

(19)



(10) **LT 3472 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **3472**

(21) Paraiškos numeris: **IP667**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 06 21**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 01 31**

(45) Patento paskelbimo data: **1995 10 25**

(60) SU duomenys: **PCT/US 90/00418, 1990 01 30**
SU 5001740, 1991 07 30

(31,32,33) Prioritetas: **304281, 1989 01 31, US**

(72) Išradėjas:
Jeffrey S. Rubin, US
Paul W. Finch, US
Stuart A. Aaronson, US

(73) Patento savininkas:
Jeffrey S. Rubin, 2020 Baltimore Road, Apt. K-44, Rockville, MD 20851, US
Paul W. Finch, 9306 Holland Avenue, Bethesda, MD 20814, US
Stuart A. Aaronson, 1006 Harriman Strest, Great Falls, VA 22066, US

(74) Patentinis patikėtinis:
Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company, Rūdninkų g. 18/2-12, 2001 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
DNR, koduojanti specifinį epitelinėms ląstelėms augimo faktorių

(57) Referatas:

Aprašomi atradimai, atskleidžiantys atskirus rekombinantinės DNR technologijos aspektus, kurie gali būti sėkmingai panaudoti gauti iki šiol nežinomą keratinocitų augimo faktoriaus (KAF) proteiną be kitų polipeptidų. Šie proteinai gali būti gauti įvairios funkcinės formos iš spontaniškai išsiskiriančių ląstelių arba DNR segmentų, įvestų į ląsteles. Šios formos įgalina įvairius šio naujo proteino biocheminius ir funkcinis tyrimus, kaip ir atikūnų gamybą.

LT 3472 B

Yra aprašyti genų ekspresijos KAF proteinui lygių nustatymo būdai, pvz., matuojant iRNR lygius ląstelėse arba matuojant antigenus, išskirtus ekstraląsteliniame arba kūno skysčiuose.

Šis išradimas skirtas augimo faktoriams, ypač polipeptidų augimo faktoriaus, analogiško faktorių šeimai, apimančiai žinomus fibroblastų augimo faktorius (FAF), išsiskyrimui. Šis išradimas taip pat skirtas komple-

5 mentarių DNR (kDNR) segmentų sudarymui iš informacinės RNR (iRNR), koduojančios naują augimo faktorių. Be to, išradimas susijęs su tokių DNR segmentų produktu sinteze rekombinantinėmis ląstelėmis ir tam tikrų kitų produktų, gaunamų DNR, koduojančių šį augimo faktorių,

10 identifikacija bei klonavimu, gamyba ir panaudojimu.

Sutrumpinimai, naudojami šiame aprašyme

rFAF	- rūgštinių fibroblastų augimo faktorius
bFAF	- bazinių fibroblastų augimo faktorius
EAF	- epiderminis augimo faktorius
HSAC	- heparino-Sefarozės afininė chromatografija
kb	- kilobazės
kDa	- kilodaltonai
KAF	- keratinocitų augimo faktorius
NaDodSO ₄ /PAGE	- Natrio dodesilsulfato (SDS)/poliakrilamido gelio elektroforezė
AF-ASSC	- atvirkščios fazės aukšto skiriamumo skystinė chromatografija
TAF α	- transformuojantis augimo faktorius α

15 Išradimo prielaidos

Augimo faktoriai yra svarbūs tarpląstelinių ryšių mediatoriai.

20 Šios galingos molekulės paprastai yra išskiriamos vieno ląstelių tipo ir įtakoja kitų tipų ląstelių proliferaciją (žiūr. nuorodą James (James, R. and Bradshaw, R.A. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 259-292) I Eksperimentiniame skyriuje žemiau). Susidomėjimas au-

25 gimo faktoriais padidėjo, įrodžius jų potencialų daly-

vavimą neoplazijoje (Sporn, M.B. and Todaro, G.J. (1980) *N. Eng. J. Med.* 303, 878-880, II Eksperimentiniame skyriuje žemiau). V-asis beždžionių sarkomos viruso transformuojantis genas koduoja proteiną, homologišką augimo faktoriaus-trombocito darinio B grandinei (James, R. and Bradshaw, R.A. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 259-292), (Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. Devare, S.G., Roobins, K.C., Aaronson, S.A. and Antoniades, M.N. (1983) *Science* 221, 275-277). Be to, daug onkogenų yra genų, koduojančių augimo faktoriaus receptorių, homologai (James, R. and Bradshaw, R.A. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 259-292). Tuo būdu, gilesnis augimo faktorių ir signalinės transdukcijos, tarpininkaujant jų receptoriams, kelių supratimas, kaip matyti, leidžia geriau suprasti tiek normalių, tiek piktybinių ląstelių augimo mechanizmus.

Viena žinoma augimo faktorių šeima, veikianti jungiamojo audinio ląsteles, apima rūgštinių fibroblastų augimo faktorių (rFAF), bazinių fibroblastų augimo faktorių (bFAF), giminingus hst ir int-2 onkogenų produktus. Be to, yra žinoma, kad kai kurie augimo faktoriai, įskaitant toliau minimus, pasižymi heparina jungiančiomis savybėmis: rFAF (Maciag, T., Mehlman, T., Friesel, R. and Schreiber, A.B. (1984) *Science* 225, 932-935), (Conn, G. and Hatcher, V.B. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 124, 262-268); bFAF (Gospodarowicz, D., Cheng, J., Lui, G.-M., Baird, A. and Bohlen, P. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6963-6967), (Maciag, T., Mehlman, T., Friesel, R. and Schreiber, A.B. (1984) *Science* 225, 932-935); granulocito/makrofago kolonija stimuliuojantis faktorius (James, R. and Bradshaw, R.A. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 259-292); ir interleukinas 3 (James, R. and Bradshaw, R.A. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 259-292). Kiekvienas iš šių polipeptidinių faktorių yra gaminamas stromos ląstelių (James, R. and Bradshaw, R.A. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 259-292),

- (Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S.A. and Antoniades, M.N. (1983) *Science* 221, 275-277), (Roberts, R., Gallagher, J., Spooncer, E., Allen, T.D., Bloomfield, F. Dexter, T.M. (1988) *Nature* 332, 376-378). Tokie faktoriai, atrodo, išsidėstę nelastelinėje matricoje arba ant proteoglikanų, dengiančių stromos ląstelės paviršių (James, R. and Bradshaw, R.A. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 259-292), (Roberts, R., Gallagher, J., Spooncer, E., Allen, T.D., Bloomfield, F. and Dexter, T.M. (1988) *Nature* 332, 376-378). Postuluota, kad jų saugojimas, išskyrimas ir kontaktai su konkrečiomis ląstelėmis-taikiniais yra reguliuojami tokia sąveika (Roberts, R., Gallagher, J., Spooncer, E., Allen, T.D., Bloomfield, F. and Dexter, T.M. (1988) *Nature* 332, 376-378), (Vlodavsky, I., Folkmann, J., Sullivan, R., Fridman, R., Ishai-Michaeli, R., Sasse, J. and Wasgburn, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84, 2292-2296).
- 20 Tačiau plačiai pripažinta, kad labai daug piktybinių darinių žmoguje yra epitelinių audinių dariniai (Wright, N. and Allison, M. (1984) *The Biology of Epithelial Cell Populations* (Oxford University Press, New York) Vol. 1, pp. 3-5). Buvo aprašyti epitelinių ląstelių iš mezenchimos audinių proliferacijos efektoriai (James, R. and Bradshaw, R.A. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 259-292), (Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S.A. and Antoniades, M.N. (1983) *Science* 221, 275-277), (Waterfield, M.D., Scrace, G.J., Whittle, N., Strooband, P., Johnson, A., Wasteton, A., Westermarck, B., Heldin, C.-H., Huang, J.S. and Deul, T.F. (1983) *Nature* 304, 35-39), tačiau jų molekulinis identiškumas ir struktūra nebuvo nustatyta.
- 35 Trūkstant žinių apie tokius mezenchiminių augimo faktorius, veikiančius epitelines ląsteles, akivaizdu,

5 kad reikalingi metodai, kompozicijos ir biologinė analizė, kurie pagilintų žinias bei epitelinių ląstelių proliferacijos reguliavimo mechanizmų analizę ir, galų gale, reikalingos naujos diagnostinės bei terapinės priemonės, paremtos tokiais faktoriais.

10 Šis išradimas numato proteino išskyrimo metodų ir rekombinantinių DNR technologijų panaudojimą minėtų poreikių patenkinimui ir mezenchiminės prigimties proteino faktorių, kurie, atrodo, yra susiję su epitelinių ląstelių proliferacijos procesais ir kurie negali būti gauti kitaip, gamybos būdų išsivystymui.

15 Šis išradimas skirtas proteino išskyrimo ir rekombinantinių DNR technologijų išsivystymui, kuris apima naujų augimo faktoriaus proteinų, veikiančių epitelines ląsteles, neturinčias kitų peptidinių faktorių, gamybą. Į išradimo sritį taip pat įeina nauji DNR segmentai ir biologinės analizės metodai.

20 Šis išradimas, atskiru atveju, skirtas naujam proteinui, turinčiam struktūrinės ir/arba funkcionalinės charakteristikas žinomos augimo faktorių šeimos, apimančios rūgštinių fibroblastų augimo faktorių (rFAF), bazinių fibroblastų augimo faktorių (bFAF) ir gimi-
 25 ningus hst ir int-2 onkogenų produktus. Šis naujas FAF polipeptidų šeimos narys išlaiko FAF hepariną jungiančias savybes, bet dar pasižymi unikaliu specifiskumu ląstelės-taikinio atžvilgiu. Šis augimo faktorius, pasirodo, yra specifinis epitelinėms ląstelėms
 30 ir ypač aktyvus keratinocitų atžvilgiu. Todėl šis naujas faktorius buvo pavadintas "keratinocitų augimo faktoriumi" (KAF). Nepaisant to, kad jis nėra aktyvus fibroblastų atžvilgiu, kadangi tai šeštas žinomas FAF polipeptidinės šeimos narys, KAF gali būti pažymėtas
 35 FAF-6.

Todėl šis išradimas iš dalies skirtas išgrynintiems KAF arba panašiams į KAF proteinams bei jų gavimo būdams. Tokie išgryninti faktoriai gali būti gauti, kultivuojant žmogaus ląsteles, kurios išskiria tokius proteinus iš prigimties ir taikant išskyrimo metodus pagal praktinį šio išradimo aspektą. Tokie proteinai gali būti panaudoti biocheminiams ir biologiniams tyrimams, vedantiems prie, pvz., DNR segmentų, koduojančių KAF arba į KAF panašų polipeptidą, išskyrimo.

Šis išradimas taip pat skirtas tokiems DNR segmentams, kurie koduoja KAF arba į KAF panašius proteinus. Pagrindiniame įgyvendinime šis išradimas skirtas DNR segmentams, kurie koduoja KAF giminingus produktus, susidedančius iš: žmogaus kDNR klonų 32 arba 49, gautų iš poliadenilintos RNR, ekstrahuotos iš žmogaus embriono plaučių fibroblasto ląstelinės linijos M426; šių klonų rekombinantų ir mutantų; giminingų DNR segmentų, kurie gali būti nustatyti hibridizacija su bet kuriais aukščiau minėtais žmogaus DNR segmentais; ir tokie giminingi segmentai koduoja į KAF panašius proteinus arba jų dalis.

Praktiškai realizuojant vieną šio išradimo įgyvendinimą, šio išradimo DNR segmentai sugeba pasireikšti tinkamose šeimininko ląstelėse, tuo pagamindami KAF arba į KAF panašius proteinus. Išradimas taip pat skirtas iRNR, gautų šio išradimo DNR segmentų jutimo sijų transkripcija.

Kitame įgyvendinime šis išradimas skirtas rekombinantinės DNR molekulei, susidedančiai iš šio išradimo vektoriaus ir DNR. Šių rekombinantinių molekulių pavyzdžiai yra molekulės, sudarytos iš KAF kDNR ir bet kurios iš šių vektorinių DNR: vektoriaus, klonuojančio bakteriofagą γ (kaip pavyzdys gali būti γ pCEV9); plazminio vektoriaus, nustatančio DNR seką (pvz., variantas

pUC); bakterinio geno ekspresijos vektoriaus (pvz., pKK233-2); arba žinduolio geno ekspresijos vektoriaus (toks kaip pMMT).

- 5 Dar kitame įgyvendinime šis išradimas apima ląstelę, geriau žinduolio ląstelę, transformuotą šio išradimo DNR. Be to, išradimas apima ląsteles, įskaitant vabzdžių ląsteles, mielių ląsteles ir bakterines ląsteles, tokias kaip *Escherichia coli* ir *B. subtilis*, trans-
- 10 formuotas šio išradimo DNR. Pagal kitą šio išradimo aspekto įgyvendinimą transformuojanti DNR sugeba būti išskirta ląstelėje, dėl ko padidėja KAF arba į KAF panašaus proteino, užkoduoto šia DNR, kiekis.
- 15 Pirminis KAF transliacijos produktas, prognozuotas iš jo kDNR sekos, turi N-galo hidrofobinę sritį, kuri, gal būt, yra kaip signalinė seka sekrecijai ir kurios nėra subrendusioje molekulėje. Šio išradimo genų ekspresijos aspekto tinkamiausiame įgyvendinime ląstelė, trans-
- 20 formuota šio išradimo DNR, išskiria proteiną, užkoduotą šios DNR, tokio (nupjauto) pavidalo, koks yra išskiriamas žmogaus embrioninio plaučio fibroplasto ląstelių.
- 25 Dar toliau, šis išradimas numato KAF arba į KAF panašius proteinus, gautus šio išradimo DNR ekspresija arba šio išradimo RNR transliacija. Geriau, kai tokie proteinai yra išskirto pavidalo (t.y. nėra aiškos signalinės sekos). Šie proteininiai faktoriai gali būti
- 30 panaudoti funkciniais tyrimams ir gali būti išgryninti papildomai struktūrinei ir funkicinei analizei, tokiai kaip kokybinė ir kiekybinė receptoriaus jungimo analizė.
- 35 Dar daugiau, sugebėjimas gaminti didelius šio naujo augimo faktoriaus kiekius rekombinantine technologija leis tikrinti jo klinikinį pritaikomumą būsenose, kur

specifinė epitelinių ląstelių augimo stimuliacija yra ypač svarbi.

Todėl į šį išradimą įeina farmaciniai mišiniai, susidedantys iš KAF arba į KAF panašių polipeptidinių, skirti vartoti ligos sąlygomis, pvz., nudegimo žaizdų gydymui arba transplantuoto ragenos audinio stimuliacijai.

10 Pagal šį išradimo įgyvendinimą nauji į KAF panašūs proteinais bus proteininiai šio išradimo "nemodifikuotų" DNR ir iRNR produktai arba bus modifikuoti ar gauti genų ekspresijos būdais proteininiai produktai. Kaip inžinerinių mutacijų DNR sekose rezultatas modifikuoti
15 į KAF panašūs proteinais turės vieną ar daugiau skirtumų aminorūgščių sekoje nuo atitinkamų gamtinių "laukinio tipo" proteinų. Pagal vieną šio išradimo aspekto įgyvendinimą modifikuoti į KAF panašūs proteinais turės "chimerines" molekules, susidedančias iš KAF amino-
20 rūgščių sekų ir bent vieno kito FAF peptidinės šeimos nario.

Galiausiai, pateikti analogiškų sėkmingų tyrimų su kitais peptidiniais faktoriais, turinčiais tas pačias
25 savybes, rezultatai, ir tokių chimerinių į KAF panašių polipeptidų išvystymas turėtų atvesti prie pagerintų į KAF- panašių "antros kartos" pavidalo peptidų, skirtų klinikiniams tikslams. Šie modifikuoti į KAF panašūs produktai gali būti mažesni, stabilesni, galingesni
30 ir/arba, pvz., lengviau ar pigiau pagaminami.

Į šį išradimą dar įeina bionalizės metodai iRNR ekspresijos žmogaus ląstelėse ir proteinų, gautų iš giminingų išradimo DNR segmentų, nustatymui. Pagal vieną toki
35 įgyvendinimą šio išradimo DNR gali būti panaudojama kaip zondas stacionarios būsenos lygių arba giminingų iRNR indukcijos kinetikos nustatymui. KAF giminingų

kDNR klonų buvimas įgalina nustatyti atvejus, kai klinikinėse būsenose, besiskiriančiose perteklišku epitelinių ląstelių augimu, įskaitant displaziją ir neoplaziją (pvz., psoriazė, piktybiniai arba gerybiniai augliai), yra anomali tokio augimo faktoriaus ekspresija.

Šis išradimas taip pat numato naujus antikūnus pap-
tidui, užkoduotam šio išradimo DNR segmentais. Šiame
išradimo įgyvendinime antikūnai yra iš prigimties mono-
kloniniai arba polikloniniai ir yra gaunami, pa-
naudojant KAF giminingus polipeptidus iš natūralių,
rekombinantinių arba sintetinių cheminių šaltinių.

Šio išradimo antikūnai specifiškai jungiasi prie KAF
arba prie į KAF panašaus proteino, kuris apima tokio
peptido seką, ir geriau, kai šis proteinas yra natyvos
(biologiškai aktyvios) konformacijos. Tokie antikūnai
gali būti naudojami KAF arba į KAF panašių proteininių
faktorių nustatymui arba gryninimui. Geriausiam šio
išradimo aspekto įgyvendinime antikūnai neutralizuos
KAF stimuliacinį aktyvumą, tuo įgalindami mechanis-
tinius tyrinėjimus ir, galų gale, klinikinių būklių,
apimančių pertekliškus KAF lygius, gydymą.

25

Trumpas figūrų aprašymas

Fig. I-1 pateikti kondicionuotos terpės iš M426 žmogaus
embrioninių fibroblastų heparino-Sefarozės afininės
chromatografijos rezultatai, rodantys, kad daugiau kaip
90% mitogeninio pelių keratinocitų (BALB/MK) aktyvumo
išplaunama eliuentu 0.6 M NaCl.

Fig. I-2 iliustruoja tolesnio mitogeno iš žmogaus
fibroblastų gryninimo rezultatus, panaudojant ASSC
(aukšto skiriamumo skystinę chromatografiją, HPLC-
angl.) su adsorbicine matrica. Nuotrauka (A) rodo

atvirkščios fazės (C_4) BALB/MK mitogeninio aktyvumo ASSC. Nuotraukoje (B) pateikti frakcijų, parinktų iš chromatografijos stadijos C_4 , parodytos nuotraukoje A, elektroforezinės ($NaDodSO_4/PAGE$) analizės duomenys, demonstruojantys faktą, kad ASSC pikų frakcijos turi vienintelę juostą sidabru apdažytame gelyje. Nuotrauka (C) yra DNR sintezės BALB/MK ląstelėse, veikiant frakcijoms, analizuotoms nuotraukoje B, grafikas, rodantis, kad santykinis mitogeninis aktyvumas gerai koreliuojasi su proteininės juostos aktyvumo profilyje intensyvumu.

Fig. I-3 parodyta alternatyvi gryninimo AF-ASSC stadija, panaudojant molekulinį sietų chromatografiją kolonėlėje (TSK G3000SW GlasPac) su vandeniniu tirpalu, esant pH artimam fiziologinio tirpalo pH, dėl ko gaunamas pagrindinis mitogeninio aktyvumo pikas BALB/MK bioanalizėje.

Fig. I-4 iliustruoja DNR sintezės BALB/MK, veikiant TSK-išgrynintam mitogenui ir kitiems augimo faktoriams, palyginimą.

Fig. I-5 rodo BALB/MK ląstelių augimo chemiškai apibrėžtoje terpėje, veikiant įvairioms augimo faktorių kombinacijoms, palyginimą.

I-1 lentelėje susumuoti įvairių gryninimo stadijų rezultatai, rodantys, kad molekulinį sietų chromatografija gaunamas žymiai geresnis aktyvumo regeneravimas, negu adsorbciniu AF-ASSC būdu.

I-2 lentelėje susumuoti įvairių augimo faktorių specifiskumo ląstelės-taikinio atžvilgiu duomenys, demonstruojantys, kad naujas išskirtas faktorius pasižymi stipriu mitogeniniu poveikiu keratinocitams (BALB-MK) ir, visiškai priešingai tam, neturi nustatomos įtakos

fibroblastams arba žmogaus poodinės venos endotelinėms ląstelėms.

Fig. II-1 pateikta nukleotidinė seka ir nustatyta KAF
5 kDNR aminorūgščių seka, kaip ir RNR, transkribuotą iš
KAF geno, identifikacija. Nuotraukoje (A) schematiškai
parodyti žmogaus KAF kDNR klonai. Nuotraukoje (B) pa-
vaizduotas KAF kDNR nukleotidas ir prognozuotos ami-
norūgščių sekos. (C) - KAF genų RNR matricų identi-
10 fikacija Northern apdažymo (Northern blot) analize.

Fig. II-2 iliustruoja giminingų molekulių, įskaitant,
FAF šeimos topologinį palyginimą, ypatingą dėmesį ski-
riant dviems proteinų duomenims, kurie turi aukštą
15 homologiją, numatomas signalines peptidų sekas ir dvi
užkonservuotas cisteino liekanas.

Fig. II-3 rodo giminingų KAF iRNR ekspresijos parink-
tose normaliose žmogaus ląstelės linijose ir audiniuose
20 analizės duomenis, atskleidžiančius, kad vienintelė 2.4
kb matrica buvo RNR iš žmogaus embrioninio plaučio
fibroplastų ir suaugusio odos fibroplastų, tuo tarpu
(B5/589) epitelinėse arba (HA83) glialinėse ląstelės
linijose, arba pirminėse žmogaus poodinės venos
25 endotelinių ląstelių kultūrose matricos nebuvo rasta.

II-1 lentelėje susumuotas heparino poveikio KAF mi-
togeniniam aktyvumui ir poveikio kitiems augimo fak-
toriams palyginimas, rodantis, kad timidino įvedimas į
30 BALB/MK ląstelių pagalba, veikiant KAF, buvo inhi-
buojamas heparinu, priešingai tiek rFAF, tiek bFAF
aktyvumui, kurie padidėjo, taip apdorojus.

Šis išradimas dalinai skirtas išgrynintiems KAF arba į
35 KAF panašiams proteinams ir šių proteinų paruošimo
būdams. Pagrindinis šio išradimo aspektas skirtas homo-
geniniam KAF, besiskiriančiam tariama 28 kDa molekuline

mase, besiremiančia migracija NaDodSO₄/PAGE, judėjimu vieninteliu piku atvirkščiosios fazės aukšto veikimo skystinės chromatografijos analizėje, ir mažiausiai 34×10^4 vienetų/miligramui, geriau mažiausiai 3.2×10^5 vienetų/miligramui specifiniu aktyvumu, kur vienas aktyvumo vienetas yra apibrėžiamas kaip kiekis, kuris sukelia pusę maksimalios galimos DNR sintezės stimuliacijos tam tikrose epitelinėse (keratinocitų) ląstelėse standartinėse sąlygose, nurodytose žemiau.

Tam, kad būtų identifikuoti nauji augimo faktoriai, specifiniai epitelinėms ląstelėms, naudojo kloninę BALB/c pelių keratinocitinę ląstelės liniją, pažymėtą kaip BALB/MK (Weissman, B.E. and Aaronson, S.A. (1983) *Cell* 32, 599, 606), kaip indikacinę ląstelę tokių faktorių aptikimui. Šios ląstelės priklauso nuo jų augimo ant epitelinės ląstelės mitogeno ekzogeninio šaltinio net terpėje, turinčioje serumo (Weissman, B.E. and Aaronson, S.A. (1983) *Cell* 32, 599, 606). Chemiškai apibrėžtos terpės šioms ląstelėms sukūrimas įgalina pademonstruoti faktą, kad BALB/MK proliferacijai reikia dviejų pagrindinių mitogeninių kelių. Vienas iš jų numato į insuliną panašaus I faktoriaus (arba didelės koncentracijos insulino) dalyvavimą, o kitam pakanka epiderminio augimo faktoriaus (EAF), transformuojančio augimo faktoriaus α (TGF α), rūgštinio fibroblastinio augimo faktoriaus (rFAF) arba bazinio fibroblastinio augimo faktoriaus (bFAF) (Falco, J.P., Taylor, W.G., DiFiore, P.P., Weissman, B.E., and Aaronson, S.A. (1988) *Oncogene* 2, 573-578).

Naudojant BALB/MK kaip prototipinę epitelinę ląstelinę liniją ir NIH/3T3 kaip jos fibroblastinę kontrdali, kondicionuotas terpes iš įvairių žmogaus ląstelių linijų analizavo dėl naujų specifinių mitogenų. Šie išradimo biologinės analizės metodai įgalina atlikti gryninimą iki vieno iš tokių naujų augimo faktorių,

išskiriamo žmogaus embrioninio plaučio fibroplastinės linijos ir pažymėto kaip keratinocitų augimo faktorius (KAF) homogeniškumo.

5 Trumpai, į KAF panašaus aktyvumo bionalizė standartinėse sąlygose susideda iš tokių stadijų:

(i) Pelių keratinocitai (BALB/MK ląstelės) yra auginami kultūroje iki susilieimo ir tada laikomi 24-72 valandas terpėje, neturinčioje serumo;

(ii) Įdėjus bandomuosius pavyzdžius, DNR sintezės stimuliacija nustato, įvesdami ^3H -timidino į rūgštimi nusodinamą DNR.

15

Tam, kad nustatytų mitogeninio augimo faktoriaus specifiškumą ląstelės-taikinio atžvilgiu, DNR sintezės stimuliacija, išreikšta kaip stimuliuotos sintezės ir foninio timidino įvedimo santykis, nesant pridėtinio bandomojo pavyzdžio, gali būti palyginta su analogiška stimuliacija, stebima ląstelėse, besiskiriančiose nuo keratinocitų tokiose pačiose analizės sąlygose. Tokiais palyginimais buvo nustatyta, kad KAF mitogeninis aktyvumas pasižymi aiškiai išreikštu specifiškumu keratinocitų atžvilgiu, skirtingai negu fibroblastų atžvilgiu (mažiausiai apie 500-kartinis stimuliacijos padidėjimas), ir mažesniu, bet žymiai (mažiausiai apie 50 kartų) stipresniu aktyvumu keratinocitų atžvilgiu negu kitų epitelinių ląstelių tipų atžvilgiu (žiūr. I-2 lentelę su tolesniais duomenimis ir I Eksperimentiniame skyriuje smulkesniam susipažinimui su standartinėmis bioanalizės sąlygomis).

Naudojant KAF gamybos būdą, apimantį ląstelių kultivavimą ir mitogeninio aktyvumo išskyrimą, kur toks būdas apima ultrafiltraciją, heparino-Sefarozės afininę chromatografiją (HSAC) ir adsorbcinę atvirkščios fazės

35

aukšto skiriamumo skystinę chromatografiją (AF-ASSC), arba, alternatyviai, molekulinį sietų ASSC (TSK-ASSC) pagal šį išradimą, buvo išskirtas preparato kiekis, pakankamas fiziniam ir biologiniam tokios molekulės smulkiam charakterizavimui.

Susumuojant, KAF gamybos iš produkuojančių ląstelių, tokių kaip M426 žmogaus embrioniniai fibroblastai (Aaronson, S.A. and Todaro, G.J. (1968) Virology 36, 254-261), būdas, pvz., susideda iš tokių stadijų:

(i) Kondicionuotos terpės paruošimas (pvz., 10 ltr), panaudojant monosluoksnes kultūras, gautas, cikliškaip apdorojant nuo terpės, kurioje yra serumo, iki terpės, neturinčios serumo, ir saugant serumo neturintį derlių -70°C temperatūroje iki tolesnio naudojimo;

(ii) Koncentravimas ultrafiltravimu, panaudojant membranas su 10 kDa molekulinės masės pralaidumu keliose nuoseklioje stadijose, atskleidžiant buferį (kad būtų palengvintas mažo molekulinio svorio medžiagų pašalinimas), paskui paprastai laikymas -70°C temperatūroje;

(iii) Afininė chromatografija heparine, sujungtame su polimeriniu pagrindu (pvz., Sefaroze), išplaunant eluentu - didėjančios NaCl koncentracijos gradientu;

(iv) Koncentracija iki 10-20 kartinio tūrio sumažinimo smulkaus mastelio ultrafiltraciniais įrengimais su pralaidumu iki 10 kDa molekulinės masės (pvz., mikrokoncentratorius Centrikon-10 iš Amicon) ir laikymas -70°C temperatūroje;

Kita gryninimo proceso stadija susideda arba iš stadijos (v) arba, alternatyviai, stadijos (vi), t.y.:

(v) Aktyvių frakcijų (0.6 M NaCl) iš ankstesnės HSAC stadijos AF-ASSC organinių tirpiklių sistemose;

arba

5

(vi) Molekulinių sietų ASSC (pvz., TSK-G3000SW Glas-Pac kolonėlė iš LKB) vandeniniame buferyje, kurio pH artimas fiziologiniam pH (pvz., Tris-HCl, pH 6.8/0.5 M NaCl), po to laikymas -70°C temperatūroje.

10

Preparatas, gautas TSK stadijoje (vi) buvo beveik toks pat grynas, kaip ir preparatas, gautas iš AF-ASSC, sprendžiant pagal NaDodSO₄/PAGE dažant sidabru analizę (duomenys nepateikti); bet TSK būdas davė žymiai geresnę aktyvumo regeneraciją (I-1 lentelė). Be to, TSK-išgryninta medžiaga pasižymėjo žymiai didesniu specifiniu aktyvumu, negu medžiaga, gauta AF-ASSC. KAF, gautas aukščiau aprašytu būdu TSK, stimulavo DNR sintezę epitelinėse ląstelėse subnanomolinėse koncentracijose, bet neindukavo jokio timidino įvedimo į fibroblastų arba endotelinių ląstelių DNR, esant palyginamoms arba aukštesnėms koncentracijoms (iki 5 mM). Toks aktyvumas jautrus rūgštims, šilumai ir tirpikliams, naudojamiems AF-ASSC stadijoje (žiūr., I Eksperimentinį skyrių, jautrumo duomenis ir kitas gamybos būdo detales).

20

25

30

Naudojant standartinę metodologiją, gerai žinomą šioje srityje, buvo nustatyta nedviprasmiška aminorūgščių seka padėtims 2-13 iš išgryninto KAF galo:

Asn-Asp-Met-Thr-Pro-Glu-Gln-Met-Ala-Thr-Asn-Val (žiūr. I Eksperimentinį skyrių).

35

I šį išradimą taip pat įeina DNR segmentai, koduojantys KAF ir į KAF panašius polipeptidus. Šio išradimo DNR pavyzdžiais gali būti tokios DNR: žmogaus kDNR

klonai 32 ir 49, gauti iš poliadenilintų RNR, ekstrahuotų iš žmogaus embrioninio plaučio fibroblasto ląstelės linijos M426; šių klonų rekombinantai ir mutantai; giminingi DNR segmentai, kurie gali būti nustatyti šių DNR segmentų hibridizacija.

Kaip aprašyta II Eksperimentiniame skyriuje, kDNR klonų, atitinkančių KAF aminorūgščių sekos žinomą dalį, paieškai buvo sudaryti du oligonukleotidinių zondų pulai, remiantis visomis galimomis nukleotidinėmis sekomis, koduojančiomis devintą amino rūgščių seką, Asn-Asp-Met-Thr-Pro-Glu-Gln-Met-Ala. kDNR biblioteka buvo konstruojama kDNR klonuojančiame vektoriuje, γ pCEV9, panaudojant poliadenilintą RNR, ekstrahuotą iš žmogaus embrioninio plaučio fibroblastų ląstelinės linijos M426, kuri buvo pradinis augimo faktoriaus šaltinis.

Bibliotekos skринingas (9×10^5 trombocitų) su ^{32}P -žymėtų oligonukleotidų identifikavo 88 trombocitus, kurie hibridizavo su abiem zondais.

Iš 10 išvalytų nuo trombocitų klonų, kurie buvo analizuojami, vienas, pažymėtas kaip 49 klonas, turėjo 3.5 kb kDNR intarpą, tuo tarpu kiti turėjo intarpus intervale 1.8 kb - 2.1 kb. Smulkesnių klonų analizė įgalino aptikti kelis bendrus restrikcinius saitus, o vieno iš smulkių klonų, pažymėto kaip 32 klonas, kartu su 49 klonu, aminorūgščių sekos nustatymas parodė, kad jie yra persidengiančios kDNR (II-1A brėž.). Dviejų tokių kDNR išnagrinėjimas leido nustatyti 3.85 kb tolydinę seką, turinčią pilną KAF koduojančią seką. Jautrios DNR sijos nukleotidinė seka ir užkoduota prognozuota pirmino proteino seka parodytos II-1B brėžinyje pilno ilgio sudėtiniai KAF kDNR sekai.

Šios DNR, kDNR 32 ir 49 klonai, kaip ir šių segmentų rekombinantinės formos, apimančios pilną KAF koduojančią seką, yra tinkamiausios šio išradimo DNR.

- 5 Iš sekos kDNR aiškiai seka, kad pradinio KAF ir hst transliacijos produktai turi hidrofobines N-galo sritis, kurios kaip matyti, yra signalinės sekos tokių sekų panašumo įvairiuose kituose proteinuose pagrindu. Todėl tokios N-galo srities nėra išgryninto subrendusio KAF molekulėje, kuri yra išskiriama žmogaus embrioninių fibroplastų.

- Be to, KAF dalinasi su visais kitais FAF šeimos nariais dvi pagrindines homologijos sritis, apimdamos aminorūgštis 65-156 ir 162-189 prognozuotoje KAF sekoje, kurios yra atskirtos įvairaus ilgio aminorūgščių nehomologinėmis serijomis skirtinguose šeimos nariuose.

- 20 Išgryninto pavidalo KAF seka turi penkias cisteino liekanas, iš kurių dvi išlieka visoje FAF giminingų proteinų šeimoje. FAF sekoje sutinkamos penkios pagrindinių liekanų poros. Toks pat vaizdas stebimas kituose KAF šeimos nariuose.

- 25 Šios srities specialistui turėtų būti suprantama, kad panaudojant šio išradimo DNR ir RNR hibridizacijos metoduose (tokiuose kaip genominių žmogaus DNR Southern apdažymo analizė -Southern blot analysis-angl.), ypač tinkamiausias DNR, išvardintas čia aukščiau, be nepageidaujamo eksperimentavimo, galima ekranizuoti genomes arba kDNR bibliotekas kitų į KAF panašių DNR, kurios patenka į šio išradimo sritį, suradimui. Be to, taip panaudojant šio išradimo DNR, genetiniai markeriai, susieti su KAF genu, tokie kaip apriboto fragmentų ilgio polimorfizmai (RFLF), gali būti identifikuoti ir susieti su paveldėtomis klinikinėmis būklėmis, apimančiomis šį ir kitus artimus jam genus.

Šis išradimas taip pat apima modifikuotas KAF DNR formas. Pagal svarbiausią šio išradimo aspekto įgyvendinimą tokios modifikuotos DNR koduoja į KAF panašius proteinus, apimančius KAF aminorūgščių sekų segmentus ir bent vieną kitą FAF peptidinės šeimos narių. Taip, pvz., kadangi nėra žymios N-galo homologijos tarp KAF išskirtos formos ir analogiškų padėčių kituose KAF gimininguose proteinuose, polipeptidai su naujomis struktūrinėmis ir funkcionalinėmis savybėmis gali būti sukurti, išskiepįjant DNR segmentus, koduojančius atskirus N-galo kito polipeptido segmentus FAF šeimoje į KAF DNR segmentą vietoje jo įprastos NH₂-galo sekos.

Polipeptidinės chimeros, pagamintos tokių modifikuotų DNR, yra naudingos, kad nustatytume, ar KAF NH₂-galo sritis yra pakankama jos unikalaus specifiškumo ląstelės-taikinio atžvilgiu nustatymui. Tokių chimelių tyrinėjimas taip pat aprūpina informacija apie sričių prigimtį, nuskančią įvairią heparino įtaką biologiniam aktyvumui.

Iš tikrųjų, šio būdo naudingumas buvo patvirtintas sėkminga inžinerija ir ekspresija molekulės, kurioje apie 40 aminorūgščių iš išskirtos KAF formos NH₂-galo (pradedant nuo subrendusio KAF amino terminalinės cys liekanos, brėž. II-1 priskirtas numeris 32, ir baigiant KAF liekana 78, arg) yra sujungta su apie 140 rKAF apvalkalo CO₃-galo aminorūgščių (pradedant liekana 39, arg, ir tęsiant iki rFAF koduojančios sekos C-galo). Toks chimerinis produktas turi pirmenybę keratinocitams kaip KAF ląstelės-taikinio atžvilgiu, bet neturi jautrumo heparinui, dėl ko jis labiau panašus į rFAF negu KAF.

Toks naujas į KAF panašus augimo faktorius gali turėti pranašumų klinikiniuose taikymuose, kur reikia vartoti

epiteliškai specifinį augimo faktorių, esant heparinui, visuotinai priimtam antikoagulantui. Kitos šios chimerinės molekulės konstrukcijos detalės ir polipeptido savybės aprašytos II Eksperimentiniame skyriuje.

5

Kitos šio išradimo DNR apima tokias rekombinantinių DNR molekules, susidedančias iš kDNR KAF ir bet kurios iš tokių vektorinių DNR: klonuojantis bakteriofago vektorius (ypCEV9); nustatančios aminorūgščių seką plazmidės DNR vektorius (pUC variantas); bakterinės ekspresijos vektorius (pKK233-2); arba žinduolių ekspresijos vektorius (pMMT/neo). Tokių rekombinantinių DNR konstrukcijų pavyzdžiai smulkiai aprašyti Eksperimentiniuose skyriuose.

15

Labiausiai tinkamos rekombinantinės molekulės yra šios: molekulės, susidedančios iš koduojančios sekos KAF išskirtai formai ir bakterinio ekspresijos vektoriaus (pvz., pKK233-2) arba kDNR, koduojančios visą pirminės transliacijos produktą (įskaitant NH₂-galo signalinį peptidą), taip pat žinduolių ekspresijos vektoriaus (pvz., pMMT), galinčio išskirti įterptą DNR žinduolių ląstelėse (pvz., NIH/3T3).

25 Rekombinantinių DNR, turinčių KAF DNR ir bakterinės ekspresijos vektorių, konstrukcija yra aprašyta II Eksperimentiniame skyriuje. Trumpai, KAF kDNR buvo išskirta, kad pagamintų polipeptidą *E. coli*, patalpinant jo koduojančią seką, kontroliuojant hibridiniam trk promotoriui, plazmidiniame ekspresijos vektoriuje pKK233-2) (Amman, E. and Brosius, J. (1985) *Gene* 40, 183).

30

Rekombinantinių DNR, turinčių KAF DNR ir žinduolių vektorių, galinti išskirti įterptą DNR kultivuotose žmogaus arba gyvulio ląstelėse, sudarymas gali būti atliktas pagal standartinę genų ekspresijos technologiją, panaudojant metodus, gerai žinomus šioje

35

srityje tokio palyginus paprasto polipeptido ekspresijai. Vienas specifinis šio išradimo aspekto rekombinantinės DNR įgyvendinimas, įjungiantis žinduolių vektorių pMMT, yra aprašytas žemiau šioje sekcijoje, skirtoje šio išradimo rekombinantinėms ląstelėms.

Šio išradimo DNR ir RNR su jautriomis sijomis gali būti panaudotos kartu su šio išradimo proteino gamybos būdais, kad būtų pagaminti dideli kiekiai iš esmės gryną KAF arba į KAF panašių proteinų. Taip pagamintas iš esmės grynas KAF proteinas gali būti panaudotas, naudojant gerai žinomus būdus diagnostinėje analizėje nustatyti receptorių tokiam proteinui buvimą įvairiuose organizmo skysčiuose ir pavyzdžiuose.

Todėl šis išradimas taip pat apima ląstelę, geriau bakterinę arba žinduolių ląstelę, transformuotą su šio išradimo DNR, kur transformuojanti DNR gali būti išskirta. Tinkamesniame šio išradimo įgyvendinime ląstelė, transformuota šio išradimo DNR, gamina KAF proteiną visiškai mitogenine forma. Geriausia, kai šie proteinai bus išskirtos formos (pvz., neturintys aki-vaizdžios signalinės sekos). Šie proteino faktoriai gali būti panaudoti funkciniais tyrimams ir gali būti išgryninti papildomai biocheminei ir funkcinei analizei, tokiai kaip kokybinė ir kiekybinė receptoriaus jungimo analizė.

Rekombinantinės E coli ląstelės buvo sudarytos bakteriniame ekspresijos vektoriuje, pKK233-2, KAF gamybai, kaip smulkiai aprašyta II Eksperimentiniame skyriuje. Susumuojant, keli rekombinantiniai bakteriniai klonai buvo išskirti dėl proteino gamybos įprastais smulkiamasteliniais metodais. Visi tirti rekombinantai sintezavo proteiną, apie ką liudijo antikūnai, atsirandantys amino-terminaliniam KAF peptidui. Vienas rekombinantas buvo auginamas viename litre kultūros,

kuri augino rekombinantinį KAF, kuris efektyviai stimuliavo timidino įvedimą į BALB/MK keratinocito ląstelių DNR, bet buvo tik nežymiai aktyvus NIH/3T3 fibroblastų atžvilgiu. Pusė maksimalios BALB/MK ląstelių stimuliacijos standartinėje keratinocito bioanalizėje buvo pasiekta, esant koncentracijai tarp 2 ir 5 ng/ml, palyginus su 10-15 ng/ml koncentracija KAF, išvalytam nuo M426 ląstelių.

Iš vieno bakterinių ląstelių litro buvo gauta apytikriai 50 mg Mono-S išgryninto rekombinantinio KAF. Genų ekspresijos srities specialistui bus akivaizdu, kad ši pradinė išeiga gali būti pagerinta iš esmės be nepageidaujamo eksperimentavimo, taikant įvairias žinomas rekombinantinės DNR technologijas.

Rekombinantinės žinduolių (NIH/3T3 pelė) ląstelės taip pat buvo sudarytos, panaudojant KAF kDNR koduojančią seką (įskaitant NH₂-galo signalinį peptidą) ir vektorių pMM/neo, kuris neša pelės metalotionino (MMT) promotorių ir selektyvų žymėtą geną neomicino stabilumui. Buvo įvertintas šios ląstelės dalyvavimas KAF gamyboje, ypač įtaka subrendusios formos (nesant signalinio peptido), gaminamos žmogaus fibroblastų sekrecijai, panaudojant šio išradimo bioanalizę. Tokio pat vektoriaus ir ląstelės-šeimininko kombinacija buvo sėkmingai panaudota išskirti kelis kitus panašius rekombinantinius polipeptidus, įskaitant aukštus augimo faktorių A ir B, išvestų iš trombocitų (TIAF), grandinių lygis (MSakai, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Norn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim. N. (1985) *Science* 230, 1350-1354). Todėl šios srities specialistui bus aišku, kad didelės rekombinanto KAF išeigos gali būti pasiektos šiuo būdu, naudojant aukščiau minėtas rekombinantines DNR ir transformuotas šio išradimo ląsteles.

Galimausiai, gali būti panaudota stambiamolekulinė gamyba, kad išgalintų klinikinį tyrimą būklėse, reikalaujančiose specifinės epitelinių ląstelių augimo stimuliacijos. Medžiagos ir metodai farmacinių mišinių paruošimui, kad galima būtų vartoti polipeptidus lokaliai (odai arba, pvz., akies ragenai) ar sistemingai yra gerai žinomi šioje srityje ir gali būti greitai pritaikomi, vartojant KAF ir į KAF panašius peptidus be nepageidaujamo eksperimentavimo.

Į šį išradimą taip pat įeina nauji antikūnai prieš peptidą, užkoduotą šio išradimo DNR segmento. Šio išradimo aspekto įgyvendinimas pateiktas keliais antikūnų, atpažįstančių KAF, pavyzdžiais. Jie buvo paruošti, naudojant standartinę metodologiją, gerai žinomą eksperimentinės imunologijos srityje, kaip nurodyta II Eksperimentiniame skyriuje. Šie antikūnai apima: monokloninius antikūnus, atsirandančius pelėse prieš nepažeistą išgrynintą proteiną iš žmogaus fibroplastų; polikloninius antikūnus, atsirandančius triušiuose prieš sintetinius peptidus su sekomis aminorūgščių sekų pagrindu, prognozuotų iš KAF kDNR sekos [pavyzdžiu gali būti peptidas su KAF liekanų 32-45 seka, būtent, NDMTPEQMATNVR (panaudojant standartinį vienos raidės kodą aminorūgščių sekoms; žiūr. II-1 brėž.)]; polikloninius antikūnus, atsirandančius triušiuose tiek prieš iš žmogaus fibroplastų natūraliai išskirtą KAF, tiek prieš rekombinantinį KAF, pagamintą E. coli (žiūr. aukščiau).

Visi tirti antikūnai atpažįsta rekombinantinį, kaip ir natūraliai atsirandantį KAF, arba kietos fazės analizėje (ELISA) ir arba Western blot analizėje. Kai kurie antikūnų pavyzdžiai, kuriems teiktina pirmenybė pagal šį išradimą, skirti neutralizuoti mitogeninį KAF aktyvumą BALB/MK bioanalizėje.

Šio išradimo antikūnų fragmentai, tokie kaip Fab arba (9ab)' fragmentai, kurie išlaiko antigeną jungiantį aktyvumą ir gali būti paruošti metodais, gerai žinomais šioje srityje, taip pat įeina į šio išradimo sritį. Be to, į šį išradimą įeina šio išradimo antikūnų ar jų aktyvių fragmentų farmacinės kompozicijos, kurios gali būti paruoštos, naudojant medžiagas ir metodus farmacinių kompozicijų su polipeptidais paruošimui, kurie yra gerai žinomi šioje srityje ir gali būti greitai pritaikomi KAF arba į KAF panašių peptidų vartojimui be nepageidaujamo eksperimentavimo.

Šie antikūnai, jų aktyvūs fragmentai gali būti panaudoti, pvz., KAF aptikimui bioanalizėje arba proteinių faktorių gryninimui. Jie taip pat gali būti panaudoti būduose, gerai žinomuose šioje srityje KAF receptorių išskyrimui, kurie, kaip aprašyta II Eksperimentiniame skyriuje, atrodo, skiriasi nuo visų kitų žinomų augimo faktorių receptorių.

Šie tinkamesni antikūnai, jų fragmentai ir farmacinės kompozicijos, kurie neutralizuoja KAF mitogeninį aktyvumą epitelinių ląstelių atžvilgiu, kaip nustatyta BALB/MK analize, pvz., gali būti panaudoti klinikinių būklių, besiskiriančių perteklišku epitelinių ląstelių augimu, įskaitant displaziją ir neoplaziją (pvz., psoriazę arba gerybinius ar piktybinius auglius), gydymui.

Į šį išradimą dar įeina nauji bioanalizės metodai genų, giminingų šio išradimo DNR, ekspresijos nustatymui. Kai kuriuose šio išradimo įgyvendinimuose šio išradimo DNR buvo panaudotos kaip zondai nustatyti giminingų irNR pastovios būsenos lygius. Šie išradimo bioanalizės būdai, panaudojant KAF DNR ir standartinius Northern-blot būdus, yra smulkiai aprašyti II Eksperimentiniame skyriuje.

5 Įgudusiam šioje srityje bus aišku be nepageidaujamo eksperimentavimo, kad tokie metodai gali būti greitai pritaikomi genų ekspresijos į KAF panašiams proteinams analizei arba atskirose ląstelėse, arba įvairiuose audiniuose. Tokia bioanalizė gali būti naudinga, pvz., auglio ląstelių įvairių klasių arba genetinių defektų epiteliniuose augimo procesuose identifikavimui.

10 Be tolesnių tikslinimų tikimasi, kad vidutinis specialistas šioje srityje, panaudodamas aukščiau pateiktą aprašymą ir taikydamas būdus, aprašytus Eksperimentiniuose skyriuose, galės pritaikyti šį išradimą jo išsamesniam kontekste. Medžiaga, pateikta eksperimentiniuose skyriuose, jei nepažymėta kitaip, pateikta
15 kaip iliustracijos ir jokių būdu neapriboja pridedamos išradimo apibrėžties.

II EKSPERIMENTINIS SKYRIUS

Naujo specifinio epitelinems ląstelėms augimo faktoriaus identifikacija ir charakterizavimas

5 Šiame skyriuje aprašomas eksperimentinis darbas, vedantis į augimo faktoriaus, specifinio epitelinių ląstelių atžvilgiu, identifikaciją. Faktorius, sąlyginai pavadintas keratinocito augimo faktoriumi (KAF) dėl jo
10 dominuojančio aktyvumo tokio tipo ląstelių atžvilgiu, buvo gryninamas iki homogeniškumo ultrafiltracijos, heparino-Sefarozės afininės chromatografijos ir hidrofobinės chromatografijos C_4 atvirkščios fazės ASSC kolonėlėje kombinacija pagal šio išradimo būdus. Buvo
15 rasta, kad KAF yra labilus tiek rūgščių, tiek šilumos veikimo atžvilgiu ir sudarytas iš vienos polipeptidinės grandinės su tariama maždaug 2800 Daltonų molekuline mase. Išgrynintas KAF buvo galingas mitogenas epitelinių ląstelių atžvilgiu, galintis stimuliuoti DNR
20 sintezę BALB/MK epiderminiuose keratinocituose ramybės būklėje, padidinant aktyvumą daugiau kaip 500 kartų, esant 0.1 nM, ir pasiekiant maksimumą, esant 1.0 nM. Mitogeninio aktyvumo nebuvimas tiek fibroplastų, tiek endotelinių ląstelių atžvilgiu parodė, kad KAF pasižymi
25 specifiškumu ląstelei-taikiniui, kuris skiriasi nuo bet kurio aukščiau charakterizuoto augimo faktoriaus. Amino rūgščių sekos nustatymas mikrometodais leido nustatyti amino-terminalinę seką, neturinčią žymios homologijos su bet kuriuo žinomu proteinu. Tokio naujo
30 augimo faktoriaus išskyrimas žmogaus embrioniniais fibroplastais rodo tai, kad KAF vaidina tam tikrą vaidmenį mezenchiminėje normalios epitelinės ląstelės proliferacijos stimuliacijoje.

BŪDAI IR MEDŽIAGOS**Kondicionuotas terpės paruošimas**

5 Ankstyvas M426 žmogaus embrioninių fibroplastų ((Aaronson, S.A. and Todaro, G.J. (1968) Virology 36, 254-261) perkėlimas buvo išdėstytas 175 cm² T-formos kolbose ir auginamas 10-14 dienų Dulbecco modifikuotoje Eagle terpėje (DMEM; GIBCO), papildytoje 10% jaučio serumu
10 (GIBCO). Užbaigus šią operaciją, monosluoksniai savaite buvo cikliška apdorojami terpių diapazonu nuo tokios, kurioje buvo serumo, iki tokios, kurioje jo nebuvo, pastarajai susidedant vien iš DMEM. Ląstelės buvo dukart perplautos 5 ml fosfatinio buferinio tirpalo,
15 prieš pridedant 20 ml DMEM. Po 72 valandų kultivuotus skysčius surinkdavo ir pakeisdavo 35 ml serumo turinčios terpės. Kondicionuota terpė buvo laikoma -70°C temperatūroje iki tolesnio naudojimo.

20 Ultrafiltracija

Maždaug 10 ltr kondicionuotos terpės buvo atitirpinta, iš anksto filtruota per 0.50 mikronų filtrą (Millipore HAWP 142 50) ir koncentruota iki 200 ml tūrio, panaudojant Pellicon kasetinę sistemą (Millipore XX42 00K
25 60) ir kasetę, turinčią 10 kDa molekulinės masės pralaidumą (Millipore PTGC 000 05). Po koncentravimo bandinys buvo iš eilės atskiestas vienu litru 20 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.3 M NaCl, ir po kiekvieno tokio atskiedimo stadijos buvo atliekama ultrafiltracija su
30 Pellicon sistema. Regeneruotas retentate aktyvumas iš karto buvo taikomas heparino-Sefarozės dervai arba laikomas -70°C temperatūroje.

Heparino-Sefarozės afininė chromatografija (HSAC)

Retentatas iš ultrafiltracijos stadijos buvo pakrautas ant heparino-Sefarozės dervos (Pharmacia), kuri nulygsvarinta 20 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.3 M NaCl. Derva buvo intensyviai plaunama tol, kol optinis tankis sugrižo prie foninės reikšmės, ir tada paveikiama didėjančios NaCl koncentracijos tiesiniu gradientu. Pašalinus alikvotas iš frakcijų timidino įvedimo bioanalizei, surinktos frakcijos sukonzentruojamos 10-20 kartų Centricon-10 mikrokonzentratoriumi (Amicon) ir laikomos -70°C temperatūroje.

Atvirkščios fazės ASSC (AF-ASSC)

Aktyvios frakcijos (0.6 M NaCl) iš HSAC buvo atitirpintos, supiltos ir papildomai koncentruotos su Centricon-10 iki galutinio tūrio ≤ 200 μ l. bandinys buvo pakrautas į Vydac C₄ ASSC kolonėlę (The Separation Group, Hesperia, CA), kuri buvo ekvilibruojama 0.1% trifluoro acto rūgštyje (TFA, Fluka)/20% acetonitrile (Baker, HPLC grade-angl.) ir išplauta eliuente didėjančio acetonitrilo tiesiniame gradientu. Alikvotos bioanalizei buvo nedelsiant atskiestos 50 μ g/ml BSA (Fraction V, Sigma)/20 mM Tris-HCl, pH 7.5 10-kartiniu pertekliumi. Likusi bandinio dalis buvo išdžiovinta Speed-Vac (Savant) struktūrinei analizei.

Molekulinių sietų ASSC

Maždaug 50 μ l dukart koncentruotų heparino-Sefarozės frakcijų buvo pakrauta į TSK-G3000SW Glas-Pac kolonėlę, kuri buvo nulygsvarinta 20 mM Tris-HCl, pH 6.8/0.5 NaCl. Bandinys buvo išplautas eliuente - šiame buferyje su 0.4 ml/min. srauto greičiu. Atskyrus alikvotas bioanalizei, frakcijos buvo laikomos -70°C temperatūroje.

NaDodSO₄-poliakrilamido gelių elektroforezė (NaDodSO₄/PAGE)

Poliakrilamido geliai buvo paruošti su NaDodSO₄ pagal Laemmli (Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685) procedūrą. Bandiniai buvo verdami 3 minutes, esant 2.5% 2-merkaptoetanoliui (tūr./tūr.). Geliai buvo fiksuoti ir padengti sidabru (Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. and Ebert, M.H. (1981) *Science* 211, 1437-1438), panaudojant reagentus ir metodiką iš BioRad. Molekulinės masės markeriai buvo gauti iš Pharmacia firmos.

DNR sintezės stimuliacija

96 duobučių mikrotitruotos plokštelės (Falcom No. 3596) buvo padengtos žmogaus fibronektiniu (Collaborative Research) 1 µg. cm² tankiu, prieš užsėjant BALB/MK ląstelėmis. Po to ląstelės buvo laikomos 24-72 valandas terpėje be serumo, turinčioje 5 µg/ml transferino (Collaborative Research) ir 30 nM Na₂SeO₃ (Baker).

³H-timidino (5µCi/ml galutinė koncentracija, NEN) įvedimas į DNR buvo matuojamas 6 valandas, pradedant 16 valandų po pavyzdžių pridėjimo. Analizė buvo baigta, perplaunant ląsteles kartą su atšaldytu ledu fosfatiniu buferiu ir dukart 5% trichloracto rūgštimi. Nuosėdos buvo vėl ištirpintos 0.25 M NaOH, perneštos į scintiliacinį skystį (Biofluor, NEN) ir buvo atlikti skaičiavimai.

DNR sintezės stimuliacija buvo reguliuojama, kaip aprašyta BALB/MK ląstelėms, naudojant didelį kiekį kitų ląstelinių linijų. NIH/3T3 fibroblastai (Jainchill, J.L., Aaronson, S.A. and Todaro, G.J. (1969) *J.Virol.* 4, 549-553) buvo gauti iš National Institutes of Health, tuo tarpu beždžionių bronchinės epitelinės ląstelės (Caputo, J.L., Hay, R.J. and Williams, C.D. (1979) *in Vitro* 15, 222-223) buvo gautos iš Amerikos Tipinių

kultūrų kolekcijos (American Type Culture Collection). Žmogaus pieno liaukos epitelinė ląstelė linija, paruošta kaip aprašyta Stampfer (Stampfer, M.R. and Bartley, J.C. (1985) *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 82, 2394-2398) buvo gauta iš Martha Stampfer (University of California, Berkeley). Pieno liaukos ląstelės buvo auginamos RPMI 1640 papildytoje 10% jaučio vaisiaus serumu ir 4 ng/ml EGF. Laikant sąlygose be serumo, pagrindinė aplinka buvo DMEM. Žmogaus poodinės venos endotelinių ląstelių pirminės kultūros buvo paruoštos ir laikomos, kaip aprašyta nuorodoje (Sharefkin, J.B., Fairchild, K.D., Albus, R.A., Cruess, D.F. and Rich, N.M. (1986) *J. Surgical Res.* 41, 462-472). Epiderminis augimo faktorius ir insulinas buvo gauti iš Collaborative Research. Rūgštinis FAF ir bFAF buvo gauti iš Kalifornia Biotechnology, Inc. Rekombinantinis TGF α buvo gautas iš Genetch, Inc. Terpė ir serumas buvo arba iš GIBCO, Biofluids, Inc., arba tai buvo terpė NIH.

20 Proliferacijos analizė

35 mm kultivavimo lėkštelės buvo iš anksto padengtos nuosekliai poli-D-lizinu ($20\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Sigma) ir žmogaus fibronektinu, tada apsėti su maždaug 2.5×10^4 BALB/MK ląstelių. Pagrindinė terpė buvo mišinys santykiu 1:1 Eagle mažo turinio Ca^{2+} minimalios esminės terpės ir Ham F-12 terpės, papildytos 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transferino, 30 nM Na_2SeO_3 ir 0.2 mM etanolamino (Sigma). Terpė buvo keičiama kas 2 arba 3 dienos. Po 10 dienų ląstelės buvo fiksuojamos formaline (Fischer Scientific Co.) ir apdarytos Giemsa (Fisher Scientific Co.).

Proteino sekos mikronustatymas

35 Maždaug 4 μg (.150 pmol) proteino iš aktyvių C_4 kolonėlės frakcijų buvo vėl ištirpinta 50% TFA ir pakrauta į dujinės fazės proteino sekvensorių (Applied Bio-

systems). Buvo atlikta 20 degradacijos pagal Edman cilų ir aminorūgščių darinių identifikacija su automatozuota ASSC (Modelis 120A Applied Biosystems).

REZULTATAI

Augimo faktoriaus nustatymas ir išskyrimas

- 5 Preliminarus kondicionuotos terpės iš įvairių ląstelės
linijų skrinimas parodė, kad terpė iš kai kurių fibro-
blasto linijų pasižymėjo mitogeniniu aktyvumu, nusta-
tomu tiek BALB/MK, tiek NIH/3T3 ląstelėse. Tuo tarpu,
kai virimas suardo BALB/MK aktyvumą, mitogeninis
10 NIH/3T3 aktyvumas lieka nepalietas. Remiantis žinomais
duomenimis apie tai, kad EAF (Cohen, S. (1962) *J. Biol.*
Chem. 237, 1555-1562) ir TAF α (DeLarco, J.E. and
Todaro, G.J. (1978) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 75, 4001-
4005) yra termiškai stabilios medžiagos, natūralu
15 daryti prielaidą, kad BALB/MK mitogeninis aktyvumas
susijęs su agento, besiskiriančio nuo šių žinomų
epitelinių augimo faktorių, buvimu.
- 20 M426 žmogaus embrioninio fibroplasto linija buvo pa-
rinkta kaip produktyviausias tokio aktyvumo šaltinis
augimo faktoriaus išgryninimui. Ultrafiltracija Pelli-
con sistema suteikė patogų kelią bandinio tūriui
sumažinti iki tinkamo lygio tolesnei chromatografijai.
Buvo išbandytos įvairios sietų jonų mainų ir izoelek-
25 trinio fokusavimo chromatografijų kombinacijos, bet
visos davė nepriimtina mažas išeigas. Iš kitos pusės
heparino-Sefarozės afininė chromatografija (HSAC), kuri
buvo panaudota kitų augimo faktorių gryninime (Raines,
E.W. and Ross, R. (1982) *J.Biol.Chem.* 257, 5154-5160;
30 Shing, Y. Folkman, J. Sullivan, R., Butterfield, C.,
Murray, J. and Klagsburn, M. (1984) *Science* 223, 1296-
1299; Gospodarowicz, D., Cheng, J., Lui G.-M., Baird, A.
and Bohlen, P. (1984) *proc.Natl.Acad.Sci. USA* 81, 6963-
6967; Maciag, T., Mehlman, T., Friesel, R. and
35 Schreiber, A.B. (1984) *Science* 225, 932-935; Conn.G.
and Hatcher, V.B. (1984) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 124,
262-268; Lobb, R.R. and Fett, J.W. (1984) *Biochemistry*

23, 6295-6299), pasirodė esanti naudinga kaip ankstyvoji šio išradimo gryninimo stadija. Nors regeneruoto specifinio aktyvumo įverčiai buvo nežinomi šioje stadijoje dėl galimo kitų faktorių buvimo, tariama
5 aktyvumo išeiga buvo 50-70% su atitinkamu 1000 kartų praturtinimu.

Kaip parodyta Fig. I-1, daugiau negu 90% BALB/MK mitogeninio aktyvumo išsiplauna iš HSAC kolonėlės su 0.6 M
10 NaCl. Toks aktyvumo pikas nesusijęs su kokiu nors aktyvumu NIH/3T3 ląstelių atžvilgiu (duomenys neparodyti). Žymiai mažesnis BALB/MK mitogeninio aktyvumo pikas išryškėja, esant 0.8-1.2 M NaCl.

15 Dėl HSAC bandinio atstatomumo aktyvios frakcijos galėjo būti identifiкуotos profilio gradiento ir optinio aktyvumo pagrindu. 10-20-kartinis koncentravimas su Centri-con-10 pasirodė esąs esminis stabilumui, kuris galėjo būti palaikomas -70°C temperatūroje kelis mėnesius.

20 Tolesnis gryninimas buvo atliekamas AF-ASSC su C₄ Vydac kolonėle, ir tai buvo paruošiamasis būdas, tinkantis aminorūgščių sekos analizei. Nors aktyvumo išeiga iš stadijos C₄ buvo paprastai tik keli procentai, šis praradimas gali būti priskirtas naudojamiems tirpikliams.
25 Kituose eksperimentuose vienos valandos eksponavimas sistema 0.1% TFA/50% acetonitrilo kambario temperatūroje sumažino preparato mitogeninį aktyvumą 98%. Vis dėlto, kaip parodyta (Fig. I-2) buvo gautas vienintelis
30 BALB/MK stimuliacinio aktyvumo pikas, kas suderinama su aiškiu piku optinio tankio profilyje. Piko frakcijos duoda vienintelę juostą NaDodSO₄/PAGE ir gelio apdažyme sidabru (Fig. I-2B), o santykinis momentinis kiekvienos išbandytos frakcijos aktyvumas (Fig. I-2C) gerai ko-
35 reliuojasi su juostos intensyvumu aktyvumo profilyje.

Alternatyvi gryninimo stadija aukščiau aprašytam ASSC būdui, panaudojant tinklelinę chromatografiją su TSK 63 000 SW Glas Pac kolonėle vandens tirpale su pH, artimu fiziologinio tirpalo pH, davė BALB/MK bioanalizėje pagrindinį aktyvumo piką (Fig. I-3).

Toks preparatas buvo beveik toks pat grynas, kaip tas, kuris buvo gautas iš AF-ASSC stadijos pagal apdažymo sidabru NaDodSO₄/PAGE duomenis (duomenys neparodyti), bet davė žymiai didesnę regeneravimo aktyvumą (I-1 lentelėje), TSK - išvalyta medžiaga buvo naudojama įprastais būdais biologiniams tyrinėjimams, kadangi ji pasižymėjo didesniu specifiniu aktyvumu.

Abiems išgrynintų preparatų tipams (t.y. išgrynintam ASSC arba su molekuliniiais sietais) mitogeninio aktyvumo profilis buvo susijęs su aiškia juosta NaDodSO₄/PAGE, kuri neatskirama abiemis preparatams.

20 **Augimo faktoriaus fizikinis ir biologinis apibūdinimas**

Išgryninto faktoriaus įvertinta molekulinė masė buvo apie 28 kDa pagal NaDodSO₄/PAGE duomenis regeneravimo Fig. I-2 ir neregeneravimo sąlygomis (duomenys neparodyti). Ši reikšmė derinasi su eliucijos padėtimi dviejose skirtingų matavimų kolonėlėse tuose tirpikliuose, kurie, kaip tikimasi išlaiko natyvią konformaciją (TSK-C3000-SW, Fig. I-3, superozė-12, duomenys neparodyti). Iš šių duomenų seka, kad mitogenas, matyt, sudarytas iš vienos polipeptidinės grandinės su 25-30 kDa molekuline mase.

Terminis ir rūgštinis mitogeninio aktyvumo labilumas buvo pademonstruoti, panaudojant BALB/MK mitogenezės bioanalizę. Nors aktyvumas nesikeitė per 10 minučių inkubavimo 50°C temperatūroje, jis sumažėjo 68% po 10 min. 60°C temperatūroje ir buvo nenustatomas po 3 min.

100°C temperatūroje. Paveikus 0.5 M acto rūgštimi 60 minučių kambario temperatūroje, aktyvumas sumažėjo iki 14% kontrolinės reikšmės. Palyginimui reikia pasakyti, kad žinomo augimo faktoriaus EAG aktyvumas nesumažėjo
5 nė po vieno tokio apdorojimo. Kreivė dozė-atsakas išgrynintam augimo faktoriui, pateikta Fig. I-4, iliustruoja faktą, kad tik 0.1 nM sukelia nustatomą sintezės DNR stimuliaciją. Tuo būdu, aktyvumo intervalas palyginamas su intervalu kitiems dviems augimo faktoriams,
10 išanalizuotiems iki dabar. Koncentracijos intervale 0.1-1.0 nM stebima tiesinė priklausomybė, ir maksimali 6000-kartinė stimuliacija buvo stebima, esant 1.0 nM koncentracijai. Naujas faktorius atitinkamai indukavo aukštesnį maksimalaus timidino įvedimo lygį, negu EAF, rFAF arba bFAF BALB/MK keratinocituose (Fig. I-4).

Būdingas tokio faktoriaus specifiškumas ląstelės-taikinio atžvilgiu demonstruojamas jo aktyvumo dideliame ląstelių tipų skaičiui palyginimu su aktyvumu kitų augimo
20 faktorų, kurie kaip žinoma, pasižymi mitogeniniu aktyvumu epitelinių ląstelių atžvilgiu.

Kaip parodyta I-2 lentelėje, naujas išskirtas faktorius parodė stiprų mitogeninį poveikį BALB/MK, bet taip pat
25 indukavo įrodomą timidino įvedimą į kitų tirtų epitelinių ląstelių DNR. Priešingai tam, šis faktorius nedarė nustatomo poveikio pelės (arba žmogaus, duomenys neparodyti) fibroplastams arba žmogaus poodinės venos endotelinėms ląstelėms.

30 Palyginimui pasakysime, kad nė vienas kitas žinomas augimo faktorius tinkamai nestimuliuoja keratinocito. TAF α ir EAF pasižymi stipriu fibroplastų atžvilgiu, tuo tarpu FAF buvo mitogeniniai tiek endotelinių ląstelių, tiek ir fibroplastų atžvilgiu (I-2 lentelė). Dėl jo specifiškumo epitelinių ląstelių atžvilgiu ir ypač jaut-

rumo keratinocitų atžvilgiu naujasis mitogenas buvo sąlyginai pavadintas keratinocito augimo faktoriumi (KAF).

5 Tam, kad būtų nustatytas faktas, jog KAF sugeba ne tik stimuliuoti DNR sintezę, bet ir palaikyti ilgalaikį ląstelių augimą, buvo tirtas BALB/MK ląstelių sugebėjimas augti visiškai apibrėžtoje, serumo neturinčioje terpėje, papildytoje augimo faktoriumi. Kaip parodyta Fig. I-5, KAF yra geras EAF, bet ne insulino (arba į
10 insuliną panašaus faktoriaus) pakaitalas tokioje chemiškai apibrėžtoje terpėje. Tuo būdu, KAF, kaip matyti, veikia pagrindiniu signaliniu maršrutu konkuruodamas su EAF, rFAF ir bFAF dėl BALB/MK ląstelių poliferacijos.

15 **Aminorūgščių sekos mikronustatymas atskleidžia unikalią N-terminalinę KAF aminorūgščių seką**

Tolesniam augimo faktoriaus charakterizavimui maždaug 150 pmol C₄-išgrynintos medžiagos buvo analizuojama
20 aminorūgščių sekos nustatymui. Buvo nustatyta vienintelė seka su neabejotinu 2-13 ciklų priskyrimu: X-Asn-Asp-Met-Thr-Pro-Glu-Gln-Met-Ala-Thr-Asn-Val. Didelis foninis triukšmas trukdė priskirti pirmajai pozicijai, kuri yra, tuo būdu, pažymėta X.

25 Kompiuterinė paieška, panaudojant FASTP programą (Lipman, D.J. and Pearson, R.W. (1985) *Science* 227, 1435-1441), nustatė, kad KAF N-terminalinė aminorūgščių seka neparodė žymesnės homologijos su bet kuriuo iš proteinų
30 iš National Biomedical Research Foundation duomenų banko, tuo patvirtindama tokio epitelinio augimo faktoriaus naujumą.

DISKUSIJA

Tyrimai, aprašyti šiame Eksperimentiniame skyriuje, nustatė žmogaus augimo faktorių, kuris pasižymi unikaliu specifiškumu epitelinių ląstelių atžvilgiu. Panaudojus ultrafiltraciją, HSAC ir AF-ASSC arba TSK sietų chromatografiją pagal šį išradimą, buvo išskirtas pakankamas preparato kiekis, kurio pakako smulkiai charakterizuoti šios molekulės fizikines ir biologines savybes.

Vienintelė sidabru apdažyta juosta, atitinkanti maždaug 28000 daltonų molekulinę masę, buvo nustatyta aktyviose frakcijose iš AF-ASSC, ir juostos intensyvumas buvo proporcingas šių faktorių mitogeniniam aktyvumui. Juosta, neatskiriama nuo tos, kuri gauta AF-ASSC, buvo numatoma aktyviose frakcijose iš TSK chromatografijos išgrynintas proteinas stimuliuo DNR sintezę epitelinėse ląstelėse, esant subnanomolinėms koncentracijoms, bet nesugebėjo indukuoti timidino įvedimo į fibroblastus arba endotelines ląsteles palyginamose arba aukštesnėse koncentracijose (iki 5 nM). Šis būdingas specifiškumas ląstelės-taikinio atžvilgiu kartu su vienintele nauja N-terminaline aminorūgščių seka, nustatyta iš išgrynintos molekulės, leidžia daryti išvadą, kad KAF yra naujas augimo faktorius.

Chemiškai apibrėžtoje terpėje išgrynintas faktorius galėjo papildyti į insuliną panašų augimo faktorių I/BALB/MK ląstelių insulino poreikį ir todėl turėjo veikti signalinės transdukcijos keliu, konkuruodamas su EAF, TAF ir FAF. Dar daugiau, naujas faktorius buvo galingesnis negu bet kuris iš žinomų epitelinių ląstelių mitogenų, stimuliuojant timidino įvedimą į BALB/MK ląsteles. Pradiniai duomenys rodo tai, kad šis faktorius sugeba palaikyti žmogaus keratinocitų antrinių kultūrų proliferaciją (duomenys nepateikti).

Gryninimo metu KAF manipuliacijos ir laikymas buvo problematiški. Be jo labilumo šilumos ir rūgščių šis faktorius buvo nepastovus liofilizacijos arba dializės atžvilgiu. Po HSAC praėjus 24 valandoms, aktyvumas visiškai prarandamas, nepaisant proteinų-nešėjų, heparino, proteazės inhibitorių, silikoninių mėgintuvėlių panaudojimo arba laikymo 4° arba -20°C temperatūroje. Tik bandinio koncentravimas šioje stadijoje gali išsaugoti jo aktyvumą.

10

Be to, kad išdžiovintas ir išgrynintas faktorius būtų perneštas, būtina panaudoti stiprią rūgštį arba detergentą, atitinkančius adsorbcines tendencijas arba netirpumą.

15

Tuo būdu, aktyvumo išsaugojimui išgrynintas faktorius buvo laikomas tirpale, esant didelėms koncentracijoms, -70°C temperatūroje, kur jis išlieka stabilus kelis mėnesius.

20

KAF sugebėjimas surišti hepariną gali būti fundamentali tokio faktoriaus savybė, kuri pernešama į jo funkciją organizme. Augimo faktoriai su hepariną jungiančiomis savybėmis apima FAF (Maciag, T., Mehlman, T., Friesel, R. and Schreiber, A.B. (1984) *Science* 225, 932-935; Conn, G. and Hatcher, V.B. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 124, 262-268; Lobb, R.R. and Fett, J.W. (1984) *Biochemistry* 23, 6295-6299), bFAF (Gospodarowicz, D. Cheng, J., Lui, G.-M., Baird, A. and Bohlen, P. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6963-6967; Lobb, R.R. and Fett, J.W. (1984) *Biochemistry* 23, 6295-6299), granulocito/makrofago koloniją stimuliuojanti faktorių ir interleukiną 3 (Roberts, R., Gallagher, J., Spooncer, E., Allen, T.D., Bloomfield, F. and Dexter, T.M. (1988) *Nature* 332, 376-378). Tokie faktoriai, kaip matyti, nusėda tarpląstelinėje matricoje arba ant proteoglikanų, dengiančių stromos ląstelės paviršių

- (Roberts, R., Gallagher, J., Spooncer, E., Allen, T.D., Bloomfield, F. and Dexter, T.M. (1988) *Nature* 332, 376-378; Vlodavsky, I., Folkman, J., Sullivan, R., Fridman, R., Ishai-Michaeli, R., Sasse, J. and Wagsburn, M. 1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2292-2296). Buvo postuliuota, kad jų laikymas, išskyrimas ir kontaktai su specifinėmis ląstelėmis-taikiniais yra reguliuojami tokia sąveika (Roberts, R., Gallagher, J., Spooncer, E., Allen, T.D., Bloomfield, F. and Dexter, T.M. (1988) *Nature* 332, 376-378; Vlodavsky, I., Folkman, J., Sullivan, R., Fridman, R., Ishai-Michaeli, R. Sasse, J. and Wagsburn, M. 1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2292-2296). Nors epitelinių ląstelių proliferacijos mezenchiminės prigimtės efektoriai taip pat buvo aprašyti (Gilchrest, B.A., Karassik, R.L., Wilkins, L.M., Vrabel, M.A. and Maciag, T. (1983) *J. Cell Physiol.* 117, 2325-240; Chan, K.Y. and Hasche, R.H. (1983) *Exp. Eye Res.* 36, 231-246; Stiles, A.D., Smith, B.T. and Post, M. (1986) *Exp. Lung. Res.* 11, 165-177), jų identiškumas nenustatytas. Hepariną-jungiančios savybės išskyrimas žmogaus embrioninių fibroblastų epitelinėmis ląstelėmis, ir epitelinių ląstelių tropizmas suteikia KAF visas savybes, kurių tikimasi iš tokio normalios epitelinės ląstelės augimo parakrino mediatoriaus.
- Dalinė aminorūgščių seka, nustatyta šiam naujam augimo faktoriui, įgalino jį koduojančios sekos molekulinių klonavimą ir jos struktūrinės priklausomybės žinomoms augimo faktorių šeimoms nustatymą, kaip aprašyta II Eksperimentiniame skyriuje žemiau.

II EKSPERIMENTINIS SKYRIUS

Naujo epitelinų ląstelių specifinio augimo faktoriaus
kDNR seka apibūdina naują FAF šeimos narį

5

Darbas, aprašytas priešėinančiame I Eksperimentiniame skyriuje, identifikavo ir išgrynino naują hepariną jungiantį augimo faktorių, pažymėtą keratinocito augimo faktoriumi (KAF), kuris yra ypač aktyvus keratinocitų atžvilgiu ir, kaip matyti, yra specifinis epitelinėms ląstelėms. Šis antras Eksperimentinis skyrius aprašo kDNR klonų, koduojančių KAF, išskyrimą ir apibūdinimą, panaudojant oligonukleotidus, remiantis eksperimentiškai nustatyta NH₂-galo aminorūgščių seka kaip hibridizacijos zonu. Nukleotido sekos analizė nustatė 582-bp atvirą skaitymo karkasą, kuris gali koduoti polipeptidą iš 194 aminorūgščių, t.y. tarp 41% ir 33% identiškas hepariną jungiantiems rūgštinių ir bazinių fibroblastų augimo faktoriams (FAF) ir giminingiems hst ir int-2 onkogenams. KAF geno RNR matricos yra išskiriamos normaliuose tiek embrioninės prigimties, tiek suaugusio fibroblastuose, bet ne epitelinėse, endotelinėse ir glialinėse ląstelėse. Tuo būdu, KAF pasirodo esąs normaliai išskiriamas mezenchimos, tuo parodydamas savo vaidmenį epitelinų ląstelių proliferacijos reguliavime.

MEDŽIAGOS IR METODAI

30 kDNR klonų išskyrimas

KAF išgryninimas ir N-galo aminorūgščių sekos nustatymas buvo aprašyti aukščiau (žiūr. I Eksperimentinį skyrių ir Rubin, J.S., Osada, H., Finch, P.W., Taylor, W.G., Rudikoff, S. and Aaronson, S.A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (in press)). Deoksioligonukleotidų pulai (50 pmolių), aprašyti Rezultatuose, buvo 5' gale pažy-

mėti, panaudojant γ - 32 P-ATP (3000 Ci/mmol, Amersham) ir 10 vienetų T4 polinukleotidinės kinazės. Rekombinantinis fagas, nešantis kDNR klonus, buvo replika, išsėta ant nitroceliuliozinių filtrų ir hibridizuota su 32 P-žymėtais deoksioligonukleotidais 20% formamide, 10% dekstrano sulfate, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 8 x SSC, 5 x Denhardt's ir 50 µg/ml denatūruotoje per naktį 42°C temperatūroje briedžio spermoje. Filtrai buvo perplauti 0.5 x SSC, 0.1% SDS 50°C temperatūroje ir eksponuoti ant Kodak X-omat AR juostelės.

DNR sekos nustatymas

KAF kDNR nukleotidinė seka buvo nustatyta dideoksi persidengiančių ribojančių fragmentų, subklonuotų į pUC vektorius, grandinės nutraukimo būdu (Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Gene 33, 103-119).

Bakterinės ekspresijos vektoriaus KAF kDNR konstravimas

KAF kDNR, koduojanti subrendusią, išskirtą polipeptido formą, buvo patalpinta hibridinio trk promotoriaus kontrolei, į plazmidės ekspresijos vektorių pKK233-2 (Amman, E. and Brosius, J. (1985) Gene 40, 183), kaip aprašyta toliau. Kad tai būtų atlikta, konkretus KAF kDNR ilgis, kuris turėjo informaciją užkoduoti subrendusią KAF molekulę (pvz., be jo signalinio peptido) buvo sustiprintas, panaudojant polimerazės reakcijos (PGR) būdą (Sakai, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Norn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Science 230, 1350-1354). Fragmentą kryptingai įterpė tarp dviejų saitų vektoriuje, būtent, saito NcoI su bukais galais po S1 nukleazės suskaldymo ir saito HindIII, panaudojant rekombinantinės DNR technologiją. KAF kDNR, gauto PCR būdu, galai buvo tokie: 5' galas buvo bukas ir prasidėjo ATG kodonu, po toėjo kodonas TGC cys liekanai, numeris 33, kuris yra KAF subren-

dusios formos amino-terminalinė liekana (žiūr. Fig. II-1), ir tada visą KAF koduojančią seką. Stop-kodonas, TAA, ir keturios fazės po jų, TTGC, t.p. buvo įjungti į kDNR 3' galą. Pradmuo naudojamas PCR būde nukreipti DNR sintezę į reikalingą padėtį kDNR 3' gale, apėmė HindIII saitą

5 sustiprintos kDNR įterpimui į vektorinę DNR.

Antikūnų prieš KAF ir KAF giminingus peptidus gamyba

10 Monokloniniai antikūnai buvo gaminami pelėse prieš nepažeistą išgrynintą proteiną iš žmogaus fibroblastų, panaudojant 5 arba daugiau poodinių injekcijų. Naudojami kraujo pavyzdžiai buvo rūšiuojami kietos fazės analize (ELISA), naudojant labai išgrynintą KAF iš

15 žmogaus epitelinių ląstelių kaip antigeną. Hibridomos buvo paruoštos įprastais būdais ir supernatantai buvo rūšiuojami ELISA analize, kad būtų aptikti KAF-reaktyvūs antigenai. Teigiami klonai serijomis buvo subklonuojami įprastais būdais, ir atrinkti subklonai buvo

20 auginami kaip acitiniai augliai pelėms, kad būtų pagaminti dideli antikūnų kiekiai. Antikūnai buvo gryninami iš ascitinių skysčių, panaudojant standartinius būdus (pvz., panaudojant hidroksiapatitą arba imunoafinines dervas).

25 Polikloniniai antikūnai prieš sintetinius peptidus buvo auginami triušiuose standartiniais būdais, kaip aprašyta toliau. Peptidai buvo gauti kietos fazės technologija ir sujungiami su tiroglobulinu reakcija su

30 gliutaraldehidu. Buvo daromos poodinės injekcijos serijomis, ir kraujo pavyzdžiai rūšiuojami ELISA analize, taip pat kitais metodais, įskaitant Western-blott ir mitogenezės bioanalizę. IgC imunoglobulinai buvo išskirti afinine chromatografija, panaudojant imobilizuotą proteiną G.

35

Polikloniniai antikūnai buvo auginami triušiuose tiek prieš natūraliai išskirtą KAF iš žmogaus fibroplastų, tiek prieš rekombinantinį KAF, pagamintą E.coli (žiūr. kitą skyrių), panaudojant tokias operacijas:

5

I) Pradinę injekciją ir pirmą imunizaciją atliko kirkšnies limfiniuose mazguose;

ii) kitas imunizacijas atliko į raumenis.

10

Tiriamų pavyzdžių skriningą atliko, naudodami ELISA analizę ir Western-blott bei mitogenezės bioanalizę. IgG gryninimas kaip antikūnai prieš sintetinius peptidus, kaip aprašyta aukščiau.

REZULTATAI

kDNR klonų, koduojančių naują augimo faktorių, išskyrimas

5

kDNR klonų, atitinkančių KAF koduojančią seką, paieškai du oligonukleotidų 26 bazių ilgio pulai buvo generuojami, remiantis devynių aminorūgščių seka Asn-Asp-Met-Thr-Pro-Glu-Gln-Met-Ala, kaip nustatyta išgryninto KAF aminorūgščių sekos mikronustatymu (žiūr. I Eksperimentinių skyrių aukščiau ir Rubin (Rubin, J.S., Osada, H., Finch, P.W., Taylor, W.G., Rudikoff, S. and Aaronson, S.A. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (in press)). Vienas oligonukleotidinis pulas turėjo visų 256 galimų koduojančių sekų mišinį devynioms aminorūgštims, tuo tarpu kitas turėjo inozino liekanas degeneruotoje trečioje kodonų pozicijoje Thr ir Pro.

Ši pastaroji konstrukcija sumažino galimų koduojančių sekų pulę skaičių iki 16. Inozinas tRNR antikodone gali sudaryti vandenilines jungtis su A, C arba U (Crick, F.H.C. (1966) *J. Mol. Biol.* 19, 548-555), ir oligonukleotidai, kurie turi deoksiinozino, kaip buvo parodyta, gali efektyviai hibridizuotis su atitinkama kDNR (Ohtsuka, R., Matsuki, S., Ikehara, M., Takashi, Y. and Matsubara, K. (1985) *J. Biol.Chem.* 260, 2605-2608).

kDNR biblioteka buvo sudaryta kDNR klonuojančiame vektoriuje pCEVP (Miki, T., Matsui, T., Heidaran, M. and Aaronson, S.A. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci* (inpress)), panaudojant poliadenilintą RNR, ekstrahuotą iš žmogaus embrioninio plaučio fibroblasto ląstelinės linijos M426 (Aaronson, S.A. and Todaro, G.J. (1968) *Virology* 36, 254-261), pradinio augimo faktoriaus ląstelės. Po bibliotekos atrinkimo (skriningo) (9×10^5 trombocitų) su ^{32}P -žymėti 26-mer oligonukleotidai identifikavo 88 trom-

bocitus, kurie hibridizavosi su abiem oligonukleotidinių zondų pulais.

Parinktų kDNR klonų charakterizavimas ir aminorūgščių nustatymas

Iš 10 išvalytų nuo trombocitų klonų, kurie buvo analizuojami, vienas, pažymėtas klonu 49, turėjo kDNR 3.5 kb tarpą, tuo tarpu likusieji turėjo 1.8 kb - 2.1 kb tarpus.

Mažesnių klonų analizė atskleidė kelis bendrus restrikcinius saitus. Būdingų mažesnių klonų, pažymėtų 32 klonu, kartu su 49 klonu, sekų nustatymas parodė, kad jie buvo persidengiantys kDNR (Fig. II-1A). Tuo tarpu kai 49 kloną veikė pradžioje iš poli (A) galo informacijos, 32 klonas išskilo, konstruojant biblioteką oigo(dT), sukėlė hibridizacija su A-praturtinta seka 3' ne-koduojančioje KAF irNR srityje.

Sekos, koduojančios KAF polipeptidą, aprašymas

Dviejų šių kDNR (32 ir 49) tyrimas leido nustatyti tolydinę 3.5 kb seką, turinčią visą KAF koduojančią seką (Fig. II-1B). ATG, matyt, esantis iniciacijos kodonu, buvo 446 nukleotido pozicijoje, sudarydamas 582-azotinių bazių porų atviro skaitymo rėmelį, kuris baigėsi TAA terminacinio kodono pozicijoje 1030. Šis atviras skaitymo rėmelis gali koduoti polipeptidą iš 194 aminorūgščių su paskaičiuota 22512 daltonų molekuline mase.

Šoninė ATG kodono seka neprisitaiko prie pasiūlyto GCC(G/A) CCATGG suderinamumo optiniam iniciavimui eukariotinėmis ribosomomis (Kozak, M. (1987) *Nucl.Acids Res.* 13, 8125-8148), tačiau aukštyn nuo ATC kodono yra A trys nukleotidai. Toje padėtyje A yra labiausiai

išsaugotos tokio suderinamumo nukleotidas. Toks ATG kodonas eina prieš 85 nukleotidus, išdėstyčius aukštyn nuo TGA stop-kodono tame pačiame skaitymo rėmelyje.

- 5 Aminorūgščių seka 19, kuri yra homologiška eksperimentiškai apibrėžtam išgryninto KAF NH_2 -galui, prasideda nuo 32 aminorūgščių, išdėstyčių žemyn nuo pasiūlyto iniciacijos kodono. Buvo visiškas atitikimas tarp prognozuotos ir eksperimentiškai nustatytos aminorūgščių sekos, todėl galėjo būti atliktas nedviprasminis priskyrimas.

- 15 Homologijos tarp KAF ir bet kurio žinomo proteino ieškojimas buvo atliekamas kompiuterine paieška National Biomedical Research Foundation duomenų bazėje, naudojant FASTP Lipman and Pearson programą (Lipman, D.J. and Pearson, R.W. (1985) *Science* 227, 1435-1441). Pagal šį būdą buvo išryškintas puikus giminingumas tarp prognozuotos KAF struktūros ir rūgštinio ir bazinio FAF struktūros, kaip ir giminingų hst ir int-2-užkoduotų proteinų.

KAF geno mRNR matricų ekspresija žmogaus ląstelėse

- 25 Parengiamuosiuose bandymuose ištirti KAF iRNR žmogaus ląstelėse zondas, apimantis didesnę KAF koduojančios sekos dalį (zondas A, Fig. II-1A), nustatė vienintelę 2.4 kb matricą Northern-blott analizės būdu iš visos M426 RNR (Fig. II-1C). Šis dydis žymiai mažesnis, negu sudėtinės kDNR ilgis, 3.85 kb.

- 35 Tačiau, ekranuojant poli(A)-parinktą M426 RNR, buvo nustatyta papildoma apytikriai 5 kb matrica. Be to, zondas išvestas iš netransliuotos 49 klono srities 3' iki 32 klono galo (zondas B, Fig. II-1A), hibridizavosi tik su didesne informacijos dalimi (Fig. II-1C). Tuo būdu, matyti, kad KAF genas yra transkribuojamas tik

tose dalyse, kurios susijusios su alternatyviom RNR. Du kiti FAF genų šeimos nariai, bFAF (Abrahams J.A., Mergia, A., Whang, J.L., Tumolo, A., Friedman, J., Hjerrild, K.A., Gospodarowicz, D. and Fiddes, J.C. (1986) *Science* 233, 545-548) ir int-2 (Mansour, S.L. and Martin, G.R. (1988) *EMBO J.* 1, 2035-2041), taip pat išskiria sudėtinių RNR, kurių svarbumą lieka papildomai išaiškinti.

Normalaus KAF funkcionalinio vaidmens ištyrimui buvo nagrinėjama jo matricos ekspresija įvairiose žmogaus ląstelinėse linijose ir audiniuose. Kaip parodyta Fig. II-3, dominuojanti 2.4 kb KAF matrica buvo nustatyta kiekvienoje iš stromalinių fibroplastinių linijų, kurios yra epitelinių audinių dariniai iš embrioninių, naujagimių ir suaugusių šaltinių, bet ne iš normalios prigimties epitelinių ląstelių linijų. Tokia matrica taip pat buvo nustatyta RNR, ekstrahuotoje iš normalių suaugusio žmogaus inkstų ir skrandžio virškinamojo trakto organų, bet ne plaučių ar smegenų. Puikus KAF RNR ekspresijos specifiškumas stromos ląstelėse parodė tai, kad šis faktorius vaidina normalų vaidmenį epitelinių ląstelių augimo mezemchiminiame stimuliavime.

Kitų augimo faktorių, pasižyminčių žinomu aktyvumu epitelinių ląstelių atžvilgiu, palyginimui iRNR buvo analizuotos taip pat tuose pačiuose audiniuose, minėtuose aukščiau. Tarp išanalizuotų epitelinių ir stromos ląstelių linijų nebuvo rasta rFAF arba bFAF matricų ekspresijos dėsningumo (Fig. II-3). EAF matrica nebuvo išskirta tose pačiose linijose ir buvo pastebėta tarp įvairių audinių tik insktuose. Galiausiai, TAF α nebuvo aptiktas jokioje stromos fibroplastų linijoje ir buvo išskirtas įvairiuose lygiuose iš epitelinių ląstelių linijų. Jis taip pat buvo aptiktas mažais kiekiais inkstuose tarp tirtų audinių (Fig. II-3).

KAF mitogeninio aktyvumo inhibicija heparinu

Buvo parodyta, kad heparinas žymiai padidina tFAF mitogeninį aktyvumą dideliame skaičiui ląstelių-taikinių kultūroje ir stabilizuoja jį terminės dezaktyvacijos atžvilgiu. Nepaisant tvirto prijungimo prie bFAF, heparinas darė minimalų poveikį jo mitogeniniam aktyvumui (Gospodarowicz, O. and Cheng, J., *Cell Physiol.* 128, 475-485). Heparino poveikis KAF mitogeniniam aktyvumui buvo ištirtas KAF ir FAF giminingumo požiūriu. Kaip parodyta II-1 lentelėje, timidino įvedimas BALB/MK ląstelėmis, veikiant KAF, buvo 16 kartų inhibuojamas, įvedus hepariną į kultūrinę terpę. Priešingai, taip paveikus, padidėjo ir rFAF bei bFAF aktyvumai.

Anti-KAF antikūnų gamyba

Kelios antikūnų, kurie atpažįsta KAF arba į KAF panašius polipeptidus, rūšys buvo paruoštos, naudojant standartines metodologijas, gerai žinomas eksperimentinės imunologijos srityje ir trumpai aprašytas Metodų skyriuje aukščiau. Į jas įeina: monokloniniai antikūnai, išauginti pelėse prieš nepažeistą, išgrynintą proteiną iš žmogaus fibroblastų; polikloniniai antikūnai, išauginti triušiuose prieš sintetinius peptidus su sekomis aminorūgščių sekų, prognozuotų KAF kDNR sekos, pagrindu; polikloniniai antikūnai, išauginti triušiuose tiek prieš natūraliai išskirtą KAF iš žmogaus fibroblastų, tiek prieš rekombinantinį KAF, pagamintą *E. coli* (žiūr. kitą skyrį).

Buvo išgryninti monokloniniai antikūnai iš trijų skirtingų hibridomų. Visi trys atpažino rekombinantą, kaip ir natūraliai pasirodantį KAF kietos fazės (ELISA) bandyme. Nė vienas iš jų nedalyvauja kryžminėse reakcijose su KAF denatūracijos sąlygose (pagal Western-

blott analize), ir nė vienas neneutralizuoja KAF mitogeninio aktyvumo BALB/MK bioanalizėje.

Polikloniniai antikūnai buvo gaunami, naudojant sintetinį peptidą su aminorūgščių seka NDMTPEQMATNVR, atitinkančia liekanas 32-44 KAF (žiūr. Fig. II-1), plus R(arg) liekana vietoj tikrosios asp liekanos, užkodotos kRNR pozicijoje 45. Asp liekana yra, galbūt, glikozilinta natūraliame KAF polipeptide ir todėl yra arg aminorūgščių sekos duomenyse, gautuose betarpiškai dėl tokio polipeptido (žiūr. Diskusijų žemiau). Polikloniniai antikūnai, generuoti su sintetiniu peptidu, atpažįsta tiek natūralų, tiek rekombinantinį KAF ELISA ir Western-blott analizės, esant jautrumo lygiui ne mažesniau kaip 10 ng proteino. Tačiau tokie antikūnai ne neutralizuoja KAF mitogeninio aktyvumo BALB/MK bioanalizėje.

Polikloninis antiserumas prieš nepažeistą natūralų KAF proteiną atpažįsta KAF tiek ELISA, tiek Western-blott analizėse. Tokie antikūnai taip pat inhibuoja KAF mitogeninį aktyvumą BALB/MK bioanalizėje.

KAF kDNR ekspresija E. coli

Buvo atlikta KAF kDNR ekspresija, kad būtų pagamintas polipeptidas E.coli, patalpinant jo koduojančią seką hibridinio trk promotoriaus (turinčio trp ir lac promotorių elementus) kontrolei plazmidėje pKK233-2 (Amman, E. and Brosius, J. (1985) *Gene* 40, 183). Kad tai būtų atlikta, konkretus KAF kDNR ilgis, kuris turėjo informaciją subrendusios KAF molekulės užkodavimui (t.y. be jo signalinės sekos), buvo sustiprintas, panaudojant polimerazinės grandinės reakcijos metodą (Sakai, R.K., Schart, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Norn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) *Science* 230, 1350-1354). Fragmentas buvo kryptingai įterpiamas tarp

- dviejų saitų vektoriuje, būtent, NcoI saito, padaryto bukais galais S1 nukleazės įsisavinimu, ir HindIII saito, panaudojant standartinę rekombinantinės DNR metodologiją. Parinktuose rekombinantuose atliko amino-
5 rūgščių sekos nustatymą jų kDNR 5' galuose, kad būtų užtikrintas teisingas ATC iniciacijos kodono su-reguliavimas su reguliaciniais trk promotoriaus ele-mentais.
- 10 Buvo tikrinamas kelių rekombinantų sugebėjimas gaminti proteinę įprastais mikrometodais. Trumpai sakant, klonai buvo auginami iki mikrosponentinės fazės ($OD_{595}=0.5$), paveikti 1 mM izopropilo β -D-tiogalaktopiranozidu 90 mi-
15 nučių, ir ląstelės ekstraktai buvo užnešti ant SDS-poliakrilamidinių gelių Western-blott apdažymo anali-zei. Visi tirti rekombinantai sintetavo proteinę, kuris buvo atpažįstamas antikūnais prieš amino-terminalinį KAF peptidą. Buvo parinktas vienas rekombinantas, kuris parodė didžiausią indukciją iš IPTG tolesnei proteino
20 analizei.
- 1 ltr bakterijų buvo auginamas NZY buljone, turinčiame 50 μ g/ml ampicilino ir 12 μ g/ml tetraciklino, iki $OD_{595}=0.5$ ir 90 min. paveikta IPTG. Ląstelės buvo surinktos cent-
25 rifugavimu, resuspenduotos 50 mM natrio fosfato (pH 7.3), 0.2 M NaCl, ir lizuotos ultragarsu. Ląstelės liekanos buvo atskirtos centrifugavimu, ir lizatas betarpiškai buvo naudojamas heparino-Serafozės afininėje kolo-nėlėje.
- 30 Kaip nustatyta Western-blott analize ir mitogeniniu aktyvumu keratinocituose, rekombinantinis KAF buvo iš-plautas eliuentu 0.5-0.6 M NaCl. Tolesnis HSAC me-džiagos gryninimas su Mono-S (FPLC) kolonėle (Pharma-
35 cia) davė KAF preparatą, kurio įvertintas grynumas) 90%, kaip įvertinta elektroferazės abalize, panaudojant SDS-poliakrilamidinius gelius ir apdažymą sidabru.

Rekombinantinis KAF efektyviai stimuliuo timidino įvedimą į BALB/MK keratinocito ląsteles, bet tik nežymiai aktyvus NIH/3T3 fibroplastų atžvilgiu. Pusė maksimalios BALB/MK ląstelių stimuliacijos standartinėje keratinocito bioanalizėje buvo atlikta, esant koncentracijai nuo 2 iki 5 ng/ml, lyginant su koncentracija nuo 10 iki 15 ng/ml išgrynintam KAF iš M426 ląstelių. Vienas bakterinių ląstelių davė maždaug 50 µg Mono-S išgryninto rekombinantinio KAF.

Chimeros, turinčio KAF ir rFAF sekas, konstravimas

Aukščiau aprašyti tyrimai parodė, kad KAF pasižymėjo dviem atskiromis charakteristikomis, kurios galėjo būti užkoduotos atskiromis polipeptidinės sekos dalimis arba sritimis, kaip yra gerai žinoma iš kitų multifunkcionalinių polipeptidų, koduojančių sekų. Šios galimybės patikrinimui chimerinės DNR segmentas, koduojantis NH₂-galo KAF seką, įskiepytas į rFAF C-galo šerdį, buvo sukonstruotas taip. Sau3AI restrikcinis fermento saitas (GATS) kDNR 5' gale, kodonų liekanomis 78 ir 79 (atitinkamai arg ir ile, žiūr. Fig. II-1) viduje buvo išpjautas ir įjungtas į homologinį saitą rFAF kDNR aminorūgščių 39 (arg) ir 40 viduje. Šios chimerinės DNR galai 3' ir 5' buvo prijungti prie plazmidės pKK233-2 vektorinės DNR tuo pačiu būdu, naudojamu KAF kDNR, koduojančios polipeptido sekrecinę formą, įterpimui (žiūr. Metodus aukščiau).

Kada rekombinantinės E. coli ląstelės buvo sukonstruotos, panaudojant vektorių, nešantį chimera, ekspresijos testai buvo atliekami, kaip aprašyta aukščiau subrendusiam KAF, buvo pagamintas naujas produktas, turintis tiek KAF, tiek rFAF savybes. Peptidas buvo praturtintas heparino-Sefarozės chromatografija ir buvo rasta, kad jis turi ląstelės-taikinio pranašumų keratinocitams, kaip KAF, su minimaliu aktyvumu

fibroplastams (NIH/3T3). Tačiau šio chimerinio polipeptido mitogeninis aktyvumas neturi jautrumo inhibicijai heparinu, charakteristikos, kuri būdinga labiau rFAF negu KAF. Faktiškai mitogeninis aktyvumas keratinocitams yra padidinamas, kaip rFAF atveju. Todėl peptido sritys, atsakingos už ląstelės-taikinio specifiškumą ir jautrumą heparinui, yra aiškiai atskiros ir greitai atskiriamos FAF pagal šio išradimo panaudojimą.

DISKUSIJA

Eksperimentai, aprašyti šiame skyriuje, iliustruoja kelių principinių šio išradimo įgyvendinimų praktiką. Jie
5 apima kDNR, koduojančių KAF, išskyrimą; tokių kDNR ekspresiją rekombinantinėse ląstelėse; įvairių antikūnų su KAF, gamybą; ir chimerinės kDNR, koduojančios naują augimo faktorių tiek su KAF, tiek su rFAF aminorūgščių sekomis ir giminingais funkcionališkumais. Geresniam
10 šio išradimo supratimui galima paminėti tokius aspektus; susijusius su šiais įgyvendinimais.

Seka, prognozuota iš KAF kDNR, atitiko aminorūgščių seką, nustatytą iš grynos KAF formos, išskirtos žmogaus
15 fibroplastų. Be to, ši seka leido potencialiai paaiškinti pozicijas, kur galutinai aminorūgščių priskyrimui gali būti atlikti tiesioginiu aminorūgščių nustatymu. Liekanos 32 ir 46 prognozuojamos iš kDNR sekos, kad būtų cisteinai, ir hidrolizuoti nemodifikuoto cisteino
20 liekanų dariniai yra nenustatomi pagal Edman degradaciją. Prognozuota KAF aminorūgščių seka taip pat turėjo vieną potencialų N-sujungtą glikozilacijos saitą (Asn-X-Ser/Thr) iš liekanų 45-47. Jei Asn 45 buvo glikozilinti, jis nebūtų buvęs nustatytas aminorūgščių
25 sekų nustatymo metodu, naudojamu čia. Iš tikrųjų, KAF migruoja kaip plati juosta NaDodSO₄/PAGE, esant didesnei molekulinei masei negu prognozuota grynam proteinui. Tai gali būti priskirta glikozilinimui.

30 FAF yra hepariną surišantys mitogenai su aiškiais ląstelės-taikinio specifiškumais (Thomas, K. (1987) *FASEB J.* 1, 434-440). hst genas buvo identifikuotas kaip transformuojantis genas iš žmogaus skrandžio auglio (Taira, M., Yoshida, T., Miyagawa, K., Sakamoto, H., Terada, M.
35 and Sugimara, T. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84, 2980-2984), gretimo normalaus skrandžio audinio (Yoshida, T., Miyagawa, K., Odagiri, H., Sakamoto, H.,

Little, P.F.R., Terada, M. and Sugimara, T. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7305-7309) ir iš Kaposi's sarkomos (DelliBovi, P. and Basilico, C. (1987) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 84, 5660-5664) standartine NIH/3T3 transfekcijos analize. int-2 geno produktas yra išskiriamas normaliai pelės embriogenezės metu (Jakobovits, A., Shackelford, M., Varmus, H.E. and Martin, G. R. (1986) *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 83, 7806-7810) ir pažeidimo atveju - po provirusinės pelės liaukos auglio viruso integracija (Peters, G. Brookes, S. and Dickson, S. (1983) 33,364-377).

KAF yra šeštas identifikuojamos fibroplastų augimo faktorių šeimos narys. Nors pavadinimas FGF-6 neatrodo tinkamas dėl to, kad KAF nėra aktyvus fibroplastų atžvilgiu, tokia terminologija gali būti panaudota šiam augimo faktoriui, pažymint struktūrinius ryšius su FAF šeima. Kadangi visi anksčiau apibūdinti augimo faktoriai arba išskiria epitelines ląsteles kaip taikinius, arba įjungia jas tarp eilės jautrių ląstelių-taikinių, labai specifinė KAF mitogeninio aktyvumo epitelinių ląstelių atžvilgiu prigimtis ir ypač jautrumas keratinocitų atžvilgiu daro ją unikalų.

Tyrinėjimuose ligi šiol KAF matricos ekspresija pasirodė specifinė stromos ląstelių, išvestų iš epitelinių audinių, atžvilgiu, rodydama jos funkciją normalios epitelinės ląstelės proliferacijoje. KAF kDNR klono buvimas įgalina nustatyti, ar normali šio augimo faktoriaus ekspresija gali būti įtraukta į klinikines būkles, apibūdinamas epitelinės ląstelės displazija ir/arba neoplazija. Be to, galimybė pagaminti didelius šio naujo augimo faktoriaus kiekius rekombinantiniais būdais turėtų leisti patikrinti jo klinikinį pritaikomumą situacijose, kur specifinis epitelinis ląstelių augimas ypač svarbus.

KAF sekos palyginimas su penkiais kitais FAF šeimos proteinais atskleidė dvi pagrindines homologijos sritis, apimančias aminorūgštis 65-156 ir 162-189 prognozuotoje KAF sekoje, kurios buvo atskirtos trumpa
5 nehomologiška aminorūgščių serija su besikeičiančiu ilgiu skirtinguose šeimos nariuose (Fig. II-2) int-2 atveju šios sekos ilgis turėjo 17 liekanų, tuo tarpu hst dvi homologinės sritys buvo gretimos. KAF išsiterpianti seka susidėjo iš penkių aminorūgščių.

10 Sulygintose srityse KAF aminorūgščių seka buvo apie 44% identiška int-2 (pelės), 39% identiška bFAF (žmogaus) ir 33% identiška hst (žmogaus). Toje pačioje srityje visi šeši proteinais buvo identiški 19% liekanų, ir,
15 panaudojus saugomus pakaitalus, jie aprodė 28% homologiją.

Kaip parodyta Fig. II-2, tokių giminingų proteinų aminogalai buvo nehomologiški ir turėjo skirtingą ilgį.
20 Pirminiai KAF ir hst transliacijos produktai turi hidrofobines N-gali sritis, kurios, kaip matyti, yra kaip signalinės sekos (von Heijne, G. (1986) *Nucl. Acids Res.* 4683-4690). Faktas, kad šios N-galo srities nėra subrendusioje KAF molekulėje (Fig. II-1B), patvirtina
25 šią išvadą. Priešingai, FAF yra sintezuojami aiškiai be signalinių peptidų (Thomas, K. (1987) *FASEB, J.* 1, 434-440). int-2 proteinas turi netipiškai trumpą N-galinių hidrofobinių liekanų sritį (Moore, R. Casey, G., Brookes, S., Dixon, M., Peters, G., and Dickon, C.
30 (1986) *EMBO J.* 5, 919-924), bet ji nėra žinoma, jei proteinas išskirtas. Dar daugiau, int-2 proteinas turi didelį C-galo pailginimą, palyginus su kitais šeimos nariais.

35 Išgrynintas KAF turi penkias cisteino liekanas, iš kurių dvi išsilaiko visoje FAF giminingų proteinų šeimoje (Fig. II-2). Reikėtų taip pat paminėti penkias

- bazių liekanų poras KAF sekoje. Tas pats vaizdas buvo stebimas kituose FAF šeimos nariuose ir į tai galima atsižvelgti jų sąveikoje su heparinu (Schwarzbauer, J.E., Tamkun, J.M., Lemischka, I.R. and Hynes, R.O. (1983) *Cell* 35, 421-431). Dviejų bazių saitai taip pat yra įprasti taikiniai proteolitiniam apdorojimui ir toks apdorojimas gali būti mikroheterogeniškumo, stebimo kai kuriuose KAF preparatuose, priežastimi (nepublikuoti duomenys).
- KAF kDNR seka buvo praturtinta AT per visą ilgį, bet ypač 3' netransliuotoje srityje, kur AT turintys buvo 70%, palyginus su 60% numatomoje koduojančioje sekoje ir 63% 5' netransliuotoje srityje. 3' netransliuota sritis turėjo didelį skaičių AT TTA sekų, kurios, kaip manome, dalyvauja selektyvioje laikinai išskirtos, nestabilios RNR degradacijoje (Shaw, G. and Kamen, R. (1986) *Cell* 46, 659-667). Klasikinio AATAAA poliadenilimo signalo nėra, bet nustatomos dvi skirtingos sekos AATTAA ir AATACA (Birnstiel, M.L., Busslinger, M. and Strub, K. (1985) *Cell* 41, 349-359), atitinkamai 24 ir 19 nukleotidų, į viršų nuo poli(A) sekos kDNR 3' gale.
- Buvo padaryta prielaida, kad heparino poveikis rūgštiniam FAF yra arba dėl aktyvios augimo faktoriaus konformacijos, arba dėl trigubo komplekso su rūgštiniu FAF ir jo receptoriumi susidarymo (Schrieber, A.B., Kenny, J., Kowalski, W., Friesel, J., Mehlman, T. and Maciag, T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6138-6142; Gospodarowicz, O. and Cheng, J. (1986) *J. Cell Physiol.* 128, 475-485). Jei taip, heparinas gali stabilizuoti KAF konformaciją, kuri ne tokia aktyvi, kaip laisva molekulė, arba sudaryti stabilų kompleksą, kuris negali efektyviai sąveikauti su jo receptoriumi.

Nors jo sugebėjimas jungti hepariną atspindi struktūrinius KAF panašumus su FAF, specifiškumą ląstelių-taikinių atžvilgiu skirtumai tarp šių giminingų mitogenų yra žymūs. FAF indukuoja daugelio neterminaliai diferencijuotų tiek embrioninės mezodermalinės, tiek neuroektodermalinės prigimties ląstelių dalijimąsi. Be fibroblastų ir kraujagyslių endotelinių audinių, mezodermalinės prigimties taikiniai kultūroje apima mioblastus, chondrocitus ir osteoblastus (Thomas, K.A. and Gimenez-Gallego, G. (1986) *Trends Biochem. Soc.* 11, 81-84). FAF yra taip pat mitogeniniai glialiniai astrocitų ir neuroblastų atžvilgiu (Gensburger, C., Labourdette, J. and Sensembrenner, M. (1987) *FEBS Lett.* 217, 1-5). Onkogeno produktas, išskirtas iš Kaposio sarkomos, kuris yra identiškas hst, taip pat stimuliuoja NIH/3T3 ir kapiliarinių endotelinių ląstelių proliferaciją. Iki šiol KAF indukuota mitogeneze buvo stebima tik epitelinėse ląstelėse, ir jokio nustatomo aktyvumo fibroblastų arba endotelinių ląstelių atžvilgiu nebuvimas buvo pademonstruotas taip pat (žiūr. I Eksperimentinį skyrių aukščiau ir Rubin (Rubin, J.S., Osada, H., Finch, P.W., Taylor, W.G., Rudikoff, S. and Aaronson, S.A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press)). Nėra žymios N-galo homologijos tarp KAF ir kitų FAF giminingų proteinų. Tuo būdu, chimerinių molekulių struktūra tarp KAF ir prototipinio FAF buvo tiriami nustatyti, ar KAF N-galo sritis yra pakankama užtikrinti jo unikalų ląstelės-taikinio specifiškumą. Pirmos tokios rekombinantinės polipeptidinės sekos tyrimo rezultatai parodė, kad N-galo KAF seka iš esmės koduoja ląstelės pirmenybę keratinocitų atžvilgiu, tuo tarpu KAF jautrumas heparinui yra užkoduotas kažkur C-gali šerdies srityje, kuri buvo pakeista rFAF sekomis. Šis naujas į KAF panašus augimo faktorius gali turėti pranašumų klinikiniuose taikymuose, kur specifinis epitelinių ląstelių atžvilgiu augimo faktorius yra reikalingas, esant heparinui, visuotinai naudojamam anti-

koagulantui. Papildomi chimery tyrimai turētu taip pat padėti suprasti, kurios specifinės sritys C-galo šerdyje įneša skirtingus heparino poveikius jų biologiniams aktyvumams.

5

Aukščiau aprašytas išradimas pateiktas čia su kai kuriomis smulkmenomis, kad būtų galima aiškiau ir geriau jį suprasti. Akivaizdu, kad gali būti atliktos įvairios formų ir detalių kombinacijos, nukrypstančios nuo išradimo srities.

10

I-1 lentelė. Augimo faktoriaus gryninimas

Gryninimo žingsnis	Proteinas (mg)	Bendras aktyvumas (vienetai)*	Specifinis aktyvumas (vienetai/mg)
Kondicionuota terpė (10 ltr)	1.4×10^{3a}	2.5×10^4	1.8×10^1
Ultrafiltracija (retentatas)	1.3×10^{3a}	3.2×10^4	2.5×10^1
HSAC 0.6 MM NaCl nupylimas	0.73^b	1.6×10^4	2.2×10^4
TSK-G3000SW	8.4×10^{-3b}	2.7×10^3	3.2×10^5
C ₄ -ASSC	6.1×10^{-3b}	2.1×10^2	3.4×10^4

5 Regeneracijos paskaičiuotos su prielaida, kad visas mitogeninis aktyvumas pradinėje medžiagoje buvo izoliuoto faktoriaus dėka.

10 *Vienas aktyvumo vienetas yra apibrėžiamas kaip pusė maksimalios timidino įvedimo stimuliacijos, indukuotos TSK-išgrynintu faktoriumi BALB/MK bioanalizėje, kurioje maždaug 3 ng TSK/išgryninto faktoriaus stimuliuoja 1 aktyvumo vieneta.

15 ^aProteinas buvo įvertintas, naudojant Bradford reagentą iš BioRad (Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254).

^bProteinas buvo įvertintas, naudojant $A_{214}^{1\%} = 140$.

I-2 lentelė. Augimo faktoriaus specifiškumas ląstelei-taikiniui.

Augimo faktoriaus	Epitelinės			Fibroplastų		Endotelinės žmogaus po- odinė vena
	BALB/MK	BS/589	CCL208	MIN/3T3S		
KAF	500-1000	2-3	5-10	<1		<1
EAF	100-200	20-40	10-30	10-20		n.n.
TAF*	150-300	n.n.	n.n.	10-20		n.n.
rFAF*	300-500	2-3	5-10	50-70		5
bFAF	100-200	2-3	2-5	50-70		5

5 Maksimalus timidino įvedimo, stimuliuoto KAF ir kitų augimo faktorių lyginimas įvairiose ląstelėse yra išreikštas kaip kartoninis stimuliacijos padidėjimas, lyginant su fonine reikšme.

10 Šie duomenys yra keturių skirtingų eksperimentų rezultatas.

*Maksimali stimuliacija rFAF reikalavo heparino (sigma) buvimo, 20 mg/ml.

15

n.n.=nenustatyta.

II-1 lentelė. Heparino poveikis KAF mitogeniniam aktyvumui.

Augimo faktorius	BALB/MK	MIN/3T3		
	□	+	□	+
KAF	150	9.5	<1	<1
rFAF	106	259	10.4	68
bFAF	30	124	45.7	70

- 5 Ląstelės buvo išdėstytos mikrotitravimo lėkštelėse, kultivuotos iki susiliejo terpėje su serumu ir tada, prieš įdedant pavyzdį, patalpintos į terpę be serumo 24-72 valandoms. Mitogenezė buvo atliekama kaip aprašyta (žiūr. I Eksperimentinį skyrių aukščiau ir Rubin
- 10 (Rubin, J.S., Osada, H., Finch, P.W., Taylor, W.G., Rudikoff, S. and Aaronson, S.A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press)). Kur nurodyta, heparinas buvo įvedamas į kultūrinę terpę galutinės 20 µg/ml koncentracijos. Visų augimo faktorių koncentracija buvo
- 15 50 ng/ml. Rezultatai yra kartoninė ³H-timidino įvedimo į nurodytą analizės ląstelę stimuliacija, esant (+) arba nesant (-) heparino. Kiekviena reikšmė yra vidutinė reikšmė pagal du nepriklausomus eksperimentus, kuriuose kiekvienas taškas savo ruožtu reiškia dvigubos
- 20 analizės vidutinę reikšmę.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Iš esmės grynas žmogaus keratinocitų augimo faktoriaus (KAF) proteinas arba į KAF panašus proteinas, kurio molekulinė masė, nustatyta migracija NaDodSO₄/PAGE, yra tarp 16 ir 30 kDa ir specifinis aktyvumas yra mažiausiai apie 3.4×10^4 vienetų proteino miligramui, kur vienas aktyvumo vienetas yra apibrėžiamas kaip tas kiekis, kuris sukelia pusę maksimalios galimos DNR sintezės stimuliacijos BALB/MK keratinocitų ląstelėse, esant standartinėms analizės sąlygoms, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėto augimo faktoriaus mitogeninis aktyvumas stimuliuoja epitelinės prigimties ląsteles, bet ne fibroblastines ląsteles.
2. Proteinas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra glikozilintas.
3. Proteinas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi visą arba dalį aminorūgščių sekos, parodytos Fig.II-1B, o Fig.II-1B yra šios apibrėžties dalis.
4. Proteinas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis neturi signalinės peptidinės sekos, kaip parodyta Fig.II-1B.
5. Proteinas pagal 3 arba 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis nėra glikozilintas.
6. Chimerinis į KAF panašus proteinas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi vienoje polipeptidinėje molekulėje žmogaus KAF funkcines sritis ir bent vieną kitą fibroblastų augimo faktorių šeimos polipeptidą.

7. Chimerinis į KAF panašus proteinas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fibroblastų augimo faktoriaus polipeptidas yra rūgštinis fibroblastų augimo faktorius (rFAF).
- 5 8. Chimerinis į KAF panašus proteinas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad KAF funkcinė sritis yra apibrėžiama aminorūgščių liekanomis, atsakingomis už pirmenybinį KAF mitogeninį aktyvumą epitelinių ląstelių atžvilgiu ir rFAF funkcinė sritis yra apibrėžiama aminorūgščių liekanomis tos rFAF srities, kuri yra homologiška KAF sekai, atsakingai už KAF jautrumą heparinui.
- 10 9. Chimerinis į KAF panašus proteinas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta funkcinė KAF sritis yra apibrėžiama aminorūgščių liekanomis, turinčiomis 39 - 78 numerius Fig.II-1B, ir minėta rFAF funkcinė sritis yra apibrėžiama maždaug 140 aminorūgščių liekanomis, apimančiomis rFAF karboksilinį galą, pradedant 39 numerio liekana.
- 15 10. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji susideda iš chimerinio į KAF panašaus proteino pagal bet kurią iš 6 - 9 punktų ir priimtino farmacinio nešiklio.
- 20 11. Farmacinė kompozicija pagal 10 punktą, skirta būklių, reikalaujančių specifinės epitelinių ląstelių stimuliacijos, esant heparinui, gydymui.
- 30 12. Antikūnas, nukreiptas prieš visą arba dalį KAF arba į KAF panašaus proteino pagal 3 punktą.
- 35 13. Antikūnas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis neutralizuoja mitogeninį žmogaus KAF aktyvumą.

14. Antikūnas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad jis yra polikloninis.

5 15. Antikūnas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad jis yra monokloninis antikūnas.

10 16. DNR segmentas, koduojantis žmogaus keratinocitų
augimo faktoriaus (KAF) proteina arba į KAF panašų pro-
teina, arba minėto DNR segmento komplementari grandinė
minėto proteino molekulinei masei esant tarp 16 ir
30 kDa, kaip apibrėžta migracija NaDodSO₄/PAGE, ir jo
specifiškumui esant mažiausiai apie 3.4×10^4 vienetų
proteino miligramui, kur vienas aktyvumo vienetas yra
15 apibrėžiamas kaip kiekis, kuris sukelia pusę maksi-
malios galimos DNR sintezės stimuliacijos BALB/MK kera-
tinocito ląstelėse, esant standartinėms analizės sąly-
goms, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėto
augimo faktoriaus mitogeninis aktyvumas stimuliuoja
epitelinės prigimties ląsteles, bet ne fibroblastines
20 ląsteles.

25 17. DNR segmentas pagal 16 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad jis koduoja visą arba dalį
aminorūgščių sekos, apibrėžtos Fig.II-1B, arba komple-
mentari minėtam DNR segmentui grandinė.

30 18. DNR segmentas pagal 17 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad jis neturi nukleotidinės sekos,
kodujančios signalinę peptido seką, parodytą Fig.II-1B
arba komplementari minėtam DNR segmentui grandinė.

35 19. DNR segmentas, b e s i s k i r i a n t i s tuo,
kad jis apima visą arba dalį nukleotidinės sekos, nu-
rodytos Fig.II-1B, arba komplementari minėtam DNR seg-
mentui grandinė.

20. DNR segmentas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis koduoja chimerinį į KAF panašų proteina, kuris vienoje polipeptido molekulėje turi žmogaus KAF funkcines sritis ir bent vieną kitą fibroblastų augimo faktorių šeimos polipeptidą, arba komplementari minėtam DNR segmentui grandine.

21. DNR segmentas pagal 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fibroblastų augimo faktoriaus polipeptidas yra rūgštinis fibroblastų augimo faktorius, arba komplementari minėtam DNR segmentui grandinė.

22. DNR segmentas pagal 21 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad funkcinė KAF sritis yra apibrėžiama aminorūgščių liekanomis, atsakingomis už pirmenybinį KAF mitogeninį aktyvumą epitelinių ląstelių atžvilgiu, ir funkcinė rFAF sritis yra apibrėžiama aminorūgščių liekanomis tos rFAF srities, kuri yra homologiška KAF sekai, atsakingai už KAF jautrumą heparinui, arba komplementari minėtam DNR segmentui grandinė.

23. DNR segmentas pagal 21 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta KAF funkcinė sritis yra apibrėžiama aminorūgščių liekanomis, turinčiomis 39 - 78 numerius Fig.II-1B, ir minėta rFAF funkcinė sritis yra apibrėžiama maždaug 140 aminorūgščių liekanomis, apimančiomis rFAF karboksilinį galą, pradedant 39 numerio liekana, arba komplementari minėtam DNR segmentui grandinė.

24. Rekombinantinė DNR molekulė, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad susideda iš DNR segmento pagal bet kuri iš 16 - 23 punktų ir vektoriaus.

25. Rekombinantinė DNR molekulė pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas vektorius yra plazmidė, bakteriofago klonuojantis vektorius, plazmidinis DNR sekos nustatymo vektorius, bakterinių genų ekspresijos vektorius arba žinduolio geno ekspresijos vektorius.
26. Ląstelių kultūra, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji transformuota minėtos rekombinantinės DNR molekulės pagal bet kurią iš 16 - 23 punktų.
27. Ląstelių kultūra pagal 26 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtos ląstelės yra prokariotinės ląstelės arba eukariotinės ląstelės.
28. Į KAF panašaus proteino analizės tiriamajame pavyzdyje būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš tokių stadijų:
- I) keratinocitų auginimas kultūroje iki susiliejimo ir susiliejusios kultūros palaikymas terpėje be serumo;
 - ii) tiriamo pavyzdžio pridėjimas prie nurodytos susiliejusios keratinocitų kultūros;
 - iii) DNR sintezės stimuliacijos nustatymas minėtuose keratinocituose.
29. Būdas pagal 28 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad stadija iii atliekama, esant ir nesant KAF neutralizuojančio antiserumo.
30. Viso arba dalies žmogaus KAF proteino arba į KAF panašaus proteino gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš ląstelių pagal 27 punktą auginimo kultūrinėje terpėje tokiose sąlygose, kad

minėtas proteinas gaunamas ir išskiriamas iš minėtų ląstelių.

31. KAF arba į KAF panašaus proteino pagal bet kurią iš
5 1 - 9, 43 arba 44 punktų gavimo iš kultivuojamų ląste-
lių būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis
susideda iš tokių stadijų:

10 I) KAF produkujančių ląstelių auginimas kultūrinėje
terpėje tokiose sąlygose, kuriose KAF susidaro;

ii) minėtų ląstelių lizavimas, jei būtina, kad intra-
ląstelinis KAF būtų išskirtas į aplinkinę kultū-
rinę terpę;

15 iii) paprastai minėtos kultūrinės terpės toks koncent-
ravimas, kad susidarytų pirmas koncentratas;

20 iv) minėto koncentrato sąlytis su heparinu tokiose są-
lygose, kad KAF, esantis nurodytame pirmame kon-
centrate, sujungiamas su heparinu, po ko susidaro
heparino-KAF kompleksas;

25 v) minėto heparino-KAF komplekso atskyrimas nuo minė-
to koncentrato;

vi) minėto heparino-KAF komplekso apdorojimas tokiose
sąlygose, kad minėtas KAF atskiria nuo heparino,
taip kad susidaro laisvo KAF tirpalas;

30 vii) toks minėto tirpalo koncentravimas kad susidaro
antras koncentratas; ir

35 viii) toks nurodyto antrojo koncentrato frakcionavimas,
kad KAF yra atskiriamas nuo likusių komponentų.

- 5 32. KAF arba į KAF panašaus proteino gavimo iš kultivuotų ląstelių būdas pagal 30 arba 31 punktą, b e s i - s k i r i a n t i s tuo, kad minėtą KAF gaminančios ląstelės yra prokariotinės ląstelės arba eukariotinės ląstelės.
33. Būdas pagal 32 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtos ląstelės yra E.coli ląstelės.
- 10 34. KAF RNR matricos lygio nustatymo būdas, b e s i - s k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš tokių stadijų:
- 15 I) iRNR išskyrimas iš audinių arba ląstelių;
- ii) minėtos RNR renatūracija DNR zonu, koduojančiu žmogaus KAF; ir
- 20 iii) DNR:RNR hibrido, turinčio minėtą DNR zoną, kiekio nustatymas.
- 25 35. KAF proteino ekspresijos lygio nustatymo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad polipeptidai iš kūno skysčių arba audinių pavyzdžių paveikiami specifiniu peptidui, turinčiam žmogaus KAF arba į KAF panašų proteina, antikūnu pagal 12 punktą ir nustatomas proteino- antikūno sujungimo kiekis.
- 30 36. Reagentas tyrimams, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš viso arba dalies KAF proteino pagal bet kurį iš 1-9, 43 arba 44 punktų, ir paprastai fiziologiškai priimtino kultūros skysčio.
- 35 37. Epitelinių ląstelių augimo *in vitro* stimuliavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima reagento pagal bet kurį iš 30-33 punktų kiekio, pakankamo stimuliuoti epitelinių ląstelių augimą, pridėjimą.

38. Būdas pagal 37 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad minėtos ląstelės yra keratinocitai.
39. Šeimininko ląstelės, transformuotos rekombinantiniu
vektoriumi pagal 24 arba 25 punktą.
40. Ląstelės pagal 39 punktą, b e s i s k i r i a n -
č i o s tuo, kad minėtos ląstelės yra prokariotinės
ląstelės arba eukariotinės ląstelės.
41. Ląstelės pagal 40 punktą, b e s i s k i r i a n -
č i o s tuo, kad jos yra E.coli ląstelės, trans-
formuotos bakterinės ekspresijos vektoriumi.
42. Antikūnas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad jis veikia prieš peptidą NDMTPEQMATNVR.
43. Žmogaus KAF proteinas pagal Fig.II-1B, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad N-galas yra prie arba
apie cisteiną 32 ir C-galas yra prie arba apie treoni-
ną 194.
44. Neglikozilintas žmogaus KAF proteinas arba jo dalis
pagal 1 punktą, kurio molekulinė masė yra tarp 16 ir 22
kDa, kaip nustatyta migracija NaDodSO₄/PAGE ir kurio
specifinis aktyvumas yra mažiausiai apie 3.4×10^4 vie-
netų proteino miligramui, kur vienas aktyvumo vienetas
yra apibrėžiamas kaip toks kiekis, kuris sukelia pusę
maksimalios galimos DNR sintezės stimuliacijos BALB/MK
keratinocitų ląstelėse, esant standartinėms analizės
sąlygoms, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėto
augimo faktoriaus mitogeninis aktyvumas stimuliuoja
epitelinės prigimties ląsteles, bet ne fibroblastines
ląsteles.

45. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji sudaryta iš bent vieno antikūno pagal 12 punktą ir farmaciškai priimtino nešiklio.
- 5 46. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji susideda iš bent vieno proteino arba peptido pagal bet kurią iš 1-9, 43 ir 44 punktų ir farmaciškai priimtino nešiklio.
- 10 47. Farmacinė kompozicija pagal 46 punktą, skirta būklių, reikalaujančių specifinės epitelinių ląstelių stimuliacijos, gydymui.
- 15 48. Kompozicija pagal 47 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtų būklių gydymas apima žaizdų gydymą, įskaitant epiderminį pagreitinimą arba pagerinimą.
- 20 49. Farmacinė kompozicija pagal 45 punktą, skirta būklių, reikalaujančių specifinės epitelinių ląstelių stimuliacijos KAF inhibicijos, gydymui.

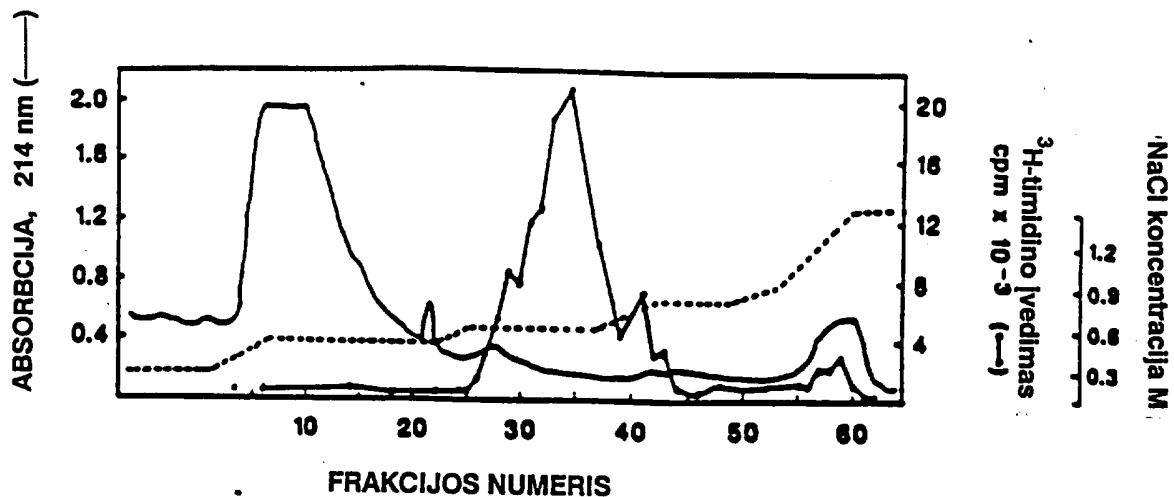


Fig. I-1. Kondicinuotos terpės iš M426 žmogaus embrioninių fibroblastų heparino-Sefarozės afininė chromatografija.

Maždaug 150 ml ultrafiltracijos retentato, gauto iš M426 kondicinuotos terpės, buvo pakrauta į heparino-Sefarozės kolonėlę (6 ml sluoksnio tūris) per 1 valandą. Perplovus kolonėlę 150 ml ekvilibracinio buferio, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.3 M NaCl, sulaikytas proteinas (<5% bendro proteino retentate) buvo išplautas eliuentu su modifikuotu tiesiniu NaCl koncentracijos didinimo gradientu. Frakcijos dydis buvo 3.8 ml ir srauto greitis gradientinės eliucijos metu buvo 108 ml/val. ³H-timidino įvedimo į BALB/MK ląsteles analizei 2 μl nurodytų frakcijų buvo perneštos į mikrotitravimo duobutes, kuriose tilpo galutinis 0.2 ml tūris.

Fig. I-2. žiūr. kitą psl.

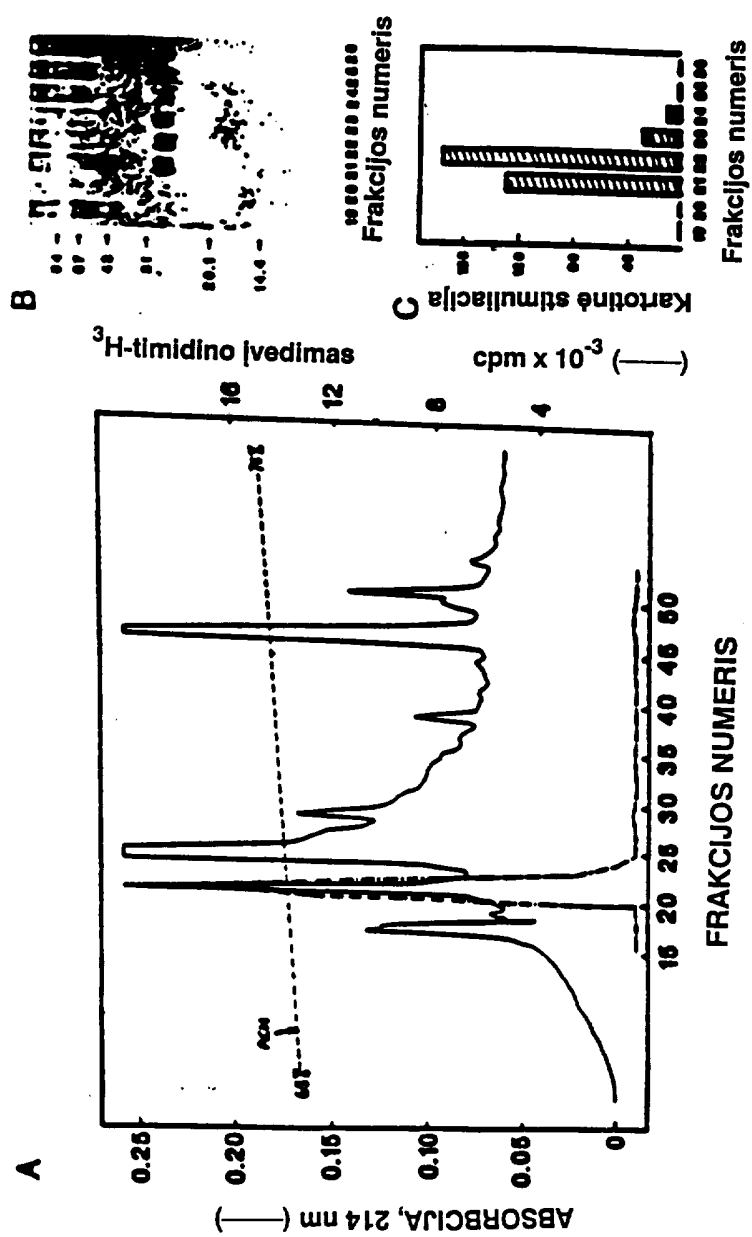


Fig. I-2. (A) BALB/MK mitogeninio aktyvumo atvirkščios fazės C₄ ASSC.

(A)

Aktyvios frakcijos, išplautos 0-6 M NaCl elientu iš heparino-Sefarozės, buvo apdorotos su Centricon-10 ir tuoj pat pakrautos į C₄ Vydac kolonėlę (4.6 x 250 mm), kuri buvo sulygsvarinta 0.1% trifluoracto rūgštyje/20% acetonitrile (ACN). Perplovus kolonėlę 4 ml sulygsvarinimo buferio, bandinys buvo perplautas elientu su modifikuotu didėjančių % ACN tiesiniu gradientu. Frakcijos dydis buvo 0.2 ml ir srauto greitis 0.5 ml/min. ³H-timidino įvedimo į BALB/MK ląsteles analizei alikvotos buvo nedelsiant atskiestos 10 kartų 50 µg/ml jaučio serumo albuminu/20 mM Tris-HCl, pH 7.5, ir atlikta analizė, esant galutiniam 200-kartiniam atskiedimui.

(B)

Atrinktų po C₄ chromatografijos frakcijų NaDodSO₄/PAGE analizė parodė nuotraukoje A. Kiekvienos frakcijos pusę išdžiovinus, vėl ištirpinus NaDodSO₄/2-merkaptetanolyje ir denatūravus pašildant, buvo atlikta elektroforezė 14% poliakrilamido gelyje, kuris paskui apdažytas sidabru. Kiekvienos molekulės masės vieta pažymėta rodykle (masė kDa).

(C)

DNR sintezė BALB/MK ląstelėse, veikiant frakcijoms, išanalizuotose nuotraukoje B. Aktyvumas yra išreikštas kaip kartotinis stimuliacijos padidėjimas, lyginant su fonine reikšme, kuri buvo 100 cpm.

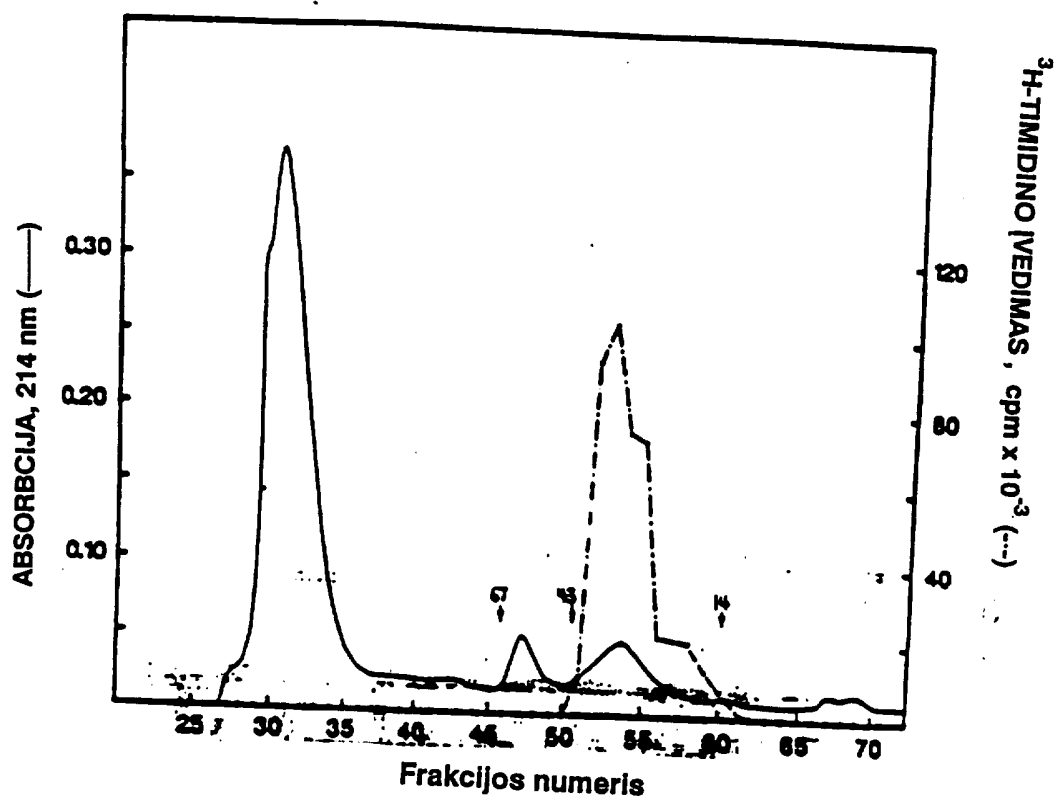


Fig. I-3. BALB. MK mitogeninio aktyvumo molekulinų sietų ASSC (TSK 3000SW) chromatografija.

Maždaug 50 μ l Centricon paveikto 0.6 M NaCl nupylimas iš ASSC buvo perneštas į LKB GlasPac TSK G3000SW kolonėlę (8 x 300 mm), prieš tai nulygsvarinus 20 mM Tris-HCl, pH 6.8/0.5 M NaCl, ir išplautas eluentu 0.2 ml frakcijų pavidalu, esant 0.4 ml/min. srauto greičiui. 2 μ l alikvotos buvo perneštos į mikrotitravimo duobutes, turinčias 0.2 ml galutinį tūrį, ³H-timidino įvedimo į BALB/MK ląsteles analizei. Molekulinės masės padėtis (masė kDa) eliacijos metu nurodyta rodyklėmis.

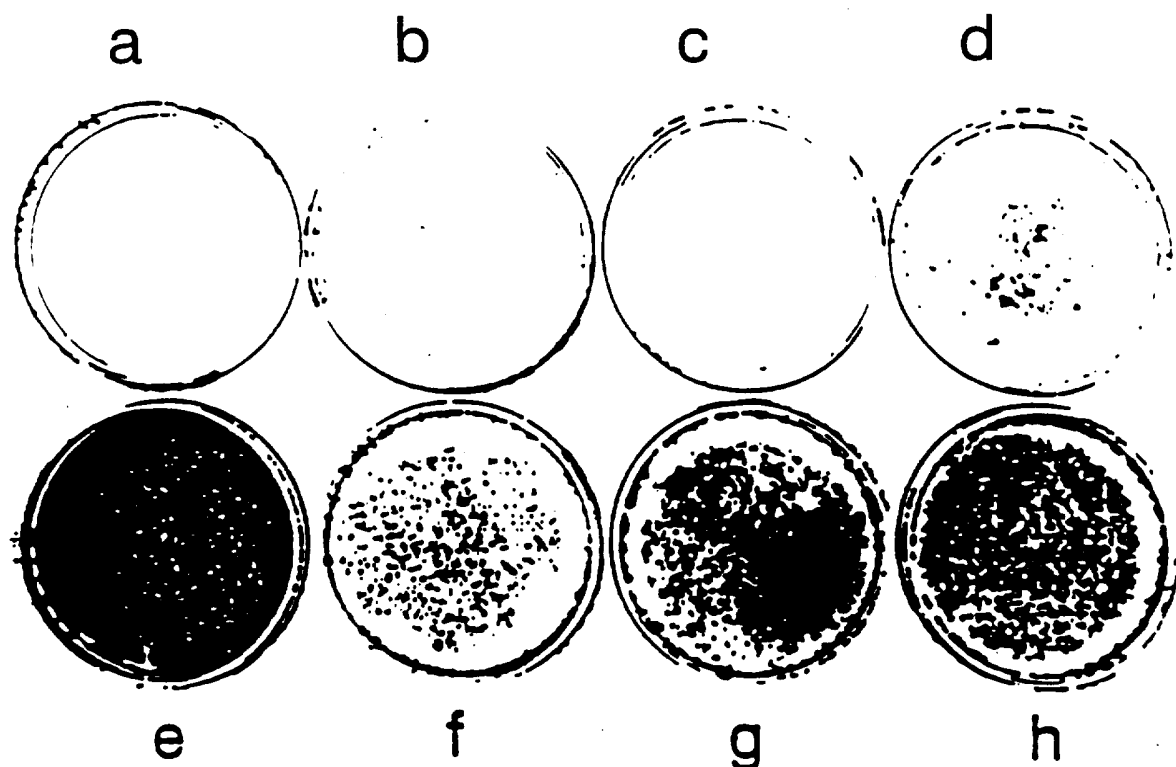


Fig. I-5. BALB/MK ląstelių palyginamasis augimas chemiškai apibrėžtoje terpėje, veikiant įvairioms augimo faktorių kombinacijoms.

Kultūros buvo išdėstytos 2.5×10^4 ląstelių į lėkštelę tankiu ant 35 mm Petri lėkštelių, iš anksto padengtų poli-D-lizinu/fibronektinu, 1 : 1 Eagle minimalios pagrindinės terpės ir Ham F12 terpės mišinyje, papildytam transferinu, Na_2SeO_3 , etanolaminu ir augimo faktoriais, nurodytais žemiau. Po 10 dienų lėkštelės buvo fiksuotos ir apdažytos Giemsa.

Išfiltravimas:

- a) augimo faktoriaus nėra;
- b) tik EAF;
- c) tik insulinas;
- d) tik KAF;
- e) EAF + insulinas.

Galutinės augimo faktorių koncentracijos buvo tokios: EAF, 20 ng/ml; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ir KAF, 40 ng/ml.

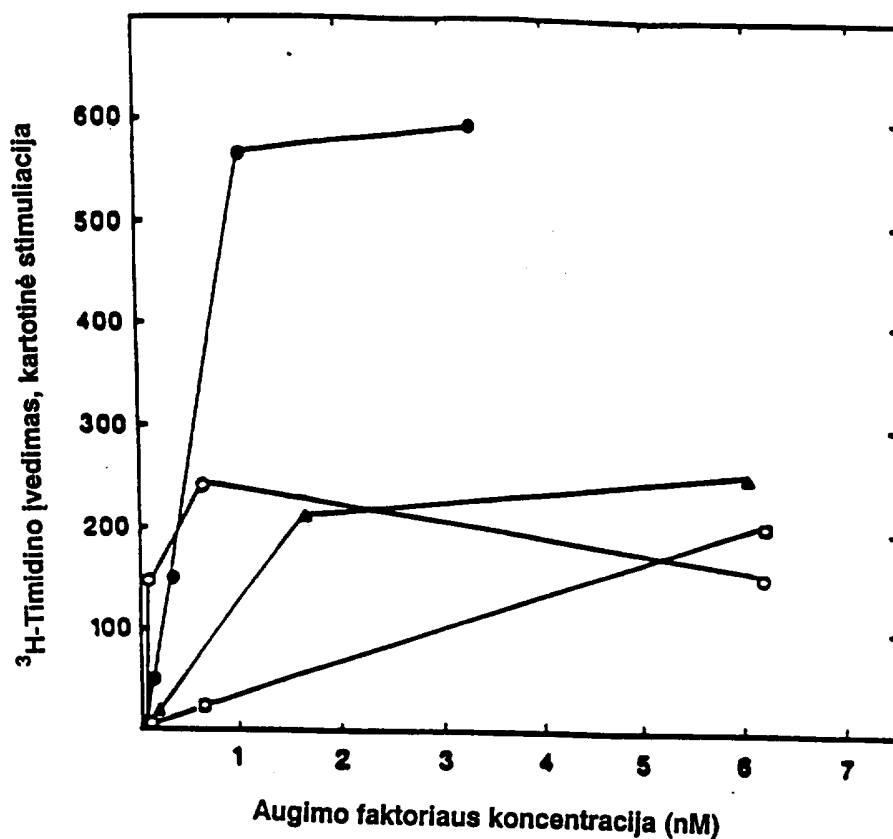


Fig. I-4. BALB/MK DNR sintezės, veikiant TSK-išgrynintam mitogenui ir kitiems augimo faktoriams, palyginimas.

^3H -timidino įvedimas į DNR, netirpią trichloracto rūgštyje, išreikštas kaip kartotinis stimuliacijos padidėjimas, lyginant su fonine reikšme, buvo matuojamas kaip nurodytų augimo faktorių koncentracijos funkcija. Foninė reikšmė, nesant pavyzdžių, buvo 150 cpm. Rezultatai - tai vidutinės reikšmės pagal du nepriklausomus eksperimentus. Nukrypimai nuo vidutinių reikšmių kiekviename eksperimente neviršija 10%. TSK-išgrynintas mitogenas, +—————+; EAF,

○ ————— ○; rFAF, □ ————— □; bFAF, ° ————— °.

Fig. II-1A. Žiūr. kita psl.

A.

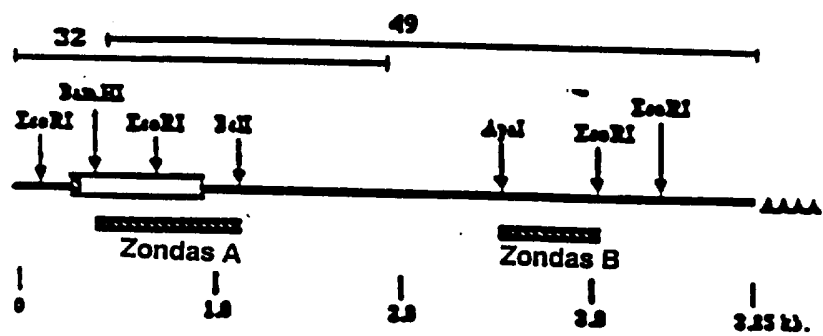


Fig. II-1B. Žiūr. kitą psl.

[illegible]

Fig. II-1C. Žiūr. kitą psl.

C.

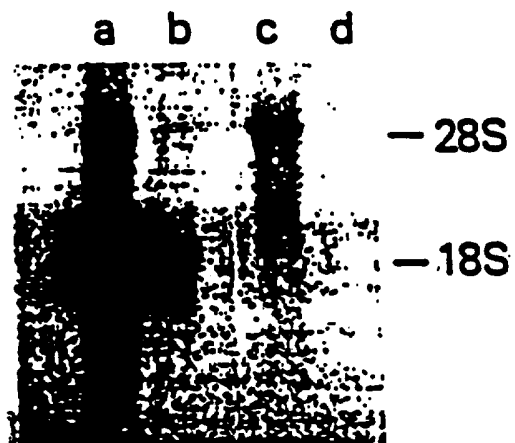


Fig. II-1. KAF kDNR nukleotidinė seka bei išvesta aminorūgščių seka ir KAF geno matricų identifikacija.

(A)

Žmogaus KAF kDNR klonų scheminis atvaizdavimas. Persidengiantys pCEV9 klonai 32 ir 49, naudoti sekos nustatyme, parodyti aukščiau visos struktūros diagramoje, kurioje netransliuotos sritys yra pavaizduotos linija ir koduojanti seka yra pavaizduota stačiakampiu. Štrichuota sritis reiškia signalinio peptido sekas, o neštrichuota sritis - subrendusį proteiną. Parinkti restrikciniai saitai yra nurodyti.

(B)

KAF kDNR nukleotidas ir prognozuotos aminorūgščių sekos. Nukleotidai yra sunumeruoti dešinėje; aminorūgštys sunumeruotos nuo pradžios iki galo. N-galo peptidinė seka, gauta iš išgryninto KAF, yra pabraukta. Hidrofobinė N-galo sritis yra pažymėta linija iš viršaus. Įvairaus poliadenilinio signalai, AATTAA ir AATACA, esantys prie 3' galo, apversti stačiakampiu.

(C)

KAF iRNR identifikacija Nothorn-blott analize. Takai a ir c, poli(A)-selektyvi M426 RNR; takas d, visa ląstelinė M426 RNR. Filtrai buvo hibridizuoti su ³²P-žymėtu 695 bp BamHI/BclI fragmentu iš 32 klonų (zondas A, Fig. II-1A), takai ir b, arba 541 bp ApaI/EcoRI fragmentas ir 49 klonų (zondas B, Fig. II-1A), takai c ir d.

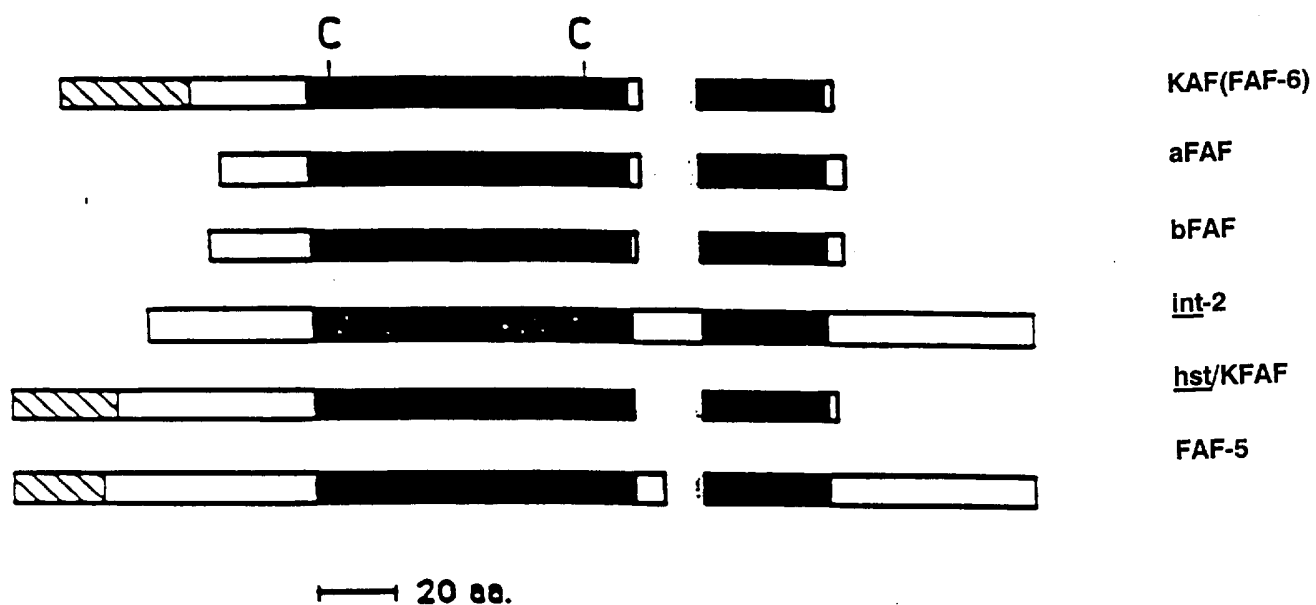


Fig. II-2. Topologinis giminingų KAF šeimos molekulių palyginimas.

Tamsiais stačiakampiais pažymėtos dvi proteino sritys, kurios pasižymi aukšta homologija. Užstričiuoti stačiakampiai rodo numatomas signalinio peptido sekas. Nurodytos dvi dviejų išlikusių cisteino liekanų vietos (C).

Fig. II-3. Žiūr. kitą psl.

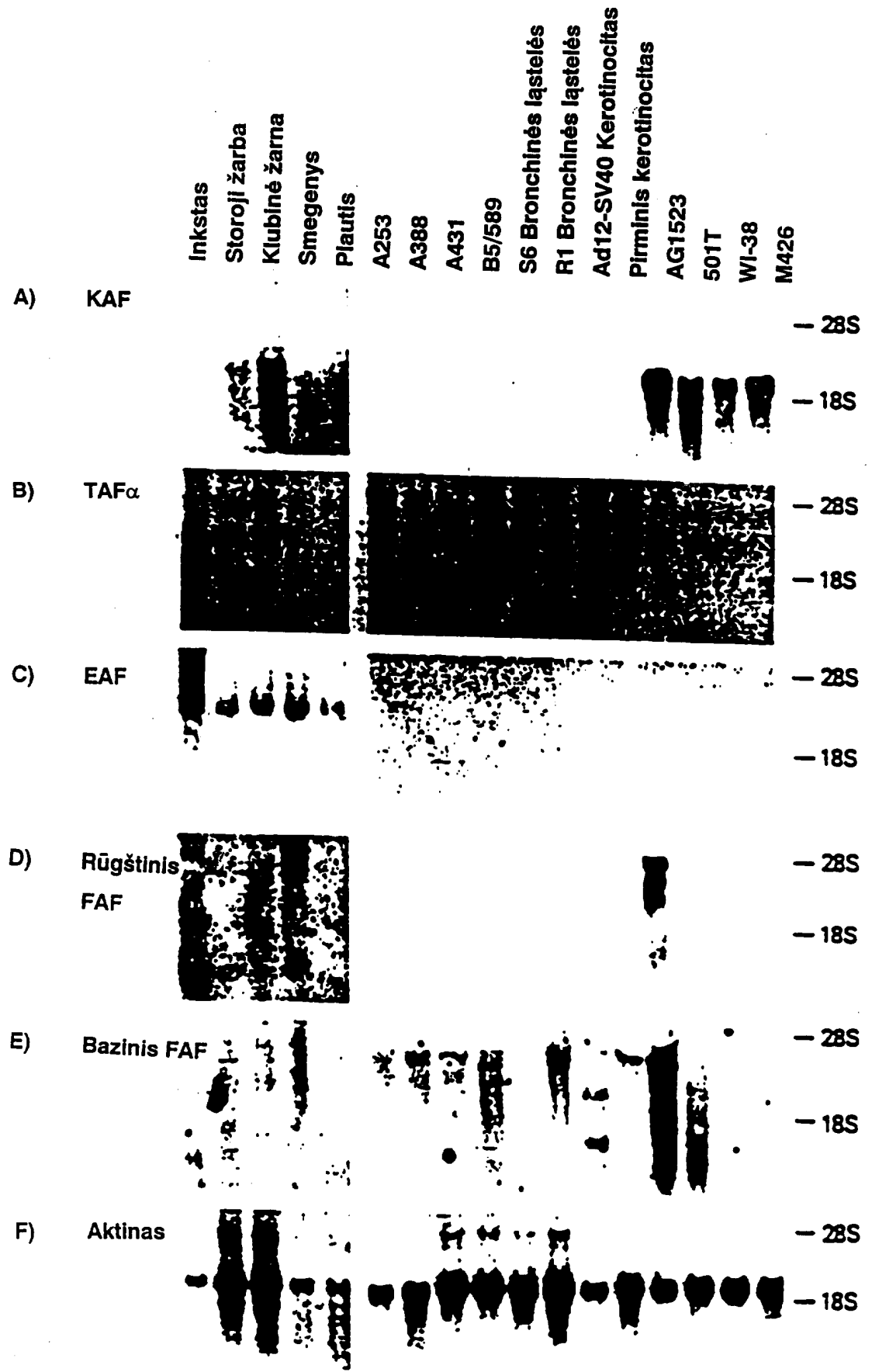


Fig. II-3. KAF iRNR Northern-blott analizė normaliose žmogaus ląstelių linijose bei audiniuose ir palyginimas su kitų augimo faktorių, pasižyminčių žinomu aktyvumu epitelinių ląstelių atžvilgiu, iRNR ekspresija.

Bendros ląstelinės RNR atskirtos cezio trifluoracetato gradientiniu centrifugavimu. 10 µg RNR buvo denatūruota, ir buvo atlikta elektroforezė 1% formaldehido geliuose. Po švelnios šarminės denatūracijos (50 mM NaOH 30 min.) RNR buvo pernešta ant nitroceliuliozinių filtrų, panaudojant 1 M amonio acetatą kaip konvektantą. Filtrai buvo hibridizuoti į ³²P-pažymėtą kDNR zondą, turintį 647 bp EcoRI fragmentą prie KAF koduojančios sekos 5' galo (A) arba panašius zondus iš kitų augimo faktorių DNR. Buvo naudoti tokie žmogaus ląstelių tipai:

žvyninės suragėjusios vėžio ląstelės (A253, A388 ir A431);

žinduolio epitelinės ląstelės (S6 ir R1);

keratinocitai, užkonservuoti Ad12-SV40;

pirminiai žmogaus keratinocitai;

naujagimio fibroblastai, AG1523;

suaugusio odos fibroblastai (501T);

embrioninio plaučio fibroblastai (WI-38 ir M426).