACC AAAGAATCTG CAGTCCACCG TGAAAAGCCC CTTTACACGC

```

```

aciI
thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
hhaI/cfoI

```

```

hinII/acyI
ahaII/bsaHI
aatII
ddeI
maeII

```

Obr. 32S

```

nlaIV          bsmAI
                rcaI
                bsrBI nlaIII
                aciI bspHI
3001 CGGAACCCCT ATTTGTTTAT TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC TCATGAGACA ATAACCCCTGA
GCCTTGGGGA TAAACAAATA AAAAGATTTA TGTAAGTTTA TACATAGCGG AGTACTCTGT TATTGGGACT

                mboII
                earI/ksp632I
                sspI
3071 TAAATGCTTC AATAATATG AAAAAGGAAG AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTGCGC CTTATTCCCCT
ATTTACGAAG TTATTATAAC TTTTTCCTTC TCATACTCAT AAGTTGTAAA GGCACAGCGG GAATAAGGGA

fnu4HI
aciI          hphI          hphI          sfaNI
3141 TTTTGGCGC ATTTTGCCCTT CCTGTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAG
AAAAACGCCG TAAAACGGAA GGACAAAAC GAGTGGTCT TTGCGACCAC TTTTCATTTTC

                hgiAI/aspHI
                bsp1286
                sau3AI      bsiHKAI
                mboI/ndeII(dam-)
                dpnI(dam+) bmyI
                dpnII(dam-)
                mboII(dam-) apaLI/snoI      taqI          aciI
                eco57I      alw44I/snoI      maeIII      bsrI          nspBII
3201 ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA
TACGACTTCT AGTCAACCCA CGTGCTCACC CAATGTAGCT TGACCTAGAG TTGTCCGCAT

```

Obr. 32I

```

sau3AI
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+]
dpnII[dam-]
alwI[dam-]
bstYI/xhoII
3261 AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTTAAAGTTC
TCTAGGAACT CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTCAAG

          maeII          hgiAI/aspHI
          psp1406I       bsp1286  tru9I
          xmnI          bsiHKAI  mseI
          asp700        bmyI   ahaIII/draI
          mboII

          scrFI
          aciI
          thaI
          fnuDII/mvnI
          bstUI
          bsh1236I
          hinPI
          hhaI/cfoI
          hnlII/acyI
          hgaI cauII
          ahaII/bsaHI
          bcgI  mcrI  fnu4HI
          TCCCGTGATG ACGCCGGGCA AGAGCAACTC GGTCCCGGCA
          ACGTATACACC GCGGATATA TCCCGTATAAT AGGGCACTAC TCGGCCCCGT TCTCGTTGAG CCAGCGGCGT

          rsaI
          csp6I  bsrI
          scaI  hphI  maeIII  sfaNI  foki
          ddeI
          3381 TACACTATTTC TCAGAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCCAGT CACAGAAAAG CATCTTACGG
          ATGTGATAAG AGTCTTACTG AACCAACTCA TGAGTGGTCA GTGTCTTTTC GTAGAATGCC

```

Obr. 32U

haeIII/palI
 eaeI
 cfri
 fnu4HI
 fnu4HI
 bbvI
 nlaIII
 nlaIII
 aciI
 3441 ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCGG CCAACTTACT
 TACCGTACTG TCATTCTCTT AATACGTCAC GACGGTATTG GTACTCACTA TTGTGACGCC GGTTGAATGA

sau96I
 avaiI
 sau3AI asuI
 mboI/ndeII[dam-]
 dpnI[dam+]
 dpnII[dam-]
 pvuI/bspCI
 mcrI mnlI
 3511 TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT TTGCACAACA TGGGGATCA TGTAACCTCGC
 AGACTGTTGC TAGCCTCCTG GCTTCCTCGA TTGGCGAAAA AACGTGTTGT ACCCCCTAGT ACATTGAGCG

mspI
 sau3AI nlaIV
 mboI/ndeII[dam-] aluI
 dpnI[dam+] hpaII
 dpnII[dam-] bsaWI
 3581 CTTGATCGTT GGGAACCGGA GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCAGCAG
 GAACTAGCAA CCCTTGGCCT CGACTTACTT CCGTATGGTT TGCTGCTCGC ACTGTGGTGC TACGGTCGTC

Obr. 32V

```

hinPI          mspI
hhaI/cfoI     hpaII
mstI          scrFI
aviII/fspI    aluI nciI
maeII         rmaI  dsaV
tru9I         maeI  cauII
psp1406I
3651 CAATGGCAAC AACGTTGCGC AACTATATA CTGGCGAACT ACTTACTCTA GCTTCCCAGC
GTTACCGTTG TTGCAACCGG TTTGATAATT GACCGCTTGA TGAATGAGAT CGAAGGGCCG

          bglI
          sau96I
          haeIII/palI
          hinPI asuI mspI
          hhaI/cfoI hpaII

          sau96I
          avaiI
          asuI
          hhaI/cfoI hpaII
          bsmAI aciI fnu4HI
          bsaI bsh1236I bbvI

          mspI          thaI
          hpaII        fnuDII/mvni
          cfr10I       bstUI
          nlaIV hphI   bsmAI aciI fnu4HI
          gsuI/bpmI    bsaI bsh1236I bbvI
3781 CTGGTTTATT GCTGATAAAT CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC
GACCAAATAA CGACTATTTA GACCTCGGCC ACTCGCACCC AGAGCGCCAT AGTAACGTCG

```

Obr. 32W

```

sau96I
asuI
nlaIV
bsrI haeIII/palI      mnII
3841 ACTGGGGCCA GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC
TGACCCCGGT CTACCATTCG GGAGGGCATA GCATCAATAG ATGTGCTGCC CCTCAGTCCG
                                eam1105I
                                pleI
                                hinfI
                                sau3AI
                                nlaIV
                                mboI/ndeII[dam-]
                                dpnI[dam+]
                                dpnII[dam-]
                                hgiCI
                                banI mnII
                                tru9I
                                mseI
3901 AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTG
TTGATACCTA CTTGCCTTAT CTGTCTAGCG ACTCTATCCA CGGAGTGACT AATTTCGTAAC
                                foki
                                tru9I
                                mseI
maeIII
3961 GTAACGTGCA GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT GATTTAAAC TTCATTTTA
CATTGACAGT CTGGTTCAA TGAGTATATA TGAATCTAA CTAATTTTG AAGTAAAT
                                ahaIII/draI
                                mseI
                                mauI
                                sau3AI
                                sau3AI hphI      mboI/ndeII[dam-]
                                mboI/ndeII[dam-]
                                dpnI[dam+]
                                dpnII[dam-]
                                tru9I bstYI/xhoII
                                mseI alwI[dam-]
                                ahaIII/draI maeI mboII[dam-]
                                bstYI/xhoII
                                rcaI
                                bspHI
                                maeII
                                tru9I
                                mseI
4021 ATTTAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCCTTT TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTCG
TAAATTTTCC TAGATCCACT TCTAGGAAAA ACTATTAGAG TACTGGTTTT AGGGAATTGC ACTCAAAGC

```

Obr. 32X

Obr. 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 TAGTTCCCTA GAAGAACTCT AGGAAAAAAA
hgaI
ddeI
thaI
fnuDII/mvnI
bstUI
bsh1236I
hinPI fnu4HI
hhaI/cfoI bbvI
4151 CTGCCCGTAA TCTGCTGCTT GCAAAACAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GTTTGTGTTG
GACGCGCATT AGACGACGAA CGTTTGTTTT TTTGGTGGCG ATGGTCGCCA CCAAACAAAC
sau3AI
mboI/ndeII(dam-)
dpnI(dam+)
dpnII(dam-)
alwI(dam-)
mspI
hpaII aluI
4211 CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTCCG AAGGTAAGT GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAATAACTG
GGCCTAGTTC TCGATGGTTG AGAAAAAGGC TTCCATTGAC CGAAGTCGTC TCGCGTCTAT GGTTTATGAC

```

4281	rmaI maeI	bslI	haeIII/palI haeI	scfI	aciI	mnII
	GTAGCCGTAG	TTAGGCCACC	ACTTCAAGAA	CTCTGTAGCA	CCGCCCTACAT	ACCTCGCTCT
	AGGAAGATCA	CATCGGCATC	AATCCCGTGG	TGAAGTTCTT	GAGACATCGT	GGCGGATGTA
						TGGAGCGAGA
4351	maeIII	alwNI	fnu4HI bbvI	bsrI	scfI nciI mspI hpaII	pleI cauII hinfi
	GCTAATCCTG	TTACCAGTGG	CTGCTGCCAG	TGGCGATAAG	TCGTGTCTTA	CCGGGTTGGA
	CGATTAGGAC	AATGGTCACC	GACCACGGTC	ACCGCTATTC	AGCACAGAAT	GGCCCAACCT
						GAGTTCTGCT
4421	mspI hpaII bsaWI maeIII	nspBII fnu4HI bbvI	mcrI	hinPI aciI hhaI/cfoI	hgiAI/aspHI bsp1286 bsiHKAI bmyI apaLI/snoI alw44I/snoI	alul
	TAGTTACCGG	ATAAGCGGCA	GCGGTCGGGC	TGAACGGGGG	GTTTCGTGCAC	ACAGCCCAGC
	ATCAATGGCC	TATTCCGGGT	CGCCAGCCCG	ACTTGCCCCC	CAAGCACGTG	TGTCGGGTGCG
						AACCTCGCTT
4491	ddeI	scfI	scfI	haeII	hinPI hhaI/cfoI	
	CGACCTFACAC	CGAACTGAGA	TACCTACAGC	GTGAGCAFTG	AGAAAGCGCC	ACGCTTCCCCG
	GCTGGATGTG	GCTTGACTCT	ATGGATGTCG	CACTCGTAAC	TCTTTCGCGG	TGCGAAGGGC
						TTCCTCTTTT

Obr. 32Z-1

scrFI
 mvaI
 ecoRII
 dsav
 bstNI
 bsaJI
 mvaI
 ecoRII
 dsav
 bstNI
 bsaJI
 hinPI mnII
 hhaI/cfoI
 aluI apyI[dcM+]
 mspI
 hpaII
 bsII
 bsaWI
 fnu4HI
 aciI
 4561 GCGGACAGG TATCCGTAA GCGGAGGGT CCGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTCC AGGGGAAAC
 CCGCCTGTCC ATAGGCCATT CGCCGTCCCA GCCTTGTCCT CTCGCGTGCT CCCTCGAAGG TCCCCCTTTG

scrFI

dsav
 bstNI
 apyI[dcM+]
 4631 GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTG TGATGCTCGT
 CGGACCATAG AAATATCAGG ACAGCCCAA GCGGTGGAGA CTGAACCTCGC AGCTAAAAC ACTACGAGCA
 mnII drdI hgaI
 taqI
 sfaNI

haeIII/palI

fnu4HI

aciI

thaI bsII

fnuDII/mvni

bstUI

bsh1236I

nlaIV

aciI

4701 CAGGGGGCG GAGCCTATGG AAAAACGCCA GCAACGCGC

GTCCCCCGC CTCGGATACC TTTTTCGGT CGTTGCGCCG

Obf. 32Z-2

haeIII/palI
 scrFI
 mvaI bsII
 ecorII
 dsav
 bstNI
 nlaIII
 nspi
 haeIII/palI nspHI
 haeI aflIII
 nlaIV haeI
 apyI[dcM+] haeIII/palI nspHI
 haeI aflIII
 4741 CTTTTTACC GG TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC CCCTGATTCT
 GAAAATGCC AAGGACCGGA AAACGACCGG AAACGAGTG TACAAGAAAG GACGCAATAG GGGACTAAGA

tfii
hinfi

fnu4HI
bbvI

4811 GTGGATAACC GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATACCG CTCGCCGCGAG CCGAACGACC
 CACCTATTGG CATAATGGCG GAAACTCACT CGACTATGGC GAGCGGCGTC GGCTTGCTGG

bsrBI aciI

aciI fnu4HI mcrI

hinPI
haeII

fnu4HI
bbvI pleI

hinPI hinfi
hhaI/cfoI

sapI hhaI/cfoI
mboII

mnlI

mnlI aciI earI/ksp632I

4871 GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG GAAGAGCGCC CAATACGCAA ACCGCCCTCTC
 CTCGCGTCCG TCAGTCACTC GCTCCTCCG CTTCTCGCGG GTTATGCGTT TGGCGGAGAG

Obr. 32Z-3

```

thai
fnuDII/mvni
bstUI
bsh1236I
hinPI
hhaI/cfoI
thai
fnuDII/mvni
bstUI          tru9I  aluI
bsh1236I haeIII/palI          pvuII
bsII  eaeI  tfII aseI/asnI/vspI
aciI  cfrI  hinFI  mseI  nspBII
4931  CCCGCCGTT  GGCCGATTCA  TTAATCCAGC  TGGCAGCACA  GGTTTCCCGA  CTGGAAAGCG
GGCGCGCAA  CCGGCTAAGT  AATTAGGTCG  ACCGTGCTGT  CCAAAGGGCT  GACCTTTCGC
bsrI  aciI
scrFI
mvaI
ecorII
dsaV
nlaIV  bstNI
hgiCI  apyI[dcm+]
bani  bsaJI
4991  GGAGTGAGC  GCAACGCAAT  TAATGTGAGT  TACCTCACTC  ATTAGGCACC  CCAGGCTTTA  CACTTTATGC
CCGTCACTCG  CGTTGCCGTTA  ATTACACTCA  ATGGAGTGAG  TAATCCGTGG  GTCCGAAAT  GTGAANTACG

```

Obr. 32Z-4

```

mspI          aciI
hpaII         bsrBI
5061 TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTCACACA GAAACAGCT ATGACCATGA
      AAGGCCGAGC ATACAACACA CCTTAACACT CGCCTATTGT TAAAGTGTGT CCTTGTCTGA TACTGGTACT

```

```

      aluI      nlaIII

```

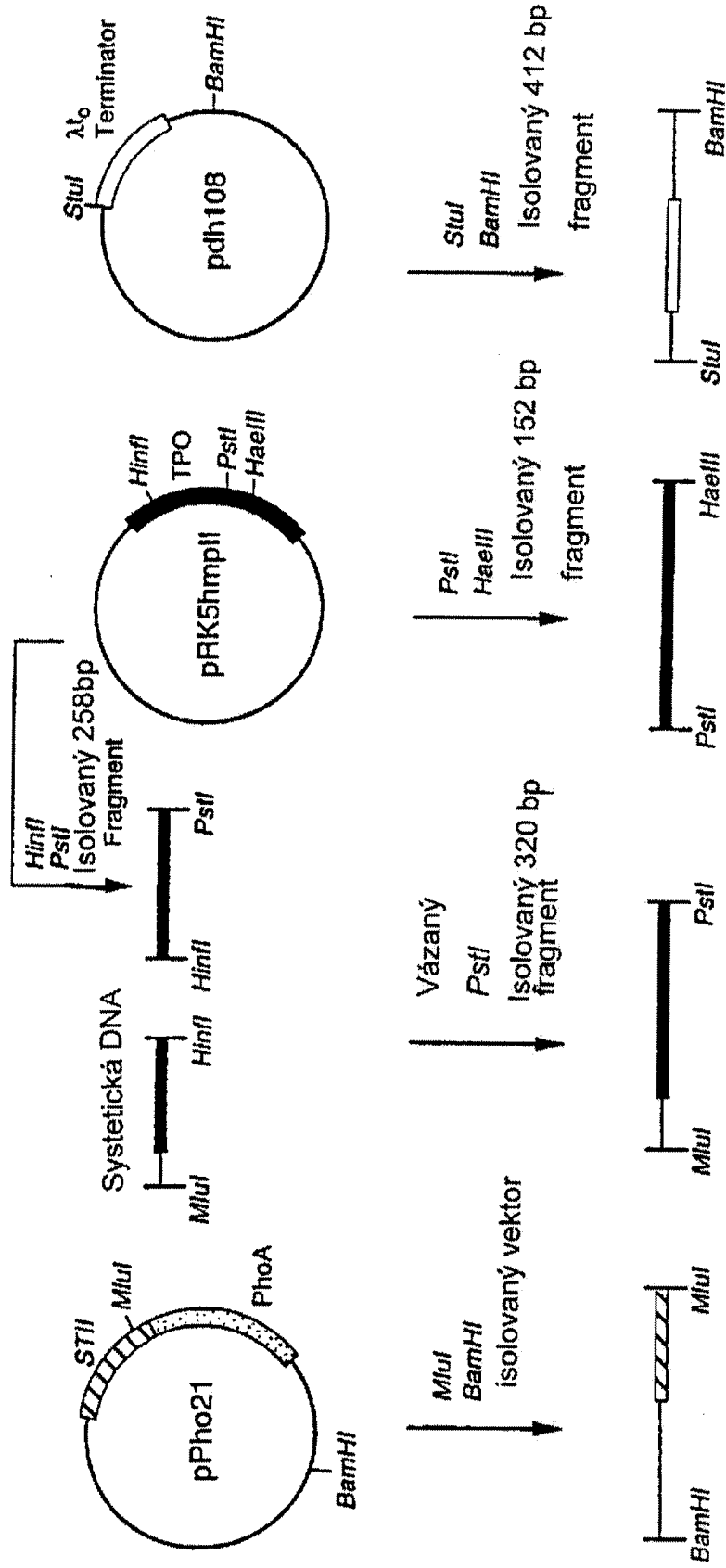
```

tru9I
mseI
aseI/asnI/vspI
xmnI
asp700
5131 TTACGAATTA A
      AATGCTTAAT T

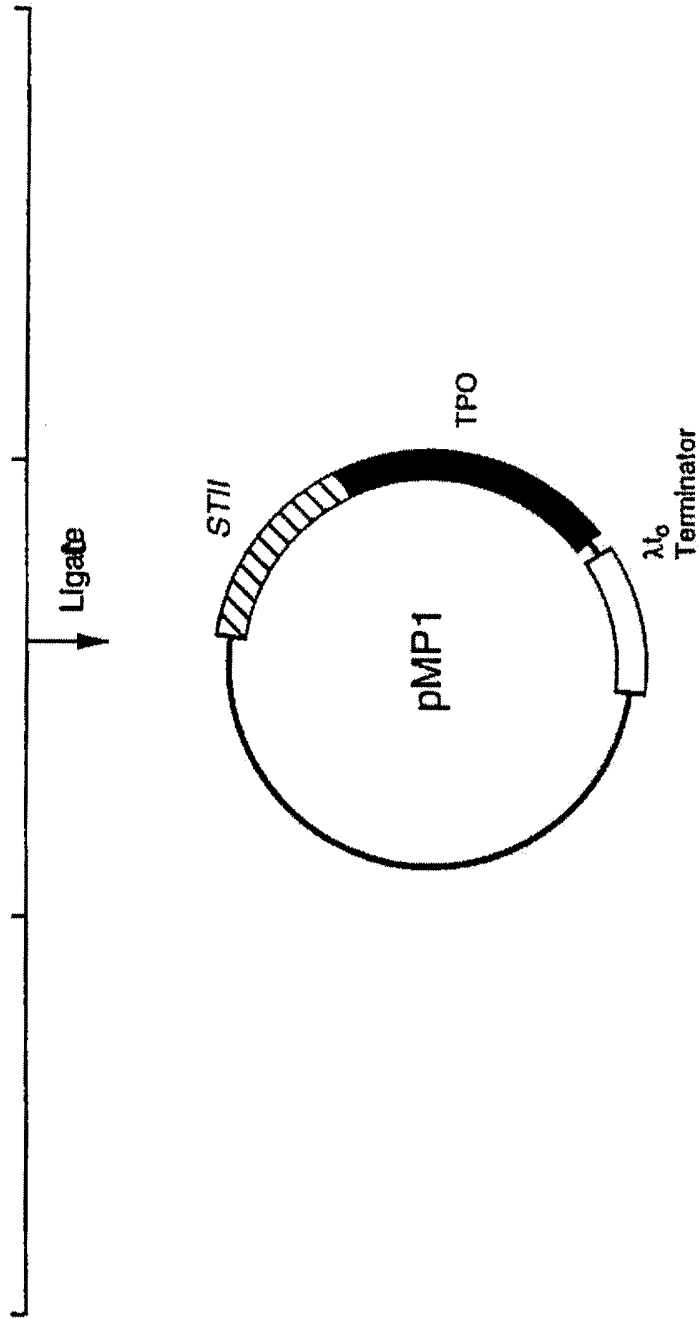
```

Obr. 32Z-5

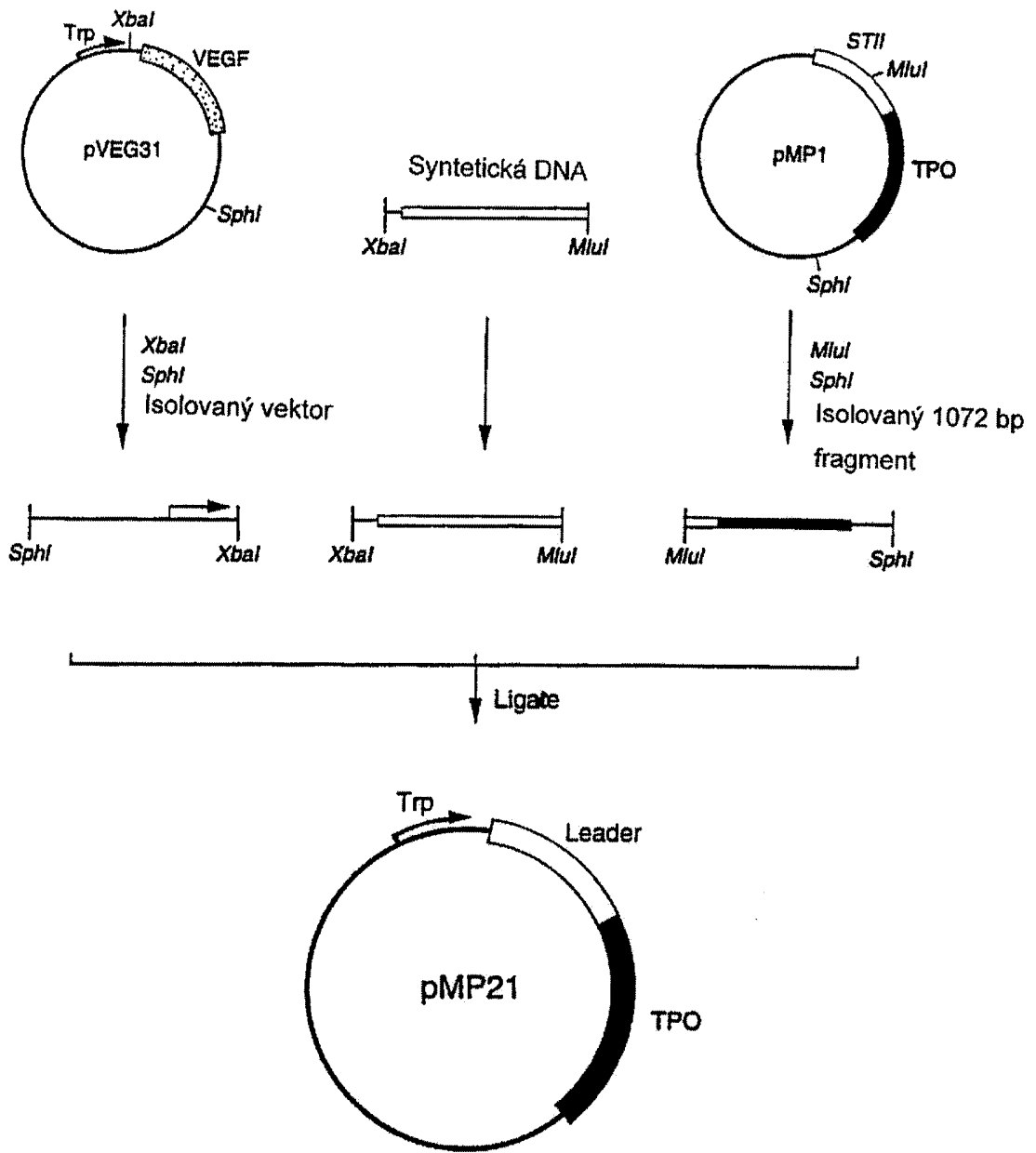
> délka: 5141



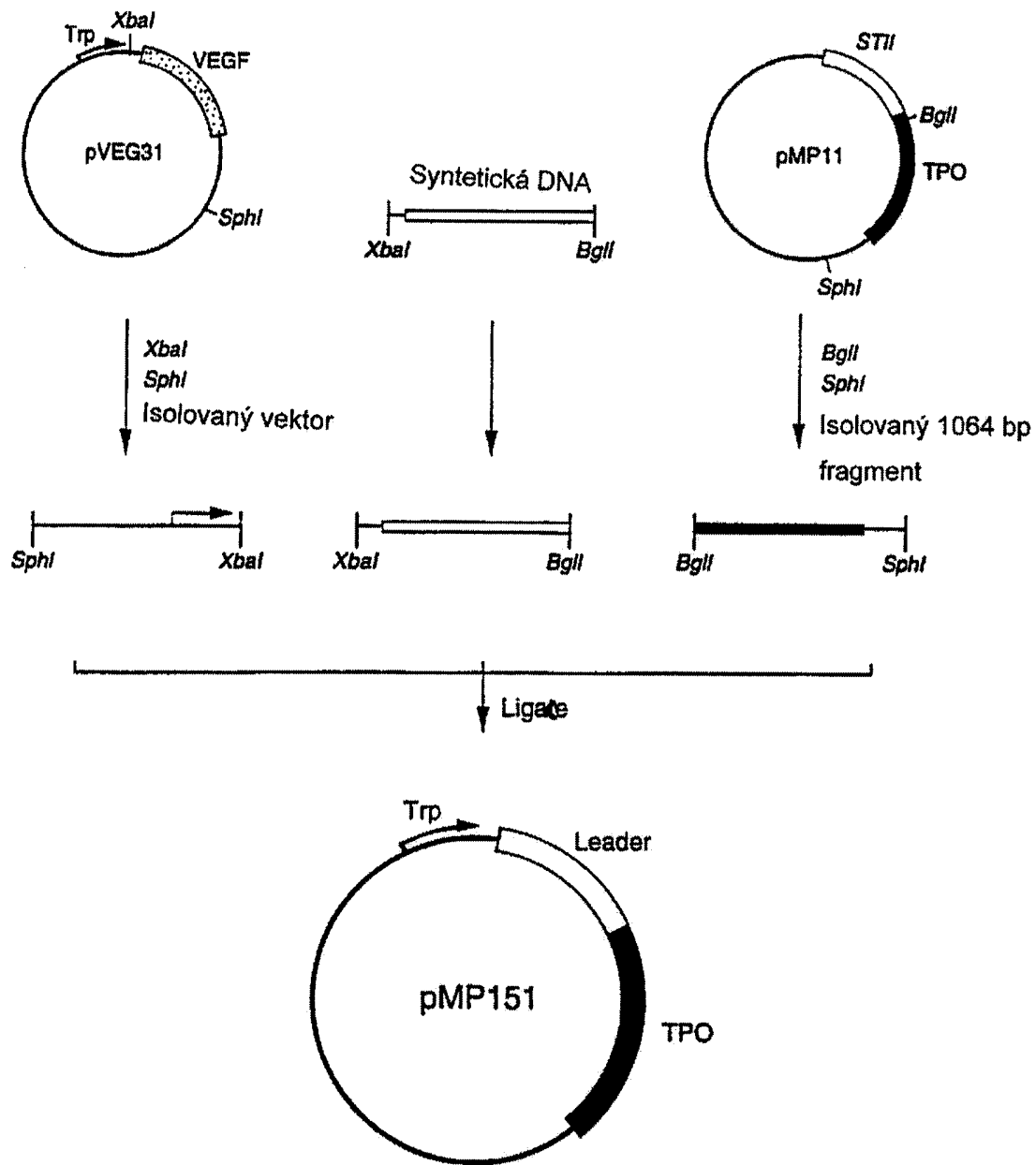
Obr. 33A



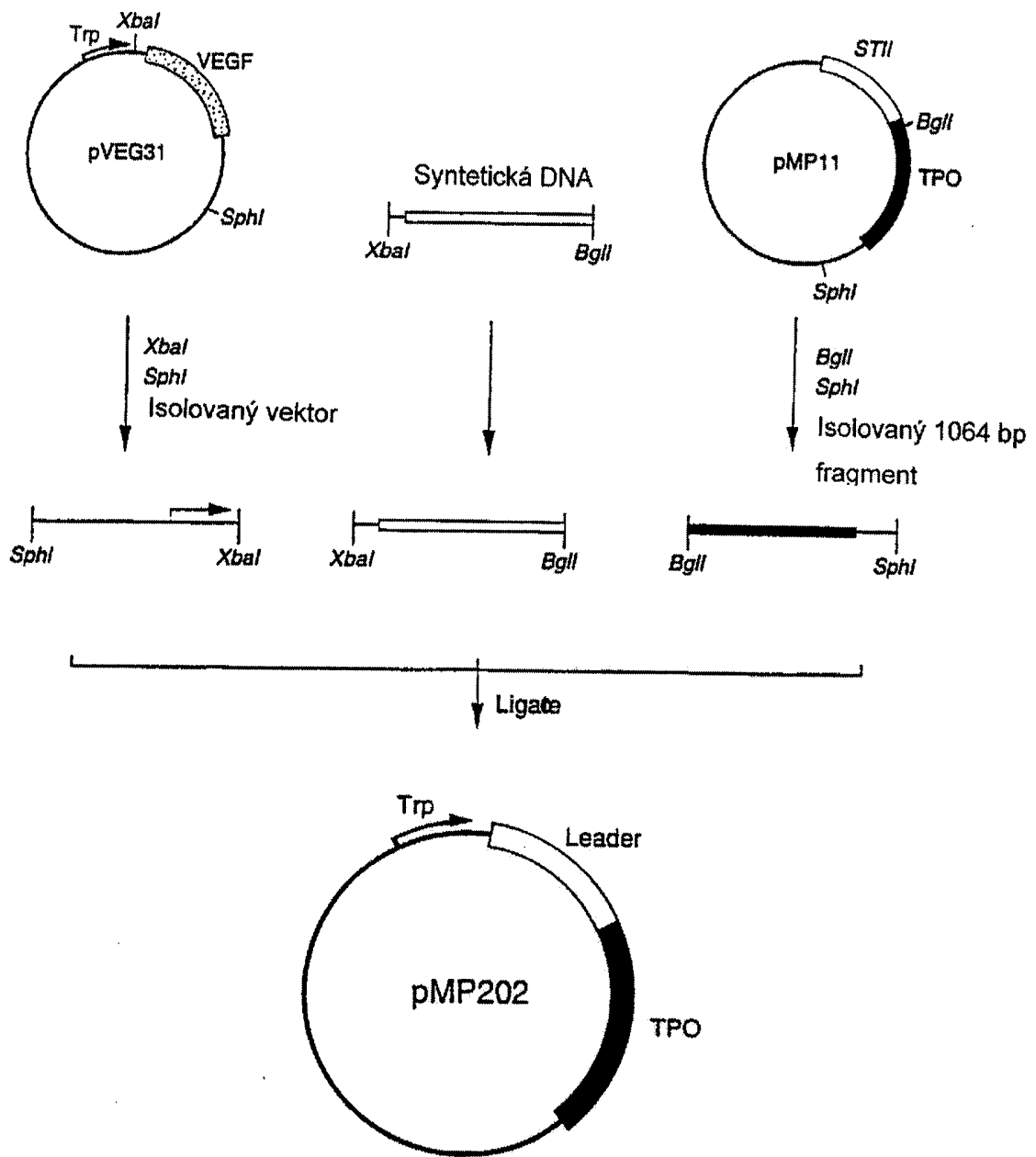
Obr. 33B



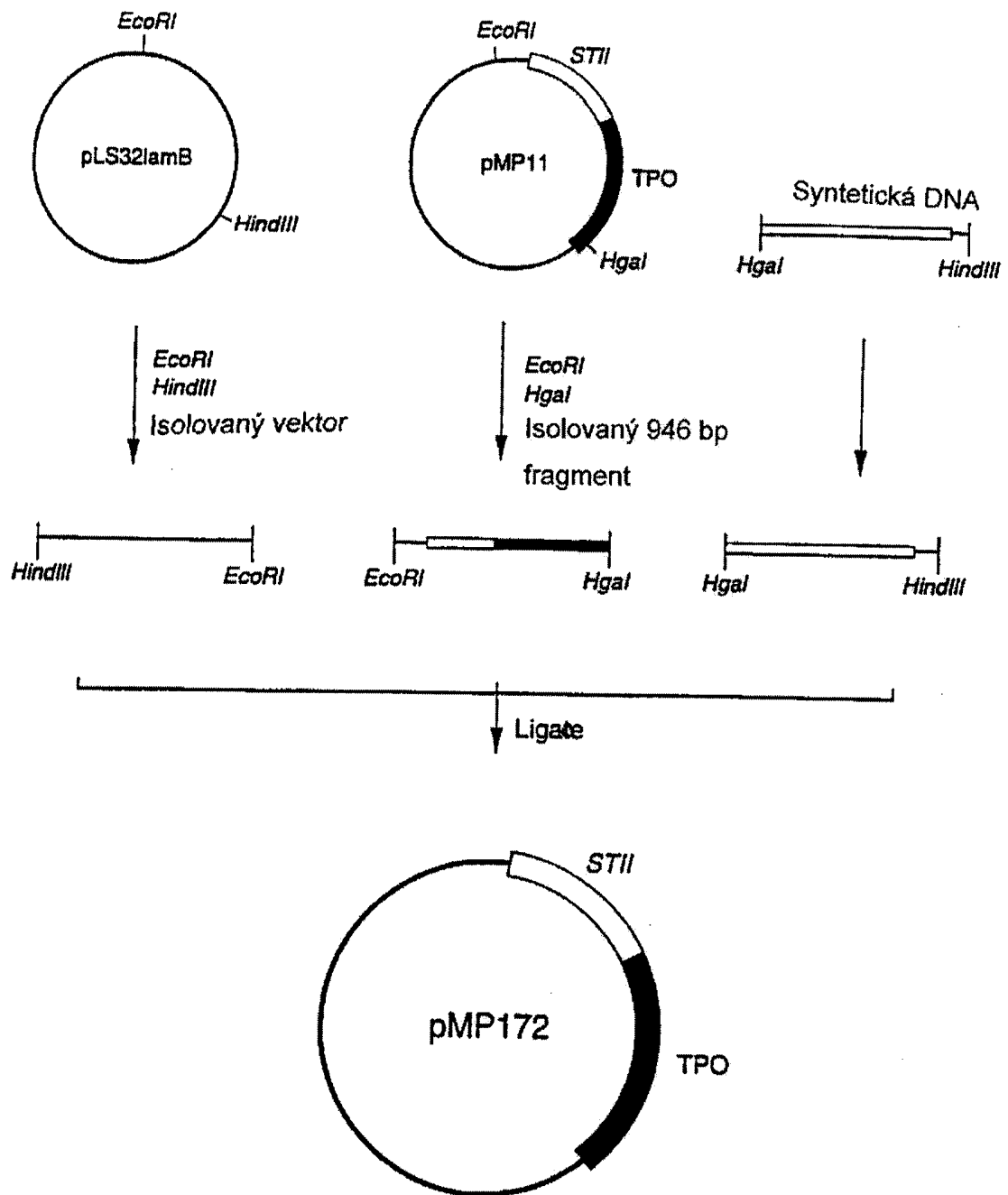
Obr. 34



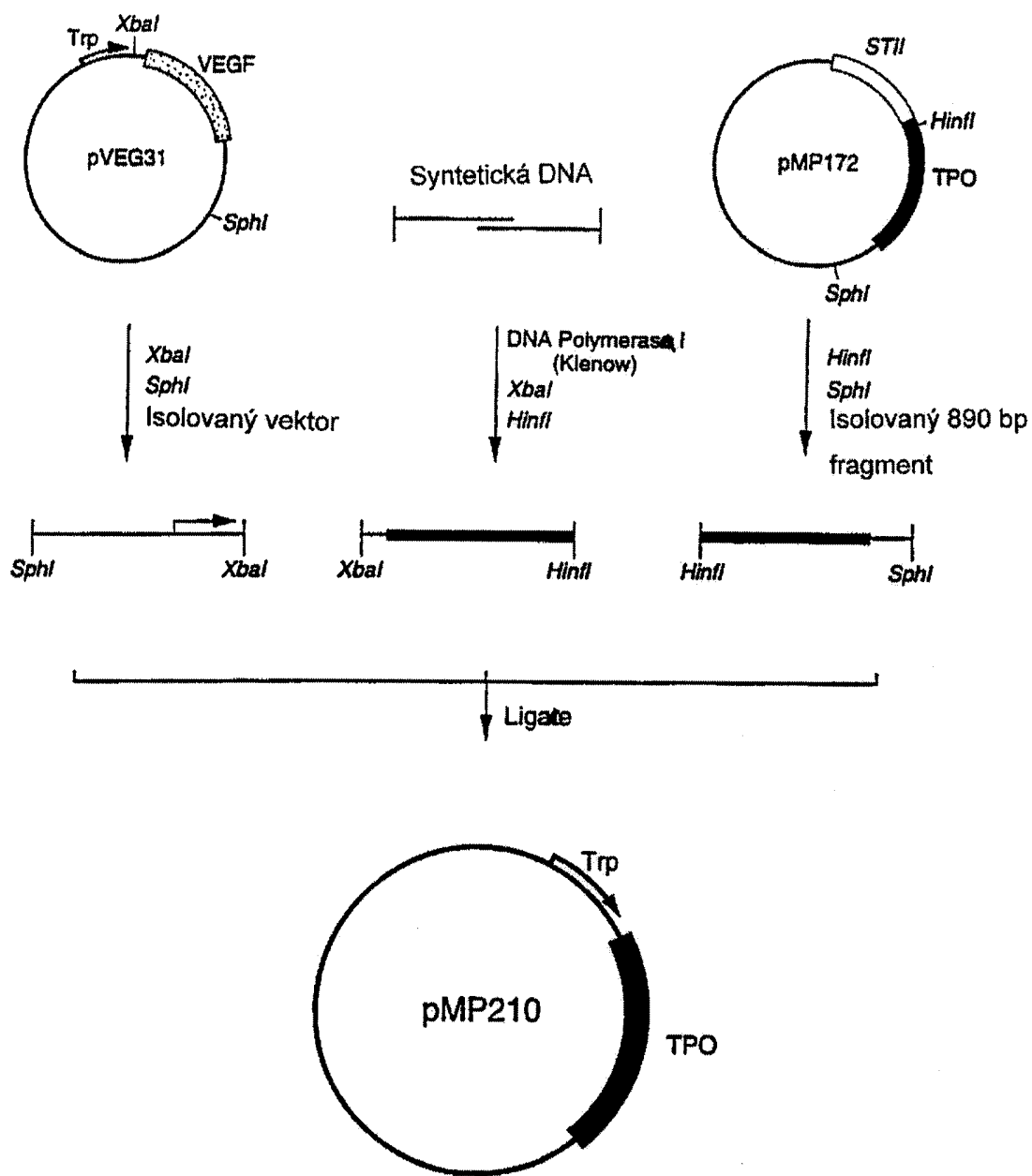
Obr. 35



Obr. 36



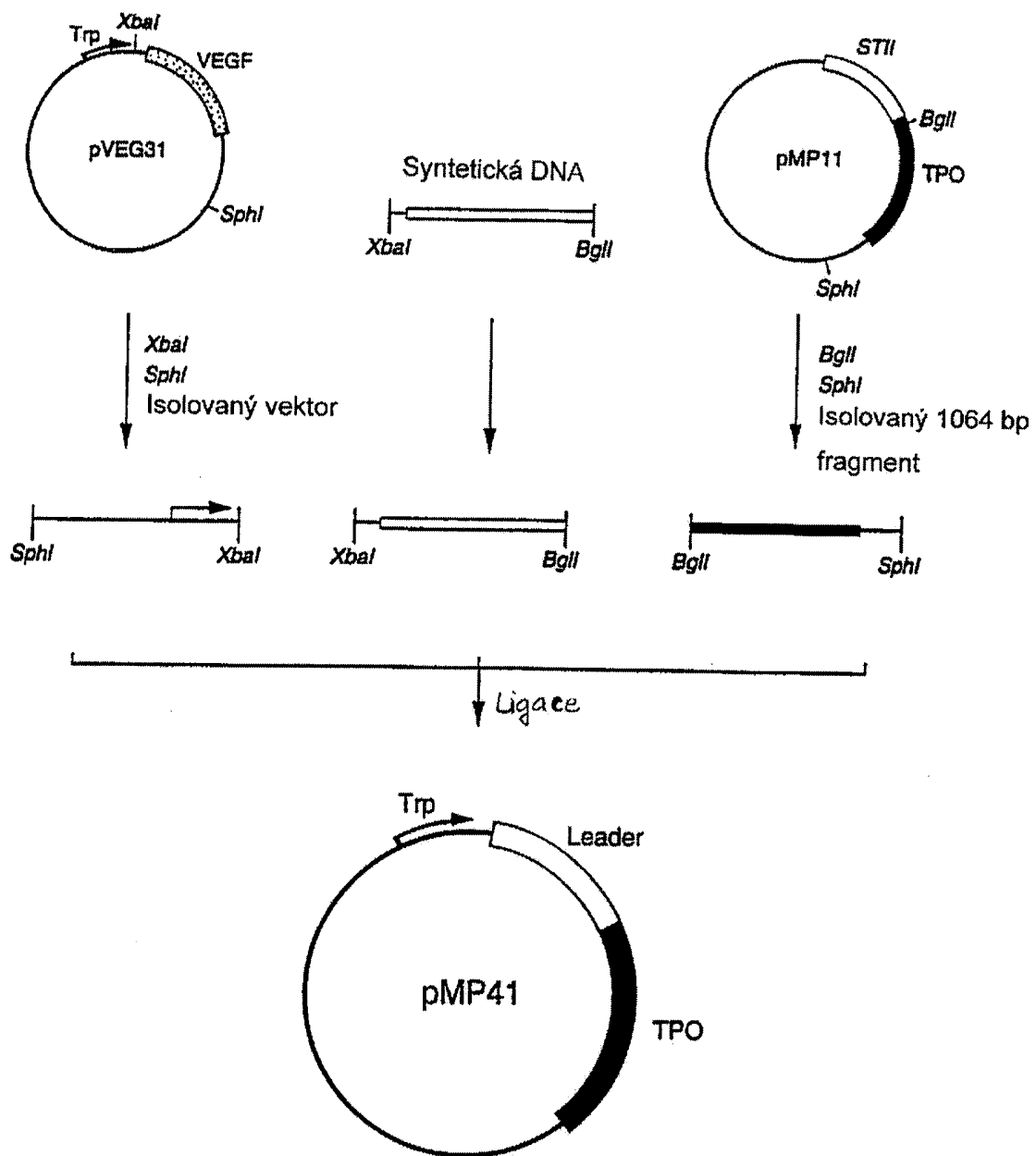
Obr.37



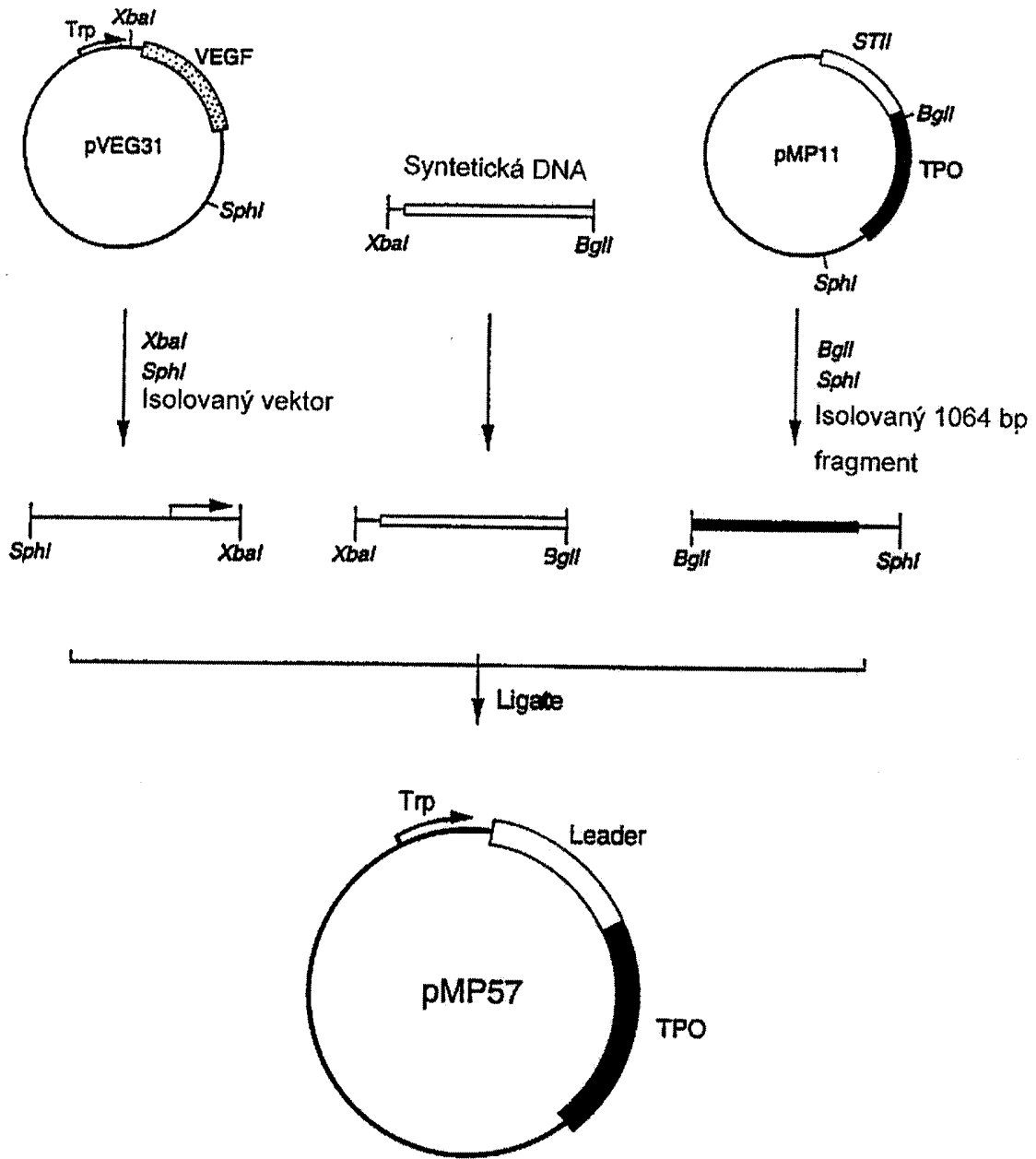
Obr.38

	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

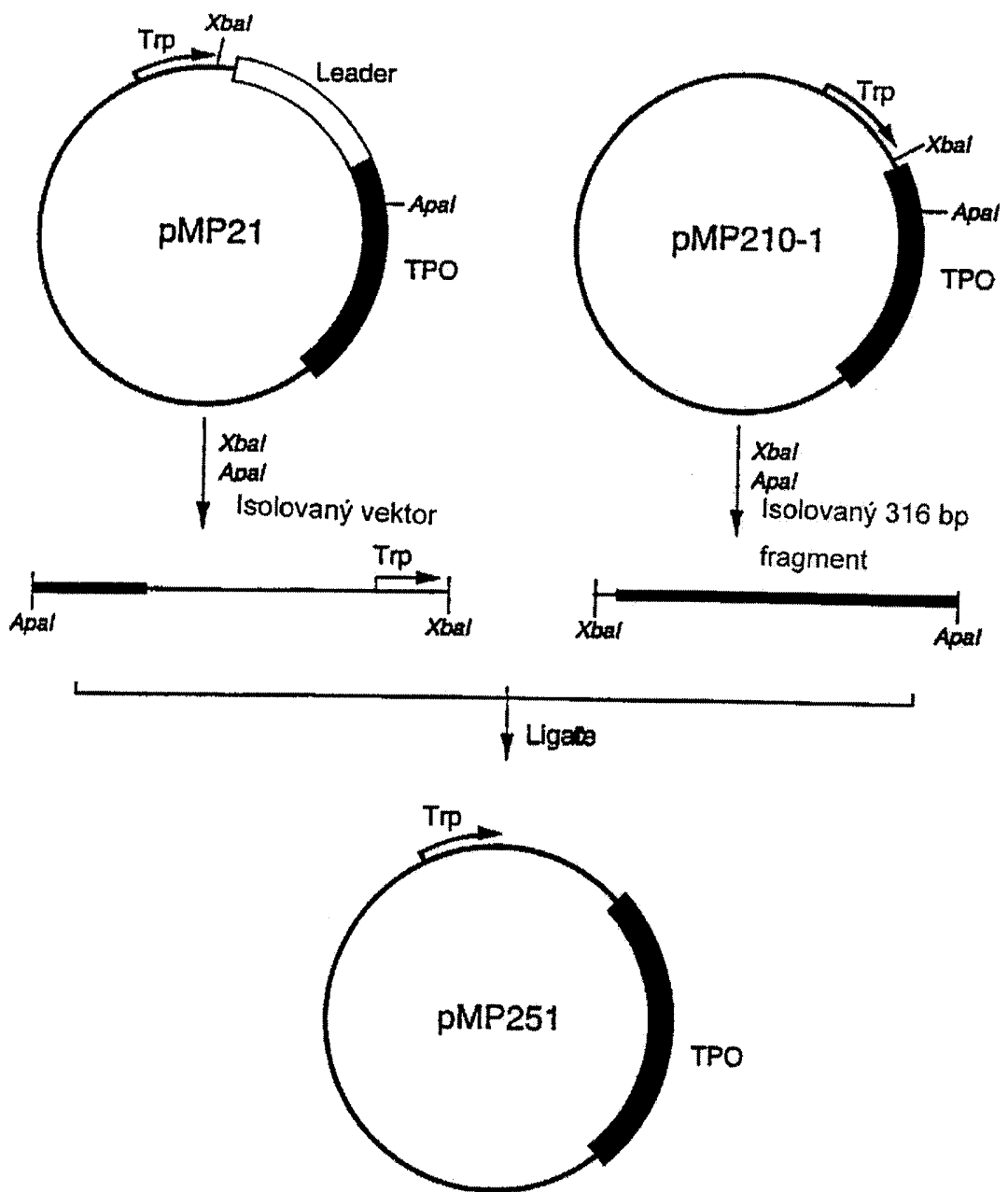
Obr. 39



Obr. 40



Obr. 41



Obr. 42

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace:

(i) Předkladatel: Eaton, Dan L.

de Sauvage, Frederic J.

(ii) Název vynálezu: Thrombopoetin

(iii) Počet sekvencí: 144

(iv) Korespondenční adresa:

(A) Adresát: Genetech, Inc.

(B) Ulice: 460 Point San Bruno Blvd

(C) Město: South San Francisco

(D) Stát: Kalifornie

(E) Země: USA

(F) Poštovní kód: 94080

(v) Forma pro počítač:

(A) Typ média: 3,5 palcová disketa

(B) Počítač: IBM PC kompatibilní

(C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: WinPatin (Genetech)

(vi) Data o podávané přihlášce:

(A) Číslo aplikace: 08/374540

(B) Datum podání: 18. ledna 1995

(C) Klasifikace:

(vii) Data o předešlé přihlášce:

(A) Číslo aplikace: PCT/US94/14553

(B) Datum podání: 28. prosince 1994

(viii) Data o předešlé přihlášce:

(A) Číslo aplikace: 08/249376

(B) Datum podání: 25. května 1994

(ix) Data o předešlé přihlášce:

(A) Číslo aplikace: 08/223263

(B) Datum podání: 4. dubna 1994

(x) Data o předešlé přihlášce:

(A) Číslo aplikace: 08/196689

(B) Datum podání: 15. února 1994

- (vii) Data o předešlé přihlášce:
 (A) Číslo aplikace: 08/348658
 (B) Datum podání: 2. prosince 1994
- (vii) Data o předešlé přihlášce:
 (A) Číslo aplikace: 08/185607
 (B) Datum podání: 21. ledna 1994
- (vii) Data o předešlé přihlášce:
 (A) Číslo aplikace: 08/348657
 (B) Datum podání: 2. prosince 1994
- (vii) Data o předešlé přihlášce:
 (A) Číslo aplikace: 08/176553
 (B) Datum podání: 3. ledna 1994
- (viii) Informace o agentovi:
 (A) Jméno: Winter, Daryl B.
 (B) Registrační číslo: 32,637
 (C) Referenční číslo: P0871P5
- (ix) Telekomunikační informace:
 (A) Telefon: 415/225-1249
 (B) Telefax: 415/952-9881
 (C) Telex: 910/371-7168
- (2) Informace o SEQ ID NO: 1
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 353 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 2

(i) Charakteristiky sekvencé:

(A) Délka: 1795 basí

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet vláken: jedno

(D) Topologie: lineární

(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 2

TCTTCCTACC CATCTGCTCC CCAGAGGGCT GCCTGCTGTG CACTTGGGTC 50

CTGGAGCCCT TCTCCACCCG GATAGATTCC TCACCCTTGG CCCGCCTTTG 100
 CCCACCCCTA CTCTGCCAG AAGTGCAAGA GCCTAAGCCG CCTCCATGGC 150
 CCCAGGAAGG ATTCAGGGGA GAGGCCCAA 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 10
 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 25
 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 ACC 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	
GGC	TCC	CTG	CCA	CCC	AAC	CTC	CAG	CCT	GGA	TAT	TCT	CCT	1097
Gly	Ser	Leu	Pro	Pro	Asn	Leu	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Pro	
				265					270				
TCC	CCA	ACC	CAT	CCT	CCT	ACT	GGA	CAG	TAT	ACG	CTC	TTC	1136
Ser	Pro	Thr	His	Pro	Pro	Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	Leu	Phe	
	275					280					285		
CCT	CTT	CCA	CCC	ACC	TTG	CCC	ACC	CCT	GTG	GTC	CAG	CTC	1175
Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Val	Gln	Leu	
			290					295					
CAC	CCC	CTG	CTT	CCT	GAC	CCT	TCT	GCT	CCA	ACG	CCC	ACC	1214
His	Pro	Leu	Leu	Pro	Asp	Pro	Ser	Ala	Pro	Thr	Pro	Thr	
300					305					310			

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 TAACIGGTAA GACACCCATA CTCCCAGGAA 260

GACACCATCA CTTCTCTAA CTCCTTGACC CAATGACTAT TCTTCCATA 310

TTGTCCCCAC CTA CTACTGATCA CACTCTCTGA CAAGAATTAT TCTTCACAAT 360

ACAGCCCCGA TTTAAAAGCT CTCGTCTAGA 390

- (2) Informace o SEQ ID NO: 5
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 390 basí
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet vláken: jedno
 (D) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 5

TCTAGACGAG AGCTTTTAAA TGCGGGCTGT ATTGTGAAGA ATAATTCTTG 50

TCAGAGAGTG TGATCAGTAG GTGGGGACAA TATGGGAAGA ATAGTCATTG 100

GGTCAAGGAG TTAGAGGAAG TGATGGTGTC TTCTGGGGAG 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) Informace o SEQ ID NO: 6
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 332 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 7
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 166 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 8
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 328 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 8

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu
 1 5 10
 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) Informace o SEQ ID NO: 9
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 265 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 10
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 261 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 11
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 7849 basí
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet vláken: jedno
 (D) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 11

CCCAGCCTCC TTTCTCTTGT TCCCTGGTCA TGCCTGCCTC CCTGTCTCCT 50
 GTCTCTCCCT CCCACACACA CCCACTATCC 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 TTCCTCTTGT CACATGTGGA ACGGTAGGAG 450
 ATGGAAGACG GAGACAGAAC AAGCAAAGGA GGGCCCTGGG CACAGAGGTC 500
 TGTGTGTGTA GCCATCCAAG CCACTGGACC CCAGCAGACG AGCACCTAAG 550
 CTCAGGCTTA ACCCAGTGCA CGTGTGCGCA CATAATGTG CCCCACCT 600
 GACAGTCCAC TCAACCCGTC CAAACCCTTT CCCATAACA CCAACCCATA 650
 ACAGGAGATT TCTCTCATGT GGGCAATATC CGTGTTCCTCA CTCGAAAGG 700
 GGAATGACA 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
 GAAGTGGCCC AGGCAGGCGT ATGACCTGCT GCTGTGGAGG GGCTGTGCCC 1150
 CACCGCCACA TGTCTTCCTA CCCATCTGCT CCCCAGAGGG CTGCCTGCTG 1200
 TGCATTGGG TCCTGGAGCC CTTCTCCACC CGGTGAGTGG CCAGCAGGGT 1250
 GTGGGGTTAT GTGAGGGTAG AAAGGACAGC AAAGAGAAAT GGGCTCCCAG 1300

CTGGGGGAGG GGCAGGCAAA CTGGAACCTA CAGGCACTGA CCTTTGTCTGA 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 TCATTCCTCG TTAGCTTAAG 1600
 GTTCTGAATC TGGTGCTGGG GAAGCTGGGC CAGGCAAGCC AGGGCGCAAG 1650
 GAGAGGGTAA TGGGAGGAGG GCCCACTCAT GTTGACAGAC CTACAGGAAA 1700
 TCCCAATATT GAATCAGGTG CAAGCCTCTT TGCACAACCTT GTGAAAGGAG 1750
 GAGGAAGCCA TGTGGGGGGT CCTGTGAAGG AACCGGAAGG GGTTCTGCCA 1800
 AGGGGGCAGG GAGGCAGGTG TGAGCTATGA GACAGATATG TTAGTGGGCG 1850
 CCTAAGACAA GGTAAGCCCC TAAGGTGGGC ATCACCAGC AGGTGCCCGT 1900
 TCCTGGGCAG CTGGTCTCAG GAAGGAAGTC CCAGAAGTGT TAGCCCATCT 1950
 CTTGGCCTCA GATAATGGAG TATTCAGGA CTTGGAGTCC AAAGAAAAGC 2000
 TCCAGTGGCT TTATGTGTGG GGGTAGATAG 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 CCTAACACC AAGGTTGCTC AGAATTTAAG 2300
 GCTAATTAAG ATATGTGTGT ATACATATCA TGTCTGCTG CTCTCAGCAG 2350
 GGGTAGGTGG CACCAAATCC GTGTCCGATT CACTGAGGAG TCCTGACAAA 2400
 AAGGAGACAC CATATGCTTT CTTGCTTTCT TTCFTTCTTT CTTTCTTTTT 2450
 TTTT'TTTTGA GACGGAGTTT CACTCTTATT GCCCAGGCTG GAGTGCAATG 2500
 GTGCGATCTC GGCTCACCAC AAACCTCCGC CTCCCAGGTA CAAGCGATTC 2550
 TCCTGTCTCA GCCTCCCAAG TAGCTTGGAT TACAGGCATG AGCCACCACA 2600
 CCCTGCTAGT TTTTTTGTAT TTCGTAGAGC CGGGGTTTCA CCATGTTAGT 2650
 GAGGCTGGTG GCGAACTCCT GACCTCAGGT GATCCACCCG CCTTGGACTC 2700

CCAAAGTGCT GGGATTACAG GCATGAGCCA CTGCACCCGG CACACCATAT 2750
 GCTTTCATCA CAAGAAAATG TGAGAGAATT CAGGGCPTTG GCAGTTCAG 2800
 GCTGGTCAGC ATCTCAAGCC CTCCCCAGCA TCTGTTACCC CTGCCAGGCA 2850
 GTCTCTTCTT AGAAACTTGG TTAAATGTTT ACTCTTCTTG CTACTTTCAG 2900
 GATAGATTCC TCACCCTTGG CCCGCCTTTG CCCCACCTA CTCTGCCAG 2950
 AAGTGCAAGA GCCTAAGCCG CCTCCATGGC CCCAGGAAGG ATTCAGGGGA 3000
 GAGGCCCAA 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
 TTCTCTCTCA TCTTTCACC TCACCTCTCC TCATCTAAGA ATTGCTCCTC 3300
 GTGGTCATGC TTCTCCTAAC TGCAAGGCTA ACGCTGTCCA GCCCGGCTCC 3350
 TCCTGCTTGT GACCTCCGAG TCCTCAGTAA ACTGCTTCGT GACTCCCATG 3400
 TCCTTCACAG CAGACTGGTG AGAACTCCCA ACATTATCCC CTTTATCCGC 3450
 GTAACGGTA AGACACCCAT ACTCCCAGGA AGACACCATC ACTTCCTCTA 3500
 ACTCCTTGAC CCAATGACTA TTCTTCCCAT ATTGTCCCCA CCTACTGATC 3550
 ACACTCTCTG ACAAGAATTA TTCTTCACAA TACAGCCCGC ATTTAAAAGC 3600
 TCTCGTCTAG AGATAGTACT CATGGAGGAC TAGCCTGCTT ATTAGGCTAC 3650
 CATAGCTCTC TCTATTCAG CTCCCTTCTC CCCCCACCAA TCTTTTTCAA 3700
 CAGAGCCAGT GCCCAGAGGT TCACCCTTTG CCTACACCTG TCCTGCTGCC 3750
 TGCTGTGGAC TTTAGCTTGG GAGAATGGAA AACCCAGATG GTAAGAAAGC 3800
 CATCCCTAAC CTTGGCTTCC CTAAGTCCTG TCTTCAGTTT CCCACTGCTT 3850
 CCCATGGATT CTCCAACATT CTTGAGCTTT TAAAAAATAT CTCACCTTCA 3900
 GCTTGGCCAC 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 TGTAATCCCA 4250
 GCACTTTGGG AGGCCGAGGC AGGCAGATCA CCTGAGGGCA GGAGTTTGAG 4300
 AGCAGCCTGG CCAACATGGC GAAACCCCGT CTCTACTAAG AATACAAAAT 4350
 TAGCCGGGCA TGGTAGTGCA TGCCTGTAAT CCCAGCTACT TGGAAGGCTG 4400
 AAGCAGGAGA ATCCCTTGAA CCCAGGAGGT GGAGGTTGTA GTGAGCTGAG 4450
 ATCATGCCAA TGCCTCCAG CCTGGGTGAC AAGAGCAAAA CTCCGTCTCA 4500
 AAAAGAAAAA AAAATTCTAC ATGTGTAAT TAATGAGTAA AGTCCTATTC 4550
 CAGCTTTCAG GCCACAATGC CCTGCTTCCA TCATTTAAGC CTCTGGCCCT 4600
 AGCACTTCCT ACGAAAAGGA TCTGAGAGAA TTAAATTGCC CCCAAACTTA 4650
 CCATGTAACA TTAAGTGAAGC TGCTATTCTT AAAGCTAGTA ATTCTTGTCT 4700
 GTTTGATGTT TAGCATCCCC ATTGTGGAAA TGCTCGTACA GAACTCTATT 4750
 CCGAGTGGAC TACTACTAAA 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
 TAGTCCCTTC TTTTCATCCT TATGATCATT ATGGTAGAGT CTCATACCTA 5050
 CATTTAGTTT ATTTATTATT ATTATTTGAG ACGGAGTCTC ACTCTATCCC 5100
 CCAGGCTGGA GTGCAGTGGC ATGATCTCAA CTCACTGCAA CCTCAGCCTC 5150
 CCGGATTCAA GCGATTCTCC TGCCTCAGTC TCCCAAGTAG CTGGGATTAC 5200
 AGGTGCCAC CACCATGCCC AGCTAATTTT TGTATTTTTG GTAGAGATGG 5250
 GGTTCACCA TGTTGGCCAG 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 TGATTCACTC TGCTGGCTAC 5650
TCCTAAGGCT CCCACCCCGC TTTTAGTGTG CCCTTTGAGG CAGTGCCTT 5700
CTCTCTTCCA TCTCTTTCTC AGGAGGAGAC CAAGGCACAG GACATTCTGG 5750
GAGCAGTGAC CCTTCTGCTG GAGGGAGTGA TGGCAGCACG GGGACAACTG 5800
GGACCCACTT GCCTCTCATC CCTCCTGGGG CAGCTTTCTG GACAGGTCCG 5850
TCTCCTCCTT GGGGCCCTGC AGAGCCTCCT TGGAACCCAG GTAAGTCCCC 5900
AGTCAAGGGA TCTGTAGAAA CTGTTCTTTT CTGACTCAGT CCCACTAGAA 5950
GACCTGAGGG AAGAAGGGCT CTTCAGGGA GCTCAAGGGC AGAAGAGCTG 6000
ATCTACTAAG AGTGCTCCCT GCCAGCCACA ATGCCTGGGT ACTGGCATCC 6050
TGTCTTTCCT ACTTAGACAA GGGAGGCTG 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 AGCTCCCAA CAGGACTTCT GGATTGTTGG AGACAAACTT 6350
CACTGCCTCA GCCAGAACTA CTGGCTCTGG GCTTCTGAAG TGGCAGCAGG 6400
GATTCAGAGC CAAGATTCCCT GGTCTGCTGA ACCAAACCTC CAGGTCCCTG 6450
GACCAAATCC CCGGATACCT GAACAGGATA CACGAACTCT TGAATGGAAC 6500
TCGTGGACTC TTTCCCTGGAC CCTCACGCAG GACCCTAGGA GCCCCGGACA 6550
TTTCCTCAGG AACATCAGAC ACAGGCTCCC TGCCACCCAA CCTCCAGCCT 6600
GGATATTCTC CTTCCTCAAC CCATCCTCCT ACTGGACAGT ATACGCTCTT 6650
CCCTCTTCCA CCCACCTTGC CCACCCCTGT GGTCCAGCTC CACCCCTGC 6700
TTCCTGACCC TTCTGCTCCA ACGCCACCC CTACCAGCCC TCTTCTAAAC 6750
ACATCCTACA CCCACTCCCA GAATCTGTCT CAGGAAGGGT AAGGTCTCA 6800
GACACTGCCG ACATCAGCAT TGTCTCATGT ACAGCTCCCT TCCCTGCAGG 6850
GCGCCCCTGG GAGACAACCTG GACAAGATTT CCTACTTTCT CCTGAAACCC 6900

AAAGCCCTGG TAAAAGGGAT ACACAGGACT GAAAAGGGAA TCATTTTCA 6950
 CTGTACATTA TAAACCTTCA GAAGCTATTT TTTTAAGCTA TCAGCAATAC 7000
 TCATCAGAGC AGCTAGCTCT TTGGTCTATT TTCTGCAGAA ATTTGCAACT 7050
 CACTGATTCT CTACATGCTC TTTTCTGTG ATAACTCTGC AAAGGCCTGG 7100
 GCTGGCCTGG CAGTTGAACA GAGGGAGAGA CTAACCTTGA GTCAGAAAAC 7150
 AGAGAAAGGG TAATTTCCCTT TGCTTCAAAT TCAAGGCCTT CCAACGCCCC 7200
 CATCCCCCTT 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 CTTTGCAAAT AAGTGCTGCC 7800
 TTGGTGCTCA GGAAAAGGTT TGTGTTGCAC AAAACACAAA TTCCACTGC 7849

(2) Informace o SEQ ID NO: 12

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 1443 basí

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet vláken: jedno

(D) Topologie: lineární

(xi) Označení sekvence: 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

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
 165 170 175

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
 320 325 330 331

G GGCCTGGCC CAGTGAGCGT CTGCAGCTTC TCTCGGGGAC 1240
 AAGCTTCCCC AGGAAGGCTG AGAGGCAGCT GCATCTGCTC CAGATGTTCT 1290
 GCTTTCACCT AAAAGGCCCT GGGGAAGGGA TACACAGCAC TGGAGATTGT 1340
 AAAATTTTAG GAGCTATTTT TTTTAAACCT ATCAGCAATA TTCATCAGAG 1390
 CAGCTAGCGA TCTTTGGTCT ATTTTCGGTA TAAATTTGAA AATCACTAAT 1440
 TCT 1443

- (2) Informace o SEQ ID NO: 13
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 352 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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
	-5					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 T r		
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) Informace o SEQ ID NO: 14
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 1536 basí
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet vláken: jedno
 (D) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 14

GAGTCCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCCGA CTCTGCCGAA AGAAGCACAG 50
 AAGCTCAAGC CGCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTTCAGGG GAGAGGCCCC 100
 ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCCT GGCCAGA ATG GAG 143
 Met Glu

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					235					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	1196
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) Informace o SEQ ID NO: 15
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 356 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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	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	Leu	Pro	Leu
100					105					110				
Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Phe	Leu
115					120					125				

Ser Leu Gln Gln Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Leu Leu
 130 135 140
 Val Glu Gly Pro Thr Leu Cys Val Arg Arg Thr Leu Pro Thr Thr
 145 150 155
 Ala Val Pro Ser Ser Thr Ser Gln Leu Leu Thr Leu Asn Lys Phe
 160 165 170
 Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Ser Val Thr
 175 180 185
 Ala Arg Thr Ala Gly Pro Gly Leu Leu Ser Arg Leu Gln Gly Phe
 190 195 200
 Arg Val Lys Ile Thr Pro Gly Gln Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser
 205 210 215
 Pro Val Gln Ile Ser Gly Tyr Leu Asn Arg Thr His Gly Pro Val
 220 225 230
 Asn Gly Thr His Gly Leu Phe Ala Gly Thr Ser Leu Gln Thr Leu
 235 240 245
 Glu Ala Ser Asp Ile Ser Pro Gly Ala Phe Asn Lys Gly Ser Leu
 250 255 260
 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) Informace o SEQ ID NO: 16
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 241 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 17
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 335 aminokyselin
 (B) Typ: amipokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 18

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 332 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Topologie: lineární

(xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 19
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 1026 basí
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet vláken: jedno
 (D) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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
 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

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
 325 330 332

CCTGCCAACT TCAGCA 1026

- (2) Informace o SEQ ID NO: 20
- (i) Charakteristiky sekvence:
- (A) Délka: 1014 basi
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Počet vláken: jedno
- (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: 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					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	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 Gly 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) Informace o SEQ ID NO: 21
- (i) Charakteristiky sekvence:
- (A) Délka: 328 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 22

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 5141 basi

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet vláken: dvě

(D) Topologie: lineární

(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 22

TTCGAGCTCG CCCGACATTG ATTATTGACT AGAGTCGATC GACAGCTGTG 50
 GAATGTGTGT CAGTTAGGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA 100
 GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAG GTGTGGAAAG 150
 TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA 200
 GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAACTCC GCCCATCCCG CCCCTAACTC 250
 CGCCCAGTTC CGCCCATTCT CCGCCCCATG GCTGACTAAT TTTTITTTATT 300
 TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG 350
 AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG CAAAAGCTA GCTTATCCGG 400
 CCGGGAACGG TGCATTGGAA CGCGGATTCC CCGTGCCAAG AGTGACGTAA 450
 GTACCGCCTA TAGAGCGATA AGAGGATTTT ATCCCCGCTG CCATCATGGT 500
 TCGACCATTG AACTGCATCG TCGCCGTGTC CAAAATATG GGGATTGGCA 550
 AGAACGGAGA CCTACCCTGG CCTCCGCTCA GGAACGAGTT CAAGTACTTC 600
 CAAAGAATGA CCACAACCTC TTCAGTGGAA GGTAAACAGA 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 TATCATAACAC 1200
 ATACGATTTA GGTGACACTA TAGATAACAT CCACTTTGCC TTTCTCTCCA 1250
 CAGGTGTCCA CTCCCAGGTC CAACTGCACC TCGGTTCTAA GCTTCTGCAG 1300
 GTCGACTCTA GAGGATCCCC GGGGAATTCA ATCGATGGCC GCCATGGCCC 1350
 AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC 1400
 AAATTCACA AATAAAGCAT TTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTTGT 1450
 CCAAACATCAT CAATGTATCT TATCATGTCT GGATCGATCG GGAATTAATT 1500
 CGGCGCAGCA CCATGGCCTG AAATAACCTC TGAAAGAGGA ACTTGTTAG 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 CCGCCCATTC 1800
 TCCGCCCCAT GGCTGACTAA TTTTTTTTAT TTATGCAGAG GCCGAGGCCG 1850
 CCTCGGCCTC TGAGCTATTC CAGAAGTAGT GAGGAGGCTT TTTTGGAGGC 1900
 CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT GTTACCTCGA GCGGCCGCTT AATTAAGGCG 1950
 CGCCATTTAA ATCCTGCAGG TAACAGCTTG GCACTGGCCG TCGTTTTACA 2000
 ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGCAG 2050
 CACATCCCCC CTTCGCCAGC 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 AGCGCCCCT 2300
 CCTTTCGCTT TCTTCCCCTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCTCCG 2350
 TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC 2400
 GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTTGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG 2450
 CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT 2500
 CTTTAAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACACTC AACCCATCT 2550
 CGGGCTAFTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTG GGCCTATTGG 2600
 TTAAAAAATG AGCTGATTTA AAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT 2650
 ATTAACGTTT ACAATTTTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG 2700
 CCGCATAGTT AAGCCAACCTC CGCTATCGCT ACGTGACTGG GTCATGGCTG 2750
 CGCCCCGACA CCCGCCAACA CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGTCTG 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 CCGTGTGCGC 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 TCCCCTGATG 3350
 ACGCCGGGCA AGAGCAACTC GGTCGCCGCA TACTACTATC TCAGAATGAC 3400
 TTGGTTGAGT ACTCACCAGT CACAGAAAAG CATCTTACGG ATGGCATGAC 3450
 AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCGG 3500
 CCAACTTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT 3550
 TTGCACAACA TGGGGGATCA TGTAACCTCGC CTTGATCGTT GGGAACCGGA 3600

GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCAGCAG 3650
 CAATGGCAAC AACGTTGCGC AAACATATAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA 3700
 GCTTCCCGGC AACAAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG 3750
 ACCACTTCTG CGCTCGGCC TCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAT 3800
 CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA 3850
 GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC 3900
 AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA 3950
 TTAAGCATTG GTAACGTGCA GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT 4000
 GATTTAAAAC TTCATTTTAA ATTTAAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT 4050
 TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTCG TTCCACTGAG 4100
 CGTCAGACCC CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT 4150
 CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT 4200
 GGTTTGTTTG CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAAGTG 4250
 GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG 4300
 TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT 4350
 GCTAATCCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA 4400
 CCGGGTTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC 4450
 TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC 4500
 CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCATTG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG 4550
 AAGGGAGAAA GGCGGACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA 4600
 GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC 4650
 TGTCCGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTGG TGATGCTCGT 4700
 CAGGGGGGCG GAGCCTATGG AAAAAACCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG 4750
 TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC 4800
 CCCTGATTCT GTGGATAACC GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATACCG 4850
 CTCGCCGCAG CCGAACGACC GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG 4900
 GAAGAGCGCC CAATACGCAA ACCGCCTCTC CCCGCGCGTT GGCCGATTCA 4950
 TTAATCCAGC TGGCACGACA GGTTCCTCCGA CTGGAAAGCG GGCAGTGAGC 5000

GCAACGCAAT TAATGTGAGT TACCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA 5050
CACTTTATGC TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA 5100
ATTTACACACA GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGAATTA A 5141

- (2) Informace o SEQ ID NO: 23
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 21 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 23

ATGTCNCCNG CNCCNCCNGC N 21

- (2) Informace o SEQ ID NO: 24
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 21 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 24

ATGTCTCCAG CGCCGCCAGC G 21

- (2) Informace o SEQ ID NO: 25
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 21 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 25

ATGTCGCCTG CTCCACCTGC T 21

- (2) Informace o SEQ ID NO: 26
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 21 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 26

ATGTCGCCAG CGCCACCAGC C 21

- (2) Informace o SEQ ID NO: 27
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 21 basí
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet vláken: jedno
 (D) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 27

ATGTCCCCAG CCCACCCGC A 21

- (2) Informace o SEQ ID NO: 28
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 21 basí
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet vláken: jedno
 (D) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 28

ATGTCGCCAG CGCCGCCAGC G 21

- (2) Informace o SEQ ID NO: 29
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 25 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 30
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 26 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 31
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 25 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 32
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 14 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 32

Xaa Pro Ala Pro Pro Ala Xaa Asp Pro Arg Leu Xaa Asn Lys
 1 5 10 14

- (2) Informace o SEQ ID NO: 33
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 9 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 33

Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg
 1 5 9

- (2) Informace o SEQ ID NO: 34
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 45 basi
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet vláken: jedno
 (D) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 34

GCCGTGAAGG ACGTGGTCGT CACGAAGCAG TTTATTTAGG AGTCG 45

- (2) Informace o SEQ ID NO: 35
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 20 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 35

CCNGCNCCNC CNGCNTGYGA 20

- (2) Informace o SEQ ID NO: 36
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 21 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:36

NCCRTGNARN ACRTGRTCRT C 21

- (2) Informace o SEQ ID NO: 37
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 69basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:37

CCAGCGCCGC CAGCCTGTGA CCCCCGACTC CTAATAAAC TGCCTCGTGA 50
TGACCACGTT CAGCACGGC 69

- (2) Informace o SEQ ID NO:38
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 69 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:38

GCCGTGCTGA ACGTGGTCAT CACGAGGCAG TTTATTTAGG AGTCGGGGGT 50
CACAGGCTGG CGGCGCTGG 69

- (2) Informace o SEQ ID NO:39
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 69 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:39

CCAGCACCTC CGGCATGTGA CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCTTCGTGA 50
CGACCACGTC CATCACGGC 69

- (2) Informace o SEQ ID NO:40
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 69 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:40

GCCGTGATGG ACGTGGTCGT CACGAAGCAG TTTATTTAGG AGTCGGGGGT 50
CACATGCCGG AGGTGCTGG 69

- (2) Informace o SEQ ID NO:41
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 69 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:41

CCAGCACCGC CGGCATGTGA CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCTTCGTGA 50
CGATCATGTC TATCACGGT 69

- (2) Informace o SEQ ID NO: 42
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 69 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:42

ACCGTGATAG ACATGATCGT CACGAAGCAG TTTATTTAGG AGTCGGGGGT 50
CACATGCCGG CGGTGCTGG 69

- (2) Informace o SEQ ID NO: 43
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 37 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 43

GCTAGCTCTA GAAATTGCTC CTCGTGGTCA TGCTTCT 37

- (2) Informace o SEQ ID NO: 44
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 22 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:44

CAGTCTGCCG TGAAGGACAT GG 22

- (2) Informace o SEQ ID NO:45
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 24 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:45

TGTGGACTTT AGCTTGGGAG AATG 24

- (2) Informace o SEQ ID NO:46
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 22 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:46

GGTCCAGGGA CCTGGAGGTT TG 22

- (2) Informace o SEQ ID NO: 47
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 31 basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Počet vláken: jedno
(D) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 47

ATCGATATCG ATAGCCAGAC ACCCCGGCCA G 31

- (2) Informace o SEQ ID NO:48
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 36 basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Počet vláken: jedno
(D) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:48

GCTAGCTCTA GACAGGGAAG GGAGCTGTAC ATGAGA 36

- (2) Informace o SEQ ID NO: 49
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 24 basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Počet vláken: jedno
(D) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:49

CTCCTTGGA CCCAGGGCAG GACC 24

- (2) Informace o SEQ ID NO: 50
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 24 basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Počet vláken: jedno
(D) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:50

GGTCCTGCCC TGGGTTCCAA GGAG 24

- (2) Informace o SEQ ID NO:51
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 27 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:51

CTGCTCCGAG GAAAGGACTT CTGGATT 27

- (2) Informace o SEQ ID NO:52
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 27 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:52

AATCCAGAAG TCCTTTCCTC GGAGCAG 27

- (2) Informace o SEQ ID NO: 53
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 28 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:53

CCCTCTGCGT CGCGGCGGCC CCACCCAC 28

- (2) Informace o SEQ ID NO:54
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 28 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:54

GTGGGTGGGG CCGCCGCGAC GCAGAGGG 28

- (2) Informace o SEQ ID NO:55
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 35 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:55

GACTCGAGGA TCCATCGATT TTTTTTTTTT TTTT 35

- (2) Informace o SEQ ID NO:56
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 17 basi
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:56

GACTCGAGGA TCCATCG 17

- (2) Informace o SEQ ID NO:57
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 32 basi
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:57

GCTAGCTCTA GAAGCCCGGC TCCTCCTGCC TG 32

- (2) Informace o SEQ ID NO: 58
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 21 basi
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:58

CGAAATTAAC CCTCACTAAA G 21

- (2) Informace o SEQ ID NO:59
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 103 basi
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:59

TGCAGCAAGG GCTACTGCCA CACTCGAGCT GCGCAGATGC TAGCCTCAAG 50
ATGGCTGATC CAAATCGATT CCGCGGCAAA GATCTTCCGG TCCTGTAGAA 100
GCT 103

- (2) Informace o SEQ ID NO:60
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 103 basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Počet vláken: jedno
(D) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:60

AGCTTCTACA GGACCGGAAG ATCTTTGCCG CGGAATCGAT TTGGATCAGC 50
CATCTTGAGG CTAGCATCTG CGCAGCTCGA GTGTGGCAGT AGCCCTTGCT 100
GCA 103

- (2) Informace o SEQ ID NO:61
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 18 basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Počet vláken: jedno
(D) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:61

TCTCGCTACC GTTTACAG 18

- (2) Informace o SEQ ID NO:62
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 25 basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Počet vláken: jedno
(D) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:62

CAGGTACCCA CCAGGCGGTC TCGGT 25

- (2) Informace o SEQ ID NO:63
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 18 basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Počet vláken: jedno
(D) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:63

GGGCCATGAC ACTGTCAA 18

- (2) Informace o SEQ ID NO:64
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 40 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:64

GACCGCCACC GAGACCGCCT GGTGGGTACC TGTGGTCCTT 40

- (2) Informace o SEQ ID NO:65
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 32 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:65

ATCGATATCG ATCAGCCAGA CACCCCGGCC AG 32

- (2) Informace o SEQ ID NO:66
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 35 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:66

TCTAGATCTA GATCACCTGA CGCAGAGGGT GGACC 35

- (2) Informace o SEQ ID NO:67
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 33 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:67

AGTCGACGTC GACGTCGGCA GTGTCTGAGA ACC 33

- (2) Informace o SEQ ID NO:68
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 36 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:68

AGTCGACGTC GACTCACCTG ACGCAGAGGG TGGACC 36

- (2) Informace o SEQ ID NO:69
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 62 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:69

CGCGTATGCC AGCCCGGCTC CTCCTGCTTG TGACCTCCGA GTCCTCAGTA 50

AACTGCTTCG TG 62

- (2) Informace o SEQ ID NO:70
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 61 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:70

AGTCACGAAG CAGTTTACTG AGGACTCGGA GGTACAAGC AGGAGGAGCC 50

GGGCTGGCAT A 61

- (2) Informace o SEQ ID NO:71
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 37 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:71

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:71:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTC TTCTTAA 37

- (2) Informace o SEQ ID NO:72
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 37 basí
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet vláken: jedno
 (D) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:72

CGCGTTAAGA AGAAATGCGA TATTCTTTTT CATAAT 37

- (2) Informace o SEQ ID NO:73
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 69 basí
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet vláken: jedno
 (D) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:73

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTC ATCACCATCA CCATCACCAT 50

CACATCGAAG GTCGTAGCC 69

- (2) Informace o SEQ ID NO:74
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 62 basí
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet vláken: jedno
 (D) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:74

TACGACCTTC GATGTGATGG TGATGGTGAT GGTGATGAAA TGCGATATTC 50

TTTTTCATAA TT 62

- (2) Informace o SEQ ID NO:75
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 69 basí
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet vláken: jedno
 (D) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:75

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTC ATCACCATCA CCATCACCAT 50

CACATCGAAC CACGTAGCC 69

- (2) Informace o SEQ ID NO:76
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 62 basi
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:76

TACGTGGTTC GATGTGATGG TGATGGTGAT GGTGATGAAA TCGATATTC 50

TTTTTCATAA TT 62

- (2) Informace o SEQ ID NO:77
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 19 basi
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:77

TCCACCCTCT GCGTCAGGT 19

- (2) Informace o SEQ ID NO:78
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 18 basi
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:78

AGCTACCTGA CGCAGAGG 18

- (2) Informace o SEQ ID NO: 79
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 62 basi
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:79

GCAGCAGTTC TAGAATTATG TCNCCNGCNC CNCCNGCNTG TGACCTCCGA 50
GTTCTCAGTA AA 62

- (2) Informace o SEQ ID NO:80
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 49 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:80

GAAGGACATG GGAGTCACGA AGCAGTTTAC TGAGAACTCG GAGGTCACA 49

- (2) Informace o SEQ ID NO:81
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 45 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:81

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTA TCGAAGGTCG TAGCC 45

- (2) Informace o SEQ ID NO:82
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 38 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:82

TACGACCTTC GATAAATGCG ATATTCTTTT TCATAATT 38

- (2) Informace o SEQ ID NO:83
- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 45 basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Počet vláken: jedno
 - (D) Topologie: lineární
- (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:83

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTC TTCTTAAACG TAGCC 45

- (2) Informace o SEQ ID NO:84
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 38 basi
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Počet vláken: jedno
 (D) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:84

TACGTTTAAG AAGAAATGCG ATATTCTTTT TCATAATT 38

- (2) Informace o SEQ ID NO: 85
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 25 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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
Arg	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) Informace o SEQ ID NO: 86
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 31 aminokyselin ;
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 87
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 31 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 87

Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ala	Phe	His	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) Informace o SEQ ID NO:88
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 7 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(C) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:88

Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro
1				5		7

- (2) Informace o SEQ ID NO: 89
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 4 aminokyseliny
(B) Typ: aminokyselina
(C) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 89

His Val Leu His
1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 90
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 4 aminokyseliny
(B) Typ: aminokyselina
(C) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 90

Ser Arg Leu Ser
1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 91
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 4 aminokyseliny
(B) Typ: aminokyselina
(C) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 91

Ser His Val Leu
1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 92
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 4 aminokyseliny
(B) Typ: aminokyselina
(C) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 92

His Ser Arg Leu
1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 93
(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 4 aminokyseliny
(B) Typ: aminokyselina
(C) Topologie: lineární
(xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 93

Ala Val Asp Phe

1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 94
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 94

Ser Leu Gly Glu

1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 95
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 95

Ala Val Thr Leu

1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 96
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 96

Leu Leu Glu Gly

1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 97
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 97

Leu Ser Ser Leu

1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 98
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 98

Leu Gly Gln Leu
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 99
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 5 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 99

Cys Xaa Leu Ser Ser
 1 5

- (2) Informace o SEQ ID NO: 100
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 100

Leu Leu Gly Gln
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 101
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:101

Ser Ser Leu Leu
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 102
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:102

Gly Gln Leu Ser
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 103
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 103

Cys Leu Ser Ser
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 104
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:104

Leu Gln Ser Leu
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 105
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 105

Leu Gly Thr Gln
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 106
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 106

Ala Leu Gln Ser
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 107
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 107

Leu Leu Gly Thr
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 108
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 108

Asn Ala Ile Phe
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 109
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 109

Leu Ser Phe Gln
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 110
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 22 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 111
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 24 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 112
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 23 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 113
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 21 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 114
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 16 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 115
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 22 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 116
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 25 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 117
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 117

Met Pro Pro Ala
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 118
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 5 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 118

Met Ala Pro Pro Ala
 1 5

- (2) Informace o SEQ ID NO: 119
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 6 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:
 119

Met Pro Ala Pro Pro Ala
 1 5 6

- (2) Informace o SEQ ID NO: 120
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 7 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 120

Met Ser Pro Ala Pro Pro Ala
 1 5 7

- (2) Informace o SEQ ID NO: 121
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 121

Ala Pro Pro Ala
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 122
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 5 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 122

Pro Ala Pro Pro Ala
 1 5

- (2) Informace o SEQ ID NO: 123
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 6 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 123

Ser Pro Ala Pro Pro Ala
 1 5 6

- (2) Informace o SEQ ID NO: 124
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 4 aminokyseliny
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 124

Val Arg Arg Ala
 1 4

- (2) Informace o SEQ ID NO: 125
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 5 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 125

Val Arg Arg Ala Pro
 1 5

- (2) Informace o SEQ ID NO: 126
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 6 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 126

Val Arg Arg Ala Pro Pro
 1 5 6

- (2) Informace o SEQ ID NO: 127
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 7 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 127

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr
 1 5 7

- (2) Informace o SEQ ID NO: 128
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 8 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 128

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr
 1 5 8

(2) Informace o SEQ ID NO:129
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 9 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:129

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala
 1 5 9

(2) Informace o SEQ ID NO: 130
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 10 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 130

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val
 1 5 10

(2) Informace o SEQ ID NO: 131
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 11 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 131

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro
 1 5 10 11

(2) Informace o SEQ ID NO: 132
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 12 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 132

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser
 1 5 10 12

(2) Informace o SEQ ID NO: 133
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 13 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 133

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg
1				5					10			13

- (2) Informace o SEQ ID NO: 134
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 14 aminokyselin.
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO:134

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr
1				5					10				14

- (2) Informace o SEQ ID NO: 135
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 15 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: SEQ ID NO: 135

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

- (2) Informace o SEQ ID NO: 136
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 16 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 137
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 17 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 138
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 18 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 139
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 19 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 140
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 20 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 141
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 21 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 142
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 22 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 143
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 23 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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) Informace o SEQ ID NO: 144
 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 24 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Topologie: lineární
 (xi) Označení sekvence: 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

Konec dokumentu
